

ISSN 0016-6758

Том 59, Номер 7

Июль 2023



ГЕНЕТИКА



www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 59, номер 7, 2023

Обзорные и теоретические статьи

- Мутации митохондриальной ДНК при заболеваниях сердечно-сосудистой системы
В. А. Корепанов, Т. Ю. Реброва, Р. Е. Баталов, С. А. Афанасьев 735

Генетика растений

- Особенности переноса ДНК-маркеров генов дикого аллотетраплоидного вида картофеля *Solanum stoloniferum* в геном культурного картофеля в зависимости от их субгеномной принадлежности и применяемых схем интрогрессии
А. П. Ермишин, А. В. Левый, А. С. Агеева, Е. В. Воронкова, В. И. Лукша, О. Н. Гукасян, В. М. Жарич 741
- Гены флавиногенераторов монооксигеназ (*FMO*) чеснока *Allium sativum* L.: идентификация в геноме, характеристика и анализ экспрессии в ответ на заражение *Fusarium proliferatum*
О. К. Анисимова, А. В. Щенникова, Е. З. Кочиева, М. А. Филошин 755
- Филогеография видов дуба на Кавказе по результатам анализа хлоропластной ДНК
С. А. Семерикова, Х. У. Алиев, Н. В. Семериков, В. Л. Семериков 772

Генетика животных

- Изменчивость морфотипов добавочных хромосом и появление микро-В-хромосом в кариотипе *Apodemus peninsulae* (Rodentia) на Дальнем Востоке России
Г. В. Рослик, И. В. Картавцева 789
- Генетическое разнообразие речной выдры (*Lutra lutra*) европейской части России и стран Закавказья (по данным полиморфизма фрагмента мтДНК)
Н. А. Соколова, Н. П. Кораблев, П. Н. Кораблев, Х. А. Эрнандес-Бланко, Г. А. Калоян, А. А. Гёнджян, А. Г. Малхасян, П. А. Сорокин 804

Генетика человека

- Вариабельность гена титина у пациентов с гипертрофической и некомпактной кардиомиопатией
Н. Н. Чакова, Р. С. Шулинский, С. М. Комиссарова, Т. В. Долматович, С. С. Ниязова, О. Ч. Мазур, А. С. Иванова, О. Д. Левданский 813

Математические модели и методы

- Экспериментальная оценка возможности выявления кросс-контаминированных образцов ДНК на основе генетических данных
Н. В. Фелиз, К. С. Грамматикати, С. И. Митрофанов, П. А. Гребнев, К. Д. Конуреева, Е. Д. Маралова, М. В. Ерохина, Т. А. Шпакова, П. Г. Казакова, Ю. Н. Ахмерова, А. А. Мкртчян, Е. А. Снигирь, В. С. Юдин, А. А. Кескинов, С. М. Юдин, В. И. Скворцова 828

Краткие сообщения

- Поиск генов-кандидатов для мутаций, нарушающих образование синаптонемного комплекса, в секвенированном геноме ржи *Secale cereale*
Ю. В. Сопова, П. А. Зыкин, Т. В. Долматович, С. П. Соснихина 839
- Анализ аллелофонда полутонкорунных овец печорской популяции с помощью STR-маркеров
В. С. Матюков, Я. А. Жариков, Л. А. Канева 843
- Пилотное исследование по выявлению репертуаров гамма-цепи Т-клеточных рецепторов у пациентов с ювенильной формой шизофрении
М. Ю. Плотникова, А. Д. Патрикеев, А. Ю. Левченко, О. Ю. Федоренко, Т. В. Андреева, Е. И. Рогаев 850

Contents

Vol. 59, No. 7, 2023

Reviews and Theoretical Articles

- Mitochondrial DNA Mutations in Cardiovascular Diseases
V. A. Korepanov, T. Yu. Rebrova, R. E. Batalov, and S. A. Afanasiev 735

Plant Genetics

- Peculiarities of Transfer of DNA Markers of Wild Allotetraploid Potato Species *Solanum stoloniferum* to Backcross Progenies Depending on Their Subgenomic Location and Used Schemes of Introgression
A. P. Yermishin, A. V. Levy, A. S. Ageeva, E. V. Voronkova, V. I. Luksha, O. N. Gukasian, and V. M. Zharich 741
- Flavin-Containing Monooxygenases (*FMO*) Genes in Garlic *Allium sativum* L.: Genome-Wide Identification, Characterization, and Expression Analysis in Response to *Fusarium proliferatum*
O. K. Anisimova, A. V. Shchennikova, E. Z. Kochieva, and M. A. Filyushin 755
- Phylogeography of Oak Species in the Caucasus Based on the Results of Chloroplast DNA Analysis
S. A. Semerikova, Kh. U. Aliev, N. V. Semerikov, and V. L. Semerikov 772

Animal Genetics

- Variability of Supernumerary Chromosome Morphotypes and the Emergence of Micro-B-Chromosomes in the Karyotype of *Apodemus peninsulae* (Rodentia) in the Russian Far East
G. V. Roslik and I. V. Kartavtseva 789
- Mitochondrial Genetic Diversity of Eurasian Otter (*Lutra lutra*) from European Part of Russia and Transcaucasian Countries
N. A. Sokolova, N. P. Korablev, P. N. Korablev, J. A. Hernandez-Blanco, G. A. Kaloyan, A. A. Gyonjyan, A. H. Malkhasyan, and P. A. Sorokin 804

Human Genetics

- Genetic Variation in Titin in Patients with Hypertrophic and Non-Compact Cardiomyopathy
N. N. Chakova, R. S. Shulinski, S. M. Komissarova, T. V. Dolmatovich, S. S. Niyazova, O. Ch. Mazur, A. S. Ivanova, and A. D. Liaudanski 813

Mathematical Models and Methods

- Experimental Evaluation of the Possibility to Detect Cross-Contaminated DNA Samples Based on Genetic Data
N. V. Feliz, K. S. Grammatikati, S. I. Mitrofanov, P. A. Grebnev, K. D. Konureeva, E. D. Maralova, M. V. Erokhina, T. A. Shpakova, P. G. Kazakova, Yu. N. Akhmerova, A. A. Mkrtchian, E. A. Snigir, V. S. Yudin, A. A. Keskinov, S. M. Yudin, and V. I. Skvortsova 828

Short Communications

- Search for Candidate Genes for Mutations Disrupting Synaptonemal Complex Formation in the Sequenced Genome of Rye *Secale cereale*
J. V. Sopova, P. A. Zykin, T. V. Dolmatovich, and S. P. Sosnikhina 839
- Analysis of the Allelofund of Semi-Fine-Wool Sheep of the Pechora Population Using STR Markers
V. S. Matyukov, Ya. A. Zharikov, and L. A. Kaneva 843
- Pilot Study to Detect the Repertoires of T-Cell Receptor Gamma Chains in Patients with Juvenile Schizophrenia
M. Yu. Plotnikova, A. D. Patrikeev, A. Yu. Levchenko, O. Yu. Fedorenko, T. V. Andreeva, and E. I. Rogaev 850

МУТАЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

© 2023 г. В. А. Корепанов¹, *, Т. Ю. Реброва¹, Р. Е. Баталов¹, С. А. Афанасьев¹

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

*e-mail: vakorep41811@gmail.com

Поступила в редакцию 09.01.2023 г.

После доработки 26.02.2023 г.

Принята к публикации 28.02.2023 г.

Ранняя профилактика развития и своевременная диагностика болезней сердечно-сосудистой системы являются одними из основных задач современной кардиологии. Один из перспективных подходов направлен на выявление ассоциаций между носительством мутаций митохондриальной ДНК и развитием сердечно-сосудистых заболеваний. Митохондрии являются единственным источником аккумуляции энергии в кардиомиоцитах, поэтому нарушение их работы, обусловленное мутациями мтДНК, непосредственно отражается на биоэнергетике и работе клеток миокарда. Целью данного обзора стало описание современных достижений в исследовании ассоциаций мутантных мтДНК с развитием различных патологий сердечно-сосудистой системы.

Ключевые слова: митохондрии, мутации, митохондриальная ДНК, сердечно-сосудистые заболевания.

DOI: 10.31857/S0016675823070068, **EDN:** QKNDWL

СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ И МИТОХОНДРИИ

Болезни сердечно-сосудистой системы (ССС) являются одной из ведущих причин инвалидизации и смертности населения по всему миру [1–3]. Изучение причин развития данных патологий является обязательным этапом, способствующим более полному пониманию фундаментальных механизмов формирования сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ).

Сердце представляет собой один из наиболее энергозависимых органов, основная функция которого – обеспечение циркуляции крови по сосудистой системе. Поддержание кровотока обеспечивается за счет ритмичного сокращения камер сердца в процессе электро-механического сопряжения миокарда. Последнее представляет собой цепь последовательных событий от проведения электрических импульсов, обеспечивающееся возбудимостью клеток, до совершения ими механической работы (мышечное сокращение). Все эти процессы обеспечиваются работой ионных каналов (Na^+/K^+ АТФ-аза, Ca^{2+} транспортирующие каналы и насосы) и контрактильных белков (актомиозиновые комплексы) [4], тесно связанной с достаточным и своевременным производством энергии в форме молекул АТФ. Для поддержания энергетического обеспечения кардиомиоцитов в последних имеется большое число

специальных органелл – митохондрий, основной функцией которых является производство АТФ [5]. По широкому спектру причин работа митохондрий может быть нарушена, что проявляется в снижении их биоэнергетической функции и негативно сказывается на клетках рабочего миокарда. На фоне энергетической недостаточности кардиомиоцитов с возрастом происходит срыв их адаптационных резервов, что выражается в развитии того или иного сердечно-сосудистого заболевания [6].

Особенности митохондрии как органеллы

Митохондрии представляют собой субклеточные структуры, в кардиомиоцитах они могут занимать до 30–35% объема клетки [6]. Основными отличительными особенностями митохондрий являются: наличие двойной мембраны, инвагинации внутренней части которой формируют кристы с ферментами дыхательной цепи переноса электронов; присутствие ферментативных систем окисления, поддерживающих биоэнергетику клетки; наличие собственной митохондриальной ДНК. Митохондриальный геном представляет собой кольцевую двухцепочечную молекулу ДНК (мтДНК), состоящую из 16594 пар оснований, кодирующих 13 белков комплексов дыхательной цепи, 22 молекулы иРНК и 2 молекулы тРНК [7]. Ввиду близкого расположения к внут-

ренней мембране митохондрий, отсутствия гистоновых белков и системы репарации, мтДНК является менее защищенной, чем ядерная ДНК, что выражается в большей вероятности ее повреждения свободными радикалами и накоплением ошибок в процессе репликации, проявляющихся в виде полиморфизмов и мутаций. Такие изменения мтДНК могут оказаться нейтральными в отношении синтезируемых молекул (вырожденность генетического кода), положительными (протективный эффект в развитии патологии) и негативными (нарушение пространственной укладки белков электрон-транспортной цепи).

МУТАЦИИ мтДНК И ИХ СВЯЗЬ С РАЗВИТИЕМ ПАТОЛОГИИ СЕРДЦА

Первые предположения о связи патологии митохондрий и развитии отдельных заболеваний выдвигались еще в середине прошлого века [8]. Однако установить причину развития митохондриальных нарушений удалось только после открытия [9] и расшифровки митохондриального генома, а также обнаружения его мутаций в 80-е гг. XX в. [10]. С тех пор число новых выявленных мутаций мтДНК постоянно растет, как и увеличивается объем информации об их взаимосвязи с отдельными патологиями органов и систем, в том числе и ССЗ [11].

Мутации мтДНК, ассоциированные с функциональными изменениями миокарда

Одной из самых распространенных выявленных мутаций мтДНК является замена аденина на гуанин в позиции 3243 (m.3243A>G) гена *MT-TL1*, кодирующего тРНК аминокислоты лейцина (tRNA^{Leu}(UUR)) [12]. Ассоциированный с данной мутацией синдром MELAS (Mitochondrial Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke like episodes) имеет широкий спектр клинических проявлений, среди которых миопатия, в том числе гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП). В ряде случаев при гистохимическом анализе биопсийного материала у пациентов с носительством мутации 3243A>G выявляется сниженная активность фермента цитохром С-оксидазы в кардиомиоцитах, играющего ключевую роль в передаче электронов в ЭТЦ [13]. Также установлено, что существует четкая взаимосвязь между развитием ГКМП и носительством мутации m.5178C>A ($p = 0.038$). В то же время у пациентов с мутацией m.12315G>A в гене тРНК^{лей} и m.3336T>C в гене NADH-дегидрогеназы ГКМП не была выявлена ($p = 0.017$ и $p = 0.014$ соответственно), что, по мнению ученых, является протективным фактором в формировании ГКМП [14].

По данным работы Y. Qi с соавт. для пациентов, имеющих дилатационную кардиомиопатию

(ДКМП), характерно носительство таких мутаций как *MT-TL1* 3302A>G, *MT-TI* 4295A>G, *MT-TM* 4435A>G, *MT-TA* 5655T>C, *MT-TH* 12201T>C, *MT-TE* 14692A>G и *MT-TT* 15927G>A [15]. Авторами установлено, что при таком изменении митохондриального генома происходит снижение энергообеспечения клетки, но при этом повышается утечка электронов из электрон-транспортной цепи, что увеличивает образование АФК (активных форм кислорода) в клетке. По мнению исследователей, этот факт может являться ключевым моментом в формировании ДКМП.

В исследовании A. Brambilla с соавт. обнаружено, что помимо ГКМП у трети детей с врожденными митохондриальными мутациями в генах *MT-TL1*, *MT-ND1-3*, 5, 6, *MT-CTB1*, *MT-CO1*, *MT-TC* поражение сердечно-сосудистой системы в форме ДКМП приводит к сердечной недостаточности, легочной гипертензии, жизнеугрожающим аритмиям и атриовентрикулярным блокадам. У детей с наследственными мутациями в мтДНК с изначально выявленными нарушениями в сердечно-сосудистой системе, в сравнении с детьми без выявленных нарушений со стороны ССС, но с врожденными митохондриальными мутациями, прогноз выживаемости гораздо хуже (22 против 45%). При этом средний возраст наступления смерти среди указанных групп достоверно не различается [16].

Мутации мтДНК, ассоциированные с нарушением проводимости и развитием внезапной сердечной смерти

Нарушения сердечного ритма и проводимости являются одними из ключевых факторов риска смерти больных с ССЗ [17]. Одним из неблагоприятных исходов данных нарушений является внезапная сердечная смерть, насчитывающая до 20% в структуре смертности населения в мире [18]. На основании имеющихся данных можно говорить о все чаще выявляемой взаимосвязи носительства отдельных гаплогрупп (вариант мтДНК с наличием полиморфизма, сформировавшийся в результате расселения людей и передачи полиморфизма по материнской линии потомкам) и вероятности наступления внезапной сердечной смерти (ВСС). Так, для жителей Финляндии показано, что у молодых людей (возраст 20–55 лет) смертность от неишемической внезапной сердечной смерти ассоциирована с носительством субгаплогруппы H1 (OR = 1.76 (95%CI, 1.02–3.04, $p = 0.043$)). Это, как считают авторы исследования, может являться косвенным предиктором развития ВСС. При этом во всей выборке пациентов ($n = 91$) доля супергаплогруппы HV, в которую входит и гаплогруппа H1, составила 56.4% [19]. В работе F. Khatami с соавт. было продемонстрировано, что носительство мутаций T14687C в умеренно консерватив-

ной области акцепторного стебля тРНК^{Глу} и T10463C в высоко консервативной области Т-петли в тРНК^{Арг} может ухудшать состояние пациентов с синдромом удлиненного интервала QT (long QT syndrome – LQTS). Исследователями продемонстрировано возраст-зависимое линейное удлинение данного интервала у больных ($r = 0.73$, $p < 0.05$), что в перспективе приводит к развитию ВСС [20].

Показано, что у носителей выше упомянутой мутации m.3243A>G на ЭКГ могут выявляться признаки преждевременного возбуждения желудочков с укорочением интервалов PR (синдром Вольфа–Паркинсона–Уайта), а также синдром слабости синусового узла и АВ-блокада I степени [21]. Все перечисленные нарушения проводимости могут приводить к возникновению жизнеугрожающих аритмий с исходом в форме ВСС.

Мутации мтДНК, ассоциированные с другими заболеваниями ССС

Помимо вышеописанных патологий сердца весьма распространенным заболеванием у населения развитых стран является атеросклероз, представляющий собой одну из основных причин развития ишемической болезни сердца [22]. В результате исследования Y. Nishigaki с соавт. было установлено, что у японских женщин-носительниц полиморфизма mt663, определяющего гаплогруппу А, риск развития атеротромботических событий повышен, что делает их группой риска развития ИБС [23]. В противоположность этому выявлено, что у японских мужчин-носителей полиморфных вариантов mt5147 и mt16519 (определяют N9b гаплогруппу) развитие инфаркта миокарда не происходит. Показано, что это связано со сниженной продукцией супероксидных анион-радикалов кислорода [24]. В публикации М.А. Сазоновой и соавт. говорится, что носительство мутации m.12315G>A в гене тРНК^{лей} ассоциировано с развитием атеросклеротических бляшек в каротидной области ($p = 0.001$), в то время как мутация m.13513G>A несет антиатерогенный эффект ($p = 0.05$) [25].

По результатам исследования С. Liu с соавт., направленного на изучение связи повышенного артериального давления и глюкозы крови с мутациями мтДНК, проведенного на 32 секвенированных митохондриальных геномах пациентов с высоким АД (один из факторов риска инфаркта миокарда и сердечной недостаточности), установлено, что полиморфизм 5913G>A (Asp4Asn) гена цитохром С-оксидазы *MT-CO1* ассоциирован с более высокими уровнями кровяного давления и концентрации глюкозы в крови. Так, артериальное давление у носителей данной мутации было на 7 мм рт. ст. выше, а уровень глюкозы кро-

ви натошак выше на 17 мг/дл в сравнении с практически здоровым контролем ($p = 0.05$ и $p = 0.009$ соответственно) за период 25-летнего наблюдения [26].

В работе Z. Jia с соавт., посвященной описанию взаимосвязи мутации 15927G>A мтДНК и развития ИБС, установлено, что носительство данной мутации ведет к нарушению структуры и физико-химических свойств треониновой тРНК. Данный факт был продемонстрирован на линии цисбридных клеток. В митохондриях последних наблюдалось снижение экспрессии субъединиц белков электронтранспортной цепи (ЭТЦ): ND1, ND3, ND4, ND5, CO2, CYTB, ATP6, ATP8, снижение их трансмембранного потенциала (примерно до 50% в сравнении с контролем), как основной движущей силы синтеза АТФ, что в целом негативно сказывалось биоэнергетике органелл. Также у носителей данной мутации отмечается повышенная генерация АФК за счет усиленной утечки электронов из ЭТЦ, сниженный потенциал ангиогенеза и большая склонность клеток к апоптозу [27].

Крупные делеции в митохондриальной ДНК – например такие как m.8470-13446del в промежутке между генами *ATPase8* и *ND5* (в 1/3 случаев), от нуклеотида 6341 до 13993 (делеция в 7652 пары оснований), могут приводить к развитию синдрома Кернса–Сайера (митохондриальная миопатия). По имеющейся информации носительство указанных мутаций ведет к нарушению работы ЭТЦ, что критически отражается на тканях с высоким энергетическим запросом (сердце, мозг, скелетная мускулатура). Клинически это проявляется в слабости мышц глаза (офтальмоплегия, птоз), мозжечковой атаксии и прочими неврологическими нарушениями а также мышечной слабостью и прогрессирующей кардиомиопатией [28, 29].

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРОФИЛАКТИКИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Профилактика и лечение митохондриальных заболеваний представляет собой на сегодняшний день трудную задачу. Одной из особенностей развития ССЗ, ассоциированных с митохондриальной дисфункцией, является наличие множества мутаций в различных генах, в отличие от “классических” митохондриальных заболеваний, затрагивающих единичные гены, что снижает потенциальный эффект таргетной генной терапии в таких случаях.

Чаще всего прибегают к вторичной профилактике уже выявленных патологий, представляющей собой назначение и прием энерготропных препаратов (L-карнитин, сукцинат, коэнзим Q10, креатин) [30, 31]. В рамках первичной профилактики (предотвращение передачи митохондриального

заболевания потомству) существует широкий спектр потенциально перспективных методов, доказавших свою эффективность в условиях лаборатории на животных моделях [32–35]. В то же время только две страны официально допустили их применение на людях в рамках клинических испытаний – Великобритания (2015 г.) и Австралия (2022 г.). Речь идет о методах заместительной митохондриальной терапии (перенос зародышевых пузырьков, перенос пронуклеусов, перенос веретена деления, перенос полярных телец и т.д.) в результате которых формируется зародыш “от трех родителей”, несущий ядерную ДНК от матери-носительницы митохондриального заболевания, а митохондрии от здоровой женщины-донора. Одним из главных недостатков данных методов является вероятность переноса митохондрий и мтДНК от больной матери [36], что увеличивает риск развития патологии либо у зачатого ребенка, либо в дальнейшем у его потомков из-за развития эффекта гетероплазии. Также не исключается возможность негативных последствий из-за несовместимости белков, кодируемых ядерной ДНК матери, и митохондрий донора, что может привести к недостаточности работы электрон-транспортной цепи в течение жизни [37].

Подводя итог, можно сказать, что митохондриальная терапия только начинает развиваться. Однако уже сейчас можно говорить о потенциальной пользе, которую принесет внедрение в клиническую практику технологий, позволяющих проводить коррекцию митохондриальных заболеваний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенного анализа современных литературных данных можно сделать вывод, что полиморфизмы и мутации в мтДНК могут оказывать различное влияние на развитие сердечно-сосудистой патологии. Носительство отдельных полиморфизмов может быть связано с развитием сердечно-сосудистой патологии, тогда как отсутствие или наличие других является протективным фактором развития отдельных нозологий. В рамках современной клинической практики анализ на носительство мутаций митохондриальной ДНК можно применить для раннего выявления и/или предсказания развития заболевания сердца. Особенно это актуально для лиц с высоким риском нарушений ритма сердца, так как их развитие может приводить к наступлению внезапной сердечной смерти. Чем раньше будет установлена предрасположенность к возникновению перебоев в сердечном ритме, тем более полный комплекс мероприятий смогут осуществить кардиологи по сохранению и поддержанию нормального функционирования миокарда пациента. В связи с этим оценка митохондриального генома

на наличие мутаций может стать важным фактором, который необходимо будет учитывать при постановке диагноза.

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. Townsend N., Kazakiewicz D., Lucy Wright F. et al. Epidemiology of cardiovascular disease in Europe // *Nat. Rev. Cardiol.* 2022. № 19. P. 133–143. <https://doi.org/10.1038/s41569-021-00607-3>
2. Hinton W., McGovern A., Coyle R. et al. Incidence and prevalence of cardiovascular disease in English primary care: A cross-sectional and follow-up study of the Royal College of General Practitioners (RCGP) Research and Surveillance Centre (RSC) // *BMJ Open.* 2018. № 8. e020282. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-020282>
3. Бойцов С.А., Дранкина О.М., Шляхто Е.В. и др. Исследование ЭССЕ-РФ (Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний и их факторов риска в регионах Российской Федерации). Десять лет спустя // *Кардиоваскулярная терапия и профилактика.* 2021. Т. 20. № 5. С. 3007.
4. Hanft L.M., Emtner C.A., McDonald K.S. Cardiac myofibrillar contractile properties during the progression from hypertension to decompensated heart failure // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2017. V. 313. № 1. P. H103–H113. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00069.2017>
5. Cao Y.P., Zheng M. Mitochondrial dynamics and inter-mitochondrial communication in the heart // *Arch. Biochem. Biophys.* 2019. V. 663. P. 214–219. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.01.017>
6. Иванов К.П. Современные медицинские проблемы энергообмена у человека // *Вестник РАМН.* 2013. № 6. С. 56–59.
7. Alston C.L., Rocha M.C., Lax N.Z. et al. The genetics and pathology of mitochondrial disease // *J. Pathol.* 2017. V. 241. № 2. P. 236–250. <https://doi.org/10.1002/path.4809>
8. Luft R., Ikkos D., Palmieri G. et al. A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: A correlated clinical, biochemical, and morphological study // *J. Clin. Invest.* 1962. V. 41. № 9. P. 1776–804. <https://doi.org/10.1172/JCI104637>
9. Nass M.M., Nass S. Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. I. Fixation and electron staining reactions // *J. Cell. Biol.* 1963. V. 19. № 3. P. 593–611. <https://doi.org/10.1083/jcb.19.3.593>
10. Wallace D.C., Singh G., Lott M.T. et al. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber’s hereditary optic neuropathy // *Science.* 1988. V. 242. № 4884. P. 1427–

1430.
<https://doi.org/10.1126/science.3201231>
11. *Понасенко А.В., Цепочкина А.В., Тхоренко Б.А. и др.* Изменчивость митохондриальной ДНК в развитии атеросклероза и инфаркта миокарда (обзор литературы) // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2018. Т. 7. № 4S. С. 75–85.
 12. *Mancuso M., Orsucci D., Angelini C. et al.* The m.3243A>G mitochondrial DNA mutation and related phenotypes. A matter of gender? // *J. Neurol.* 2014. V. 261. № 3. P. 504–510.
<https://doi.org/10.1007/s00415-013-7225-3>
 13. *Ng Y.S., Grady J.P., Lax N.Z. et al.* Sudden adult death syndrome in m.3243A>G-related mitochondrial disease: An unrecognized clinical entity in young, asymptomatic adults // *Eur. Heart. J.* 2016. V. 37. № 32. P. 2552–2559.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv306>
 14. *Sazonova M.A., Sinyov V.V., Ryzhkova A.I. et al.* MtDNA mutations linked with left ventricular hypertrophy // *Vessel Plus.* 2019. № 3. P. 5.
<https://doi.org/10.20517/2574-1209.2018.56>
 15. *Qi Y., Wu Z., Bai Y. et al.* Screening for mitochondrial tRNA mutations in 318 patients with dilated cardiomyopathy // *Hum. Hered.* 2022. V. 87. P. 1–11.
<https://doi.org/10.1159/000521615>
 16. *Brambilla A., Olivotto I., Favilli S. et al.* Impact of cardiovascular involvement on the clinical course of paediatric mitochondrial disorders // *Orphanet J. Rare Dis.* 2020. V. 15. № 1. P. 196.
<https://doi.org/10.1186/s13023-020-01466-w>
 17. *Гетман С.И.* Распространенность нарушений ритма сердца и проводимости среди обратившихся за медицинской помощью к кардиологу на амбулаторном этапе // *Кардиология.* 2018. Т. 58. № 6. С. 20–28.
 18. *Deo R., Albert C.M.* Epidemiology and genetics of sudden cardiac death // *Circulation.* 2012. V. 125. P. 620–637.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.023838>
 19. *Kytövuori L., Juntila J., Huikuri H. et al.* Mitochondrial DNA variation in sudden cardiac death: A population-based study // *Int. J. Legal. Med.* 2020. V. 134. № 1. P. 39–44.
<https://doi.org/10.1007/s00414-019-02091-4>
 20. *Khatami F., Mehdi Heidari M., Houshmand M.* The mitochondrial DNA mutations associated with cardiac arrhythmia investigated in an LQTS family // *Iran J. Basic. Med. Sci.* 2014. V. 17. № 9. P. 656–661.
 21. *Niedermayr K., Pözl G., Scholl-Bürgi S. et al.* Mitochondrial DNA mutation “m.3243A>G”. Heterogeneous clinical picture for cardiologists (“m.3243A>G”: A phenotypic chameleon) // *Congenit. Heart. Dis.* 2018. V. 13. № 5. P. 671–677.
<https://doi.org/10.1111/chd.12634>
 22. *Li X., Liu M., Sun R. et al.* Atherosclerotic coronary artery disease: The accuracy of measures to diagnose pre-clinical atherosclerosis // *Exp. Theor. Med.* 2016. V. 12. № 5. P. 2899–2902.
<https://doi.org/10.3892/etm.2016.3710>
 23. *Nishigaki Y., Yamada Y., Fuku N. et al.* Mitochondrial haplogroup A is a genetic risk factor for atherothrombotic cerebral infarction in Japanese females // *Mitochondrion.* 2007. V. 7. № 1–2. P. 72–79.
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2006.11.002>
 24. *Nishigaki Y., Yamada Y., Fuku N. et al.* Mitochondrial haplogroup N9b is protective against myocardial infarction in Japanese males // *Hum. Genet.* 2007. V. 120. № 6. P. 827–836.
<https://doi.org/10.1007/s00439-006-0269-z>
 25. *Sazonova M.A., Sinyov V.V., Ryzhkova A.I. et al.* Role of mitochondrial genome mutations in pathogenesis of carotid atherosclerosis // *Oxid. Med. Cell Longev.* 2017. V. 2017. P. 6934394.
<https://doi.org/10.1155/2017/6934394>
 26. *Liu C., Yang Q., Hwang S.J. et al.* Association of genetic variation in the mitochondrial genome with blood pressure and metabolic traits // *Hypertension.* 2012. V. 60. № 4. P. 949–956.
<https://doi.org/10.1161/Hypertensionaha.112.196519>
 27. *Jia Z., Zhang Y., Li Q. et al.* A coronary artery disease-associated tRNAThr mutation altered mitochondrial function, apoptosis and angiogenesis // *Nucl. Ac. Res.* 2019. V. 47. № 4. P. 2056–2074.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky1241>
 28. *Zhu Q., Chen C., Yao J.* Kearns–Sayre syndrome with a novel large-scale deletion: A case report // *BMC Ophthalmol.* 2022. V. 22. № 1. P. 35.
<https://doi.org/10.1186/s12886-021-02224-7>
 29. *Khambatta S., Nguyen D.L., Beckman T.J., Wittich C.M.* Kearns–Sayre syndrome: A case series of 35 adults and children // *Int. J. Gen. Med.* 2014. № 7. P. 325–332.
<https://doi.org/10.2147/IJGM.S65560>
 30. *Mancuso M., Orsucci D., Filosto M. et al.* Drugs and mitochondrial diseases: 40 queries and answers // *Expert. Opin. Pharmacother.* 2012. V. 13. № 4. P. 527–543.
 31. *Komura K., Nakano K., Ishigaki K. et al.* Creatine monohydrate therapy in a Leigh syndrome patient with A8344G mutation // *Pediatr. Int.* 2006. V. 48. № 4. P. 409–412.
 32. *Kaur S., Nagpal M.* Recent advancement in human reproduction three-parent babies: A technique to neutralize mitochondrial disease load—A boon or a bane for society? // *Curry Trends Diagn. Treat.* 2017. V. 1. № 2. P. 100–103.
 33. *Labarta E., de Los Santos M.J., Escrivá M.J. et al.* Mitochondria as a tool for oocyte rejuvenation // *Fertil. Steril.* 2019. V. 111. № 2. P. 219–226.
 34. *Neupane J., Vandewoestyne M., Ghimire S. et al.* Assessment of nuclear transfer techniques to prevent the transmission of heritable mitochondrial disorders without compromising embryonic development competence in mice // *Mitochondrion.* 2014. V. 18. P. 27–33.
 35. *Wolf D.P., Mitalipov N., Mitalipov S.* Mitochondrial replacement therapy in reproductive medicine // *Trends Mol. Med.* 2015. V. 21. № 2. P. 68–76.
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.12.001>
 36. *Hyslop L.A., Blakeley P., Craven L. et al.* Towards clinical application of pronuclear transfer to prevent mitochondrial DNA disease // *Nature.* 2016. V. 534. P. 383–386.
 37. *Zaidi A.A., Makova K.D.* Investigating mitonuclear interactions in human admixed populations // *Nat. Ecol. Evol.* 2019. № 3. P. 213–222.
<https://doi.org/10.1038/s41559-018-0766-1>

Mitochondrial DNA Mutations in Cardiovascular Diseases

V. A. Korepanov^{a, *}, T. Yu. Rebrova^a, R. E. Batalov^a, and S. A. Afanasiev^a

^a*Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Science, Tomsk, 634012 Russia*

**e-mail: vakorep41811@gmail.com*

Early prevention of development and timely diagnosis of diseases of the cardiovascular system are some of the main tasks of modern cardiology. One of the promising approaches is aimed at identifying associations between the carriage of mitochondrial DNA (mtDNA) mutations and the development of cardiovascular diseases. Mitochondria are the only source of energy accumulation in cardiomyocytes; therefore, failure of their functioning, caused by mtDNA mutations, directly affects the bioenergetics and the work of myocardial cells. The purpose of this review is to describe the current achievements in the study of associations of mutant mtDNA with the development of various pathologies of the cardiovascular system.

Keywords: mitochondria, mutations, mitochondrial DNA, cardiovascular diseases.

ОСОБЕННОСТИ ПЕРЕНОСА ДНК-МАРКЕРОВ ГЕНОВ ДИКОГО АЛЛОТЕТРАПЛОИДНОГО ВИДА КАРТОФЕЛЯ *Solanum stoloniferum* В ГЕНОМ КУЛЬТУРНОГО КАРТОФЕЛЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИХ СУБГЕНОМНОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ И ПРИМЕНЯЕМЫХ СХЕМ ИНТРОГРЕССИИ

© 2023 г. А. П. Ермишин¹*, А. В. Левый¹, А. С. Агеева¹, Е. В. Воронкова¹, В. И. Лукша¹, О. Н. Гукасян¹, В. М. Жарич¹

¹Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, 220072 Беларусь

*e-mail: ermishin@igc.by

Поступила в редакцию 26.12.2022 г.

После доработки 21.02.2023 г.

Принята к публикации 06.03.2023 г.

Одним из факторов, затрудняющих использование дикого аллотетраплоидного вида картофеля *Solanum stoloniferum* Schldt et Bouchet (геном AABB) в селекции, являются геномные различия с *S. tuberosum* L. (AAAA). Однако в литературе практически отсутствует информация о том, какие ценные гены этого дикого вида расположены на субгеноме В и каким образом происходит их перенос в геном *S. tuberosum*. Целью настоящей работы было определение субгеномной принадлежности ряда генов *S. stoloniferum* с использованием оригинального подхода, основанного на различиях в наследовании маркеров этих генов первым поколением беккрасса (BC₁) культурным картофелем удвоенных триплоидных гибридов (6х, AAAABB) в зависимости от их расположения на субгеноме А или В, анализ наследования маркеров в BC₂ и BC₃ в рамках четырех схем интрогрессии и маркер-опосредованной селекции по гену устойчивости к фитофторозу *Rpi-sto1*. Маркеры генов устойчивости к фитофторозу *Rpi-sto1*, *R3b*, *R2*, генов устойчивости к PVY *Ry_{sto}*, *Ry_{adg}*, гена устойчивости к раку картофеля *Sen2* локализованы на субгеноме В, а гена *Ry_{chc}* устойчивости к PVY – на субгеноме А *S. stoloniferum*. Наблюдала спорадическое появление гибридов BC₁ без маркеров, что можно объяснить редкими случаями рекомбинации гомеологичных хромосом субгеномов А и В. Наследование маркеров в BC₂ (близкое к 1 : 1) в целом соответствовало ожидаемому при случайной передаче потомству BC₂ отдельных хромосом субгенома В. В BC₃ отобрано несколько перспективных для селекции гибридов с маркером гена *Rpi-sto1*.

Ключевые слова: беккросс, ДНК-маркеры, геномные различия, интрогрессия генов, межвидовая гибридизация, картофель.

DOI: 10.31857/S0016675823070056, **EDN:** QKFUVA

Дикий аллотетраплоидный вид картофеля *Solanum stoloniferum* рассматривают как ценный источник генов устойчивости к болезням и вредителям для использования в селекции. Многие образцы *S. stoloniferum* известны как носители генов крайней устойчивости к вирусам PVY, PVX, PVA и PVV [1, 2], а также устойчивости к фитофторозу, бактериальным болезням и вредителям картофеля [3–5]. Некоторые ценные гены *S. stoloniferum*, прежде всего устойчивости к PVY, нашли применение в селекции и представлены в значительном количестве сортов картофеля. Однако используется лишь ограниченный генофонд этого вида, что связано с наличием ряда репродуктивных барьеров, затрудняющих его интрогрессию в геном культурного картофеля. Основная проблема –

принадлежность *S. stoloniferum* и *S. tuberosum* к разным группам скрещиваемости в отношении постзиготного барьера, обусловленного так называемым балансовым числом эндосперма (EBN): первый относят к 4х (2EBN), а второй – к 4х (4EBN) видам [6]. Кроме того, гибридизация сопряжена с односторонней несовместимостью, при которой гибридные семена удается получить только при использовании дикого вида в качестве материнской формы [7], а полученные гибриды характеризуются мужской стерильностью, связанной с цитоплазмой дикого вида [4, 8–10].

Отдельного внимания заслуживают геномные различия между *S. stoloniferum* (геномный состав AABB) и *S. tuberosum* (AAAA), которые могут затруднять интрогрессию ценных генов, локализо-

ванных на субгеноме В, из-за нарушений в мейозе межвидовых гибридов [11]. Геном В, характерный для североамериканских диплоидных и аллополиплоидных видов картофеля, имеет относительно высокую степень гомологии с геномом А. G. Marks [12] наблюдал у гаплоида аллотетраплоидного дикого вида *S. polytrichon* Rydb. (= *S. stoloniferum*; геномный состав АВ) высокую частоту формирования бивалентов в мейозе (в среднем 7, 9, максимум 12). Образование в мейозе преимущественно бивалентов отмечено у гибридов, полученных при опылении пыльцой *S. stoloniferum* (ААВВ) тетраплоидных гибридов (АААА) между 6х *S. demissum* Lindl. и диплоидными (АА) южноамериканскими видами *S. gibberulosum* Juz. et Buk. (= *S. chacoense* Bitt.), *S. simplicifolium* Bitt. (= *S. microdontum* Bitt.), *S. goniocalyx* Juz. et Buk. (= *S. stenotomum* Juz. et Buk.) [13].

Аналогичную картину описал Prohach (цит. по [14]) у гибридов между 4х *S. acaule* Bitt. (сегментарный аллотетраплоид ААА^аА^а) и 4х *S. stoloniferum* (ААВВ): было выявлено в среднем 1.9 унивалентов и 19 бивалентов, а также 0.9 тривалентов и 1.4 квадριвалентов на клетку. В клетках межвидовых гибридов сродство гомеологичных хромосом геномов А и В было выше, чем у полигаплоидов [14]. J. Hermesen, M. Ramanna [15] наблюдали нормальное образование бивалентов у диплоидных межвидовых гибридов *S. verrucosum* Schtdl × × *S. bulbocastanum* Dun. (геномный состав АВ). Аналогичная картина отмечена также у тетраплоидных трехвидовых гибридов 6х (*S. acaule* × *S. bulbocastanum*)² × 2х *S. phureja* Juz. et Buk. [16, 17]. Недавно Т. Gavrilenko et al. [18] и S. Kikuchi et al. [19], используя метод геномной гибридизации *in situ* (GISH), продемонстрировали возможность интрогрессии генетического материала генома В полиплоидных межвидовых гибридов в геном А гибридов их беккрасса культурным картофелем.

Однако считается общепринятым, что гомеологичная рекомбинация с участием хромосом геномов А и В может быть неэффективной в случае наличия в клетках межвидовых гибридов парных хромосом, принадлежащих одному из геномов [11, 20–22]. Такая ситуация складывается, например, при вовлечении в селекцию диких аллотетраплоидных видов картофеля, в том числе *S. stoloniferum*. Большинство методов преодоления их нескрещиваемости с культурным картофелем основано на получении полиплоидных (чаще всего 6х) межвидовых гибридов, которые затем включают в программы беккрасса на культурный картофель [21, 23–28].

Первый беккросс сортами *S. tuberosum* полиплоидных межвидовых гибридов приводит к формированию потомства с непарными хромосомами субгенома В. Поскольку нормальный си-написис ожидается только между гомологичными

хромосомами субгенома А таких гибридов, возникает вопрос о возможности интрогрессии генетического материала субгенома В в геном А культурного картофеля. В литературе отсутствует информация о специально проведенной субгеномной локализации ценных генов *S. stoloniferum*, а также характере их переноса в геном культурного картофеля в зависимости от принадлежности к субгеномам А или В.

Ранее нами реализован ряд новых схем вовлечения в селекцию образца *S. stoloniferum* PI205522 с целью маркер-опосредованной интрогрессии в геном культурного картофеля гена устойчивости к фитофторозу широкого спектра действия *Rpi-sto1* (гомолога известного гена *Rpi-blb1* из *S. bulbocastanum*) и получения мужски фертильных межвидовых гибридов [29, 30]. Помимо гена *Rpi-sto1*, у этого образца выявлены ДНК-маркеры других генов устойчивости к фитофторозу (*R2*, *R3b*), а также к PVY (*Ry_{adg}*, *Ry_{sto}*, *Ry_{chc}*), раку картофеля (*Sen2*) ([31], настоящая статья).

В настоящей работе представлены результаты использования оригинального подхода для определения субгеномной принадлежности ряда генов *S. stoloniferum* PI 205522, основанного на различиях в наследовании маркеров этих генов первым поколением беккрасса (BC₁) на культурный картофель гексаплоидных межвидовых гибридов (удвоенных триплоидных гибридов, ААААВВ) в зависимости от их расположения на субгеноме А или В. Исходные триплоидные гибриды IGC15/118.3 и IGC15/114.52 (ААВ) были получены в результате гибридизации между *S. stoloniferum* (sto) PI205522 (ААВВ) и диплоидными линиями *S. tuberosum* (tub) (АА). Один из субгеномов А межвидовых гибридов происходит от дикого вида, а второй – от культурного картофеля. Эти межвидовые гибриды, как и sto PI 205522, несут семь маркеров генов устойчивости. Они могут быть расположены на субгеноме А, субгеноме В или на обоих субгеномах дикого вида.

Митотически удвоенные 6х клоны имеют две копии субгенома В sto PI 205522 и в случае расположения генов на субгеноме В они будут представлены у межвидовых гибридов в гомозиготном состоянии. Следует ожидать отсутствие расщепления по таким генам в BC₁ при преимущественном спаривании гомологичных хромосом в мейозе межвидовых гибридов. Аналогичная картина расщепления очевидно имеет место, если гены расположены на обоих субгеномах дикого вида.

Митотически удвоенные 6х клоны также имеют две копии субгенома А sto PI 205522 и в случае расположения генов на субгеноме А они будут представлены у межвидовых гибридов в гомозиготном состоянии. Кроме того, они имеют две копии генома А культурного картофеля, которые, как правило, не имеют маркеров изучаемых ге-

нов. Таким образом, их можно рассматривать в качестве аналогов дуплексов автотетраплоидного картофеля (4х сортов с двумя копиями генов), которые демонстрируют расщепление 5 : 1 (3.67 : 1 в случае хроматидного расщепления) в потомстве от скрещивания с нуллиплексными тестерами [32–34].

Целью настоящего исследования было:

– изучить наследование названных генов в первом поколении беккросса (BC₁) на культурный картофель *S. tuberosum* 6х межвидовых гибридов, что позволит определить возможную их принадлежность к субгенам А или В *S. stoloniferum* PI 205522;

– изучить наследование этих генов в последующих поколениях беккросса (BC₂ и BC₃) в рамках четырех схем интрогрессии с использованием маркер-опосредованной селекции по гену *Rpi-sto1*, отбора по полевой устойчивости к фитофторозу и по признакам культурного картофеля.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал

В качестве материала использовали *S. stoloniferum* PI 205522 (семена получены из генбанка по картофелю США NRSP-6), диплоидную S_vS_v-линию IGC08/168.4 (F₂ 2х *S. tuberosum* × *S. verrucosum*) [35], фертильную диплоидную линию IGC10/1.21 [36], межвидовые гибриды и их потомство от беккроссирования на сорта культурного картофеля, полученное в результате реализации четырех схем интрогрессии (рис. 1).

Схемы интрогрессии

Первая и вторая схемы – традиционные. Они включают получение триплоидных межвидовых гибридов, митотическое удвоение их хромосом и беккроссирование полученных гексаплоидных клонов на сорта картофеля. В первой схеме использован 6х клон IGC15/118.3.C6.2016, полученный с помощью обработки колхицином 3х гибрида 2х S_vS_v-линия *S. tuberosum* × *S. stoloniferum* PI 205522 [31]. Для получения BC₁ использован сорт Katahdin (в качестве опылителя), BC₂ – сорт Quarta (в качестве опылителя), BC₃ – сорта Свитанок Киевский, Уладар (в качестве опылителя), Янка (в качестве материнской формы). Для целей генетического анализа наследования в BC₁ комплекса маркеров генов устойчивости к болезням, выявленных у sto PI 205522, также использовали гибриды IGC19/334.n между IGC15/118.3.C6.2016 и 2х линией tub IGC17n8, формирующей фертильную нередуцированную пыльцу (у нее отсутствует шесть из восьми маркеров, выявленных у PI 205522). Во второй схеме использован 6х меж-

видовой гибрид IGC15/114.52.C5.2017, полученный в результате митотического удвоения хромосом 3х гибрида sto PI 205522 × 2х линия tub IGC10/1.21. В анализ включено потомство от его скрещивания с линией IGC17n8 – гибриды IGC19/330.n.

Третья и четвертая схемы интрогрессии имеют целью повысить вероятность гомеологичной рекомбинации субгеномов А и В [30]. В схеме 3 использован 4х межвидовой гибрид IGC16/36.1, полученный в результате опыления 6х клон IGC15/118.3.C6.2016 2х линией tub IGC10/1.21 (BC₁, предполагаемая геномная формула – AAAB). В настоящей статье представлены результаты анализа потомства от скрещивания IGC16/36.1 (в качестве материнской формы) с тестерной линией IGC17n8 – гибриды IGC19/305.n. В схеме 4 использован в качестве материнской формы 5х гибрид IGC15/103.53 (предполагаемый геномный состав AAABB), выделенный среди гибридов sto PI 205522 × 2х tub IGC10/1.21. Очевидно, его образование связано с формированием 2n яйцеклеток sto PI 205522. Для получения BC₁ (гибрид IGC17/192.4) был использован сорт Quarta (в качестве опылителя), BC₂ – сорта Quarta и Labadia (гибриды соответственно IGC19/323.n и IGC19/335.n).

Поскольку один из субгеномов А у IGC15/103.53 в непарном состоянии, предполагалось, что у гибридов BC₁ будет представлена только часть его хромосом. Это должно ускорить процесс достижения тетраплоидного уровня беккроссированием межвидового гибрида с культурным картофелем и повысить вероятность интрогрессии в геном культурного картофеля генетического материала субгена В за счет представленности у пентаплоидного гибрида не одного (как в традиционной схеме интрогрессии), а двух копий субгена В. Еще более перспективным для повышения вероятности гомеологичной рекомбинации представлялся гибрид IGC16/36.1 (4х, AAAB), имеющий в непарном состоянии два полных набора хромосом субгеномов А и В. Следует отметить, что скрещивания гибридов IGC16/36.1 и IGC15/103.53 с культурным картофелем в значительной степени затруднены (очевидно из-за различий их EBN) [30].

ДНК-маркеры

С целью изучения наследования генов устойчивости sto PI 205522 в рамках четырех схем интрогрессии проводили детекцию ряда маркеров у исходных межвидовых гибридов и их гибридов беккросса на культурный картофель. Это маркеры RYSC3₃₂₁, Yes3-3A₃₄₁ и RY364-14₂₉₈ генов устойчивости к PVY *Ry_{adg}*, *Ry_{sto}* и *Ry_{chc}* соответственно, маркеры 517/1519₇₅₀, R2₂₅₀₀ и R3b₃₇₈ генов устойчивости к фитофторозу (патоген *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) *Rpi-sto1*, R2 и R3b соот-

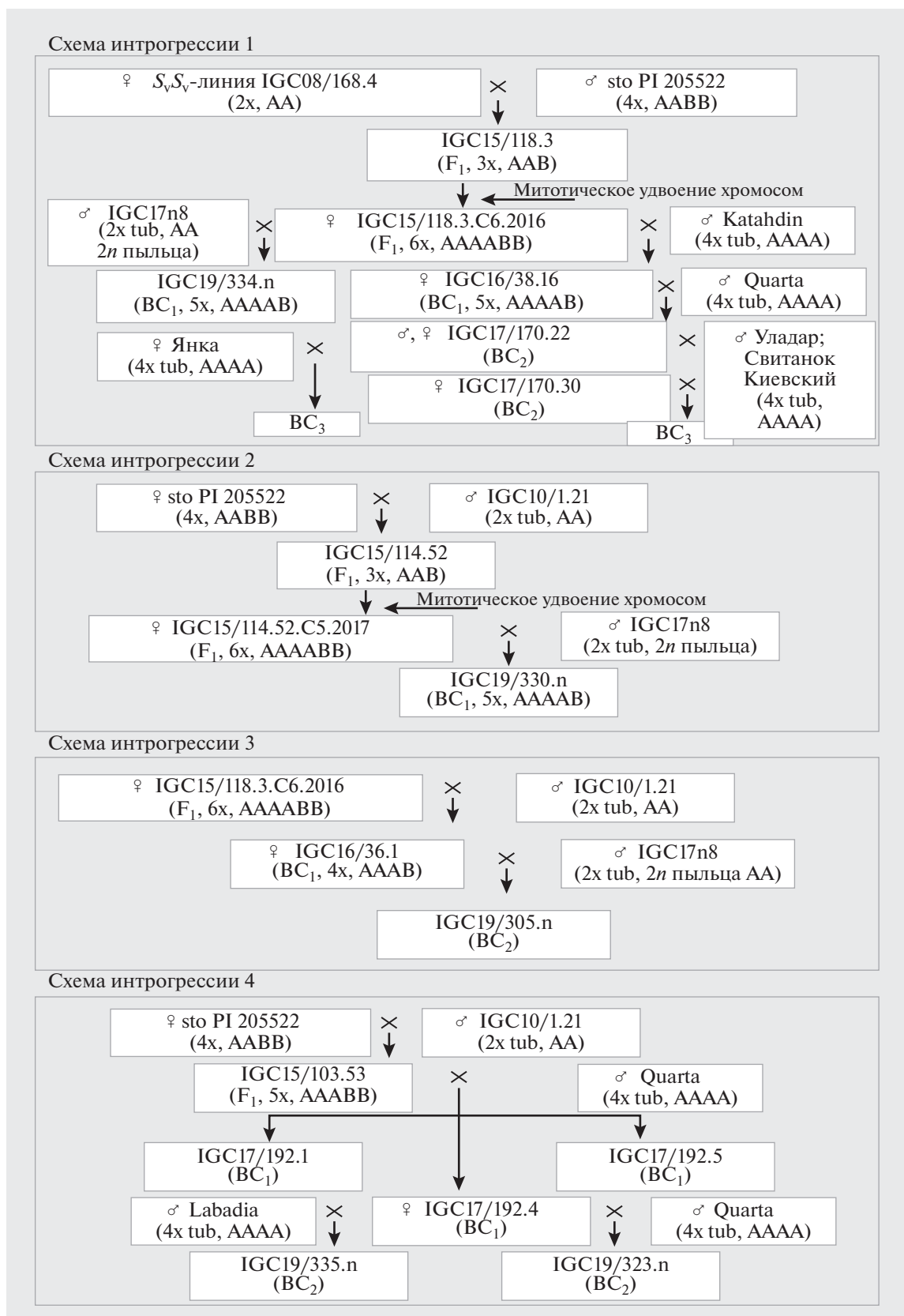


Рис. 1. Схемы интрогрессии генетического материала *S. stoloniferum* PI 205522 в геном культурного картофеля: традиционные (1 и 2) и имеющие целью повышение вероятности рекомбинации гомеологичных хромосом субгеномов А и В (3 и 4). В скобках приведены предполагаемые плоидность и геномный состав.

Таблица 1. ДНК-маркеры, использованные в работе

Маркер	Ген	Хромосома	Праймеры (5'–3')	Ссылка
SolB ₄₆₉	<i>FLint2</i>	III	F: ATAАСТСТCAAATACGAAACAAA R: СТСТGТААСТGTCCTAGATTCTGTGT	[42]
RYSC ₃₂₁	<i>Ry_{adg}</i>	XI	F: ATACACTCATCTAAATTTGATGG R: AGGATATACGGCATCATTTTTCCGA	[37]
Yes3-3A ₃₄₁	<i>Ry_{sto}</i>	XII	F: TAACTCAAGCGGAATAACCC R: AATTCACCTGTTTACATGCTTCTTGTG	[9]
RY364-14 ₂₉₈	<i>Ry_{chc}</i>	IX	F: СТАТТААAGTCTGGTACTAGGACG R: GGCTATATGTTCAATGAATTCATGCTAA	[38]
517/1519 ₇₅₀	<i>Rpi-sto1</i>	VIII	F: CATTCCAACTAGCCATCTTGG R: TATTCAGATCGAAAGTAC	[3]
R2 ₂₅₀₀	<i>R2</i>	IV	F: ATGGCTGATGCCTTTCTATCATTTGC R: TCACAACATATAATTCGGCTTC	[39]
R3b ₃₇₈	<i>R3b</i>	XI	F: GTCGATGAATGCTATGTTTCTCGAGA R: ACCAGTTTCTTGCAATTCAGATTG	[40]
5450_3 ₁₀₄₆	<i>Sen2</i>	XI	F: ATGATCATTGATGGCAGCAG R: GGGCATTTTGGAGCATAAAA	[41]
TG689	<i>H1</i>	V	F: TAAAАСТСТTGGTTATAGCCTAT R: AATAGAATGTGTTGTTTCACCAA	[43]

ветственно, маркер 5450_3₁₀₄₆ гена *Sen2* устойчивости к раку картофеля (патоген *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc.) табл. 1) [3, 9, 37–41]. Дополнительно детектировали SCAR-маркер SolB₄₆₉, специфический для субгенома В аллотетраплоидных видов картофеля серии *Longipedicillata* Buk. Этот маркер разработан на основе полиморфных последовательностей интрона 2 FLORICAULA/LEAFY (Flint2), который широко используется таксономистами растений [42]. У гибридов BC₃ также детектировали маркер TG689₁₄₁ гена *H1* устойчивости к нематоду *Globodera rostochiensis* (Woll.) Behr. [43].

Выделение и очистку ДНК осуществляли из листьев растений с использованием наборов “DNA purification Kit” производства фирмы “Thermo Scientific” (ЕС) в соответствии с рекомендациями производителя и нашими модификациями. Синтез праймеров осуществлен в ОДО “Праймтех” (Минск, Беларусь). ПЦР проводили на термоциклере “GenAmp System 2700”, “PE Applied Biosystems” (США). Применялся унифицированный состав реакционной смеси: препарат тотальной ДНК в конечном объеме 100 нг, праймеры – 0.4 мкМ, dNTP – 0.25 мМ, MgCl₂ – 2.5 мМ, Taq-ДНК-полимераза – 1 ед. Для детекции маркера R2₂₅₀₀ использовали 2.0 ед. *Pfu* ДНК-полимеразы и реакционную смесь, рекомендованную ООО АртБиоТех (Минск, Беларусь), которая включала 100 нг ДНК, 0.4 мкМ праймеров, 2.0 мМ dNTP, 2.0 мМ MgCl₂.

Программы ПЦР для амплификации соответствующих маркеров были следующие:

SolB₄₆₉ – один цикл 3 мин при 94°C; далее 35 циклов по 15 с при 94°C, 15 с при 60°C, 30 с при 72°C; 1 цикл 5 мин при 72°C.

RYSC₃₂₁ – два цикла 9 мин при 93°C; далее 35 циклов по 45 с при 94°C, 45 с при 56°C и 60 с при 72°C; один цикл 5 мин при 72°C.

Yes3-3A₃₄₁ – один цикл 2 мин при 94°C; далее 10 циклов по 40 с при 94°C, 40 с при 60°C и 60 с при 72°C; далее 30 циклов по 40 с при 94°C, 40 с при 55°C и 60 с при 72°C; один цикл 10 мин при 72°C.

RY364-14₂₉₈ – один цикл 10 мин при 95°C; далее 35 циклов по 30 с при 94°C, 30 с при 55°C и 90 с при 72°C; один цикл 5 мин при 72°C.

517/1519₇₅₀ – один цикл 7 мин при 95°C; далее 38 циклов по 20 с при 95°C, 20 с при 58°C и 2 мин при 72°C; один цикл 7 мин при 72°C.

R2₂₅₀₀ – один цикл 7 мин при 95°C; далее 38 циклов по 20 с при 95°C, 20 с при 58°C и 2 мин при 72°C; один цикл 7 мин при 72°C.

R3b₃₇₈ – один цикл 7 мин при 95°C; далее 38 циклов по 20 с при 95°C, 20 с при 58°C и 2 мин при 72°C; один цикл 7 мин при 72°C.

5450_3₁₀₄₆ – один цикл 3 мин при 93°C; далее 35 циклов по 2 мин при 93°C, 45 с при 58°C и 1.5 мин при 72°C; один цикл 10 мин при 72°C.

TG689₁₄₁ – один цикл 3 мин при 95°C; далее 35 циклов по 20 с при 94°C, 20 с при 55°C и 30 с при 72°C; один цикл 3 мин при 72°C.

Продукты амплификации разделяли с помощью электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле с бромистым этидием и визуализировали в ультрафиолетовом свете.

Для определения характера расщепления гибридов по отдельным маркерам анализировали ДНК 17–38 растений на комбинацию скрещивания. Соответствие полученного расщепления теоретически ожидаемому при различных вариантах скрещиваний подтверждали с помощью метода хи-квадрат.

Для получения поколений беккрасса межвидовых гибридов BC_2 и BC_3 отбирали наиболее продуктивные гибриды с признаками культурного картофеля (компактное гнездо клубней правильной формы и с мелкими глазками), не имеющие симптомов фитофтороза в конце периода вегетации (устойчивость 9 баллов по 9-балльной шкале) в течение как минимум двух лет полевых испытаний, несущие маркер 517/1519₇₅₀ гена устойчивости к фитофторозу *Rpi-sto1*. Место полевых испытаний гибридов (г. Минск, Беларусь) характеризуется ежегодными эпифитотиями фитофтороза (в годы испытаний отмечено сильное поражение патогеном восприимчивых сортов Уладар, Одиссей, Янка и Лилея).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Представленность маркеров sto PI 205522 у родительских форм и межвидовых гибридов F_1

У 2х S_vS_v -линии IGC08/168.4, использованной в качестве материнского родителя для гибридизации с sto PI 205522, обнаружены маркеры R2₂₅₀₀ и R3b₃₇₈, что может затруднять анализ их наследования в последующих поколениях беккрасса. У гибрида F_1 IGC15/118.3 и его удвоенного с помощью колхицина клона представлены все взятые в анализ маркеры.

У 2х родительской линии IGC10/1.21, выступавшей в качестве опылителя при получении межвидового гибрида IGC15/114.52, маркеры образца дикого вида не выявлены. У названного гибрида и соответствующего митотически удвоенного бх клона обнаружены все маркеры, за исключением маркера RY364-14₂₉₈ гена *Ry_{che}*. Пентаплоидный гибрид IGC15/103.5 имел все маркеры дикого вида (табл. 2).

Наследование маркеров sto PI 205522 гибридами BC_1

Как видно из табл. 2, гибриды BC_1 IGC16/38.n, IGC16/39.n, IGC19/334.n и IGC19/330.n демонстрировали отсутствие расщепления по маркерам генов устойчивости к фитофторозу *Rpi-sto1*, R2 и R3b, генов устойчивости к PVY *Ry_{adg}* и *Ry_{sto}*, а также по маркерам 5450_3₁₀₄₆ и SolB₄₆₉, что указывает

на локализацию этих генов на субгеноме В. Спорадическое появление гибридов без вышеупомянутых маркеров в некоторых гибридных комбинациях (IGC19/334.n по маркеру Yes3-3A₃₄₁, IGC19/330.n по маркерам 5450_3₁₀₄₆ и SolB₄₆₉) можно объяснить скорее редкими случаями гомеологической рекомбинации хромосом субгеномов А и В в мейозе бх клонов, чем расположением этих генов на субгеноме А. Расщепление 15 : 2 в случае Yes3-3A₃₄₁ у IGC19/334.n соответствует ожидаемому 5 : 1 для анализирующих скрещиваний дуплекса ($\chi^2 = 0.17$, $\chi^2_{0.05} = 3.84$) и 3.67 : 1 ($\chi^2 = 0.57$). Однако все 38 гибридов между материнской формой, бх клоном IGC15/118.3.C6.2016 и другим тестером, сортом Katahdin (IGC16/38.n и IGC16/39.n) имели этот маркер. В свою очередь, расщепление 22 : 1 по маркеру SolB₄₆₉ у IGC19/330.n также соответствует 5 : 1 и 3.67 : 1 ($\chi^2 = 1.85$ и $\chi^2 = 2.99$), однако у IGC19/334.n, IGC16/38.n и IGC16/39.n отсутствовало расщепление по этому маркеру. Кроме того, маркер SolB₄₆₉ является специфическим для субгенома В аллотетраплоидных видов картофеля [42].

В настоящем эксперименте возможно присутствие у гибридов BC_1 дополнительных копий некоторых изучаемых генов на субгеноме А, которые они могли получить от культурного картофеля. В частности, гены R2 и R3b могли быть перенесены не только от дикого вида, но и от S_vS_v -линии, а гены *Ry_{adg}* и *Sen2* – от тестера IGC17n8. В случае маркера 5450_3₁₀₄₆ гена *Sen2* у гибридов IGC19/330.n расщепление 22 : 1 соответствует ожидаемому 11 : 1 ($\chi^2 = 0.63$) для скрещиваний между 4х дуплексом и 4х симплексом. Несмотря на отсутствие расщепления у IGC19/334.n (17 : 0) по этому маркеру и как результат расщепление 39 : 1 у 40 аналогичных гибридов BC_1 (IGC19/330.n и IGC19/334.n), не исключается расположение *Sen2* на субгеноме А у sto PI 205522 ($\chi^2 = 1.33$). Напротив, отсутствие расщепления у гибридов IGC19/334.n (17 : 0) и IGC19/330.n (23 : 0) по маркерам генов R2, R3b и *Ry_{adg}* указывает на расположение этих генов скорее на субгеноме В, чем субгеноме А.

Значительная часть гибридов BC_1 IGC19/334.n и IGC19/330.n не имела маркера RY364-14₂₉₈ гена *Ry_{che}*, что очевидно связано с его локализацией на субгеноме А sto PI 205522. Расщепление 18 : 5 в случае с IGC19/330.n соответствует ожидаемому 5 : 1 для тестерных скрещиваний 4х дуплекса ($\chi^2 = 0.19$; $\chi^2_{0.05} = 3.84$), отклонение от ожидаемого расщепления у IGC19/334.n (9 : 8, $\chi^2 = 3.62$) было недостоверным.

У тетраплоидного гибрида BC_1 IGC16/36.1 (схема интрогрессии 3) представлены все использованные маркеры. У гибрида IGC17/192.4 (схема

Таблица 2. Наличие маркеров генов устойчивости и специфического для субгенома В маркера SolB₄₆₉ у межвидовых гибридов *S. stoloniferum* PI 205522, их родительских форм; наследование маркеров в потомстве беккрасса межвидовых гибридов на культурный картофель в рамках четырех схем интрогрессии

Родители, гибриды	ДНК-маркеры							
	517/1519 ₇₅₀	R2 ₂₅₀₀	R3b ₃₇₈	RYSC3 ₃₂₁	Yes3-3A ₃₄₁	RY364-14 ₂₉₈	5450_3 ₁₀₄₆	SolB ₄₆₉
Родители								
<i>S. stoloniferum</i> PI 205522	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>S_vS_v</i> -линия IGC08/168.4	0	1	1	0	0	0	0	0
IGC10/1.21	0	0	0	0	0	0	0	0
IGC17n8	0	0	0	1	0	0	1	0
Katahdin	0	0	0	1	0	0	0	0
Quarta	0	1	0	0	0	1	1	0
Labadia	0	0	0	0	0	0	1	0
Традиционные схемы интрогрессии								
Схема 1: F ₁ IGC15/118.3.C6.2016	1	1	1	1	1	1	1	1
BC ₁ IGC16/38.n, IGC16/39.n (IGC15/118.3.C6.2016 × Katahdin)	38 : 0*	Н.д.	Н.д.	Н.д.	38 : 0	Н.д.	Н.д.	38 : 0
BC ₁ IGC19/334.n (IGC15/118.3.C6.2016 × IGC17n8)	17 : 0	17 : 0	17 : 0	17 : 0	15 : 2	9 : 8	17 : 0	17 : 0
BC ₂ IGC17/170.n (IGC16/38.16 × Quarta)	14 : 16**	9 : 6	10 : 5	10 : 5	13 : 17**	2 : 13	8 : 7	10 : 20**
Схема 2: F ₁ IGCC15/114.52.C5.2017	1	1	1	1	1	1	1	1
BC ₁ IGC19/330.n (IGC15/114.52.C5.2017 × IGC17n8)	23 : 0	23 : 0	23 : 0	23 : 0	23 : 0	18 : 5	22 : 1	22 : 1
Схемы интрогрессии, имеющие целью повысить вероятность рекомбинации гомеологичных хромомом субгеномов А и В								
Схема 3: BC ₁ IGC16/36.1	1	1	1	1	1	1	1	1
BC ₂ IGC19/305.n (IGC16/36.1 × IGC17n8)	8 : 15	23 : 0	15 : 8	23 : 0	12 : 11	7 : 16	18 : 5	10 : 13
Схема 4: F ₁ IGC15/103.53	1	1	1	1	1	1	1	1
BC ₁ IGC17/192.4 (IGC15/103.53 × Quarta)	1	1	1	0	1	0	1	1
BC ₂ IGC19/323.n (IGC17/192.4 × Quarta)	5 : 10	12 : 3	8 : 7	0 : 15	5 : 10	7 : 8	15 : 0	3 : 12
BC ₂ IGC19/335.n (IGC17/192.4 × Labadia)	9 : 9	12 : 6	15 : 3	0 : 18	4 : 14	0 : 18	12 : 6	8 : 10

Примечание. 1 – маркер представлен, 0 – маркер отсутствует, Н.д. – нет данных. * Гибриды с маркером : гибриды без маркера. ** Данные, опубликованные ранее [31].

интрогрессии 4) отсутствовали маркеры генов Ry_{che} и Ry_{adg} . Оба гибрида отличались, прежде всего, высокой устойчивостью к фитофторозу в течение ряда лет полевых испытаний и наличием маркера 517/1519₇₅₀ гена *Rpi-sto1* (табл. 2).

Следует отметить наличие маркеров RYSC₃₂₁ и 5450_3₁₀₄₆ у тестера IGC17n8, использованного для получения гибридов BC₂ в нескольких схемах, что может затруднять анализ интрогрессии соответствующих генов дикого вида в геном культурного картофеля.

Наследование маркеров *sto PI 205522* гибридами BC₂

В табл. 2 представлены результаты анализа 30 гибридов BC₂ IGC17/170.n (схема интрогрессии 1) по маркерам 517/1519₇₅₀, Yes3-3A₃₄₁ и SolB₄₆₉, опубликованным ранее [31], а также части этой гибридной популяции (15 гибридов) по маркерам других генов устойчивости к болезням, выявленным у *sto PI 205522*. Расщепление гибридов IGC17/170.n по маркеру целевого гена *Rpi-sto1* соответствовало 1 : 1 (14 : 16). Аналогичный характер наследования в BC₂ выявлен и для других генов *sto PI 205522*, которые были локализованы на субгеноме В по результатам анализа расщепления у BC₁. По маркеру SolB₄₆₉ наблюдали отклонение от ожидаемого расщепления в сторону повышенной доли гибридов без маркера (10 : 20), однако оно было статистически недостоверным ($\chi^2 = 3.33$; $\chi^2_{0.05} = 3.84$).

Наследование маркеров специфичных для *sto PI 205522* генов гибридами BC₂ в рамках схем 3 и 4 в целом не отличалось от такового для гибридов традиционных схем. Эффективность переноса маркера 517/1519₇₅₀ в BC₂ IGC19/305.n в рамках схемы интрогрессии 3 соответствовала расщеплению 1 : 2 (8 : 15). Такой же она была у гибридов IGC19/323.n (IGC17/192.4 × Quarta) схемы интрогрессии 4 – 5 : 10. Однако среди других гибридов BC₂ этой схемы, IGC19/335.n (IGC17/192.4 × Labadia), доли генотипов с маркером и без маркера были равны (9 : 9). Аналогичная картина наследования в BC₂ схем 3 и 4 была характерна и для маркеров R3b₃₇₈, Yes3-3A₃₄₁ и SolB₄₆₉ – расщепление, близкое к 1 : 1 с разной степенью смещения в сторону генотипов, имеющих или не имеющих маркера.

Обращает внимание отсутствие расщепления в BC₂ по некоторым маркерам в ряде комбинаций скрещивания: все гибриды с маркером у IGC19/305.n по R2₂₅₀₀ и RYSC₃₂₁, у IGC19/323.n по Sen2₁₀₄₆; все гибриды без маркера у IGC19/323.n и IGC19/335.n по RYSC₃₂₁ и у IGC19/335.n по маркеру RY364-14₂₉₈ гена Ry_{che} . Это можно объяснить отсутствием или наличием и аллельным состоя-

нием (присутствием одной или нескольких копий) анализируемых генов у тестеров и гибридов BC₁, отобранных для получения BC₂.

Наличие маркеров генов устойчивости к болезням и вредителям у гибридов BC₃

В табл. 3 представлены результаты детекции маркеров генов устойчивости к болезням и вредителям у гибридов BC₃, отобранных по признакам культурного картофеля и высокой устойчивости к фитофторозу. Большинство гибридов (6 из 9) имело маркер целевого гена *Rpi-sto1*. У некоторых из них также присутствовал маркер гена устойчивости к фитофторозу R2. Его происхождение у отдельных генотипов может быть разным: как от *sto PI 205522*, так и от родительской S_vS_v-линии IGC08/168.4 или сорта Quarta, использованных при беккроссировании межвидовых гибридов. Третий из использованных маркеров генов устойчивости к фитофторозу R3b у отобранных гибридов BC₃ не выявлен.

Из маркеров генов устойчивости к PVY у отобранных гибридов BC₃ представлен только RYSC₃₂₁: он имелся у шести из девяти гибридов. Однако, как и в случае с маркером гена R2, его происхождение остается неясным. Интересно, что маркер SolB₄₆₉, специфичный для субгенома В *S. stoloniferum*, сохранился у трех гибридов. У двух гибридов BC₃, в том числе наиболее продуктивного IGC18/161.32, обнаружен маркер гена устойчивости к нематоде, что улучшает их перспективы использования в селекции. Для гибрида IGC18/161.32 также характерна высокая мужская фертильность, что позволило успешно использовать его в скрещиваниях 2021 и 2022 г. в качестве опылителя с рядом сортов картофеля.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей статье представлены результаты определения субгеномной локализации ряда генов *sto PI 205522* на основании данных о наследовании их ДНК-маркеров в первом поколении беккросса 6х межвидовых гибридов (AAAABB) на культурный картофель 4х *S. tuberosum*. Полученные нами результаты подтвердили В-геномную специфичность маркера SolB₄₆₉. В свою очередь, соответствие полученных результатов ожидаемому характеру наследования в BC₁ маркеров, расположенных на субгеноме В, указывает на эффективность предложенного подхода. По этой причине не был неожиданным установленный факт расположения гена *Rpi-sto1* на субгеноме В *sto PI 205522*. Существует предположение [3, 44], что *Rpi-sto1* является функциональным гомологом гена устойчивости к фитофторозу широкого спектра действия *Rpi-blb1* дикого 2х вида карто-

Таблица 3. Наличие маркеров генов устойчивости и специфического для субгена *B* маркера *SoIB*₄₆₉ у гибридов *BC*₃ программы маркер-опосредованной интрогрессии гена *Rpi-sto1 S. stoloniferum* PI 205522 в геном культурного картофеля

Гибриды, сорта	Происхождение	ДНК-маркеры								
		517/1519 ₇₅₀	R2 ₂₅₀₀	R3b ₃₇₈	RYSC3 ₃₂₁	Yes3-3A ₃₄₁	RY364-14 ₂₉₈	5450_3 ₁₀₄₆	TG689	SoIB ₄₆₉
IGC18/161.32	Янка × IGC17/170.22	1	0	0	1	0	0	0	1	0
IGC18/164.35a	IGC17/170.22 × Свитанок Киевский	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IGC18/164.38	IGC17/170.22 × Свитанок Киевский	0	1	0	1	0	0	0	0	1
IGC18/164.40	IGC17/170.22 × Свитанок Киевский	1	0	0	1	0	0	0	0	0
IGC18/164.42	IGC17/170.22 × Свитанок Киевский	1	1	0	0	0	0	0	0	1
IGC18/164.45	IGC17/170.22 × Свитанок Киевский	0	1	0	1	0	0	1	0	0
IGC18/163.7	IGC17/170.22 × Уладар	1	1	0	0	0	0	0	0	1
IGC18/163.13	IGC17/170.22 × Уладар	1	1	0	1	0	0	0	0	0
IGC18/165.10	IGC17/170.30 × Свитанок Киевский	1	1	0	0	0	0	0	1	0
Родительские гибриды <i>BC</i> ₂ и сорта										
IGC17/170.22	IGC16/38.16 × Quarta	1	1	0	1	0	0	1	0	1
IGC17/170.30	IGC16/38.16 × Quarta	1	1	1	0	1	1	1	1	0
Янка		0	0	0	1	0	1	1	1	0
Свитанок Киевский		0	0	0	0	0	0	0	0	0
Уладар		0	0	0	1	0	0	0	1	0

Примечание. 1 – маркер представлен, 0 – маркер отсутствует.

феля из Мексики *S. bulbocastanum* (геном ВВ), и этот вид является одним из предков *S. stoloniferum* (в качестве источника субгенома В). Кроме того, выглядит естественным расположение гена *Ry_{che}* на субгеноме А sto PI 205522, поскольку этот ген является характерным для А-геномных видов картофеля. Напротив, локализация на субгеноме В генов устойчивости к фитофторозу *R2* и *R3b*, а также гена *Ry_{adg}* устойчивости к PVY оказалась неожиданной, поскольку эти гены также ассоциируются, прежде всего, с А-геномными видами картофеля. Семья *R2* включает большую группу гомологичных генов различного происхождения, локализованных на хромосоме IV [45]. У *S. stoloniferum* рассматривают *Rpi-blb3* в качестве гомолога гена *R2* [45], а ген *Rpi-sto2* — гомолога *R3b* [46]. Однако в литературе отсутствует информация о субгеномной локализации этих генов у *S. stoloniferum*. Не установлено и субгеномное расположение гена *Ry_{sto}* устойчивости к PVY. Таким образом, нам впервые удалось прояснить эту ситуацию.

Согласно нашим данным [47], у диплоидных межвидовых гибридов между sto PI 205522 и 2х линией IGC10/1.21, предположительно сохранивших субгеном В дикого вида, выявлены маркеры генов устойчивости к фитофторозу *Rpi-sto1*, *R3b*, устойчивости к PVY *Ry_{sto}* и *Ry_{adg}*, а также маркер SolB₄₆₉. Это подтверждает приведенные выше результаты настоящего исследования.

Определение субгеномной принадлежности ряда генов устойчивости к болезням *S. stoloniferum* имеет большое практическое значение, так как позволяет прогнозировать уровень сложности их интрогрессии в геном культурного картофеля. В частности, наши результаты указывают на то, что перенос большинства изученных генов может быть затруднен из-за их расположения на субгеноме В.

Высокая степень соответствия выявленного характера наследования в ВС₁ ожидаемому для генов, локализованных на субгеноме В (отсутствие расщепления), означает, что спаривание хромосом в мейозе бх межвидовых гибридов преимущественно интрагеномное, а гомеологическая рекомбинация А и В субгеномов отмечена только в редких случаях. Так, мы выявили спорадическое появление гибридов ВС₁, не несущих маркеры гена *Ry_{sto}* (хромосома XII) и последовательности ДНК *FLint2* (хромосома III), что можно объяснить гомеологической рекомбинацией. Известно, что ген *Ry_{sto}* устойчивости к PVY был успешно интрогрессирован от *S. stoloniferum* [4, 25] и присутствует у многих сортов картофеля.

Этот вывод подтвержден результатами цитогенетического исследования ряда межвидовых гибридов и их беккроссного поколения, использованных в настоящей работе [18]. Авторы с помощью метода

GISH выявили одну—две рекомбинантные хромосомы А/В в мейозе двух гибридов ВС₁ (IGC16/38.16, IGC17/192.4) и двух гибридов ВС₂ (IGC17/170.30, IGC19/305.5). Кроме того, они получили данные, указывающие на то, что спаривание хромосом субгенома А преимущественно интрагеномное, а большинство хромосом субгенома В остается в виде унивалентных как у гибридов ВС₁, так и у гибридов ВС₂.

Как видно из табл. 2, расщепления изучаемых маркеров в ВС₂ варьировали в довольно широких пределах. Это ожидалось, принимая во внимание данные [48] по вариации гомеологичных хромосом у беккроссных поколений аналогичных бх межвидовых гибридов. Наличие некоторых из изучаемых маркеров у сортов и линий культурного картофеля и их отсутствие у части гибридов ВС₁, использованных для беккроссирования, могли вносить свой вклад в эту вариацию (табл. 2, схемы интрогрессии 3 и 4). Так, легко объяснить отсутствие расщепления в некоторых популяциях ВС₂ мультиплексным состоянием соответствующих генов у родительских форм *S. tuberosum* или отсутствием маркеров у родительских гибридов ВС₁, отобранных для получения гибридов ВС₂.

В целом наследование маркеров в ВС₂ в рамках четырех схем интрогрессии (расщепление, близкое к 1 : 1 с различной степенью отклонения) соответствовало ожидаемому как при случайном переносе потомству соответствующих хромосом субгенома В, так и при образовании рекомбинантных А/В хромосом.

Следует отметить продемонстрированную в работе возможность отбора генотипов ВС₂ с широким набором использованных маркеров: в качестве примера можно рассматривать IGC17/170.22 и IGC17/170.30 (табл. 3). Однако нам не удалось перенести отобранным гибридам ВС₃ гены *R3b*, *Ry_{sto}* и *Ry_{che}*, а маркер гена *Sen2* был представлен только у одного гибрида. Неясно, связано это с выбранной программой селекции (отбор по признакам культурного картофеля, полевой устойчивости к фитофторозу и наличию маркера гена *Rpi-sto1*), с недостаточно большой популяцией гибридов ВС₃ (около 900 семян первого года, 56 семян первой клубневой репродукции) или с характером переноса потомству генов дикого вида в зависимости от их геномной локализации. Более того неясно произошла ли интрогрессия генов субгенома В дикого вида в геном А гибридов ВС₃ или у них имеются дополнительные хромосомы субгенома В с соответствующими генами.

Важно то, что мы впервые продемонстрировали в настоящей работе возможность успешной маркер-опосредованной интрогрессии ценного гена устойчивости к фитофторозу *Rpi-sto1* от *S. stoloniferum* к культурному картофелю, исполь-

зую оригинальные S_vS_v -линии. Отобрано несколько гибридов BC_3 , перспективных для селекции по комплексу признаков культурного картофеля (относительно высокой продуктивности клубней правильной формы и с мелкими глазками), высокой полевой устойчивости к фитофторозу, наличию маркера гена *Rpi-sto1* и мужской фертильности.

Сложно сделать заключение об эффективности схем интрогрессии 3 и 4 для улучшения гомеологического спаривания хромосом субгеномов А и В в поколениях беккрасса. Как видно из результатов статьи [18], беккроссирование гибрида IGC15/103.53 (схема интрогрессии 4) на культурный картофель позволило получить гибрид BC_1 IGC17/192.4, у которого представлена одна рекомбинантная А/В хромосома, а в потомстве гибрида IGC16/36.1 (схема интрогрессии 3) получен гибрид BC_2 IGC19/305.5, который имеет две хромосомы субгенома В с фрагментами хромосом субгенома А. Тем не менее ограниченное количество изученных межвидовых гибридов не позволяет сделать заключение, что эти схемы лучше традиционных схем интрогрессии. Гибрид BC_1 IGC16/38.16, имеющий две рекомбинантные А/В хромосомы, был получен в рамках традиционной схемы интрогрессии 1 [18].

Существенным фактором, который может минимизировать преимущества схем интрогрессии 3 и 4, является плохая скрещиваемость с культурным картофелем гибридов IGC16/36.1 (4х, АААВ) и IGC15/103.53 (5х, АААВВ) из-за более низких значений их эффективной ploидности по сравнению с 4ЕВN *S. tuberosum* (4х, АААА) [30]. Кроме того, выяснилось, что те гибриды, которые все-таки удалось получить (BC_2 IGC19/305.5, схема 3; BC_1 IGC17/192.1 и IGC17/192.4, схема 4), неожиданно имели четыре полных набора хромосом генома А [18], т.е. они существенно не отличались по составу хромосом от аналогичных гибридов традиционных схем интрогрессии. Материнские родители этих гибридов, IGC16/36.1 (4х, АААВ) и IGC15/103.53 (5х, АААВВ), имели 12 непарных хромосом субгенома А (один набор), которые наследуются в беккроссном потомстве случайным образом. Появление вышеупомянутых гибридов можно объяснить только тем, что в процессе оплодотворения имеет место отбор яйцеклеток, которые имеют 2ЕВN благодаря тому, что они получили полный набор (12) хромосом непарного субгенома А. Это обеспечивает образование жизнеспособных семян в результате оплодотворения таких яйцеклеток (имеющих 24 хромосомы субгенома А) 2ЕВN пыльцой сортов картофеля. Появление гибрида BC_2 IGC19/305.5, гибридов BC_1 IGC17/192.1 и IGC17/192.4 также указывает на преимущественно интрагеномное спаривание хромосом в мейозе у их родителей, что приводит к образованию 2ЕВN гамет с увеличенным коли-

чеством хромосом субгенома А. Следовательно создание благоприятных условий для гомеологической рекомбинации хромосом путем использования схем интрогрессии 3 и 4 (непарное состояние хромосом субгеномов А и В) не гарантирует положительных результатов. Разработка схем интрогрессии, имеющих целью повышение вероятности гомеологической рекомбинации хромосом субгеномов А и В, по-прежнему остается актуальной.

Таким образом, результаты настоящего исследования, с одной стороны, подтвердили сложность проблемы интрогрессии в геном культурного картофеля генов дикого аллотетраплоидного вида картофеля *S. stoloniferum*. Показано, что многие гены ценных для селекции признаков этого вида могут располагаться на субгеноме В и их перенос в геном А затруднен из-за преимущественно интрагеномного спаривания хромосом в мейозе межвидовых гибридов и в поколениях их беккрасса культурным картофелем. С другой стороны, отмечены редкие случаи гомеологической рекомбинации хромосом субгеномов А и В, что позволяет осуществить интрогрессию генов, локализованных на субгеноме В. Однако остается неясным, все ли хромосомы субгенома В способны к гомеологической рекомбинации или только часть из них.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б20Р-418).

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. *Solomon-Blackburn R.M., Barker H.* A review of host major-gene resistance to potato viruses X, Y, A and V in potato: Genes, genetics and mapped location // *Heredity*. 2001. V. 86. P. 8–16. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.2001.00798.x>
2. *Zimnoch-Guzowska E., Yin Z., Flis B.* Sources and effectiveness of potato PVY resistance in IHAR's breeding research // *Am. J. Potato Res.* 2013. V. 90. P. 21–27. <https://doi.org/10.1007/s12230-012-9289-5>
3. *Wang M., Allefs S., van den Berg R.G. et al.* Allele mining in *Solanum*: Conserved homologues of *Rpi-blb1* are identified in *Solanum stoloniferum* // *Theor. Appl. Genet.* 2008. V. 116. P. 933–943. <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0725-3>
4. *Ross H.* Potato breeding. Problems and perspectives // *Adv. Plant Breed. (Suppl.)*. 1986. V. 13. 132 p.

5. Ortiz R. Potato breeding via ploidy manipulations // Plant Breed. Reviews. 1998. V. 16. P. 15–86. <https://doi.org/10.1002/9780470650110.ch2>
6. Jackson S.A., Hanneman R.E., Jr. Crossability between cultivated and wild tuber- and non-tuber-bearing *Solanum* // Euphytica. 1999. V. 109. P. 51–67. <https://doi.org/10.1023/A:1003710817938>
7. Hayes R.J., Dinu I.I., Thill C.A. Unilateral and bilateral hybridization barriers in inter-series crosses of 4x 2EBN *Solanum stoloniferum*, *S. pinnatisectum*, *S. cardiophyllum* and 2x 2EBN *S. tuberosum* haploids and haploid-species hybrids // Sex. Plant Reprod. 2005. V. 17. P. 303–311. <https://doi.org/10.1007/s00497-005-0244-1>
8. Lössl A., Götz M., Braun A., Wenzel G. Molecular markers for cytoplasm in potato: Male sterility and contribution of different plastid-mitochondrial configurations to starch production // Euphytica. 2000. V. 116. P. 221–230. <https://doi.org/10.1023/A:1004039320227>
9. Song Ye-Su, Schwarzfischer A. Development of STS markers for selection of extreme resistance (*Rysto*) to PVY and maternal pedigree analysis of extremely resistant cultivars // Am. J. Potato Res. 2008. V. 85. P. 159–170. <https://doi.org/10.1007/s12230-008-9044-0>
10. Анисимова И.Н., Гавриленко Т.А. Цитоплазматическая мужская стерильность и перспективы ее использования в селекционно-генетических исследованиях и семеноводстве картофеля // Вавил. журн. генетики и селекции. 2017. Т. 21. № 1. С. 83–95. <https://doi.org/10.18699/VJ17.226>
11. Spooner D.M., Rodriguez F., Polgar Z. et al. Genomic origins of potato polyploids: GBSSI gene sequencing data // Plant Genome. Suppl. Crop Sci. 2008. V. 48. (Suppl. 1). P. S27–S36. <https://doi.org/10.2135/cropsci2007.09.0504tpg>
12. Marks G.E. A polyhaploid plant of *Solanum polytrichon* Rydb. // Nature (London). 1955. V. 175. P. 469. <https://doi.org/10.1038/175469a0>
13. Magoon M.L., Hougas R.W., Cooper D.C. Chromosome pairing at different ploidy levels in the tuber bearing *Solanums* // J. Genet. 1960. V. 57. P. 279–298. <https://www.ias.ac.in/article/fulltext/jgen/057/02-03/0279-0297>
14. Dvorak J. Evidence for genetic suppression of heterogenous chromosome pairing in polyploidy species of *Solanum*, sect. *Petota* // Canadian J. Genet. Cytol. 1983. V. 25. P. 530–538. <https://doi.org/10.1139/g83-080>
15. Hermesen J.G.Th., Ramanna M.S. Barriers to hybridization of *Solanum bulbocastanum* Dun. and *S. verrucosum* Schlecht. and structural hybridity in their F1 plants // Euphytica. 1976. V. 25. P. 1–10. <https://doi.org/10.1007/BF00041523>
16. Hermesen J.G.Th., Ramanna M.S. Meiosis in different F1-hybrids of *Solanum acaule* BITT × *S. bulbocastanum* Dun. and its bearing on genome relationship, fertility and breeding behavior // Euphytica. 1969. V. 18. P. 27–35. <https://doi.org/10.1007/bf00021979>
17. Ramanna M.S., Hermesen J.G.Th. Somatic chromosome elimination and meiotic chromosome pairing in the triple hybrid 6x-(*Solanum acaule* × *S. bulbocastanum*) × 2x-*S. phureja* // Euphytica. 1971. V. 20. P. 470–481. <https://doi.org/10.1007/BF00034200>
18. Gavrilenko T.A., Pendinen G.I., Yermishin A.P. GISH analysis of the introgression of the B subgenome genetic material of wild allotetraploid species *Solanum stoloniferum* into backcrossing progenies with potato // Agronomy. 2022. V. 12. Pub. 787. <https://doi.org/10.3390/agronomy12040787>
19. Kikuchi S., Ishii H., Hosaka K., Sanetomo R. Behavior of chromosomes from the Mexican wild diploid species *Solanum pinnatisectum* in the interspecific hybrid with cultivated potato and its backcross progenies // Euphytica. 2022. V. 218. Pub. 56. <https://doi.org/10.1007/s10681-022-03003-1>
20. Adiwilaga K.D., Brown C.R. Use of 2n pollen-producing triploid hybrids to introduce tetraploid Mexican wild species germplasm to cultivated tetraploid potato gene pool // Theor. Appl. Genet. 1991. V. 81. P. 645–652. <https://doi.org/10.1007/BF00226732>
21. Bamberg J.B., Hanneman R.E., Jr., Palta J.P., Harbage J.F. Using disomic 4x (2EBN) potato species germplasm via bridge species *Solanum commersonii* // Genome. 1994. V. 37. P. 866–870. <https://doi.org/10.1139/g94-122>
22. Watanabe K., Arbizu C., Schmiediche P. Potato germplasm enhancement with disomic tetraploid *Solanum acaule*. I. Efficiency of introgression // Genome. 1992. V. 35. P. 53–57. <https://doi.org/10.1139/g92-009>
23. Lamm R. Investigation of some tuber-bearing *Solanum* hybrids // Hereditas. 1953. V. 39. P. 97–112. <https://doi.org/10.1111/j1601-5223.1953.tb03404.x>
24. Swaminathan M.S. Notes on induced polyploids in the tuber-bearing *Solanum* species and their crossability with *S. tuberosum* // Am. Potato J. 1951. V. 28. P. 472–489. <https://doi.org/10.1007/BF02854980>
25. von Wangenheim K.H. Zur Ursache der Kreuzungsschwierigkeiten zwischen *Solanum tuberosum* L. und *S. acaule* BITT. bzw. *S. stoloniferum* Schldtl. & Bouchet // Zeitschrift für Pflanzenzüchtung. 1954. V. 34. P. 7–48.
26. Лебедева Н.А. Изменение свойств и признаков картофеля под влиянием полиплоидии и использование экспериментальной полиплоидии в селекции картофеля: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Киев: Акад. наук Украинской ССР, 1966. 38 с.
27. Camadro E.L., Espinillo J.C. Germplasm transfer from the wild tetraploid species *Solanum acaule* Bitt. to the cultivated potato *S. tuberosum* L using 2n eggs // Am. Potato J. 1990. V. 67. P. 737–749. <https://doi.org/10.1007/BF03044524>
28. Watanabe K.N., Orillo M., Vega S. et al. Potato germplasm enhancement with disomic tetraploid *Solanum acaule*. II. Assessment of breeding value of tetraploid F1 hybrids between tetrasomic tetraploid *S. tuberosum* and

- S. acaule* // Theor. Appl. Genet. 1994. V. 88. P. 135–140. <https://doi.org/10.1007/BF00225888>
29. Yermishin A.P., Levy A.V., Voronkova E.V. et al. Overcoming unilateral incompatibility in crosses with wild allotetraploid potato species *Solanum stoloniferum* Schldtl. & Bouchet // Euphytica. 2017. V. 213. Pub. 249. <https://doi.org/10.1007/s10681-017-2041-y>
 30. Антонова О.Ю., Ермишин А.П., Левый А.В. и др. Разработка хромосом-специфичных ДНК-маркеров для изучения интрогрессивной гибридизации картофеля с диким мексиканским аллотетраплоидным видом *Solanum stoloniferum* Schldtl. & Bouchet // Биотехнология и селекция растений. 2019. Т. 2. № 4. С. 24–35. <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2019-4-о3>
 31. Левый А.В. Интрогрессия в *Solanum tuberosum* L. генов устойчивости к Y-вирусу картофеля и фитофторозу дикого аллотетраплоидного вида *S. stoloniferum* Schldtl. & Bouchet: Дис. ... канд. биол. наук. Минск: Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси, 2019. 151 с.
 32. Bradshaw J.E., Mackay G.R. Breeding strategies for clonally propagated potatoes // Potato Genetics. Wallingford (UK): CABI, 1994. P. 109–132.
 33. Ortiz R., Peloquin S.J. Use of 24 chromosome potatoes (diploids and diplandroids) for genetical analysis // Potato Genetics. Wallingford (UK): CABI, 1994. P. 133–154.
 34. Ермишин А.П., Светоч О.В., Воронкова Е.В. и др. Определение состава и аллельного состояния генов устойчивости к болезням и вредителям у родительских линий картофеля с помощью ДНК-маркеров // Генетика. 2016. Т. 52. № 5. С. 569–578.
 35. Полохович Ю.В., Маханько О.В., Савчук А.В. и др. Создание линий-посредников для преодоления межвидовой несовместимости у картофеля // Изв. НАН Беларуси. Сер. биол. наук. 2010. № 2. С. 51–58.
 36. Ермишин А.П., Воронкова Е.В. Создание исходного материала для маркер-опосредованной селекции родительских линий картофеля (*Solanum tuberosum* L.) на диплоидном уровне // С.-хоз. биология. 2017. Т. 52. № 1. С. 50–62. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.1.50rus>
 37. Kasai K., Morikawa Y., Sorri V.A. et al. Development of SCAR markers to the PVY resistance gene *Ryadg* based on a common feature of plant disease resistance genes // Genome. 2000. V. 43. P. 1–8. <https://doi.org/10.1139/g99-092>
 38. Mori K., Mukojima N., Nakao T. et al. Germplasm release: Saikai 35, a male and female fertile breeding line carrying *Solanum phureja*-derived cytoplasm and potato cyst nematode resistance (*HI*) and potato virus Y resistance (*Ry_{chc}*) genes // Am. J. Potato Res. 2012. V. 89. P. 63–72. <https://doi.org/10.1007/s12230-011-9221-4>
 39. Kim H.J., Lee H.R., Jo K.R. et al. Broad spectrum late blight resistance in potato differential set plants MaR8 and Ma R9 is conferred by multiple stacked R genes // Theor. Appl. Genet. 2012. V. 124. P. 923–935. <https://doi.org/10.1007/s00122-011-1757-7>
 40. Rietman H., Bijsterbosch G., Cano L.M. et al. Qualitative and quantitative late blight resistance in the potato cultivar Sarpo Mira is determined by the perception of five distinct RXLR effectors // Mol. Plant Microbe Interact. 2012. V. 25. P. 910–919. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-12-0010-R>
 41. Plich J., Przetakiewicz J., Śliwka J. et al. Novel gene *Sen2* conferring broad-spectrum resistance to *Synchytrium endobioticum* mapped to potato chromosome XI // Theor. Appl. Genet. 2018. V. 131. P. 2321–2331. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3154-y>
 42. Drobyazina P.E., Khavkin E.E. Floricaula/Leafy intron 2-based markers of wild *Solanum* species and genomes for introgression breeding // PPO-Special Report Schepers H.T.A.M. 2012. V. 15. P. 187–192.
 43. Milczarek D., Flis B., Przetakiewicz A. Suitability of molecular markers for selection of potatoes resistant to *Globodera* spp. // Am. J. Potato Res. 2011. V. 88. P. 245–255. <https://doi.org/10.1007/s12230-011-9189-0>
 44. Fadina O.A., Beketova M.P., Kuznetsova M.A. et al. Polymorphisms and evolution of *Solanum bulbocastanum* genes for broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* // Russ. J. Plant Physiol. 2019. V. 66. P. 950–957. <https://doi.org/10.1134/S1021443719060062>
 45. Vleeshouwers V.G.A.A., Raffaele S., Vossen J. et al. Understanding and exploiting late blight resistance in the age of effectors // Ann. Rev. Phytopathol. 2011. V. 49. P. 25.1–25.25. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095326>
 46. Champouret N. Functional genomics of *Phytophthora infestans* effectors and *Solanum* resistance genes: PhD thesis. Wageningen Univ., 2010. 153 p.
 47. Ермишин А.П., Левый А.В., Воронкова Е.В. и др. Диплоидные гибриды между диким аллотетраплоидным видом картофеля *Solanum stoloniferum* Schldtl. & Bouchet и диплоидными клонами культурного картофеля *S. tuberosum* L., имеющие геном В дикого вида // Докл. НАН Беларуси. 2017. Т. 61. № 5. С. 80–89.
 48. Sanetomo R., Ono S., Hosaka K. Characterization of crossability in the crosses between *Solanum demissum* and *S. tuberosum*, and the F₁ and BC₁ progenies // Am. J. Potato Res. 2011. V. 88. P. 500–510. <https://doi.org/10.1007/s12230-011-9217-0>

Peculiarities of Transfer of DNA Markers of Wild Allotetraploid Potato Species *Solanum stoloniferum* to Backcross Progenies Depending on Their Subgenomic Location and Used Schemes of Introgression

A. P. Yermishin^{a, *}, A. V. Levy^a, A. S. Ageeva^a, E. V. Voronkova^a, V. I. Luksha^a,
O. N. Gukasian^a, and V. M. Zharich^a

^a*Institute of Genetics and Cytology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220072 Belarus*

**e-mail: ermishin@igc.by*

Genomic difference between wild allotetraploid potato species *Solanum stoloniferum* Schldtl et Bouchet (genome AABB) and *S. tuberosum* L. (AAAA) is one of the factors hampering its use in breeding. However, there is practically no information on valuable genes of this species located in the subgenome B and on the way of their transfer into the genome A of cultivated potatoes. The objectives of this research were to identify subgenomic location of a set of *S. stoloniferum* genes using an original approach based on a difference of inheritance of DNA markers of the genes in backcross BC₁ of chromosome doubled triploid hybrids (6x, AAAABB) to 4x *S. tuberosum* dependent on belonging to A or B subgenome; to study their inheritance in BC₂ and BC₃ in the framework of four introgression schemes and marker assisted selection of the gene *Rpi-sto1*. The markers of late blight (LB) resistance genes *Rpi-sto1*, *R3b*, *R2*, potato virus Y (PVY) resistance genes *Ry_{sto}*, *Ry_{adg}* were located on the subgenome B and the marker of PVY resistance gene *Ry_{chc}* – on the subgenome A. We observed an appearance of unexpected sporadic hybrids free of markers in BC₁ that may be explained by rare cases of homeological recombination of A and B subgenome chromosomes. The segregation of the markers in BC₂ (close to 1 : 1) matched in general to that expected in the case of random transfer of the corresponding chromosomes of the subgenome B. Some promising for breeding hybrids have been selected in BC₃ having the marker of the gene *Rpi-sto1*.

Keywords: backcross, DNA markers, gene introgression, genomic differences, interspecific hybridization, potato.

ГЕНЫ ФЛАВИНСОДЕРЖАЩИХ МОНООКСИГЕНАЗ (FMO) ЧЕСНОКА *Allium sativum* L.: ИДЕНТИФИКАЦИЯ В ГЕНОМЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ В ОТВЕТ НА ЗАРАЖЕНИЕ *Fusarium proliferatum*

© 2023 г. О. К. Анисимова¹, А. В. Щенникова¹, Е. З. Кочиева¹, М. А. Филошин¹, *

¹Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: michel7753@mail.ru

Поступила в редакцию 11.01.2023 г.

После доработки 13.02.2023 г.

Принята к публикации 21.02.2023 г.

В настоящей работе в геноме чеснока *Allium sativum* L. идентифицировано 39 генов флавинодержущих монооксигеназ. Показано разделение AsFMOs на три филогенетические клады, ассоциированные с N-оксигенированием (22 белка), биосинтезом ауксинов (13 белков) и S-оксигенированием (4 белка). В аминокислотных последовательностях AsFMOs найдены мотивы связывания с FAD и NADPH, FMO-идентифицирующий мотив и FATGY-мотив. Показано, что транскрипты AsFMOs присутствуют во всех органах чеснока с максимумом в корнях, листьях, цветоносе и воздушных луковичах. В ответ на заражение патогенным грибом *Fusarium proliferatum* выявлена дифференциальная экспрессия генов клады I (*AsFMO4*, *AsFMO11*, *AsFMO12* и *AsFMO35*) в корнях чеснока сортов Сармат и Стрелец, контрастных по устойчивости к фузариозной гнили. При этом экспрессионный ответ гена *AsFMO18* клады III, вовлеченного в биосинтез аллиина, идентичен для обоих сортов, независимо от их устойчивости/восприимчивости к фузариозу. Это предполагает совместное участие генов клады I и III в ответных реакциях растений на заражение патогенами. Проанализирована кодирующая и регуляторная последовательности гена *AsFMO35* у сортов Стрелец и Сармат. Показано, что промоторная область гена *AsFMO35* отличается присутствием АБК-ассоциированного *cis*-регуляторного элемента ABRE у сорта Стрелец, восприимчивого к фузариозной гнили.

Ключевые слова: чеснок, *Allium sativum* L., флавинодержущие монооксигеназы, фузариозная гниль, анализ экспрессии.

DOI: 10.31857/S0016675823070020, **EDN:** QISHNL

Флавинодержущие монооксигеназы (FMO; EC 1.14.13.8) катализируют реакцию окисления путем включения одного атома молекулярного кислорода в молекулу субстрата (нуклеофильные или электрофильные соединения) с образованием гидроксильной группы [1]. Окисление этих соединений изменяет их физические и химические свойства, такие как полярность, растворимость, реакционная способность и восприимчивость для дальнейших ферментативных модификаций [2].

Флавинодержущие монооксигеназы обнаружены у всех царств организмов. В геномах бактерий и одноклеточных эукариот присутствует один ген FMO, млекопитающих и человека — пять генов FMO, тогда как в геномах растений генов FMO значительно больше. Например, у модельного вида *Arabidopsis thaliana* их 29, у ячменя *Hordeum vulgare* — 41 [1, 3].

На основе филогении и наличия специфических мотивов FMO разделяют на восемь классов (A–H).

У растений найдены только FMO класса В, которые встречаются во всех царствах живых организмов и катализируют гидрокселирование соединений, содержащих гетероатомы (азот, сера, фосфор, селен и йод) [1]. FMO класса В строго зависят от наличия никотинамидного кофермента (NADH или NADPH) для восстановления флавина (в частности, флавинадениндинуклеотида, FAD). До связывания с субстратом фермент FMO образует комплекс с NADPH, что приводит к восстановлению связанной с ферментом молекулы FAD. Восстановленный комплекс флавин–фермент связывает молекулярный кислород, в результате чего образуется нестабильный промежуточный продукт C4a-гидропероксифлавин с высокой реакционной способностью. При реакции фермента с субстратом, содержащим гетероатом (например, азот или серу), с которым он может взаимодействовать, один атом молекулярного кислорода переносится на субстрат. В результате

высвобождаются NADP⁺ и вода, а связывание NADPH запускает новый цикл [1, 4, 5].

Функции флавиносодержащих монооксигеназ наиболее изучены у человека и животных. Ключевой физиологической ролью FMO является детоксикация широкого спектра ксенобиотиков в печени, поскольку опосредованное FMO гидрокселирование делает молекулы более полярными и облегчает их экскрецию, детоксикацию и транспорт [1, 6]. Также показано, что FMO участвуют в старении и гомеостазе холестерина, а нарушение функций/дисбаланс FMO приводит к таким заболеваниям, как триметиламинурия (неспособность метаболизировать триметиламин из пищевых источников) и атеросклероз [7, 8]. Бактериальные и грибные FMO нашли применение в биотехнологии производства красителей и фармацевтических препаратов [1].

Наличие у растений по сравнению с животными большего числа генов FMO предполагает, что растения могут более широко использовать это семейство ферментов, чем это делают остальные организмы [3]. Показано, что у растений FMO участвуют в биосинтезе ауксинов, метаболизме гликозидов и других веществ, участвующих в сигнальных путях развития и ответа на стрессы [1, 3]. Существуют четыре пути биосинтеза ауксина из аминокислоты триптофана. Флавиносодержащие монооксигеназы подсемейства YUCCA катализируют реакцию окислительного декарбоксации индол-3-пирувата с образованием индолилуксусной кислоты (ауксин) [9, 10]. Различия в пространственно-временном профиле экспрессии белков YUCCA определяют локальный биосинтез ауксина в растениях, способствуя их развитию и адаптивности [1, 11].

Реакция окисления серы, катализируемая ферментами подсемейства FMO_{GS-OX}, является важным этапом биосинтеза различных сераорганических соединений у растений. Например, в результате S-оксигенирования образуются специфичные для представителей порядка Brassicales глюкозинолаты, которые придают растениям резкий и терпкий вкус и вместе с продуктами распада (репеллентами и токсинами) обеспечивают защиту от фитопатогенов и травоядных животных [12, 13]. У чеснока *Allium sativum* идентифицирован ген *AsFMO1*, продукт которого осуществляет высокостереоселективное S-оксигенирование S-аллил-L-цистеина с образованием аллиина, из которого затем образуется аллицин — сераорганическое соединение, придающее чесноку характерный вкус и аромат [14, 15].

Окисляющие азот флавиносодержащие монооксигеназы играют критическую роль в иммунитете растений [16]. Так, патоген-индуцируемый путь деградации L-лизина осуществляется через стадию образования N-гидроксипепеколиновой

кислоты — критического регулятора системной приобретенной устойчивости (SAR) к патогенной инфекции [1, 11].

К настоящему времени гены семейства FMO идентифицированы и охарактеризованы у многих видов растений. У чеснока *A. sativum* известен только один ген семейства FMO — *AsFMO1*, продукт которого, как говорилось выше, участвует в биосинтезе аллиина. Цель настоящей работы — идентификация и характеристика генов флавиносодержащих монооксигеназ в геноме чеснока *A. sativum* и анализе их экспрессии в ответ на заражение патогеном *Fusarium proliferatum*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Идентификация и структурная характеристика генов FMOs у A. sativum. Поиск последовательностей генов флавиносодержащих монооксигеназ проводили в геноме и транскриптом чеснока *A. sativum* cv. Ershuizao, доступных в базе данных NCBI (PRJNA606385, сборка Garlic.V2.fa; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) [17]. В качестве референса использовали последовательности мРНК генов FMOs *A. thaliana* [14]. Выравнивание и анализ последовательностей FMOs проводили в программе MEGA 7.0 (<https://www.megasoftware.net/>). Консервативные домены и мотивы белков определяли с помощью программ NCBI-CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), MEME 5.1.1 (<http://meme-suite.org/tools/meme>) и литературных данных. Для поиска доменов связывания с кофакторами FAD/NADPH использовали программу Cofactory-1.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?Cofactory-1.0>) и литературные данные. Молекулярную массу и изоэлектрическую точку (pI) рассчитывали с помощью ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>). Локализацию белков предсказывали с помощью программы LocTree3 (<https://roslab.org/services/loctree3/>). Цис-регуляторные элементы в промоторных областях идентифицировали с помощью PlantCare (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>).

Растительный материал. Для проведения работы использовали растения чеснока сортов Сармат и Стрелец (луковицы предоставлены Федеральным научным центром овощеводства, Московская обл.). Растения выращивали в условиях экспериментальной установки искусственного климата (ЭУИК, ФИЦ Биотехнологии РАН; день/ночь — 16/8 ч, 22/16°C; освещенность 190 мкМ/(м²/с)). Через 90 дней собирали различные органы растения (корни, донце, луковица, листья, цветонос, цветоложе и воздушные луковицы) и использовали для анализа профиля экспрессии генов FMOs.

Для исследования изменения уровней транскриптов генов FMOs в ответ на инфицирование грибным патогеном *F. proliferatum* использовали

зубки устойчивого (Сармат) и восприимчивого (Стрелец) к фузариозной гнили сортов чеснока. Заражения проводили по описанной нами ранее методике [18, 19]: зубки каждого сорта стерилизовали в 70%-ном этаноле (3 мин), промывали дистиллированной водой, помещали на чашки Петри с влажной фильтровальной бумагой и инкубировали при 25°C в темноте. Через 72 ч половину зубков каждого сорта заражали грибом *F. proliferatum* изолят Стрелец [20] путем вымачивания в течение 5 мин в суспензии конидий (~10⁶ конидий/мл). Затем зубки помещали на чашки Петри и инкубировали при 25°C в темноте. Неинфицированные зубки использовали в качестве контроля. Для анализа экспрессии генов *FMOs* у каждого из сортов чеснока отбирали корни через 24 и 96 ч после заражения (по два биологических повтора для каждого сорта).

Выделение ДНК, РНК, синтез кДНК. Собранный растительный материал растирали в жидком азоте и использовали для выделения суммарной РНК с последующей очисткой от примесей ДНК (наборы RNeasy Plant Mini Kit и RNase free DNasey set; QIAGEN, Германия). На основе полученных препаратов РНК синтезировали кДНК (набор GoScript™ Reverse Transcription System, Promega, США). Из ткани листьев выделяли геномную ДНК с помощью СТАВ-буфера (100 мМ Tris (pH 8.0), 20 мМ ЭДТА (pH 8.0), 2 М NaCl, 2% PVP, 5% меркаптоэтанола (w/v), 2% СТАВ (w/v), 10 мМ ацетата аммония). Качество препаратов ДНК и РНК оценивали электрофорезом в 1%-ном агарозном геле. Концентрацию препаратов нуклеиновых кислот измеряли на приборе Qubit® Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) с помощью соответствующих реактивов (Qubit RNA HS Assay Kit и Qubit DS DNA HS Assay Kit, Invitrogen, США).

Аmplification и секвенирование последовательности *AsFMO35*. С помощью праймеров (5'-TCACACTTGTCCCGGTCAT-3' и 5'-CAGT-TAATCCACATCACCTCA-3') на препаратах кДНК корней сортов Сармат и Стрелец амплифицировали и секвенировали кодирующие последовательности гена *AsFMO35*. На препаратах геномной ДНК сортов Сармат и Стрелец с помощью праймеров (5'-TAGCCAAACCATAACTTTCTAG-3' и 5'-ACGT-TATCGAGAACGTCTTCA-3') амплифицировали и секвенировали промоторную (~1000 пн) область гена *AsFMO35*. Полученные ампликоны секвенировали на ABI Prism 3700 DNA Analyzer (ЦКП Биоинженерия, ФИЦ Биотехнологии РАН) и анализировали в программе MEGA7.0.

Определение профиля экспрессии генов *FMOs*. Профиль экспрессии генов *FMOs* определяли методом ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР). Для этого на основе идентифицированных кодирующих последовательностей генов *FMOs* разрабаты-

Таблица 1. Последовательности праймеров для проведения РВ-ПЦР

Ген	Последовательность праймера (5' → 3')
<i>AsFMO4</i>	CAGTGTTCAGCACGGAGTTGAT CATTTGGTGGAAAGCTTGGGATG
<i>AsFMO10</i>	GTGCGATCTTGTACCTTTAGCTG TTCTGGTCCTTTGCCCTGAC
<i>AsFMO11</i>	CTGGCGAATGGCATGTGACTA GTAGGGATCCTTGGTTTGTGCT
<i>AsFMO12</i>	CTGGGTACAAGGGGGATGAAAAT CTAGTTGTGGGATACGAGGG
<i>AsFMO18</i>	TGCGGAGATTCCTGGAATTGATG GGCAAATCTGGCAACATCTCTTG
<i>AsFMO34</i>	ATGAGGTCAGGACGTGGGAT CTGAAGCGTCCAATGCACAG
<i>AsFMO35</i>	CCGAGCCTATAGAGACTGATC GTAGTAGTAGTTGGAGAAGAAGCA

вали специфичные праймеры (табл. 1). Относительный уровень экспрессии исследуемых генов *FMOs* оценивали, используя референсные гены *GAPDH* и *UBQ* [19]. Для РВ-ПЦР использовали набор “Реакционная смесь для проведения РВ-ПЦР в присутствии SYBR GreenI и ROX” (ООО “Синтол”, Россия) и термоциклер CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США). Реакции проводили в двух биологических и трех технических повторах в следующих условиях: 95°C – 5 мин; 40 циклов (95°C – 15 с, 62°C – 50 с). Для визуализации данных и статистической обработки результатов использовали программу GraphPad Prism v 8 (<https://www.graphpad.com>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация и анализ последовательностей *FMOs* чеснока

В результате проведенного поиска в геноме чеснока *A. sativum* (cv. Ershuizao, PRJNA606385) [17] было идентифицировано 39 последовательностей, кодирующих флавиноидсодержащие монооксигеназы, что существенно больше, чем у модельного вида *A. thaliana* (29 генов), и почти совпадает с количеством генов данного семейства у ячменя (41) [1] (табл. 2). Это может быть связано с повышенной скоростью дупликации генов *A. sativum* в связи с мужской стерильностью данного вида и адаптацией чеснока к самым разным эколого-географическим нишам [21].

Было определено, что идентифицированные гены *AsFMOs* локализируются на хромосомах 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8, при этом на хромосомах 2, 3, 4 и 6 гены располагаются преимущественно кластерами (рис. 1,а), что предполагает происхождение последних в результате кластерной дупликации и возмож-

Таблица 2. Характеристика генов *AsFMOs*, найденных в геноме *A. sativum* cv. Ershuizao (PRJNA606385)

Ген	Ген ID [17]	Локализация в геноме	Длина, пн	Число экзонов	CDS, пн	Белок, ао	MW, кДа	pI
<i>AsFMO1</i>	Asa2G00563.1	chr2:178565470..178567394	1925	5	1566	521	60.51	8.68
<i>AsFMO2</i>	Asa2G00564.1	chr2:179085308..179087234	1927	5	1569	522	60.05	8.61
<i>AsFMO3</i>	Asa2G00566.1	chr2:179585518..179587463	1946	5	1497	498	57.29	7.90
<i>AsFMO4</i>	Asa2G01829.1	chr2:509274501..509278822	4322	3	1527	508	57.23	7.13
<i>AsFMO5</i>	Asa2G01873.1	chr2:520505798-520507326	1529	3	1260	419	47.14	7.54
<i>AsFMO6</i>	Asa2G02211.1	chr2:613535251-613536670	1420	3	1257	418	46.8	8.38
<i>AsFMO7</i>	Asa2G05158.1	chr2:1404441386..1404443330	1945	5	1572	523	60.35	8.41
<i>AsFMO8</i>	Asa2G05159.1	chr2:1404695990..1404697879	1890	3	897	298	34.38	9.25
<i>AsFMO9</i>	Asa3G01542.1	chr3:413006960-413008314	1355	4	1101	366	40.71	8.87
<i>AsFMO10</i>	Asa3G01750.1	chr3:469416393..469423516	7124	5	1224	407	46.04	8.95
<i>AsFMO11</i>	Asa3G01757.1	chr3:470140014..470142303	2290	5	1554	517	58.26	7.86
<i>AsFMO12</i>	Asa3G01758.1	chr3:470836804..470839146	2343	5	1557	518	58.58	8.58
<i>AsFMO13</i>	Asa3G01764.1	chr3:471340029..471345878	5850	7	1668	555	62.80	6.13
<i>AsFMO14</i>	Asa3G01829.1	chr3:488097425-488098809	1385	4	1128	375	41.63	8.83
<i>AsFMO15</i>	Asa3G01832.1	chr3:488256596-488257950	1355	4	1101	366	40.43	8.62
<i>AsFMO16</i>	Asa3G04411.	chr3:1214016645..1214019971	3327	8	1035	344	39.36	6.11
<i>AsFMO17</i>	Asa3G04881.1	chr3:1356644444..1356647057	2614	4	966	321	36.33	6.45
<i>AsFMO18</i>	Asa3G05097.1	chr3:1436738168..1436757284	19117	7	1374	457	50.57	5.99
<i>AsFMO19</i>	Asa4G04959.1	chr4:1349548769..1349551625	2857	7	1371	456	52.39	6.64
<i>AsFMO20</i>	Asa4G04963.1	chr4:1349970865..1349974164	3300	7	1398	465	53.45	6.51
<i>AsFMO21</i>	Asa4G05174.1	chr4:1411323304-1411326160	2857	4	1194	397	43.74	8.85
<i>AsFMO22</i>	Asa5G01162.1	chr5:277255700-277257092	1393	4	1146	381	42.31	7.13
<i>AsFMO23</i>	Asa5G02100.1	chr5:537732944-537735419	2476	4	1203	400	44.38	9.13
<i>AsFMO24</i>	Asa5G03493.1	chr5:916164858-916166644	1878	3	1191	396	44.18	8.28
<i>AsFMO25</i>	Asa5G05156.1	chr5:1391616063-1391618783	2721	4	1203	400	44.95	9.23
<i>AsFMO26</i>	Asa6G01973.1	chr6:516470472-516471830	1359	4	1101	366	40.45	8.65
<i>AsFMO27</i>	Asa6G02575.1	chr6:653898897-653900282	1386	4	1116	371	41.19	8.81
<i>AsFMO28</i>	Asa6G02576.1	chr6:654152583-654153984	1402	4	1146	381	41.99	8.77
<i>AsFMO29</i>	Asa6G02577.1	chr6:654185319-654186677	1359	4	1101	366	40.62	9.03
<i>AsFMO30</i>	Asa6G04803.1	chr6:1294764827-1294769658	4832	4	1320	439	49.66	9.21
<i>AsFMO31</i>	Asa6G05996.1	chr6:1658620606-1658623858	3253	4	1233	410	45.94	9.00
<i>AsFMO32</i>	Asa7G00434.1	chr7.1:159310605-159311930	1326	2	1233	410	45.9	8.89
<i>AsFMO33</i>	Asa7G01650.1	chr7.1:452936301-452937625	1325	2	1233	410	45.9	8.89
<i>AsFMO34</i>	Asa7G07228.1	chr7.2:925441006..925444175	3170	5	1527	508	57.18	8.49
<i>AsFMO35</i>	Asa8G00387.1	chr8:123423317..123428786	5468	5	1536	511	57.66	6.35
<i>AsFMO36</i>	Asa0G00609.1	scaffold13024:6793-8304	1512	4	1230	409	46.23	6.52
<i>AsFMO37</i>	Asa0G01058.1	scaffold15137:38288-40207	1320	5	1128	375	42.27	8.81
<i>AsFMO38</i>	Asa0G01059.1	scaffold15138:21603-23787	2185	5	1065	354	40.04	8.87
<i>AsFMO39</i>	Asa0G03474.1	scaffold2776:21775-23668	1894	4	1197	398	44.72	8.27

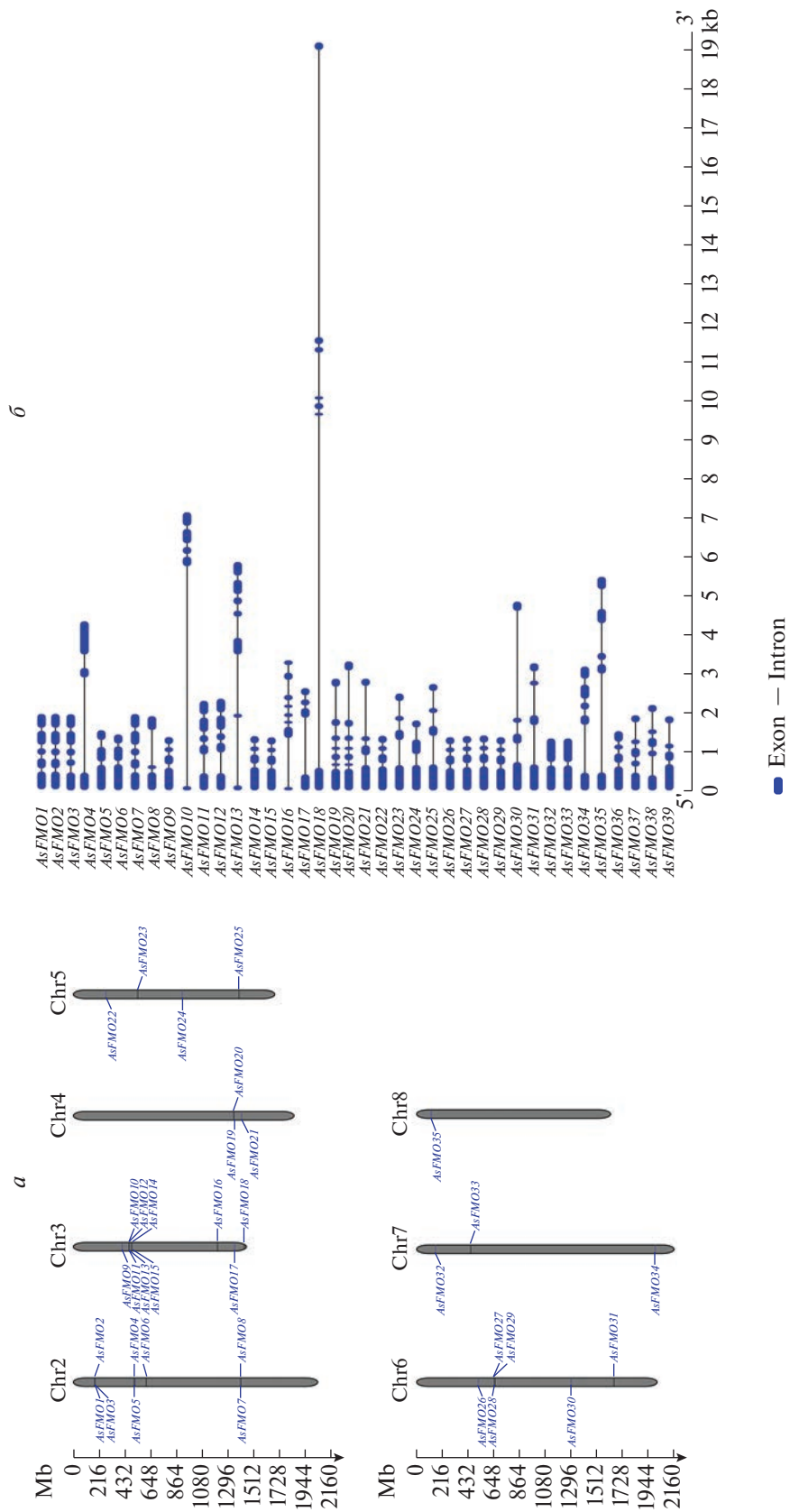


Рис. 1. Локализация генов *AsFMOs* на хромосомах чеснока *A. sativum* cv. Eishuizao (PRJNA606385) (а) и их экзон-интронная структура (б).

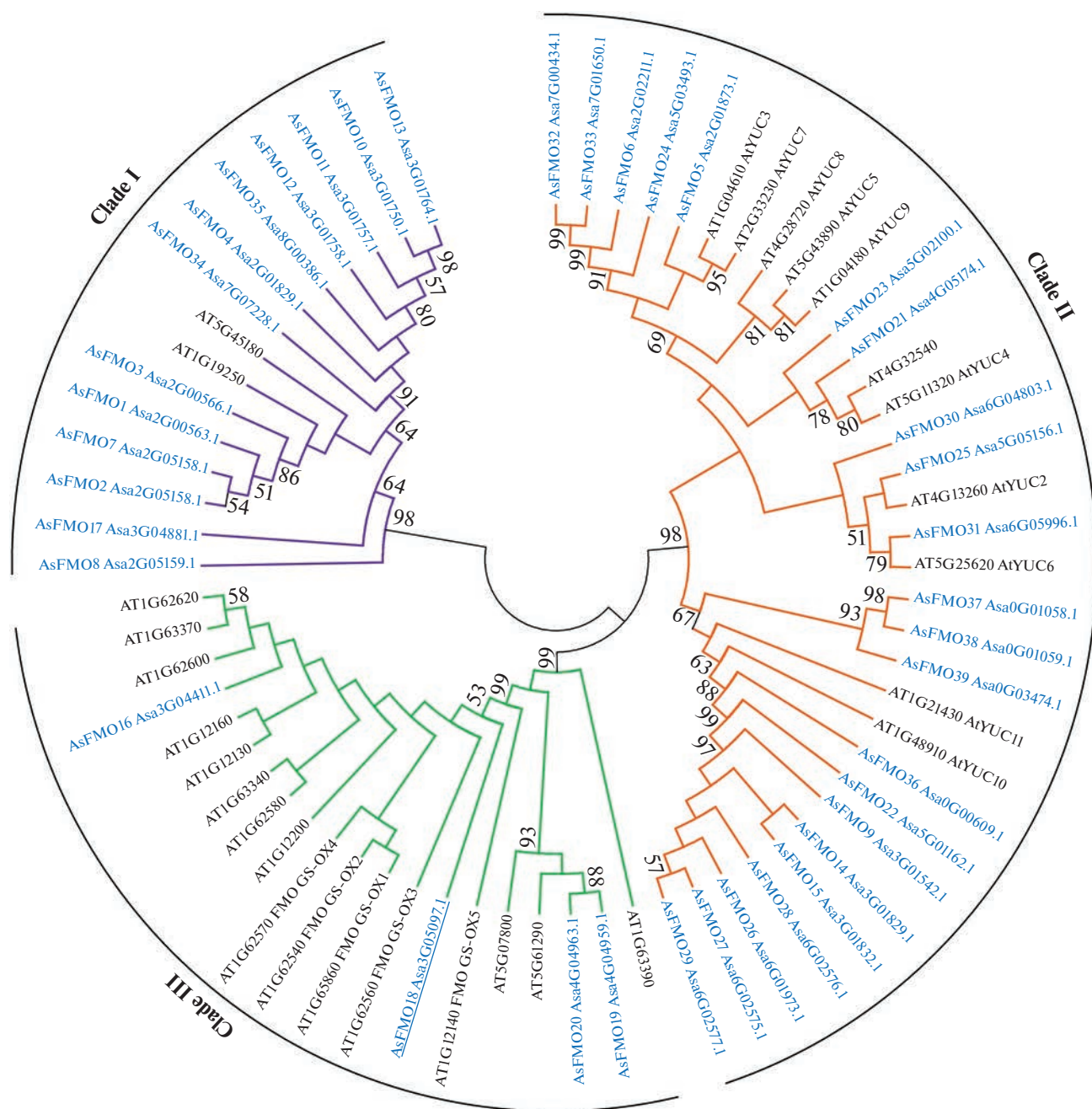


Рис. 2. Дендрограмма, построенная на основе сравнительного анализа аминокислотных последовательностей FMO чеснока *A. sativum* (As, синий шрифт) и *A. thaliana* (AT, черный шрифт). Дендрограмма получена с помощью программы MEGA 7.0 (метод Maximum Likelihood, 1000 бутстреп-реплик).

ное сходство их функций. Для генов *AsFMO36–39* хромосомная локализация выявлена не была, поскольку последовательности были обнаружены в некартированных скаффолдах (табл. 2).

Найденные гены *AsFMOs* имели длину от 1320 до 19117 пн и содержали от двух до восьми экзонов (рис. 1,б), размер кодирующих последовательностей варьировал от 897 до 1668 пн (табл. 2). Молекулярная масса белков *AsFMOs* варьирова-

ла в пределах 34.38–62.80 кДа, изоэлектрическая точка – от 5.99 до 9.25 (табл. 2). Согласно предсказанию в программе LocTree3 все белки *AsFMOs* локализованы в цитоплазме.

На дендрограмме, построенной на основе сравнительного анализа аминокислотных последовательностей FMO *A. sativum* и *A. thaliana*, было выявлено четкое разделение белков на три клады (рис. 2), что характерно для растительных FMO,



Рис. 3. Выравнивание аминокислотных последовательностей AsFMOs клады I (фиолетовый шрифт), клады II (желтый) и клады III (зеленый). Зелеными рамками выделены найденные с помощью программы Cofactory-1.0 мотивы связывания с FAD и NADPH, консенсус GxGxxG подчеркнут. Указаны мотивы FMO (оранжевая рамка) и FATGY (фиолетовая рамка).

согласно [1]. Члены клады I предположительно осуществляют реакцию N-оксигенации и вовлечены в ответ на заражение патогенами [11]. В кладу I вошли только два белка *A. thaliana* и 13 белков *A. sativum*, что может свидетельствовать о повышенной адаптивности чеснока к неблагоприятным условиям окружающей среды, а также о возможной избыточной, дополняющей и/или взаимозаменяющей роли генов *AsFMO* по отношению к друг другу. В кладу II, объединяющую FMO, вовлеченные в биосинтез ауксина [1], вошли 22 белка *A. sativum* и 11 *A. thaliana*. К кладе III, предположительно имеющей отношение к реакции S-оксигенации [1], относятся 16 белков *A. thaliana* и 4 –

чеснока, включая *AsFMO18*, участвующий в биосинтезе аллиина, согласно [14].

Интересно, что гены *AsFMO10–13* и *AsFMO14,15*, которые локализованы в одном кластере на хромосоме 3 (рис. 1, а), относятся при этом к разным кладам – I и III соответственно (рис. 2). Это может указывать на явление неофункционализации дуплицированных генов, либо о совмещении ими функций, свойственных для обеих клад.

С помощью программы Cofactory-1.0 и литературных данных [3, 22] в белках AsFMOs был проведен поиск мотивов связывания с FAD и NADPH, FMO-последовательности и других консервативных мотивов (рис. 3, табл. 3). В результате было

Таблица 3. Последовательности консервативных мотивов в белках AsFMOs. Выделенные зеленым аминокислотные остатки идентичны консенсусу

Белок	FAD-мотив GxGxxG	NADPH-мотив GxGxxG	FATGY-мотив F/LATGY	FMO-мотив FxGxxxHxxxY/F
Клада I				
AsFMO1	GGCISG	GYKKA	LATGF	FHCQVMHSLDY
AsFMO2	GGCISG	GYKKA	LATGF	FQCQVMHSLDY
AsFMO3	GGCISG	GYKKA	LATGF	FQCQVMHSLDY
AsFMO4	GAGLSG	CMKSG	FATGF	FSGKVIHSMDY
AsFMO7	GGCISG	GYKKA	LATGF	FQCQVMHSLDY
AsFMO8	GGCISG	н/о	н/о	н/о
AsFMO10	н/о	CLKSA	FATGY	LQCQVLHSDY
AsFMO11	GAGISG	CLKSA	FATGY	FQCQVLHSDY
AsFMO12	GAGISG	CSKSA	FATGY	FQCQVLHSDY
AsFMO13	GAGISG	н/о	FATGY	FQCQVLHSDY
AsFMO17	GAGISG	FLKSA	н/о	FQCQVLHSDY
AsFMO34	GAGLSG	CMKSG	LATGY	FKCKMVHSVEY
AsFMO35	GAGLSG	CKKSG	YATGY	FKCQVIHSLDY
Клада II				
AsFMO5	GAGPSG	CCNSG	YATGY	FSGEVLHASDY
AsFMO6	GAGPSG	CCNSG	MATGY	FGNPITHVCNY
AsFMO9	н/о	CCNSG	FATGY	FSGKVLHSSEF
AsFMO14	RAGPGG	CCNSG	FATGY	FSGKVLHSSEF
AsFMO15	н/о	CCNSG	FATGY	FGKVLHSSEF
AsFMO21	GAGPSG	CCNSG	FATGY	FCKRAVHTCGY
AsFMO22	GAGPGG	CCNSG	LATGY	FSGEVLHSSQY
AsFMO23	GAGPSG	SGNSG	LATGY	FKGLMHSSSEY
AsFMO24	GAGPSG	CCNSG	LATGY	CCTNVLHVSDY
AsFMO25	GAGPSG	CCNSG	FATGY	FECRKHVSAY
AsFMO26	н/о	CCNSG	FATGY	FSGKVLHSSEF
AsFMO27	GAGPGC	CCNSG	FATGY	FSGKVLHSSEF
AsFMO28	GAGPGG	CCNSG	FATGY	FSGKVLHSSEF
AsFMO29	н/о	CCNSG	FATGY	FSGKVMHSSEF
AsFMO30	GAGPSG	CCNSG	LATGY	FKCQIHTSCY
AsFMO31	GAGPSG	CCNSG	LATGY	YKCIVMHTSSY
AsFMO32	GAGPSG	CCNSG	MATGY	FGSQITHVSDY
AsFMO33	GAGPSG	CCNSG	MATGY	FGSQITHVSDY
AsFMO36	GAGPAG	SGNSG	FATGY	FKCDMMHSCQY
AsFMO37	GAGPAG	SGNSG	LATGY	FICKVMHSSEY
AsFMO38	н/о	SGNSG	LATGY	FICKVMHSSEY
AsFMO39	GAGPAG	SGNSG	LATGY	FICTDIAYIIASKYAFSELIQSLITGKVLHSSEY
Клада III				
AsFMO16	н/о	CCPSA	HC TGY	FVGLCNKVIIF
AsFMO18	GAGAAG	SSASA	HC TGY	FVGI PWKIVPF
AsFMO19	GAGPSG	CNSMSG	YC TGY	FVGI PRKLIGF
AsFMO20	GAGPSG	CNSMSG	YC TGY	FVGI PRKLIGF

Примечание. н/о – мотив не обнаружен.

показано, что AsFMO9, 10, 15, 16, 26, 29 и 38 не содержат FAD-связывающего мотива, а AsFMO8 и 13 – NADPH-связывающего мотива. В FAD-связывающем мотиве остальных белков AsFMOs (кроме AsFMO14 и 27) был идентифицирован консенсус складки Россмана “GxGxxG” (табл. 3). В NADPH-связывающем мотиве консенсус “GxGxxG” был выявлен только у AsFMOs клады II, тогда как в белках AsFMOs клады I и III последовательность консенсуса оказалась вариабельной (Gxxxxx, GxxxxG, GxGxxx) (табл. 3). Это находится в согласии с ранее опубликованными данными о том, что у растительных FMOs последовательность NADPH-связывающего мотива менее консервативна по сравнению с FAD-связывающим мотивом [3]. В подтверждение полученным нами данным все белки FMOs *A. thaliana* содержат в FAD-связывающем мотиве консенсус “GxGxxG”, в то время как консенсус “GxGxxG” в NADPH-связывающем мотиве выявлен только у белков подсемейства YUCCA (клады II), а у белков клады I и III – только в виде “Gxxxxx” или “GxxxxG” [23]. Возможно, это является характеристикой именно растительных белков FMO, относящихся к кладам I и III, что может быть связано с особенностями белковых взаимодействий в процессе выполнения функций в биосинтезе ауксинов или S-оксигенации субстратов.

FMO-идентифицирующий мотив был обнаружен во всех белках AsFMOs, кроме AsFMO8 (рис. 3). При этом у белков клады I и II он располагался между FAD- и NADPH-связывающими мотивами, а у белков клады III – на С-конце, что согласуется со структурной спецификой растительных белков FMO, касающейся локализации FMO-мотива, показанной ранее [24]. Так, расположение FMO-мотива на С-конце белков характерно для S-окисляющих FMO (клады III); у N-окисляющих FMO (клады I) и белков подсемейства YUCCA (клады II) FMO-мотив располагается между FAD- и NADPH-связывающими мотивами [1, 3]. В белке AsFMO39 FMO-мотив был более протяженным, чем в остальных белках AsFMOs (табл. 3). Подобное явление, а также отсутствие FMO-мотива (как у AsFMO8) ранее были выявлены у белков *A. thaliana* AT1G63390 (отсутствие мотива) и AT1G62580 (более протяженный мотив) [3]. Специфичный для FMO-мотива консенсус “FxGxxHxxxY/F” был найден в последовательности 26 белков AsFMOs и его менее консервативный вариант – у остальных белков (табл. 3). У *A. thaliana* консенсус “FxGxxHxxxY/F” содержался в FMO-мотивах белков клады I и II, а в белках клады III данный консенсус был менее консервативен [3].

Консервативный FATGY-мотив, обычно характерный для всех FMO [1], был идентифицирован на С-конце белков AsFMOs, кроме AsFMO8 и

17 (рис. 3, табл. 3). В белках клады I и II данный мотив более соответствовал консенсусу “F/LATGY”, а в белках клады III данный мотив был представлен только аминокислотами TGY. В целом наличие только аминокислот TGY в FATGY-мотиве характерно для растительных FMO клады III [3]. Это может свидетельствовать о значимости именно данных трех аминокислот для осуществления активности ферментами FMO растений. Отсутствие мотива может предполагать изменения в функции соответствующих белков.

В последовательностях белков AsFMOs была проведена сравнительная характеристика консервативных мотивов (MEME 5.1.1) (рис. 4). Было идентифицировано 15 мотивов и показано четкое соответствие полученных консенсусных профилей разделению белков на клады. Мотивы 12 и 13 были специфичны для белков клады I, тогда как мотивы 3, 5, 6 и 10 – для белков клады II, что предполагает связь данных мотивов с функциональной специфичностью AsFMOs. Для белков клады III специфичных мотивов обнаружено не было, что может указывать на более раннее происхождение данных AsFMOs и свойственную им первоначальную роль в реакции S-оксигенации.

Профиль экспрессии генов AsFMOs в различных органах растения чеснока

Транскриптомные данные *A. sativum* cv. Er-shuizao (PRJNA607255, GSE145455) [17] были использованы для *in silico* оценки уровней транскриптов генов AsFMOs в различных тканях растения чеснока (рис. 5). Было обнаружено, что экспрессия генов AsFMOs в анализируемых тканях низкая (FPKM < 10) либо отсутствует, за исключением генов AsFMO4, AsFMO10, AsFMO11, AsFMO18, AsFMO34 и AsFMO35, для которых во всех или в отдельных органах были выявлены значения FPKM > 10 (рис. 5). Транскрипты генов AsFMO4, AsFMO10, AsFMO11, AsFMO18 и AsFMO35 присутствовали во всех анализируемых органах чеснока, при этом максимальные значения экспрессии детектированы в корнях, листьях, ложном стебле, цветках и проростках. Ген AsFMO34 экспрессировался преимущественно в листьях и проростках (рис. 5).

Методом РВ-ПЦР нами был определен профиль экспрессии генов AsFMO4, AsFMO10, AsFMO11, AsFMO12, AsFMO18, AsFMO34 и AsFMO35 в корне, луковиче, донце, ложном стебле, листе, цветоносе, цветоложе и воздушной луковиче чеснока сорта Сармат (рис. 6). Было обнаружено, что транскрипты AsFMO4, AsFMO11, AsFMO12, AsFMO18 и AsFMO35 присутствуют во всех анализируемых органах. Максимальные уровни экспрессии гена AsFMO4 наблюдались в корнях и листьях, гена AsFMO11 – в цветоносе и цветоложе, AsFMO12 –

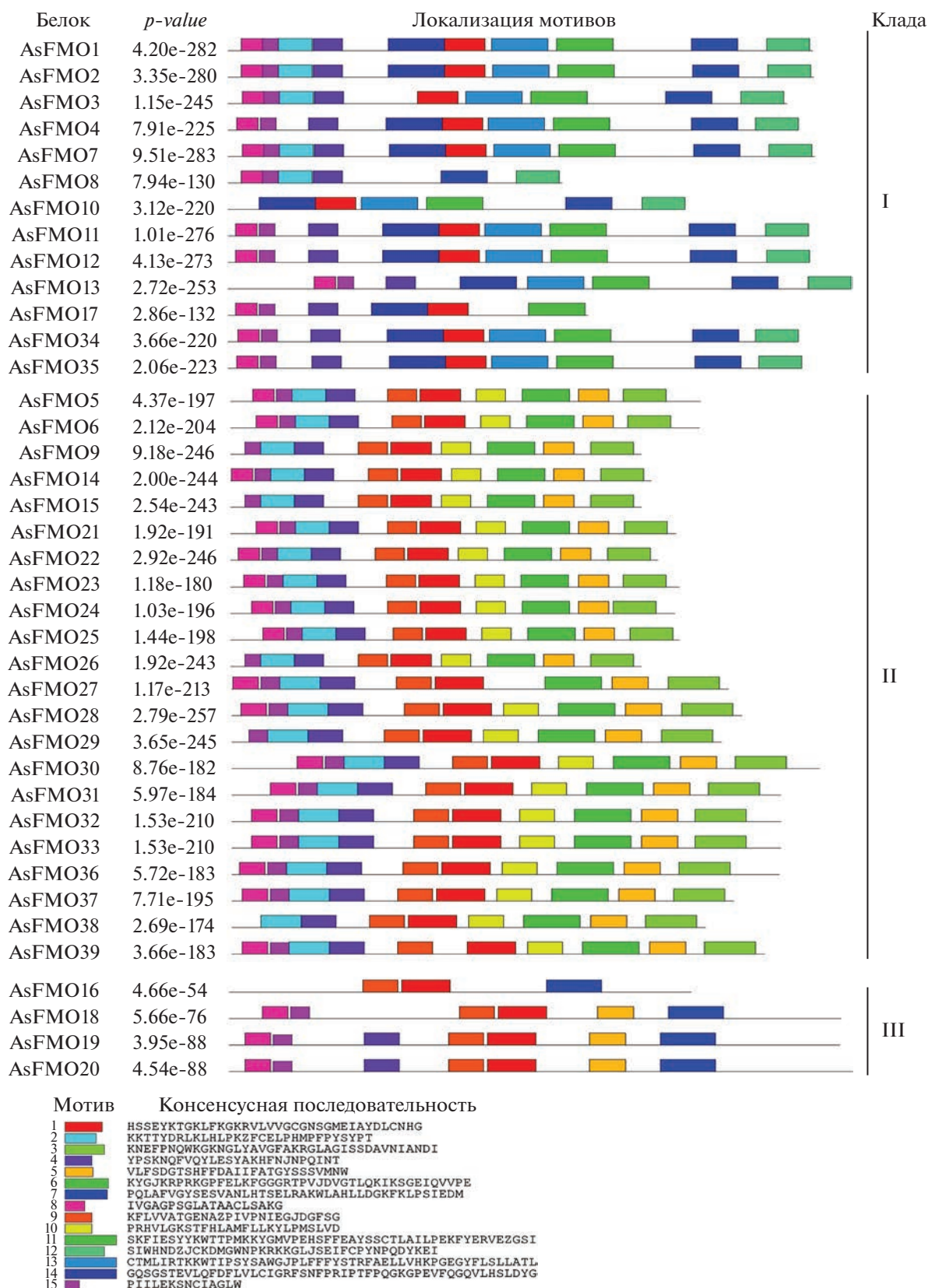


Рис. 4. Идентифицированные с помощью MEME 5.1.1 консервативные мотивы в белках AsFMOs.

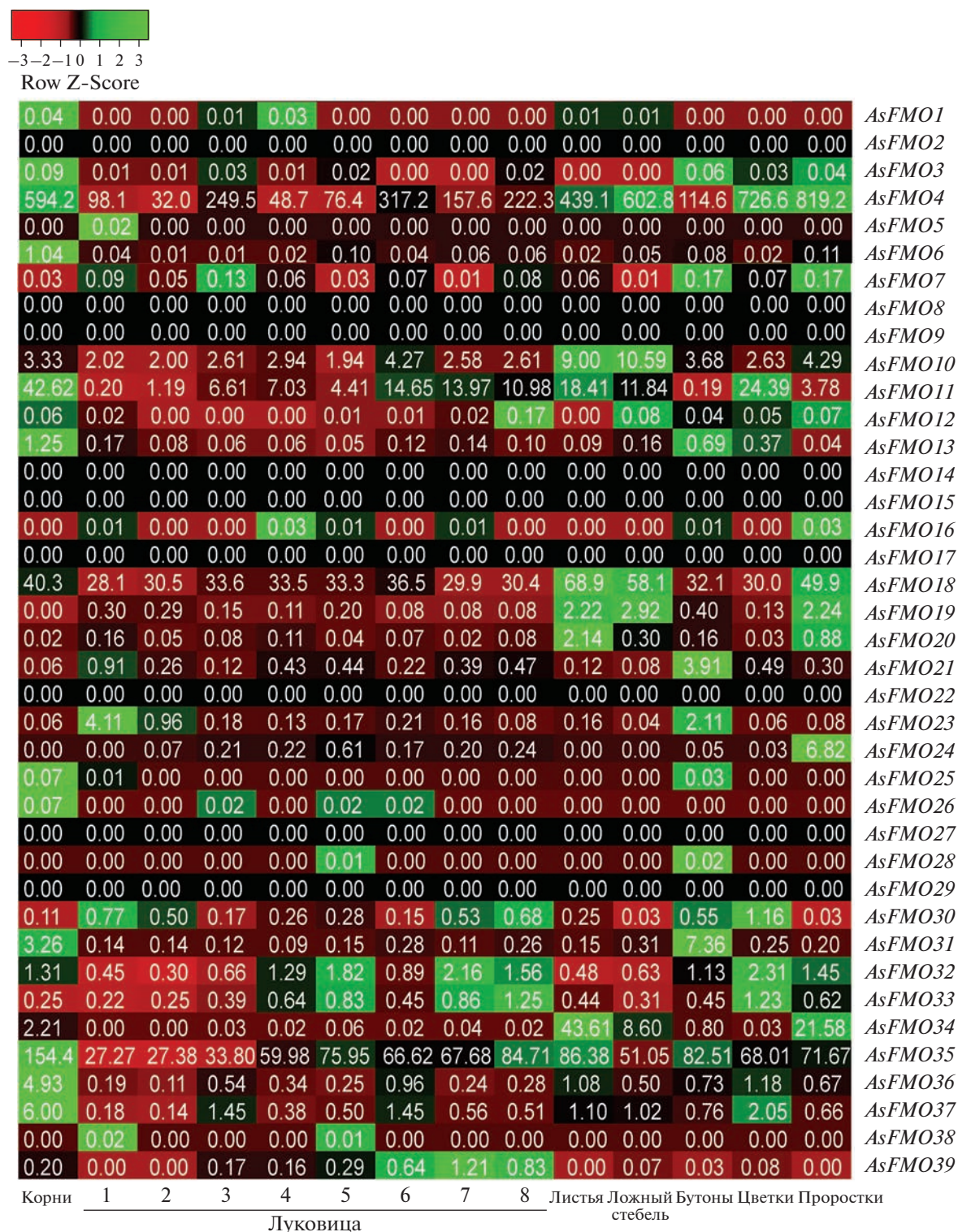


Рис. 5. Тепловая карта экспрессии генов *AsFMOs* у *A. sativum* cv. Ershuizao в корнях, луковицах (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 соответственно 192, 197, 202, 207, 212, 217, 222 и 227 дням развития луковицы), листьях, ложном стебле, бутонах, цветках и проростках. Цвета от красного к зеленому показывают градиент экспрессии гена от низкого к высокому. Цифрами указаны значения ФРКМ согласно транскриптомным данным [17].

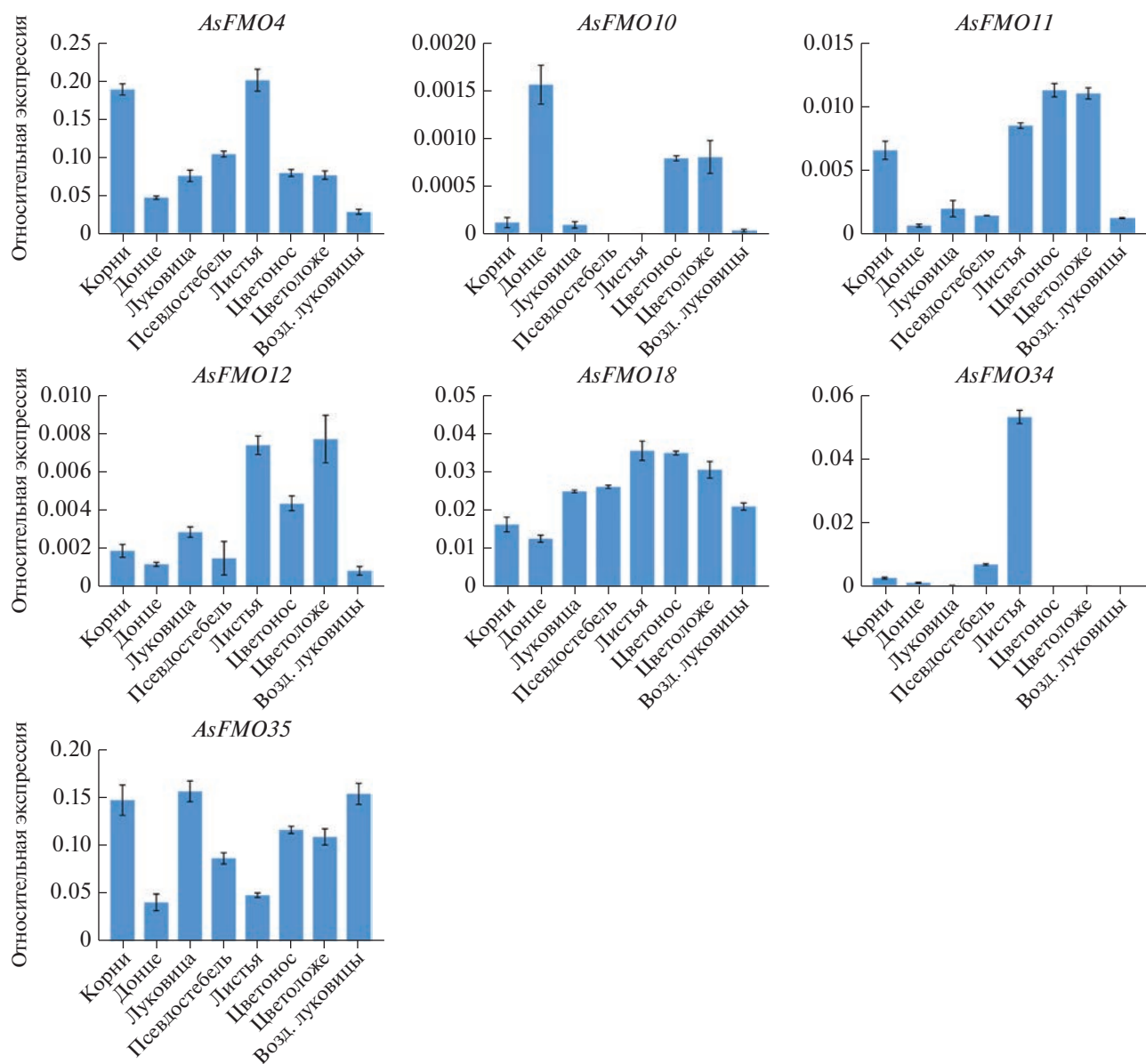


Рис. 6. Профиль экспрессии генов *AsFMOs* в различных органах чеснока сорта Сармат. Данные нормализовали по уровням транскрипции генов *GAPDH* и *UBQ*.

в листьях и цветоложе, *AsFMO35* — в корнях, луковице и воздушных луковицах (рис. 6). Ген *AsFMO18*, продукт которого участвует в биосинтезе аллиина [14], экспрессировался во всех анализируемых органах чеснока с максимумом в листьях, цветоносе и цветоложе. Максимальный уровень транскриптов гена *AsFMO10* был выявлен в донце, при этом в ложном стебле и листьях транскрипты *AsFMO10* отсутствовали. Максимальный уровень экспрессии *AsFMO34* был детектирован в листьях, а в цветоносе, цветоложе и воздушных луковицах транскрипты данного гена зафиксированы не были (рис. 6).

Полученные результаты в целом согласуются с данными экспрессионного *in silico* анализа *A. sativum* cv. Ershuizao — максимальные уровни транскриптов генов *AsFMOs* характерны для корней и листьев (рис. 5). Исключение составили данные по экспрессии *AsFMO12* — по данным транскриптомного анализа слабая экспрессия данного гена наблюдается в корнях, ложном стебле, цветках и проростках, тогда как по данным РВ-ПЦР — ген экспрессируется во всех органах с максимумом в листьях и цветоложе (рис. 6). Это может быть связано с различиями в генотипе анализируемых сортов cv. Ershuizao (*in silico*) и Сармат (РВ-ПЦР).

Профиль экспрессии генов AsFMOs в ответ на заражение Fusarium proliferatum

С целью определить, участвуют ли гены *AsFMOs* в ответе на биотические стрессы, нами было исследовано изменение уровней транскриптов генов *AsFMO4*, *AsFMO10*, *AsFMO11*, *AsFMO12*, *AsFMO18*, *AsFMO34* и *AsFMO35* в ответ на заражение патогеном *F. proliferatum*. Анализ проводили методом РВ-ПЦР в корнях чеснока сортов Сармат (устойчив к фузариозной гнили) и Стрелец (восприимчив к фузариозной гнили) через 24 и 96 ч после заражения *F. proliferatum* (рис. 7).

В корнях контрольных растений (без заражения) сортов Сармат и Стрелец уровень транскриптов генов *AsFMOs* не менялся или менялся незначительно в период 24–96 ч, за исключением генов *AsFMO11* и *AsFMO12* у сорта Сармат и гена *AsFMO35* у сорта Стрелец (резкое падение экспрессии в период 24–96 ч); также для гена *AsFMO4* у сорта Стрелец и *AsFMO18* у сорта Сармат наблюдался легкий подъем уровня транскриптов от 24 к 96 ч (рис. 7).

Через 24 ч после заражения *F. proliferatum* в корнях обоих сортов была выявлена активация транскрипции анализируемых генов *AsFMOs*, за исключением *AsFMO11* у сорта Сармат, уровень транскриптов которого рос, но незначительно (рис. 7).

Через 96 ч после заражения у устойчивого к фузариозной гнили сорта Сармат активировалась транскрипция генов *AsFMO4*, *AsFMO11*, *AsFMO12* и *AsFMO35*, а уровни экспрессии *AsFMO10* и *AsFMO18* остались на одном уровне с контролем. В то же время у восприимчивого сорта Стрелец экспрессия большинства генов осталась на уровне контроля, и только у двух генов, *AsFMO12* и *AsFMO35*, оказалась повышенной.

В целом экспрессионный ответ генов *AsFMOs* на заражение *F. proliferatum* в корнях чеснока сортов Сармат и Стрелец был сходен, за исключением реакции гена *AsFMO35*. По отношению к контролю у устойчивого к фузариозной гнили сорта Сармат в точке 96 ч уровень транскриптов гена *AsFMO35* возрос в 7 раз, а у восприимчивого сорта Стрелец – только в 2 раза (рис. 7).

Полученные данные позволяют предположить, что дифференциальная экспрессия генов *AsFMO4*, *AsFMO11*, *AsFMO12* и *AsFMO35* может быть связана со степенью устойчивости генотипов чеснока к фузариозной гнили. Все четыре гена входят в кладу I (рис. 2), т.е. предположительно участвуют в реакции N-оксигенирования субстратов, что указывает на связь данного процесса с устойчивостью растения к патогенам наряду с S-оксигенированием у видов Brassicaceae [12, 13]. Только один ген клады III (ассоциированной с S-оксигенированием; [1]) – *AsFMO18* – был использован нами для сравнительного экспресси-

онного анализа. Однако для обоих сортов, независимо от их устойчивости/восприимчивости к фузариозу, экспрессионный ответ гена *AsFMO18* на заражение был практически идентичен. Это может свидетельствовать о том, что для действенной стимуляции устойчивости к патогенам кроме генов *AsFMO* клады I (и N-оксигенирования) необходимо участие также генов *AsFMO* клады III (и S-оксигенирования).

Анализ последовательностей гена AsFMO35 у сортов чеснока Сармат и Стрелец

Поскольку в корнях сортов чеснока Сармат и Стрелец, контрастных по устойчивости к фузариозной гнили, была обнаружена дифференциальная экспрессия гена *AsFMO35* в ответ на заражение патогеном *F. proliferatum*, нами были проанализированы кодирующие последовательности данного гена и его промоторной области (~1000 пн до старт-кодона). Кодирующие последовательности гена *AsFMO35* были одинаковыми у сортов Сармат и Стрелец и отличались от референса (сорт Ershuizao) четырьмя нуклеотидными заменами (C23G, C120A, A271G и G918A), две из которых приводили к замещениям аминокислотных остатков (S8C и N91D). В промоторной области гена *AsFMO35* у сортов Сармат и Стрелец, в сравнении с референсом, было выявлено пять нуклеотидных замен и однонуклеотидная вставка (–881(A→T), –662(G→A), –628(G→A), –582(T→C), –469(A→C) и –448 insT). При этом замены в положениях –881 и –628 были специфичны для сорта Сармат, замена в положении –582 – специфична для сорта Стрелец.

С помощью программы PlantCare в промоторных областях гена *AsFMO35* сортов Сармат, Стрелец и Ershuizao был проведен поиск *cis*-регуляторных элементов. Всего было найдено 13 типов *cis*-регуляторных элементов, связанных с ответом на гормоны (ABRE, AuxRR-core, TGA-element и ERE), стрессы (MYB, MYC и STRE), свет (Box 4, 3-AF1 binding site и TCT-motif) и с неизвестной функцией (CCGTCC-motif, A-box и AAGAA-motif) (табл. 4). У восприимчивого к фузариозной гнили сорта Стрелец специфичная замена в положении –582(T→C) привела к возникновению элемента ABRE, который отсутствует в промоторах *AsFMO35* у сортов Сармат и Ershuizao (табл. 4). Нуклеотидная замена в положении 662(G→A) у сортов Сармат и Стрелец привела к появлению *cis*-элемента 3-AF1 binding site, который отсутствовал в промоторе у св. Ershuizao. Как было показано ранее, элемент 3-AF1 binding site встречается в промоторах генов, вовлеченных в ответы на различные стрессы. Например, у винограда (*Vitis quinquangularis*) элемент 3-AF1 binding site является одним из ключевых *cis*-регулятор-

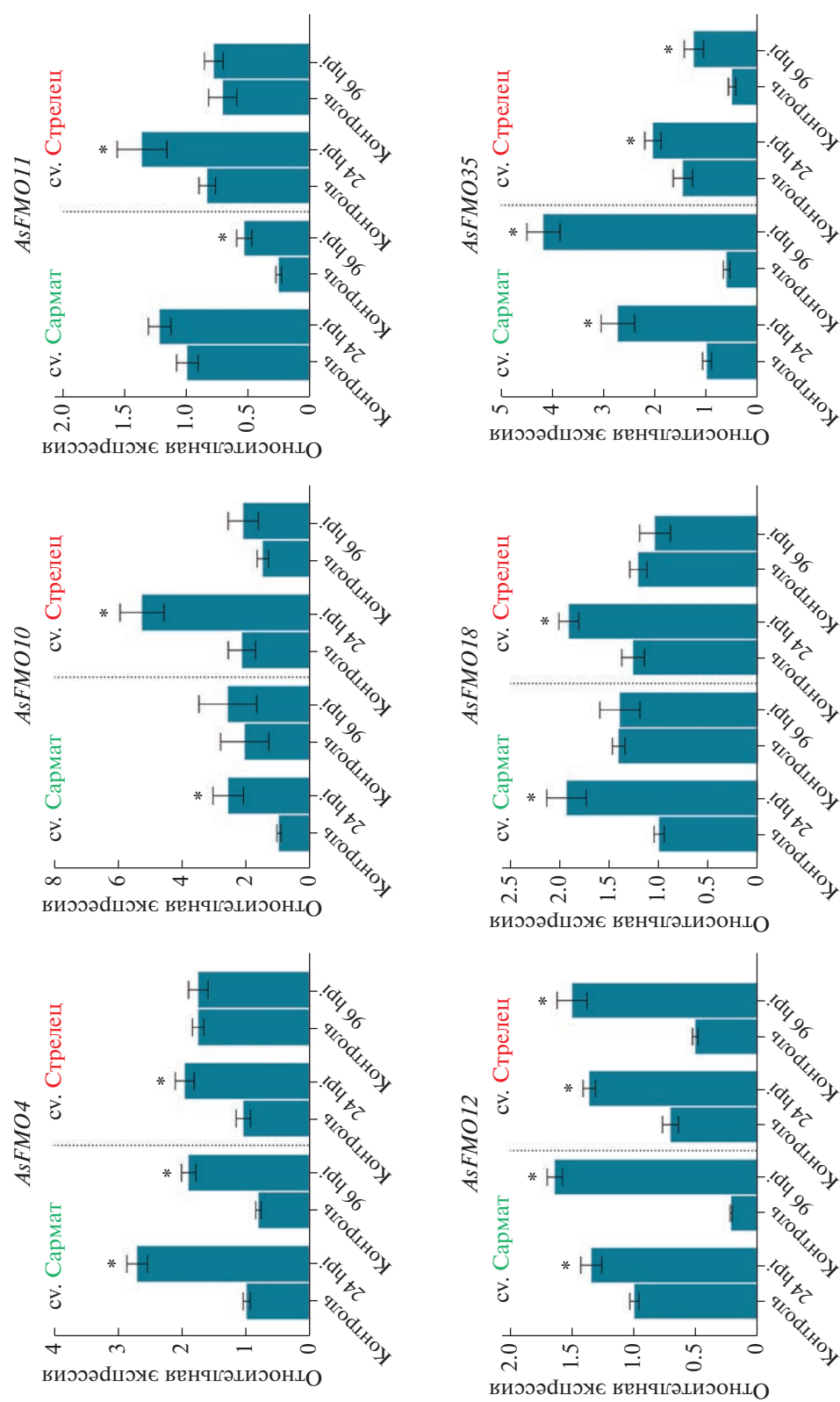


Рис. 7. Изменение уровней транскриптов генов *AsFM*0s в корнях чеснока сортов Сармат (устойчивый) и Стрелец (восприимчивый) через 24 и 96 ч после заражения *F. proliferatum*. Данные нормализовали по уровням транскриптов генов *GAPDH* и *UBQ* и представляли как кратное изменение (среднее \pm стандартная ошибка) от контроля (24 ч) сорта Сармат, принятого за 1; * p -value < 0.01 в сравнении с неинфицированным контролем. hpi — часов после заражения.

Таблица 4. Цис-регуляторные элементы в промоторной области (~1000 пн) гена *AsFMO35* у сортов Ershuizao, Сармат и Стрелец

Сорт	ABRE	AuxRR-core	TGA-element	ERE	Box 4	3-AF1 binding site	TCT-motif	CCGTCC-motif	MYB	MYC	A-box	AAGAA-motif	STRE
Ershuizao		2	1	2	1		2	1	3	2	1	1	2
Сармат		2	1	2	1	1	2	1	3	2	1	1	1
Стрелец	1	2	1	2	1	1	2	1	3	2	1	1	1

ных элементов в промоторе гена *MYB15*, который играет важную роль в устойчивости растений к биотическим и абиотическим стрессам [25].

В целом, если говорить о различиях в регуляции гена *AsFMO35* у сортов Сармат и Стрелец, контрастных по устойчивости к фузариозной гнили, то единственное расхождение связано с появлением элемента ABRE (сцеплен с ответом на АБК) в случае сорта Стрелец (восприимчив к фузариозу) (табл. 4). Поскольку АБК играет одну из ключевых ролей в обеспечении устойчивости растения к стрессам [26], можно предположить, что появление данного элемента в промоторе *AsFMO35* могло повысить степень участия гена в ответе растения чеснока на инфекцию.

Таким образом, в геноме чеснока было идентифицировано 39 генов флавин-содержащих монооксигеназ. Филогенетический анализ разделил *AsFMOs* на три клады, ассоциированные с N-оксигенированием (I; 22 гена), биосинтезом ауксинов (II; 13 генов) и S-оксигенированием (III; 4 гена). Диспропорция в количестве членов каждой из трех клад (увеличение в кладах I и II, сокращение в кладе III) у чеснока в сравнении с *A. thaliana* может свидетельствовать о повышенной адаптивности чеснока к стрессовым факторам (гены клады I) и значении триптофан-зависимого пути биосинтеза ауксинов (гены клады II).

В аминокислотных последовательностях *AsFMOs* были найдены характерные мотивы связывания с FAD и NADPH, FMO-идентифицирующий мотив и FATGY-мотив, присутствие и вариабельность которых подтверждали принадлежность к кладам. Отсутствие одного или нескольких мотивов в некоторых *AsFMOs* может быть связано с изменением или потерей функции у данных белков.

Анализ профиля экспрессии генов *AsFMOs* показал, что транскрипты *AsFMOs* (за исключением *AsFMO34*) присутствуют во всех органах чеснока с максимумом в корнях, листьях, цветоносе и воздушных луковицах.

Анализ экспрессионного ответа выборки генов *AsFMO* на заражение патогенным грибом *F. proliferatum* в корнях чеснока выявил дифференциальную экспрессию генов клады I *AsFMO4*, *AsFMO11*, *AsFMO12* и *AsFMO35* между сортами Сармат и Стрелец, контрастными по устойчивости к фузариозной гнили. Такой ответ указывает на связь реакции N-оксигенирования с устойчивостью растения к патогенам наряду с S-оксигенированием. Экспрессионный ответ гена клады III (ассоциированной с S-оксигенированием) – *AsFMO18* – был идентичен для обоих сортов, независимо от их устойчивости/восприимчивости к фузариозу, что предполагает обязательное совместное участие генов клады I и III (N- и S-оксигенирования) в стимуляции устойчивости растения к патогенам.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (№ 21-76-00007) и Министерства науки и высшего образования РФ.

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. Thodberg S., Jakobsen Neilson E.H. The “Green” FMOs: diversity, functionality and application of plant flavoproteins // *Catalysts*. 2020. V. 10. Article 329. <https://doi.org/10.3390/catal10030329>
2. Van Berkel W.J.H., Kamerbeek N.M., Fraaije M.W. Flavoprotein monooxygenases, A diverse class of oxidative biocatalysts // *J. Biotechnol.* 2006. V. 124. P. 670–689. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.03.044>
3. Schlaich N.L. Flavin-containing monooxygenases in plants: looking beyond detox // *Trends Plant Sci.* 2007. V. 12. P. 412–418. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.08.009>

4. Ziegler D.M. Flavin-containing monooxygenases: Catalytic mechanism and substrate specificities // *Drug Metab. Rev.* 1988. V. 19. P. 1–32.
5. Ziegler D.M. An overview of the mechanism, substrate specificities, and structure of FMOs // *Drug Metab. Rev.* 2002. V. 34. P. 503–511.
<https://doi.org/10.1081/dmr-120005650>
6. Yanni S.B., Annaert P.P., Augustijns P. et al. Role of flavin-containing monooxygenase in oxidative metabolism of voriconazole by human liver microsomes // *Drug Metab. Dispos.* 2008. V. 36. P. 1119–1125.
<https://doi.org/10.1124/dmd.107.019646>
7. Rossner R., Kaeberlein M., Leiser S.F. Flavin-containing monooxygenases in aging and disease: Emerging roles for ancient enzymes // *J. Biol. Chem.* 2017. V. 292. P. 11138–11146.
<https://doi.org/10.1074/jbc.R117.779678>
8. Krueger S.K., Williams D.E. Mammalian flavin-containing monooxygenases: Structure/function, genetic polymorphisms and role in drug metabolism // *Pharmacol. Ther.* 2005. V. 106. P. 357–387.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.01.001>
9. Zhao Y., Christensen S.K., Fankhauser C. et al. A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis // *Science*. 2001. V. 291. P. 306–309.
<https://doi.org/10.1126/science.291.5502.306>
10. Won C., Shen X., Mashiguchi K. et al. Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by tryptophan aminotransferases of *Arabidopsis* and YUCCAs in *Arabidopsis* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108(45). P. 18518–18523.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1108436108>
11. Hartmann M., Zeier T., Bernsdorff F. et al. Flavin monooxygenase-generated N-hydroxypipicolinic acid is a critical element of plant systemic immunity // *Cell*. 2018. V. 173(2). P. 456–469.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.049>
12. Halkier B.A., Gershenzon J. Biology and biochemistry of glucosinolates // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2006. V. 57. P. 303–333.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105228>
13. Kong W., Li J., Yu Q. et al. Two novel flavin-containing monooxygenases involved in biosynthesis of aliphatic glucosinolates // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7. Article 1292.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01292>
14. Yoshimoto N., Onuma M., Mizuno S. et al. Identification of a flavin-containing S-oxygenating monooxygenase involved in alliin biosynthesis in garlic // *Plant J.* 2015. V. 83. P. 941–951.
<https://doi.org/10.1111/tpj.12954>
15. Yoshimoto N., Saito K. S-Alk(en)ylcysteine sulfoxides in the genus *Allium*: Proposed biosynthesis, chemical conversion, and bioactivities // *J. Exp. Bot.* 2019. V. 70. P. 4123–4137.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erz243>
16. Mishina T.E., Zeier J. The *Arabidopsis* flavin-dependent monooxygenase fmo1 is an essential component of biologically induced systemic acquired resistance // *Plant Physiol.* 2006. V. 141. P. 1666–1675.
<https://doi.org/10.1104/pp.106.081257>
17. Sun X., Zhu S., Li N. et al. A chromosome-level genome assembly of garlic (*Allium sativum*) provides insights into genome evolution and alliin biosynthesis // *Mol. Plant*. 2020. V. 13. P. 1328–1339.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.07.019>
18. Filyushin M.A., Anisimova O.K., Kochieva E.Z., Shchennikova A.V. Genome-wide identification and expression of chitinase class I genes in garlic (*Allium sativum* L.) cultivars resistant and susceptible to *Fusarium proliferatum* // *Plants*. 2021. V. 10. Article 720.
<https://doi.org/10.3390/plants10040720>
19. Анисимова О.К., Щенникова А.В., Кочиева Е.З., Филушин М.А. Идентификация генов монодегидроаскорбатредуктаз (MDHAR) чеснока (*Allium sativum* L.) и их участие в ответе на заражение *Fusarium proliferatum* // *Генетика*. 2022. Т. 58. № 7. С. 754–764.
<https://doi.org/10.31857/S0016675822070037>
20. Anisimova O.K., Seredin T.M., Danilova O.A., Filyushin M.A. First report of *Fusarium proliferatum* causing garlic clove rot in Russian federation // *Plant Dis.* 2021. V. 105. P. 3308.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-12-20-2743-PDN>
21. Tchórzewska D., Deryło K., Błaszczuk L., Winiarczyk K. Tubulin cytoskeleton during microsporogenesis in the male-sterile genotype of *Allium sativum* and fertile *Allium ampeloprasum* L. // *Plant Reprod.* 2015. V. 28. P. 171–182.
<https://doi.org/10.1007/s00497-015-0268-0>
22. Qin M., Wang J., Zhang T. et al. Genome-wide identification and analysis on YUCCA gene family in *Isatis indigotica* Fort. and IiYUCCA6-1 functional exploration // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. Article 2188.
<https://doi.org/10.3390/ijms21062188>
23. Hansen B.G., Kliebenstein D.J., Halkier B.A. Identification of a flavin-monooxygenase as the S-oxygenating enzyme in aliphatic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis* // *Plant J.* 2007. V. 50. P. 902–910.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03101.x>
24. Eswaramoorthy S., Bonanno J.B., Burley S.K., Swaminathan S. Mechanism of action of a flavin-containing monooxygenase // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. P. 9832–9837.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0602398103>
25. Li R., Zhu F., Duan D. Function analysis and stress-mediated cis-element identification in the promoter region of *VqMYB15* // *Plant Signal Behav.* 2020. V. 15. Article 1773664.
<https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1773664>
26. Nakashima K., Yamaguchi-Shinozaki K. ABA signaling in stress-response and seed development // *Plant Cell Rep.* 2013. V. 32. P. 959–970.
<https://doi.org/10.1007/s00299-013-1418-1>

Flavin-Containing Monooxygenases (FMO) Genes in Garlic *Allium sativum* L.: Genome-Wide Identification, Characterization, and Expression Analysis in Response to *Fusarium proliferatum*

O. K. Anisimova^a, A. V. Shchennikova^a, E. Z. Kochieva^a, and M. A. Filyushin^{a, *}

^aFederal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: michel7753@mail.ru

In this study, 39 flavin-containing monooxygenase genes were identified in the garlic (*Allium sativum* L.) genome. The distribution of AsFMOs into three phylogenetic clades associated with N-oxygenation (22 proteins), auxin biosynthesis (13 proteins), and S-oxygenation (4 proteins) has been shown. FAD and NADPH binding, FMO-identifying, and FATGY motifs were found in the AsFMO sequences. *AsFMOs* transcripts were present in all garlic organs with a maximum in roots, leaves, peduncle, and aerial bulbs. In response to infection with the pathogenic fungus *Fusarium proliferatum*, differential expression of clade I genes (*AsFMO4*, *AsFMO11*, *AsFMO12*, and *AsFMO35*) was detected in the roots of cv. Sarmat and Strelets, contrasting in *Fusarium* rot resistance. At the same time, the expression response of the clade III *AsFMO18* gene involved in the alliin biosynthesis was similar for both cultivars, regardless of their resistance/susceptibility to *Fusarium*. This suggests the clades I and III genes redundancy in plant responses to infection. The *AsFMO35* coding and regulatory sequences were analyzed in the Sarmat and Strelets cultivars. It was shown that the *AsFMO35* promoter differs in the presence of the ABA-associated *cis*-regulatory element ABRE in cv. Strelets susceptible to *Fusarium* rot.

Keywords: garlic, *Allium sativum* L., flavin-containing monooxygenase, *Fusarium* rot, expression analysis.

ФИЛОГЕОГРАФИЯ ВИДОВ ДУБА НА КАВКАЗЕ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ АНАЛИЗА ХЛОРОПЛАСТНОЙ ДНК

© 2023 г. С. А. Семерикова¹*, Х. У. Алиев², Н. В. Семериков³, В. Л. Семериков¹

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

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

³Ботанический сад Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, 620144 Россия

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

Поступила в редакцию 17.01.2023 г.

После доработки 30.01.2023 г.

Принята к публикации 13.02.2023 г.

С целью изучения биогеографии и истории умеренной биоты кавказского региона, одного из центров биологического разнообразия Евразии, была исследована филогеографическая структура хлоропластной ДНК робуроидных дубов (*Quercus* L., секция *Quercus*, Fagaceae). Было проанализировано 926 деревьев пяти видов (*Quercus robur*, *Q. petraea*, *Q. pubescens*, *Q. hartwissiana*, *Q. macranthera*) из 70 популяций, расположенных в разных частях Кавказа. Секвенирование пяти фрагментов общей длиной более 10000 пар нуклеотидов выявило восемь гаплотипов, для типирования которых использовались хлоропластные микросателлитные локусы (cpSSR), секвенирование и рестриктивный анализ. Филогенетическое дерево *Quercus*, включающее 34 хлоропластных гаплотипа западно-евроазиатских и восточно-азиатских робуроидных видов, подтвердило монофилию робуроидных дубов, образующих несколько линий, не имеющих между собой поддержанных топологических отношений. Выявленные на Кавказе гаплотипы относятся к двум дивергентным западно-евроазиатским линиям. Эти гаплотипы эндемичны для Восточного Причерноморья и не имеют родственных гаплотипов за его пределами, что свидетельствует о длительном обитании дубов на Кавказе и об исторических связях дубов кавказского региона с Восточным Крымом и Восточной Турцией при отсутствии обменов хлоропластной ДНК с восточно-европейской частью ареала. Результаты настоящего исследования показывают, что кавказские популяции не могли вносить существенный вклад в колонизацию северных территорий и не испытывали влияния более северных популяций, по крайней мере путем переноса семян. Области распространения кавказских гаплотипов почти не пересекаются между собой, занимая определенные географические районы, вероятно благодаря расселению из отдельных ледниковых рефугиумов и генетическому дрейфу. Географическая структура изменчивости хлоропластной ДНК указывает на длительное присутствие дуба, помимо Западного Закавказья (Колхидский рефугиум), в районах Северо-Западного, Центрального, Восточного Кавказа и на Малом Кавказе. Совпадающий состав гаплотипов исследованных видов *Quercus* в пределах географических районов свидетельствует о долговременном совместном существовании разных видов в разных частях Кавказа.

Ключевые слова: филогеография, Кавказ, *Quercus*, хлоропластная ДНК, популяционная структура, рефугиумы, молекулярная филогения.

DOI: 10.31857/S001667582307010X, **EDN:** QQLYKV

Расположенные на юге европейской лесной зоны горные области, граничащие со средиземноморским бассейном, характеризуются стабильностью среды, способствующей сохранению в течение многих ледниковых циклов популяций предшественников умеренной биоты и аккумуляции генетического разнообразия [1]. Кавказ является одним из самых биологически богатых регионов умеренного климата, признанным “очагом биоразнообразия” [2–5], в котором сочетаются элементы

трех флористических областей: Циркумбореальной, Средиземноморской и Ирано-Туранской [6]. Ввиду сложной геологической истории, изолированного географического положения и высокого разнообразия климатических и эдафических условий кавказский регион создает уникальные возможности для эволюции умеренной и бореальной биоты. Исследования генетического разнообразия кавказских популяций растений и животных [4, 7–15] выявили внутрорегиональные

различия и дифференциацию с европейскими частями ареалов, имеющую у разных видов разную структуру. Для описания истории растительности наиболее информативными могут быть филогеографические исследования лесообразующих видов умеренной флоры, в том числе широколиственных видов деревьев.

Практически во всех районах Кавказа наиболее распространенной лесной породой является дуб (род *Quercus* L.) [3, 16]. В горах представители *Quercus* формируют обширный пояс дубовых лесов. Они обильны во многих растительных формациях, от влажных низменностей до ксерофитных высокогорных местообитаний. Виды дуба на Кавказе характеризуются значительной изменчивостью. Их систематике и популяционной структуре неоднократно было уделено внимание исследователей [17, 18]. В то же время общепризнанной таксономической схемы кавказских дубов до сих пор нет; многие таксоны, описанные ранее как виды, сегодня рассматриваются в ранге подвидов, вариаций и географических рас. В настоящее время в Конспекте флоры Кавказа [19] указывается восемь видов *Quercus*. Из них шесть относятся к робуроидным дубам, т.е. евроазиатским представителям секции *Quercus* [20], среди которых наиболее распространены дуб черешчатый (*Q. robur* L.) с двумя подвидами на Кавказе и дуб скальный (*Q. petraea* (Matt.) Liebl.) с пятью подвидами. Эти виды обычны в Европе, а на Кавказе находится их юго-восточный анклав, связанный с основным ареалом через Малую Азию. В более влажных р-нах Западного Кавказа встречается дуб Гартвиса (*Q. hartwissiana* Steven) – восточноевропейско-малоазиатско-кавказский вид. В горных районах, обычно выше 1700 м, произрастает дуб крупнопильниковый, или восточный (*Q. macranthera* Fisch. et C.A. Mey. ex Hohen) – вид с западно-азиатским распространением. Ареал средиземноморского ксерофитного дуба пушистого (*Q. pubescens* Willd.) на Кавказе ограничен районами Северо-Западного и Восточного Кавказа. Хотя виды и подвиды различаются по экологическим требованиям и репродуктивной стратегии, их ареалы на Кавказе в значительной степени совпадают, и между ними часто наблюдается существенное перекрытие таксономических диагностических признаков. Например, исследование морфологических признаков дубов Кавказа [11] не позволило разделить два подвида у *Q. robur* и два подвида у *Q. petraea*.

Сложности в изучении таксономической структуры кавказских дубов определяют важность молекулярно-генетических исследований видов *Quercus* в регионе. Филогеография, основанная на изменчивости хлоропластной ДНК (хпДНК), является важным источником информации о близких видах растений и гибридных взаимодействиях, об эволюционной истории и об

истории растительных сообществ, о расположении климатических рефугиумов, прошлых изоляциях и путях миграции. Это обусловлено материнским наследованием хпДНК и, соответственно, пространственной подвижностью, связанной с переносом семян. Виды *Quercus* благодаря своему экологическому значению и генетическому разнообразию представляют собой один из основных объектов филогеографических исследований европейских широколиственных древесных растений (например, [21–24]). Однако кавказская часть ареалов европейских дубов остается слабоизученной.

Предки современных робуроидных дубов впервые отмечены на Кавказе в конце миоцена [25]. В более поздние эпохи они регулярно обнаруживаются в пыльцевых спектрах и, вероятно, никогда полностью не исчезали на этой территории. Хотя во время последнего ледникового максимума (LGM) (~21–14 тыс. л. н.) пыльца *Quercus* отмечается только в Колхидском районе (Западный Кавказ, Восточное Причерноморье), нет сомнения, что виды дуба продолжали существовать и в других частях Кавказа, иначе невозможно объяснить быстрое широкое распространение пыльцы *Quercus* вскоре после LGM [2, 26, 27]. Филогеографические исследования позволяют не только выявить рефугиумы, но и оценить их древность и стабильность условий обитания.

Ранее для Крымско-Кавказского региона [28] была исследована изменчивость пяти участков хпДНК (ASq, CDq, TFq, *trnH-psbA* и *trnK-matK*) общей длиной более 10000 пн у трех видов робуроидных дубов (*Q. robur*, *Q. petraea*, *Q. pubescens*). По совокупности результатов секвенирования обнаружено 10 эндемичных для Восточного Причерноморья гаплотипов, которые отличались от гаплотипов восточно-европейской части ареала, выявленных ранее [23]. Был оптимизирован подход к их генотипированию, предусматривающий анализ изменчивости хлоропластных микросателлитов (срSSR), рестриктный анализ и поэтапное секвенирование [28]. Совместное использование этих методов позволяет выявить гаплотипы в пределах отдельных географических регионов (Восточная Европа, Крым, Кавказ), а в сочетании с секвенированием – надежно их диагностировать.

При проведении филогенетического анализа была установлена принадлежность гаплотипов Кавказского региона к нескольким дивергентным филогенетическим линиям [28], при отсутствии близкородственных гаплотипов между Кавказом и Восточной Европой, что может указывать на относительную древность и самостоятельность кавказских линий хпДНК. Однако проведенные филогенетические исследования в основном включали гаплотипы Восточного Причерноморья, Восточной и Центральной Европы

[28, 29]. Возникшие в ряде работ предположения о возможной близости некоторых кавказских и восточно-азиатских линий хпДНК [11, 29] требовали уточнения положения кавказских гаплотипов в филогении робуроидных дубов, с добавлением в анализ представителей других линий и других видов, включая имеющиеся в базах данных пластымы различных европейских и азиатских дубов секции *Quercus*.

Ранее на Северном Кавказе была обнаружена дифференциация популяций в направлении с запада на восток, где предполагалось, по крайней мере, три района, различающихся по составу гаплотипов: западный, центральный и восточный [28]. В Закавказье (Грузия) по двум хпДНК-маркерам в работе J. Ekhvaia et al. [11] было выявлено подразделение на две области, западную и восточную. В то же время географически ограниченный набор выборок и изменчивых маркеров в предыдущих исследованиях требовал более детального анализа разнообразия хлоропластных гаплотипов внутри Кавказа и в прилегающих областях.

В Кавказском регионе [11, 28], как и в других районах Европы и Западной Азии [21, 24, 29, 30], у разных видов робуроидных дубов наблюдается совпадение гаплотипов хпДНК, что указывает на исторический поток генов, передающихся по материнской линии [20]. На Кавказе при совпадающих частых гаплотипах [28] более редкие гаплотипы были обнаружены в малом количестве выборок, иногда только у одного из видов. В ряде исследований [29, 30] отмечалась разница в составе гаплотипов между симпатрическими популяциями разных видов. Информация о локализации редких гаплотипов и различии в частотах гаплотипов между видами может свидетельствовать об истории конкретной популяции или о неравномерной интенсивности межвидового генного потока, что требует увеличения количества выборок на Кавказе, в том числе в местах совместного обитания разных видов.

Цель данной работы – исследование филогеографии робуроидных дубов *Quercus* на Кавказе, выявление путей миграции и связей с прилегающими территориями. Использовались апробированные в предыдущей работе маркеры хпДНК и оптимизированные варианты генотипирования [28]. Была существенно расширена география выборок трех видов дуба (*Q. robur*, *Q. petraea*, *Q. pubescens*), добавлено несколько популяций еще двух робуроидных видов (*Q. hartwissiana*, *Q. macranthera*), встречающихся на Кавказе. Для прояснения возможных обменов между популяциями *Q. robur* северо-восточной части ареала и Предкавказья были исследованы популяции этих регионов. Для определения позиции кавказских гаплотипов в филогении хпДНК евроазиатских ро-

буроидных дубов, в филогенетический анализ, кроме кавказских и восточно-европейских гаплотипов, были включены гаплотипы пластовых европейских и восточно-азиатских видов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В Кавказском регионе проанализировано 926 деревьев из 70 популяционных выборок, расположенных в разных ботанико-географических районах Кавказа [19], включая Западное и Восточное Предкавказье, Западный, Центральный и Восточный Кавказ, Северо-Западное Закавказье, Западное, Центральное и Южное Закавказье. В исследование были включены следующие виды: дуб черешчатый *Q. robur* (415 деревьев из 31 популяции), дуб скальный *Q. petraea* (446 образцов из 32 популяций), дуб пушистый *Q. pubescens* (40 образцов из двух популяций), дуб крупнопольниковый *Q. macranthera* (10 деревьев из двух выборок), дуб Гартвиса *Q. hartwissiana* (15 деревьев из трех выборок) (табл. 1, рис. 1). В северо-восточной части ареала, в дополнение к ранее изученному материалу [23], исследовано 10 популяционных выборок *Q. robur* из Поволжья, Южного Урала, Ростовской области, Украины, и одна выборка *Q. petraea* из Калининградской области (рис. 1,а).

Материал собирали в естественных местообитаниях дубов вдали от населенных пунктов. Расстояние между изученными деревьями составляло не менее 50 м. В большинстве выборок для снижения эффекта семейной кластеризации образцы с деревьев отбирались по маршруту протяженностью в несколько километров. Величина популяционной выборки составляла в среднем 13,2 особи (от 1 до 33 деревьев), в большинстве случаев более пяти деревьев. Таксономическую принадлежность устанавливали по описаниям, приведенным в [17, 18]. Внутривидовые таксоны не учитывались. В случаях совпадения или непосредственной близости точек сбора разных видов *Quercus* выборкам присваивалось одинаковое название, но разные номера (табл. 1). Ваучерные образцы хранятся в лаб. молекулярной экологии растений ИЭРиЖ УрО РАН. Выделение геномной ДНК проводили с помощью метода СТАВ [31] из высушенных в силикагеле листьев.

Для генотипирования был использован анализ изменчивости хлоропластных микросателлитных локусов (срSSR) [28, 32], в сочетании с секвенированием и рестриктным анализом. Как было показано ранее [23, 28], внутри отдельных географических регионов (восточно-европейская часть ареала, Крымский п-ов, Кавказ) большинство гаплотипов может быть определено с помощью срSSR-маркеров, однако в Кавказском регионе для разделения некоторых близких гаплотипов требуется дополнительное секвенирование. Ме-

Таблица 1. Характеристика исследованных популяций дуба черешчатого *Q. robur* (*rb*), дубов скального *Q. petraea* (*pt*), дуба пушистого *Q. pubescens* (*pb*), дуба Гартвиса *Q. hartwissiana* (*h*), дуба крупнопольничкового *Q. macranthera* (*mc*)

№	Популяция	Координаты		n	H	Гаплотипы (число особей)
		с. ш.	в. д.			
Кавказ, <i>Q. robur</i>						
1	Темрюк (<i>rb</i>)*	45°12'31"	37°17'06"	5	0	Z-I (5)
2	Школьный (<i>rb</i>)*	45°03'14"	37°34'33"	20	0	Z-I (20)
3	Гостагаевская (<i>rb</i>)*	44°58'58"	37°30'21"	11	0	Z-I (11)
4	Семигорский (<i>rb</i>)*	44°53'53"	37°36'10"	25	0	Z-I (25)
5	Крымская (<i>rb</i>)*	44°56'28"	38°03'24"	22	0	Z-I (22)
6	Убинская (<i>rb</i>)*	44°42'20"	38°31'27"	23	0	Z-I (23)
7	Новомихайловский (<i>rb</i>)	44°14'35"	38°50'35"	3	0	Z-I (3)
8	Горячий Ключ (<i>rb</i>)	44°35'22"	39°00'31"	25	0.2800	E (21), Z-I (4)
9	Куринская (<i>rb</i>)*	44°24'20"	39°26'03"	20	0.5211	E (9), E-III (11)
10	Цыпка (<i>rb</i>)	44°10'15"	39°10'07"	14	0	E (14)
11	Анастасиевка (<i>rb</i>)	44°09'55"	39°16'02"	4	0	E (4)
12	Псебай (<i>rb</i>)*	44°02'28"	40°45'38"	18	0	E (18)
13	Нижний Архыз (<i>rb</i>)	43°40'22"	41°26'03"	9	0	E (9)
14	Теберда (<i>rb</i>)	43°24'51"	41°43'51"	6	0	E (6)
15	Кропоткин (<i>rb</i>)	45°24'06"	40°34'15"	28	0	E-III (28)
16	Ставрополь (<i>rb</i>)	45°02'47"	41°56'11"	10	0	E (10)
17	Русск. лесная дача (<i>rb</i>)	45°02'13"	41°52'10"	15	0	E (15)
18	Буденновск (<i>rb</i>)	44°45'23"	44°09'55"	33	0	E (33)
19	Кисловодск (<i>rb</i>)	43°53'12"	42°46'41"	3	0	E (3)
20	Пятигорск (<i>rb</i>)	44°03'16"	43°06'35"	3	0	E (3)
21	Бештау (<i>rb</i>)	44°07'16"	43°03'44"	22	0	E (22)
22	Нальчик (<i>rb</i>)*	44°26'41"	43°35'36"	24	0.4094	E (18), X-II (5), A-II (1)
23	Балта (<i>rb</i>)*	42°55'12"	44°38'21"	4	0.6667	F (2), E (2)
24	Нохчи-Келой (<i>rb</i>)	42°45'08"	45°55'34"	5	0	F (5)
25	Гуниб (<i>rb</i>)	42°23'15"	46°57'03"	5	0	F (5)
26	Талги (<i>rb</i>)	42°52'39"	47°25'22"	4	0	F (4)
27	пер. Буйнакский (<i>rb</i>)	42°56'07"	47°21'49"	4	0	F (4)
28	Эрпели (<i>rb</i>)*	42°47'21"	46°58'40"	12	0	F (12)
29	Дербент (<i>rb</i>)	42°01'49"	48°16'07"	5	0	F (5)
30	Самур (<i>rb</i>)	41°50'16"	48°31'19"	25	0	F (25)
31	Цхинвал (<i>rb</i>)*	42°14'57"	43°59'47"	8	0	X-I (8)
	Среднее, № 1–31			13.4		
	Всего, № 1–31			415		
Кавказ, <i>Q. petraea</i>, <i>Q. pubescens</i>						
32	Сукко (<i>pt</i>)*	44°47'37"	37°24'56"	28	0	Z-I (28)
33	Широкая балка (<i>pb</i>)	44°39'41"	37°42'14"	24	0	Z-I (24)
34	Кабардинка (<i>pb</i>)*	44°40'40"	37°53'56"	16	0	Z-I (16)
35	Убинская (<i>pt</i>)	44°42'20"	38°31'27"	5	0	Z-I (5)
36	Новомихайловский (<i>pt</i>)*	44°14'35"	38°50'35"	28	0.6349	Z-I (12), Z-II (12), E (4)
37	Горячий Ключ (<i>pt</i>)	44°35'22"	39°00'31"	4	0.5000	E (3), Z-I (1)
38	Фанагорийская (<i>pt</i>)	44°32'30"	39°08'06"	4	0	Z-I (4)
39	Куринская (<i>pt</i>)	44°24'20"	39°26'03"	4	0.5000	E (3), E-III (1)
40	Цыпка (<i>pt</i>)	44°10'15"	39°10'07"	7	0	E (7)
41	Анастасиевка (<i>pt</i>)	44°09'55"	39°16'02"	19	0	E (19)
42	р. Шахе (<i>pt</i>)	43°50'30"	39°21'16"	14	0.2637	E (12), Z-I (2)
43	г. Б. Ахун (<i>pt</i>)	43°32'41"	39°50'35"	27	0	E
44	Роза Хутор (<i>pt</i>)	43°40'32"	40°18'11"	19	0	Z-I
45	Ахштырь (<i>pt</i>)	43°31'39"	39°59'08"	8	0.2500	Z-I (7), E (1)
46	Гагра (<i>pt</i>)*	43°16'04"	40°19'40"	29	0.5025	Z-I (12), X-III (17)

Таблица 1. Окончание

№	Популяция	Координаты		<i>n</i>	<i>H</i>	Гаплотипы (число особей)
		с. ш.	в. д.			
47	Агараки (<i>pt</i>)	43°12'17"	40°25'19"	12	0.6212	Z-I (6), X-III (5), E (1)
48	Псебай (<i>pt</i>)	44°02'28"	40°45'38"	4	0	E (4)
49	Теберда (<i>pt</i>)	43°24'51"	41°43'51"	1	0	E (1)
50	Ставрополь (<i>pt</i>)	45°02'47"	41°56'11"	3	0	E (3)
51	Русск. лесная дача (<i>pt</i>)	45°02'13"	41°52'10"	20	0	E (20)
52	Бештау (<i>pt</i>)	44°07'16"	43°03'44"	28	0	E (28)
53	Пятигорск (<i>pt</i>)*	44°03'16"	43°06'35"	12	0	E (12)
54	Балта (<i>pt</i>)	42°55'12"	44°38'21"	18	0	F (18)
55	Нохчи-Келой (<i>pt</i>)	42°45'08"	45°55'34"	4	0	F (4)
56	Шаро-Аргун (<i>pt</i>)	42°48'25"	45°49'31"	6	0	F (6)
57	Эрпели (<i>pt</i>)	42°47'21"	46°58'40"	27	0	F (27)
58	пер. Буйнакский (<i>pt</i>)	42°56'07"	47°21'49"	26	0	F (26)
59	Терменлик (<i>pt</i>)*	42°44'39"	47°00'17"	7	0	F (7)
60	Дербент (<i>pt</i>)	42°02'49"	48°15'47"	24	0	F (24)
61	Цхинвал (<i>pt</i>)	42°14'57"	43°59'47"	24	0	X-I
62	Орбели (<i>pt</i>)	42°38'51"	42°48'52"	8	0	X-I'
63	Бзиаури (<i>pt</i>)	42°15'57"	42°56'46"	4	0	X-I
64	Боржоми (<i>pt</i>)	41°46'18"	43°28'22"	10	0	X-I
65	Шикахох (<i>pt</i>)	39°05'18"	46°27'34"	12	0	E (12)
	Среднее, № 32–65			14.3		
	Всего, № 32–65			486		
Кавказ, <i>Q. macranthera</i>, <i>Q. hartwissiana</i>						
66	Дилижан (<i>mc</i>)	40°42'04"	44°50'49"	6	0	E (6)
67	Вайк (<i>mc</i>)	39°41'42"	45°34'25"	4	0	E (4)
68	Крымск (<i>h</i>)	44°56'28"	38°03'24"	2	0	E (2)
69	Анастасиевка (<i>h</i>)	44°09'55"	39°16'02"	2	0	E (2)
70	Ахштырь (<i>h</i>)	43°31'39"	39°59'08"	11	0.1818	Z-I (10), E (1)
	Среднее, № 66–70			5		
	Всего, № 66–70			25		
Северо-восточная часть ареала, <i>Q. robur</i>, <i>Q. petraea</i>						
71	Светлогорск (<i>pt</i>)	54°55'56"	20°08'35"	17	0	S
72	Ульяновск (<i>rb</i>)	54°06'40"	47°02'56"	5	0	A-I (5)
73	Жигули (<i>rb</i>)	53°24'	49°42'	5	0	A-II (5)
74	Тольятти (<i>rb</i>)	53°28'38"	49°19'40"	10	0	A-II (10)
75	Климовка (<i>rb</i>)	53°30'04"	48°59'14"	5	0	A-II (5)
76	Вольский р-н (<i>rb</i>)	52°00'29"	47°18'19"	10	0	A-I (10)
77	Оренбургская обл (<i>rb</i>)	51°22'21"	57°24'52"	5	0	A-I (5)
78	Кипчак-Аскарово (<i>rb</i>)	53°57'18"	55°04'07"	5	0	A-II (5)
79	Исянгуловские горы (<i>rb</i>)	52°06'32"	56°36'12"	5	0	A-I (5)
80	Днепропетровск (<i>rb</i>)	48°30'33"	34°45'42"	8	0	A-I (8)
81	Миллерово (<i>rb</i>)	49°53'34"	41°23'14"	7	0	A-I (7)
	Среднее, № 71–81			11		
	Всего, № 71–81			82		

Примечание. *n* – объем выборки; *H* – несмещенное гаплотипическое разнообразие.

* Популяционные выборки, исследованные на Кавказе в работах [28, 29].

тодика исследования изменчивости *срSSR*-локусов методом вертикального электрофореза подробно описана нами ранее в работе [23]. Для новых образцов кавказского и северо-восточного регионов был проведен анализ изменчивости че-

тырех *срSSR*-локусов (*μdt1*, *μdt3*, *μdt4*, *μcd4*) [32], установлено сочетание аллелей (*срSSR*-гаплотипы). Для установления гаплотипов, не различающихся по *срSSR*-маркерам внутри региона, и для подтверждения правильности типирования гаплотипов

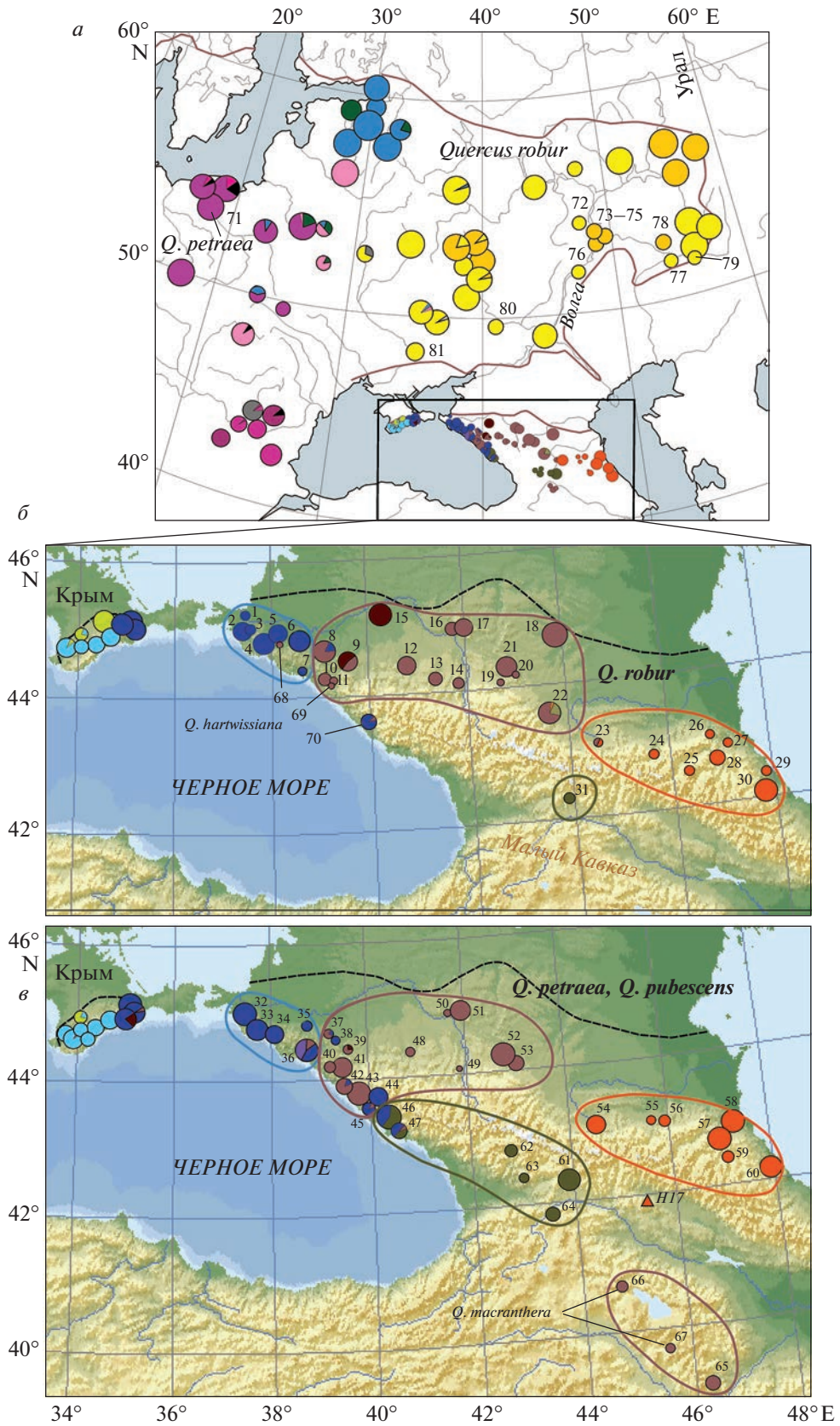


Рис. 1. Географическое распределение хлоропластных гаплотипов: *a* – *Q. robur* и *Q. petraea* в северо-восточной части ареала, № 71–81 – вновь исследованные популяции, диаграммы без номеров – выборки из работ [23, 29]. Цветовые обозначения гаплотипов соответствуют рис. 2, 3. Сплошной линией обозначена граница ареала *Q. robur*. Площадь диаграмм пропорциональна размеру выборки; *b* – на Кавказе в популяциях *Q. robur* (№ 1–31) и *Q. hartwissiana* (№ 68–70). В Крыму обозначены выборки из работы [29]. Штриховой линией указана северная граница крымско-кавказской части ареала дуба. Цветными линиями обозначены группы AMOVA для *Q. robur*; *в* – на Кавказе в популяциях *Q. petraea*, *Q. pubescens* (№ 32–65) и *Q. macranthera* (№ 66–67). Треугольником маркировано происхождение пластома из базы данных [39]. Цветными линиями обозначены группы AMOVA для *Q. petraea*–*Q. pubescens*.

типов из разных регионов, кроме секвенирования, проводился рестриктивный анализ (PCR-RFLP), сочетание фрагмент/рестриктаза приводится в работе [28]. Разделение родственных гаплотипов, таких как X-I, X-II, X-III, а также гаплотипов Z-I и Z-II, для которых рестриктаза не была подобрана, осуществлялось секвенированием определенных фрагментов [28]. Образцы каждого выявленного сrSSR-гаплотипа были секвенированы у разных видов в 40 популяциях, полностью по пяти фрагментам или частично для подтверждения гаплотипа, всего у 95 образцов.

Последовательности гаплотипов были получены для пяти хлоропластных регионов: *psaA-trnS* (ASq), *psbC-trnD* (CDq), *trnT-trnF* (TFq), *trnK-matK* и *trnH-psbA* [28], общей длиной ~10 100 пн. Используемые праймеры, условия амплификации и секвенирования, параметры изменчивости фрагментов описаны ранее в работах [23, 28]. ПРЦ-продукты очищали с помощью набора ExS-Pure, NimaGen B.V. Реакцию секвенирования проводили с помощью набора BrilliantDye Terminator v 3.1 (NimaGen, Нидерланды), продукты реакции анализировали на автоматическом секвенаторе Нанофор 05 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 [33]. С помощью пакета программ Arlequin ver 3.5 [34] для каждой популяции оценивалось несмещенное гаплотипическое разнообразие (*H*). Для кавказских популяций трех наиболее распространенных видов (*Q. robur*, комплекс *Q. petraea*–*Q. pubescens*) в программе Arlequin [34] проводили анализ молекулярной дисперсии AMOVA. Кроме частот гаплотипов учитывались генетические дистанции между гаплотипами, вычисленные на основе нуклеотидных замен и перестроек в пяти фрагментах хпДНК. Использовались следующие уровни изменчивости: внутри популяций, между популяциями внутри групп популяций, между группами популяций. Проведено несколько вариантов иерархического анализа AMOVA: 1) при объединенном анализе выборки трех видов в качестве двух разных групп выступали популяции *Q. robur*/популяции *Q. petraea*–*Q. pubescens*; 2) при анализе только популяций *Q. robur*, в качестве групп выступали четыре географических региона, различающихся

по составу гаплотипов (см. Результаты); 3) при анализе только популяций *Q. petraea*–*Q. pubescens* в качестве групп выступали пять географических регионов (см. Результаты).

Филогенетические деревья гаплотипов построены с использованием байесовского подхода (BI) в программе MrBayes v 3.1.2 [35] и метода максимальной экономии (MP) в программном пакете RAUP*4.0b1 [36]. Параметры и модели BI и MP анализов описаны в работе [37]. В анализ были включены все точковые мутации, инделы и инверсии, за исключением мутаций числа микросателлитных повторов и инверсии во фрагменте CDq [28] ввиду их высокой гомоплазии. Ранее описанные на Кавказе гаплотипы E-I и E-II, которые различались только числом микросателлитных повторов во фрагменте ASq [23], были объединены в один гаплотип (E).

В филогении хпДНК робуроидных дубов были использованы имеющиеся в базе данных GenBank пластома (полные хлоропластные геномы) большинства видов восточно-азиатских робуроидных дубов [38], всего 12 гаплотипов 10 таксонов: *Q. mongolica*, *Q. dentata*, *Q. dentata* ssp. *stewardii*, *Q. fabrei*, *Q. griffithii*, *Q. aliena*, *Q. serrata*, *Q. serrata* var. *brevipetiolata*, *Q. wutaishanica* и *Q. yunnanensis*. Номера GenBank указаны на рис. 2. Из западно-евроазиатских гаплотипов в анализ, кроме кавказских, были включены гаплотипы, полученные нами из восточной части основного ареала *Q. robur* [23], включая крымско-балканские гаплотипы [29], последовательности которых были ранее помещены в GenBank (см. [23, 28, 29]). Филогенетическая реконструкция была дополнена тремя гаплотипами западно-европейских линий хпДНК (описанных в работе R.J. Petit et al. [21, 22] как линии В и D), взятых из коллекции пластома европейских робуроидных дубов [39]: пластом “Qrobur_129.36.1.2” (RFLP-гаплотип *H10* согласно [22]), “Qrobur_239.37.10.4” (гаплотип *H12*), “Qpetraea_92.49.13.2” (гаплотип *H21*). Кроме того, использовались гаплотипы из Турции “Qpetraea_249.35.12.4” (*H18*) и Восточной Грузии “Qpetraea_184.43.9.4” (*H17*), а также пластом *Q. robur* западно-европейского происхождения (GenBank, LT799088). Для включения в анализ из пластома были взяты участки пяти соответствующих фрагментов. Кроме робуроидных дубов, в анализе присутствовали американские виды *Q. lobata* (секция *Quercus*) (пластом из GenBank,

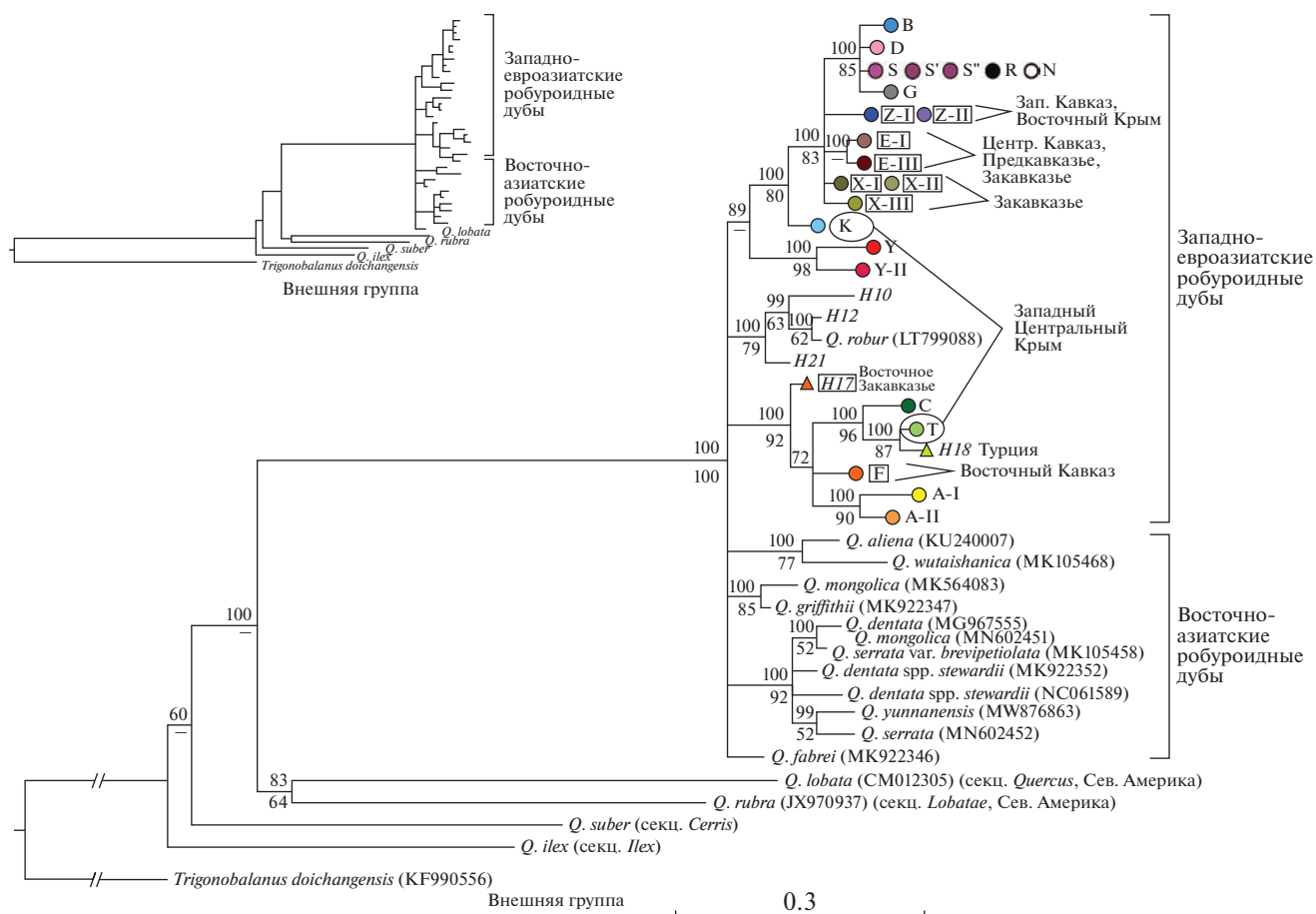


Рис. 2. Филогенетическое дерево 34 хлоропластных гаплотипов робуроидных дубов и гаплотипов *Q. lobata*, *Q. rubra*, *Q. ilex*, *Q. suber*, построенное с помощью байесовского метода (50%-ный консенсус) на основе нуклеотидных последовательностей пяти фрагментов хпДНК общей длиной ~10 100 пн. Над линиями приведена статистическая поддержка байесовским методом (значения апостериорной вероятности, %), под линиями – бутстрэп-поддержка (MP, 1000 репликаций). Цветными кругами маркированы гаплотипы, полученные в настоящей работе и предыдущих исследованиях, обозначения гаплотипов соответствуют принятым ранее [23, 28]. В прямоугольные рамки заключены кавказские гаплотипы, в овальные рамки – гаплотипы Крыма. Шкала отражает число замен на нуклеотидную позицию. *H10*, *H12*, *H21*, *H17*, *H18* – гаплотипы пластов из базы данных [39] (см. Материалы и методы). Для гаплотипов восточно-азиатских робуроидных дубов, видов других групп и секций и для внешней группы приводятся номера пластов из GenBank.

CM012305) и *Q. rubra* (секция *Lobatae*) (JX970937), а также два средиземноморских вида подрода *Cerris* из разных секций: пробковый дуб *Q. suber* (секция *Cerris*) и каменный дуб *Q. ilex* (секция *Ilex*), последовательности которых были взяты из нашей предыдущей работы [28]. В качестве внешней группы был использован *Trigonobalanus doichangensis* (KF990556). Для построения сети гаплотипов был применен подход Median-Joining в программе NETWORK 5.0.1.0 [40], где внешней группой выступил наиболее близкий к робуроидным гаплотип *Q. lobata* (секция *Quercus*). Представители других секций не были включены в анализ сети гаплотипов из-за значительной удаленности от гаплотипов робуроидных дубов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В кавказских популяциях по данным секвенирования пяти хлоропластных фрагментов было обнаружено восемь гаплотипов (Z-I, Z-II, E, E-III, F, X-I, X-II, X-III). Новых гаплотипов, по сравнению с полученными в работе [28], не было выявлено. Обозначения хпДНК гаплотипов соответствуют принятым в предыдущих работах [23, 28]. Они типировались вариантами сrSSR, которые совпадали с описанными ранее [28]. В кавказских популяциях наблюдалось шесть комбинаций сrSSR-аллелей, новых аллелей не было обнаружено. Секвенированием подтверждено совпадение большинства сrSSR-комбинаций с типизируемыми гаплотипами, за исключением гаплотипов группы X,

которые типизируются сrSSR-комбинациями с аллелем 4 в локусе $\mu dt3$, с дальнейшим разделением на гаплотипы секвенированием участка фрагмента CDq [28]. Наиболее часто встречается комбинация аллелей (2/4/2/1) в локусах $\mu dt1$, $\mu dt3$, $\mu dt4$, $\mu cd4$ соответственно. Установлено, что данная комбинация может соответствовать двум родственным гаплотипам: в выборке Орбели (№ 62) — гаплотипу X-I', в выборке Гагра (№ 46) — гаплотипу X-III.

На Кавказе гаплотипов основного восточно-европейского ареала не обнаружено, кроме описанного ранее гаплотипа A-II в выборке *Q. robur* (№ 22, Нальчик) [28]. Все особи, типизируемые с помощью комбинации сrSSR как кавказский гаплотип F (совпадающий по сrSSR-маркерам с гаплотипом A-II из основного ареала), были дополнительно проанализированы рестриктивным анализом с комбинацией CDq/*Hinf*I или секвенированием. Образцов с “северным” гаплотипом A-II на Кавказе больше не было выявлено.

В результате анализа 926 образцов из 70 популяций получено распределение гаплотипов пяти видов дуба в Кавказском регионе (табл. 1, рис. 1, б, в). Гаплотипическое разнообразие в кавказских популяциях *Quercus* невысокое (табл. 1), в большинстве выборок независимо от их объема присутствует один гаплотип. Характерной чертой является увеличение разнообразия в пограничных зонах между областями распространения наиболее частых гаплотипов. Максимальная изменчивость наблюдалась в выборках южного макросклона Западного Кавказа (рис. 1, б, в).

Области распространения наиболее частых и родственных им гаплотипов четко географически очерчены. “Западные” гаплотипы группы Z (преобладающий Z-I и родственный ему Z-II) распространены на западе Кавказского региона, преобладают в Северо-Западном Закавказье, на крайнем западе Кавказа и Предкавказья. На северном макросклоне Большого Кавказского хребта данные гаплотипы не отмечены восточнее р. Пскупс (выборки № 8, 37, 38). На южном макросклоне “западный” гаплотип продвигается дальше, с весьма неравномерным распределением вдоль побережья Черного моря до Абхазии, где гаплотип Z-I обнаружен в р-не Адлера вдоль р. Мзымты, в р-не Гагры и Пицунды у *Q. petraea* и *Q. hartwissiana*.

Наиболее распространенными в Кавказском регионе являются гаплотипы группы E (“центральные”), они преобладают в популяциях на северном макросклоне Большого Кавказа, в горной части Западного Кавказа, в Предкавказье и на Центральном Кавказе. В Западном Закавказье эта гаплогруппа вклинивается в область распространения гаплотипов Z в р-не Туапсе, доходя до Абхазии. В Закавказье распространение гаплотипа E имеет разрыв и вновь обнаруживается в трех выборках *Q. petraea* и *Q. macranthera* в Армении (рис. 1, в).

Область распространения гаплотипа F (“восточного”) ограничена Восточным Кавказом (Дагестан, Чечня, Сев. Осетия).

Варианты гаплотипов X (“закавказские”) обнаружены в основном в Западном и Центральном Закавказье. Единственное исключение — наличие гаплотипа X-II на северном макросклоне Большого Кавказа в выборке Нальчик (№ 22). Данный вариант отличается от наиболее распространенного закавказского гаплотипа X-I инверсией (GA/TC) во фрагменте CDq.

На Кавказе у видов *Quercus* выявлена высокая географическая дифференциация, которая была у разных видов примерно одинакова, $F_{ST} = 96\%$ (*Q. robur*) и $F_{ST} = 95\%$ (*Q. petraea*/*Q. pubescens*), при этом наибольшие различия наблюдаются между географическими группами, различия между популяциями внутри групп были невелики. При иерархическом анализе генетической изменчивости AMOVA на Кавказе, при рассмотрении только *Q. robur*, популяции априорно разделялись на четыре группы по преобладающим гаплотипам: 1) Западный Кавказ (Северо-Западное Закавказье, западная область Зап. Кавказа, крайне западный р-н Зап. Предкавказья), популяции с преобладанием “западного” гаплотипа (№ 1–8); 2) Предкавказье, Центральный Кавказ, горные районы Зап. Кавказа, популяции с “центральными” гаплотипами (№ 9–22); 3) Восточный Кавказ, популяции с преобладанием “восточного” гаплотипа (№ 23–30); 4) Центральное Закавказье, “закавказский” гаплотип (№ 31). Анализ AMOVA (табл. 2) для кавказских популяций *Q. robur* при разделении на четыре группы показал очень высокую дифференциацию между группами ($F_{ST} = 0.93890$).

В анализе AMOVA близкородственные виды *Q. petraea* и *Q. pubescens* были объединены, так как в некоторых районах Восточного Кавказа между ними наблюдается континуум таксономических признаков, поэтому в табл. 1 все выборки Восточного Кавказа отнесены к *Q. petraea*. Достаточно четко два вида были определены только в пределах Северо-Западного Кавказа, где в двух изученных выборках *Q. pubescens* присутствовал гаплотип Z-I, совпадающий с гаплотипами других видов в том же районе. При анализе AMOVA комплекса *Q. petraea*—*Q. pubescens* популяции были разделены на пять групп, четыре из которых аналогичны группам *Q. robur*: 1) крайне Западный Кавказ, популяции с преобладанием “западного” гаплотипа (№ 32–36); 2) Предкавказье, Центральный Кавказ, горные районы Зап. Кавказа, Зап. Закавказье, популяции с “центральными” и “западными” гаплотипами (№ 37–45, № 48–53); 3) Восточный Кавказ, популяции с “восточным” гаплотипом (№ 54–60); 4) Центральное Закавказье, область распространения “закавказских” га-

Таблица 2. Иерархический анализ генетической изменчивости (AMOVA) в кавказской части ареала отдельно для *Q. robur* и дубов *Q. petraea*/*Q. pubescens*, популяции априорно разделены на группы (рис. 1, б, в), см. Результаты

Вид	Источник изменчивости	Число степеней свободы	Компонента изменчивости	Доля изменчивости, %
<i>Q. robur</i>	Между четырьмя группами	3	4.35240	93.89
	Между популяциями внутри групп	27	0.11885	2.56
	Внутри популяций	384	0.16439	3.55
Индексы фиксации: $F_{ST} = 0.93890^{****}$, $F_{ST} = 0.96454^{****}$, $F_{SC} = 0.41960^{****}$				
<i>Q. petraea</i> / <i>Q. pubescens</i>	Между пятью группами	4	3.88960	85.69
	Между популяциями внутри групп	28	0.43081	9.49
	Внутри популяций	453	0.21849	4.81
Индексы фиксации: $F_{ST} = 0.85695^{****}$, $F_{ST} = 0.95186^{****}$, $F_{SC} = 0.66350^{****}$				

Примечание. Уровень значимости: **** $P < 0.00001$.

плотипов (№ 61–64, № 46, 47); 5) Армянское нагорье, выборка *Q. petraea* с гаплотипом E (№ 65). При разделении *Q. petraea/pubescens* на пять групп доля изменчивости между группами также была высокой ($F_{ST} = 85.7\%$), что значительно превышает дифференциацию внутри групп ($F_{ST} = 9.5\%$) (табл. 2).

При варианте иерархического анализа AMOVA популяций Кавказа, где в качестве разных групп выступали популяции *Q. robur*/популяции *Q. petraea–pubescens*, разделение на группы было незначимым (данные не приводятся). Гаплотипы совпадали у видов по географическим районам. Общими для двух видов на Кавказе были преобладающие гаплотипы: Z-I на западе, E и E-III в центральной части, F на востоке, X-I в Центральном Закавказье. Гаплотипы, отмеченные только у одного из видов (Z-II, X-II, X-III), были редкими, в местах их локального обнаружения были собраны в основном представители одного вида дуба. Однако даже сравнительно редкие гаплотипы совпадали в местах совместного произрастания. Например, достаточно редкий гаплотип E-III в выборке Куринская присутствует у обоих видов (табл. 1). Гаплотипы, выявленные у менее распространенных видов *Q. hartwissiana* и *Q. macranthera*, относятся к наиболее частым гаплотипам Центрального, Западного Кавказа и Закавказья (гаплотипы E и Z-I). В двух популяциях *Q. macranthera* фиксирован гаплотип E, совпадающий с гаплотипом *Q. petraea* из того же района. Выявленное различие по составу гаплотипов между разными видами наблюдалось в единственном случае в выборке Крымск (№ 5, 68), где у 22 деревьев *Q. robur* обнаружен гаплотип Z-I, однако у двух собранных в том же массиве деревьев *Q. hartwissiana* наблюдался гаплотип E, что может свидетельствовать о недавнем внедрении дуба Гартвиса в этот лесной массив.

В северо-восточной части ареала *Q. robur* добавление нового материала подтверждает выявленную ранее филогеографическую структуру [23]: наличие на востоке двух гаплотипов (A-I и A-II), причем в южных районах преобладает гаплотип A-I, в Центральном Поволжье встретились оба гаплотипа. В Калининградской области в выборке *Q. petraea* у всех особей присутствовал гаплотип S, который являлся самым распространенным в симпатрических популяциях *Q. robur* в Калининградской области [23].

В филогенетический анализ были включены 34 гаплотипа робуроидных дубов (23 – западно-евроазиатских, 11 – восточно-азиатских). Из них 17 гаплотипов взяты из наших работ [23, 28, 29]. Остальные представлены гаплотипами пластов. Гаплотипы, которые отличались друг от друга только инверсией в CDq (гаплотипы Z-I/Z-II, X-I/X-II) или числом микросателлитных повторов (см. Материалы и методы), на филогенетическом дереве и сети гаплотипов занимают одинаковую позицию (рис. 2, 3). На рис. 2 представлено байесовское дерево (BI), с указанием значений статистических поддержек клад обоих деревьев (BI и MP). Гаплотипы робуроидных дубов образуют высокоподдержанную монофилетичную кладу, которая значительно дифференцирована от гаплотипов дубов других секций и американских видов секции *Quercus* и секции *Lobatae*. Внутри “робуроидной” кладу линии гаплотипов западно-евроазиатских дубов и восточно-азиатских дубов не образуют монофилетичных групп. Гаплотипы западно-евроазиатских дубов формировали несколько глубоко дивергировавших клад с неопределенными филогенетическими отношениями. Сеть гаплотипов, основанная на 91 изменчивом признаке, во многом соответствует дереву гаплотипов (рис. 3) и состоит из нескольких расходящихся ветвей. Выявленные в кавказских популяциях гаплотипы относятся к двум дивергентным филоге-

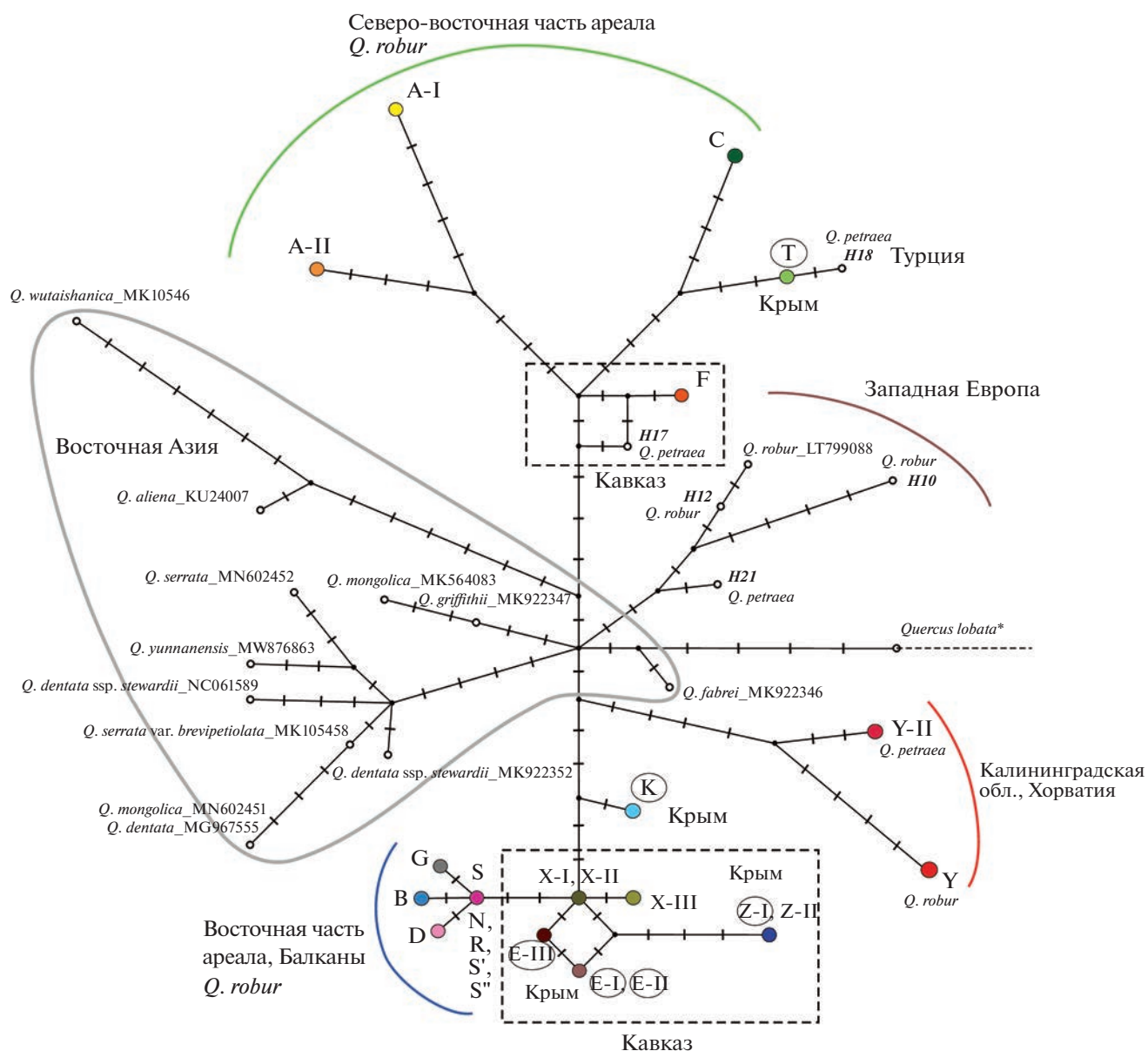


Рис. 3. Филогенетическая сеть хлоропластных гаплотипов 34 хлоропластных гаплотипов робуроидных дубов и *Q. lobata*, построенная на основе нуклеотидных последовательностей пяти фрагментов хпДНК с помощью метода Median-Joining в программе NETWORK [40]. В штриховые рамки заключены кавказские гаплотипы, в овальные рамки – гаплотипы Крыма. Сплошной линией обведены гаплотипы восточно-азиатских видов. Поперечные линии обозначают мутации. * При построении филогенетической сети не учитывались мутации, специфичные для внешней группы *Q. lobata*.

нетическим кладам западно-евроазиатских видов (рис. 2, 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Место кавказских гаплотипов в филогении хлоропластной ДНК робуроидных дубов

Филогенетическое дерево (рис. 2) хлоропластной ДНК подтверждает монофилию гаплотипов робуроидных дубов. Их ветвь состоит из несколь-

ких глубоко разошедшихся клад без определенных топологических отношений, что соответствует гипотезе о происхождении робуроидных дубов в результате миграции в Евразию американских представителей секции *Quercus* и гибридизации с видами секции *Pontica* [20, 41]. Эволюционная успешность возникшей гибридной группы [41] обусловила быструю дифференциацию и распространение в Евразии, что объясняет отсутствие филогенетической структуры между линиями

хпДНК. Соотношение длин ветвей основных клад робуроидных дубов и клад разных секций *Quercus* по хпДНК (примерно 1 : 4) соответствует соотношению оценок возраста дивергенции видов внутри группы робуроидных дубов (~10–11 млн л. н.) и возраста дивергенции секций (~45 млн л. н.), полученных на основе мультигенных ядерных данных [41]. Следовательно, 10–11 млн л. н. можно принять в качестве оценки возраста дивергенции клад хпДНК робуроидных дубов. Близкая оценка – 10.81 млн л. н. (3.45–20.98) была получена на основе кодирующих последовательностей хлоропластной ДНК [38].

Линии хлоропластных гаплотипов (рис. 2) не разделились на западно-евроазиатскую и восточно-азиатскую группы, как это было показано для этих групп по ядерной ДНК [41]. На Кавказе присутствуют гаплотипы двух дивергентных западно-евроазиатских линий. Эти гаплотипы эндемичны для всего Восточного Причерноморья, включая Восточную Турцию и Крым, и не имеют родственных гаплотипов за его пределами. Из этого следует, что дубы в Восточном Причерноморье длительное время находятся в изоляции от остальных частей их ареалов в отношении матерински наследуемой хпДНК, т.е. в отношении миграций посредством переноса семян. При этом на Кавказе выявлено сравнительно мало редких гаплотипов, филогенетически близких к каким-либо частым. Вероятной причиной такой картины может быть длительное существование в нескольких областях, изолированных друг от друга морскими бассейнами, высокими горами, степными пространствами и т.п., что исключает распространение одной линии хпДНК во всем Кавказском регионе. В то же время периодические сокращения численности, например в ледниковые фазы плейстоцена, способствовали фиксации отдельных гаплотипов в пределах локальных областей.

В Кавказском регионе, как и в других частях ареалов робуроидных дубов [22, 23, 30], структура изменчивости хпДНК почти не зависит от таксономической принадлежности образцов (рис. 1, б, в), что также отражается в незначимой доле изменчивости, соответствующей межвидовым различиям, притом что доля изменчивости между географическими группами очень велика, например у *Q. robur* на Кавказе $F_{ST} = 95\%$ (табл. 2). Обычно отсутствие межвидовых различий объясняется захватом матерински наследуемой хпДНК при интрогрессивной гибридизации (см. [20, 30] и ссылки в этих работах). Совпадающий состав гаплотипов у видов *Quercus* в выявленных географических группах на Кавказе свидетельствует о долговременном совместном существовании популяций разных видов в отдельных районах Кавказа. Выявленные межвидовые различия по составу гаплотипов наблюдались лишь в нескольких локальных случаях

и скорее свидетельствуют об истории конкретного насаждения (см. Результаты).

Географическое распространение хлоропластных гаплотипов и история дубов в Восточном Причерноморье

Из двух присутствующих на Кавказе линий хпДНК одна содержит гаплотипы Западного и Центрального Кавказа, а также Закавказья (гаплогруппы X, E и Z, см. рис. 3). Из них закавказские гаплотипы (X-I и X-II) находятся в базальном положении к остальным кавказским гаплотипам и к субкладе гаплотипов (S, B, D, G), распространенных на Балканах и северо-западе Русской равнины. Другая линия содержит восточно-кавказские гаплотипы F и H17, а также сильно дивергированные от них субклады гаплотипов северо-восточной части ареала дуба черешчатого (A-I и A-II) и гаплотипов Крыма, Малой Азии и Восточной Европы (T и C) (рис. 3). В предыдущей работе [28] было проведено сопоставление последовательностей хлоропластных фрагментов гаплотипов Крыма и Кавказа с гаплотипами Закавказья из работы [11] по двум фрагментам *trnH-psbA* и *trnK-matK*, и с гаплотипами Турции из исследования [30] по фрагменту TFG, что дало основание с большой определенностью сравнивать распространение кавказских, крымских и родственных им гаплотипов на прилегающих территориях.

Гаплотипы *Quercus* на Кавказе имеют хорошо очерченные, почти не перекрывающиеся ареалы. Часть исследованных выборок имела небольшой размер (1–5 деревьев) (табл. 1), но все описанные географические группы популяций характеризуются значительным числом выборок нескольких видов (рис. 1), имеющих один основной гаплотип (родственные гаплотипы), что исключает ошибку в выделении каждой из групп, обусловленную малым размером выборок.

Гаплогруппа Z (с преобладанием Z-I) распространена на северо-западном Кавказе по северному склону на восток до р. Псекупс и по черноморскому побережью на юг до м. Пицунда. Гаплогруппа E распространена по северному склону Кавказа далее на восток примерно до р. Терек. В наиболее низкой части гаплогруппа E переваливает Кавказский хребет и выходит на черноморское побережье (район Джубга–Туапсе), разрывая область распространения гаплогруппы Z. По данным наших предыдущих исследований крымских популяций дуба [29], гаплотип Z-I доминирует в Восточном Крыму, что очевидно указывает на колонизацию Крыма с Северо-Западного Кавказа. Но в Крыму в небольшом количестве присутствует и гаплогруппа E, что, вероятно, объясняется дальней миграцией через Черное море из участка кавказского побережья, занятого E. Ин-

интересно отметить, что единично гаплотип Е найден также и в западной части Крыма, а гаплотипы Западного Крыма (Т и К) имеют родственные гаплотипы в Малой Азии [29]. Все это указывает на множественность дальних миграций в Причерноморье.

Гаплогруппа Е, кроме северного склона Центрального Кавказа и Предкавказья, распространена на Малом Кавказе в популяциях *Q. petraea* и *Q. macranthera*, после разрыва, заполненного ареалом гаплотипа Х. Также гаплотип, родственный Е, встречается в Восточной Турции у *Q. macranthera* [30]. Гаплотипы группы Х распространены в Закавказье от Абхазии на западе до Лихского хребта на востоке. На северном склоне гаплотип Х-II обнаружен только в районе Нальчика. Идентичные гаплогруппе Х гаплотипы отмечены на востоке Турции у нескольких видов робуроидных дубов [30].

Гаплотип F и родственный ему гаплотип пластома H17 распространены восточнее Владикавказа на Северном Кавказе и восточнее Лихского хребта в Закавказье, что подтверждается данными исследования дубов Закавказья [11]. Кроме того, по данным из работы [30] родственный или идентичный гаплотипу F вариант встречается на севере Турции вдоль черноморского побережья.

Ареалы хлоропластных гаплотипов робуроидных дубов на Кавказе не всегда строго локализованы и в некоторых случаях образуют разрывы, что, как и с примерами обнаружения гаплотипов Е в Крыму, может быть объяснено дальним переносом [29], но в большинстве случаев вероятнее всего есть следствие вымираний популяций – носителей одних гаплотипов, и последующей реколонизации свободной территории с участием популяций – носителей других гаплотипов, как, например, при частичном вытеснении гаплотипов Z гаплотипами Е на черноморском побережье Кавказа или при образовании разрыва ареала Е в Закавказье. Вымирания и расселения являются следствием климатических колебаний, и ареалы гаплотипов указывают на районы расположения рефугиумов, в которых данный гаплотип сохранялся в неблагоприятные климатические фазы и из которого происходила реколонизация [1, 4, 7, 15, 21, 22, 29].

В Кавказском регионе присутствие пыльцы *Quercus* во время последнего ледникового максимума отмечено только на западе Закавказья, в области так называемого “колхидского” рефугиума биоты умеренных лесов [2, 25, 42]. В этом районе реконструируются предковые популяции для яшерииц, саламандр, примул и др. [4, 8, 13]. В то же время географически очерченных районов, занятых определенной гаплогруппой хпДНК *Quercus*, на Кавказе имеется не менее пяти, и только два из них, районы распространения гаплогрупп Z и X,

возможно связаны с “колхидским” рефугиумом. Следовательно, рефугиумы – источники колонизации в большинстве случаев не отражены в имеющихся пыльцевых данных. Это определяет важность анализа структуры изменчивости хпДНК для локализации рефугиумов лесной растительности на Кавказе. Так, только на основании распространения хлоропластных гаплотипов, в дополнение к “колхидскому”, можно предполагать наличие ледниковых рефугиумов дубовых лесов на северном склоне Центрального Кавказа, на Восточном Кавказе и на Малом Кавказе. В Предкавказье дубы, видимо, распространились по рекам бассейнов Кубани и Кумы, текущим со склонов Центрального Кавказа, что объясняет присутствие только гаплотипов группы Е как в Западном, так и в Восточном Предкавказье. Показательный пример эффекта основателя при таком расселении – фиксация редкого гаплотипа Е-III в выборке Кропоткин (№ 15).

Также длительное, превышающее LGM существование дуба можно предполагать в северо-западных районах Кавказа, где во всех популяциях трех видов дуба (*Q. robur*, *Q. petraea*, *Q. pubescens*) фиксированы гаплотипы группы Z. Трудно допустить распространение гаплотипа Z-I исключительно из “колхидского” рефугиума, поскольку его ареал включает, помимо Северо-Западного Кавказа, и Восточный Крым, куда быстрая колонизация носителей кавказского гаплотипа Z-I с востока [29], навстречу эндемичным западнокрымским гаплотипам Т и К, могла происходить только из наиболее близких Крыму районов Северо-Западного Кавказа.

Молекулярные данные подтверждают длительное обособленное существование популяций дуба в плейстоцене в достаточно обширных районах Восточного Кавказа и Восточного Закавказья. Особенности восточных популяций Кавказа описываются во многих генетических исследованиях разных таксономических групп растений и животных (например, [4, 10, 11]). Дифференциация лесной биоты Кавказа могла начаться еще с конца верхнего миоцена, когда при появлении поперечного хребта Закавказье разделилось на западную (теплую и влажную) и восточную (аридную, с континентальным климатом) части [25]. Область распространения “восточных” гаплотипов дуба предстоит уточнить при исследовании прикаспийских районов Азербайджана и Ирана, в том числе дубов Гирканского рефугиума [5] и гор Малого Кавказа.

Вызывает интерес то обстоятельство, что резкая подразделенность Кавказского региона на районы, занятые определенными гаплотипами, при почти полном отсутствии изменчивости хпДНК внутри них, явно контрастирует с более южными областями обитания дубовых лесов. На-

пример, в Малой Азии районы распространения отдельных гаплотипов носят более мозаичный характер [30]. Предположительно эти особенности связаны с более мягкими условиями Средиземноморья, включая Малую Азию, по сравнению с более северными регионами. Вероятно, в Средиземноморье сокращения пригодных для широколиственных лесов местообитаний во время ледниковых фаз были менее критичными, и источников реколонизации ко времени улучшения климата оказывалось больше.

Результаты настоящей работы при сравнении с нашими данными по Крымскому п-ову [29] и с исследованиями дубов Малой Азии [30] показывают существование исторической связи кавказских популяций с географически близкими регионами Восточного Причерноморья – Восточным Крымом и Восточной Турцией. Гаплотипы Центрального и Восточного Кавказа (E, F) и Закавказья (гаплогруппа X) близки гаплотипам Северо-Восточной Турции. Из них гаплотипы F и X отсутствуют в Крыму. Гаплотипы Западного Крыма (T, K) близки гаплотипам Западной и Центральной Турции и отсутствуют на Кавказе. Гаплотип Z является эндемичным для района Западного Кавказа и Восточного Крыма. В целом в Причерноморском регионе выявляется сложная структура, показывающая выраженные различия в истории растительности Крыма и Кавказа. Общим для двух регионов – Крыма и Кавказа – является отсутствие обмена с восточно-европейской частью ареала по матерински наследуемым маркерам.

Отличие популяций Кавказа и основного ареала по хлоропластным маркерам

Исследования генетической изменчивости некоторых растений, например сосны обыкновенной по митохондриальной ДНК [15], можжевельника обыкновенного [10] и черемухи обыкновенной [14] по хлоропластной ДНК, тиса ягодного по ядерным маркерам [9], демонстрируют различия между популяциями западной и восточной части Кавказа. При этом северо-западные группы этих видов оказываются значительно ближе к европейским популяциям, чем восточные, что указывает на реализацию в прошлом генетического обмена между Северным Кавказом и Русской равниной через Приазовье или Северное Причерноморье. Однако в кавказской части ареалов дубов во всех популяциях присутствуют только гаплотипы, специфичные Кавказскому региону. Единственный случай вблизи г. Нальчик (дерево с гаплотипом A-II), по-видимому, имеет антропогенное, заносное происхождение, что подтверждается отнесением данного образца к восточно-европейскому кластеру по ядерным (nSSR) маркерам, в отличие от других образцов дуба Кавказа (Семерикова, неопубл. данные). В выборках Предкавказья, наибо-

лее близких к северной границе кавказского ареала дуба, “северных” гаплотипов, характерных для Восточной Европы, также не наблюдается.

Увеличение числа изученных выборок из северо-восточной части ареала, в том числе из районов, близких к южной границе ареала дуба черешчатого, и сравнение с данными других исследований дуба из южных областей Русской равнины [24] показывает, в свою очередь, отсутствие крымско-кавказских гаплотипов в восточно-европейской части ареала *Q. robur* (рис. 1, a). Таким образом, по матерински наследуемым маркерам связь между Кавказским регионом и Восточной Европой не выявлена. Барьером для генетического потока в этом случае, очевидно, является аридная степная зона. Считается [43, 44], что понтокаспийский регион в LGM и во времена более ранних плейстоценовых оледенений в основном был покрыт холодной степью. Кроме степной зоны географическим барьером между Кавказским перешейком и Русской равниной выступал Маньчский пролив, через который неоднократно происходил водообмен между черноморским и каспийским бассейнами [43]. В результате кавказские популяции не могли вносить существенный вклад в колонизацию северных территорий, и не испытывали влияния более северных популяций, по крайней мере путем переноса семян, поскольку матерински наследуемые маркеры не обнаруживают генетического обмена между двумя регионами. Однако вопрос об обмене ядерными генами посредством переноса пыльцы остается открытым ввиду способности пыльцы дуба распространяться на значительно большие расстояния, чем желуди [24, 45].

Имеющиеся палеоданные для областей к северу от Кавказа допускают возможную связь лесной растительности Западного Кавказа с Русской равниной. В последние годы стали формироваться представления о том, что полного исчезновения лесной зоны в LGM на территории Русской равнины не происходило [46–48], а лишь наблюдался ее сдвиг на юг. По данным, приводимым в работах [47, 48], при переходе от плейстоцена к голоцену на территории нижнего Дона были распространены леса, в том числе с участием дуба. В предгорьях Северо-Западного Кавказа [27] дубовые леса в гумидные фазы голоцена неоднократно распространялись из горных районов на Таманский п-ов. Для проверки гипотезы о взаимовлияниях кавказских и восточно-европейских популяций за счет пыльцевого переноса необходимо исследовать структуру изменчивости ядерной ДНК в сочетании с моделированием демографических сценариев, включающих возможные миграции ядерных генов.

Авторы выражают благодарность И.Ю. Исакову, Е.Г. Филиппову, М.А. Полежаевой, П.И. Та-

лайкиной, Т.В. Семериковой, П.А. Волковой, И.А. Шанцеру за помощь в сборе образцов дуба, рецензенту статьи за конструктивные 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.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hewitt G.M.* Post-glacial re-colonization of European biota // *Biol. J. Linn. Soc.* 1999. V. 68. P. 87–112.
2. *Connor S.E., Kvavadze E.V.* Modelling late Quaternary changes in plant distribution, vegetation and climate using pollen data from Georgia, Caucasus // *J. Biogeogr.* 2008. V. 36. № 3. P. 529–545. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2008.02019.x>
3. *Литвинская С.А., Муртазалиев Р.А.* Флора Северного Кавказа (Атлас-определитель). М.: Фитон XXI, 2013. 688 с.
4. *Tarkhnishvili D.* Historical Biogeography of the Caucasus. N. Y.: Nova Science, 2014. 218 p.
5. *Nakhutsrishvili G., Zazanashvili N., Batsatsashvili K., Montalvo Mancheno C.S.* Colchic and Hircanian forests of the Caucasus: similarities, differences and conservation status // *Fl. Medit.* 2015. V. 25 (Special Issue). P. 185–192. <https://doi.org/10.7320/FIMedit25SI.185>
6. *Тахтаджян А.Л.* Флористические области Земли. Л.: Наука, Ленингр. отд., 1978. 247 с.
7. *Seddon J.M., Seddon J.M., Santucci F. et al.* Caucasus Mountains divide postulated postglacial colonization routes in the white-breasted hedgehog, *Erinaceus concolor* // *J. Evol. Biol.* 2002. V. 15. № 3. P. 463–467.
8. *Grimm G.W., Denk T.* The Colchic region as refuge for relict tree lineages: Cryptic speciation in field maples // *Turk. J. Bot.* 2014. V. 38. P. 1050–1066.
9. *Mayol M., Riba M., González-Martínez S.C. et al.* Adapting through glacial cycles: insights from a long-lived tree (*Taxus baccata*) // *New Phytologist.* 2015. V. 208. № 3. P. 973–986. <https://doi.org/10.1111/nph.13496>
10. *Hantemirova E.V., Heinze B., Knyazeva S.G. et al.* A new Eurasian phylogeographical paradigm? Limited contribution of southern populations to the recolonization of high latitude populations in *Juniperus communis* L. (Cupressaceae) // *J. Biogeogr.* 2017. V. 44. P. 271–282. <https://doi.org/10.1111/jbi.12867>
11. *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>
12. *Алиев Х.У., Колтунова А.М., Куцев М.Г., Туниев Б.С.* Популяционно-генетический анализ бука восточного (*Fagus orientalis* Lipsky) с территории Крыма и Кавказа // *Turczaninowia.* 2020. V. 23. № 4. С. 17–31. <https://doi.org/10.14258/turczaninowia.23.4.3>
13. *Volkova P., Laczko L., Demina O. et al.* Out of Colchis: The Colonization of Europe by *Primula vulgaris* Huds. (Primulaceae) // *Acta Societatis Botanicorum Poloniae.* 2020. V. 89. № 3. <https://doi.org/10.5586/asbp.89313>
14. *Volkova P.A., Burlakov Y.A., Schanzer I.A.* Genetic variability of *Prunus padus* (Rosaceae) elaborates “a new Eurasian phylogeographical paradigm” // *Plant Syst. Evol.* 2020. V. 306. № 1. <https://doi.org/10.1007/s00606-020-01644-0>
15. *Semerikov N.V., Petrova I.V., Sannikov S.N. et al.* Cytoplasmic DNA variation does not support a recent contribution of *Pinus sylvestris* L. from the Caucasus to the main range // *Tree Genet. Genom.* 2020. V. 16. № 4. <https://doi.org/10.1007/s11295-020-01458-8>
16. Леса юга европейской части СССР и Закавказья // Леса СССР. М.: Наука, СО АН СССР, 1966. Т. 3. 463 с.
17. *Меницкий Ю.Л.* Дубы Азии. Л.: Наука, 1984. 315 с.
18. *Семериков Л.Ф.* Популяционная структура древесных растений (на примере видов дуба европейской части СССР и Кавказа). М.: Наука, 1986. С. 140.
19. Конспект флоры Кавказа: в 3 томах // Под ред. Кудряшовой Г.Л., Татанова И.В. СПб.; М.: Тов. науч. изд. КМК, 2012. Т. 3. Ч. 2. 623 с.
20. *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>
21. *Petit R.J., Csai 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. P. 5–26. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(01\)00645-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(01)00645-4)
22. *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](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(01)00634-X)
23. *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>

24. 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. № 10. Article number 1425. <https://doi.org/10.3390/f12101425>
25. Shatilova I., Mchedlishvili N., Rukhadze L., Kvavadze E. The history of the flora and vegetation of Georgia (South Caucasus). Tbilisi: Georgian Natl Museum, Institute of Paleobiology, 2011. 200 p.
26. Messager E., Belmecheri S., Von Grafenstein U. et al. Late Quaternary record of the vegetation and catchment-related changes from Lake Paravani (Javakheti, South Caucasus) // *Quaternary Science Reviews*. 2013. V. 77. P. 125–140. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2013.07.011>
27. Bolikhovskaya N.S., Porotov A.V., Richards K. et al. Detailed reconstructions of Holocene climate and environmental changes in the Taman Peninsula (Kuban River delta region) and their correlation with rapid sea-level fluctuations of the Black Sea // *Quat. Int.* 2018. V. 465. P. 22–36. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2017.08.013>
28. Семерикова С.А. Маркеры хлоропластной ДНК в исследовании филогеографии робуроидных дубов (*Quercus* L. sect. *Quercus*, Fagaceae) крымско-кавказского региона // *Генетика*. 2023. Т. 59. № 1. С. 50–64. <https://doi.org/10.31857/S0016675823010095>
29. Семерикова С.А., Подергина С.М., Ташев А.Н., Семериков В.Л. Филогеография видов дуба в Крыму выявляет плейстоценовые рефугиумы и пути миграций // *Экология*. 2023. V. 54. № 3. <https://doi.org/10.31857/S0367059723030058>
30. 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. № 5. Article number 40. <https://doi.org/10.1007/s11295-021-01522-x>
31. 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>
32. 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>
33. 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.
34. Excoffier L., Lischer H. ARLEQUIN ver. 3.5: An integrated software package for population genetics data analysis. Switzerland, Bern: Univ. Bern, 2011. 174 p.
35. 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>
36. Swofford D.L. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods). Version 4.0 beta10. Sunderland: Sinauer Associates, Massachusetts, 2002.
37. 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>
38. Yang Y., Zhou T., Qian Z., Zhao G. Phylogenetic relationships in Chinese oaks (Fagaceae, *Quercus*): Evidence from plastid genome using low-coverage whole genome sequencing // *Genomics*. 2021. V. 113. № 3. P. 1438–1447. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.03.013>
39. https://quercusportal.pierroton.inra.fr/index.php?p=GENOMIC_SEQ
40. Bandelt H.J., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // *Mol. Biol. Evol.* 1999. V. 16. № 1. P. 37–48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
41. 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>
42. Tarasov P.E., Volkova V.S., Webb T. et al. Last glacial maximum biomes reconstructed from pollen and plant macrofossil data from northern Eurasia // *J Biogeogr.* 2000. V. 27. P. 609–620. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.2000.00429.x>
43. Krijgsman W., Tesakov A., Yanina T. et al. Quaternary time scales for the Pontocaspian domain: Interbasinal connectivity and faunal evolution // *Earth-Science Rev.* 2019. V. 188. P. 1–40. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2018.10.013>
44. Болиховская Н.С., Маркова А.К., Фаустов С.С. Изменения ландшафтно-климатических условий в Терско-Кумской низменности в плейстоцене // *Вестник Моск. ун-та. Серия 5. География*. 2015. № 1. С. 55–70.
45. Buschbom J., Yanbaev Y., Degen B. Efficient long-distance gene flow into an isolated relict oak stand // *J. Heredity*. 2011. V. 102. № 4. P. 464–472. <https://doi.org/10.1093/jhered/esr023>
46. Эволюция экосистем Европы при переходе от плейстоцена к голоцену (24–8 тыс. л. н.) / Отв. ред. Маркова А.К., ван Кольфсхотен Т. М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2008. 556 с.
47. Демина О.Н. Становление степного типа растительности на территории Приазовья // *Аридные экосистемы*. 2009. Т. 15. № 4. С. 22–37.
48. Демина О.Н., Шилова Г.Н., Чепальга А.Л. и др. Результаты палинологического анализа и палеоботанические реконструкции в районе позднелепелитической стоянки Юловская (долина западного Маньчя) // *Изв. высш. уч. заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки*. 2009. № 4. С. 106–111.

Phylogeography of Oak Species in the Caucasus Based on the Results of Chloroplast DNA Analysis

S. A. Semerikova^{a, *}, Kh. U. Aliev^b, N. V. Semerikov^c, and V. L. Semerikov^a

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

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

^c*Botanical Garden, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, 620144 Russia*

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

In order to study the biogeography and history of the temperate biota of the Caucasian region, one of the centers of biological diversity of Eurasia, the phylogeographic structure of the chloroplast DNA of roburoid oaks (*Quercus* L. sect. *Quercus*, Fagaceae) was studied. We analyzed 926 trees of five species (*Quercus robur*, *Q. petraea*, *Q. pubescens*, *Q. hartwissiana*, *Q. macranthera*) from 70 populations located in different parts of the Caucasus. Sequencing of five fragments with a total length of more than 10000 bp revealed eight haplotypes, which were typed using chloroplast microsatellite loci (cpSSR), sequencing, and restriction analysis. The *Quercus* phylogenetic tree, which includes 34 chloroplast haplotypes of Western Eurasian and East Asian roburoid species, confirmed the monophyly of roburoid oaks, which form several lines that do not have supported topological relationships with each other. The haplotypes identified in the Caucasus belong to two divergent Western Eurasian lineages. These haplotypes are endemic for the Eastern Black Sea and Caucasian region and do not have related haplotypes beyond its borders, which indicates the long-term presence of oaks in the Caucasus and the historical links of the oaks of the Caucasian region with the Eastern Crimea and Eastern Turkey in the absence of chloroplast DNA exchanges with the Eastern European part of the range. The results of the present study indicate that Caucasian populations could not significantly contribute to the colonization of northern territories, and were not influenced by more northern populations, at least through seed transfer. The distribution zones of the Caucasian haplotypes almost do not intersect with each other, occupying certain geographical areas, probably due to the settlement from individual glacial refugia and genetic drift. The geographical structure of chloroplast DNA variability indicates a long-term presence of oak in addition to Western Transcaucasia (Colchis refugium), in the regions of the Northwestern, Central, Eastern Caucasus and the Lesser Caucasus. The coincident composition of the haplotypes of the studied oak species within the geographic regions indicates the long-term coexistence of different species in different parts of the Caucasus.

Keywords: phylogeography, Caucasus, *Quercus*, chloroplast DNA, population structure, refugia, molecular phylogeny.

ИЗМЕНЧИВОСТЬ МОРФОТИПОВ ДОБАВОЧНЫХ ХРОМОСОМ И ПОЯВЛЕНИЕ МИКРО-В-ХРОМОСОМ В КАРИОТИПЕ *Apodemus peninsulae* (Rodentia) НА ДАЛЬНЕМ ВОСТОКЕ РОССИИ

© 2023 г. Г. В. Рослик¹, *, И. В. Картавцева¹

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

*e-mail: roslik_g@mail.ru

Поступила в редакцию 15.12.2022 г.

После доработки 02.02.2023 г.

Принята к публикации 07.02.2023 г.

Описана изменчивость по числу и морфотипам макро-, мини- и микро-В-хромосом в кариотипах восточноазиатской мыши *Apodemus peninsulae* долины р. Зея Амурской области. Микро-В-хромосомы в кариотипах мышей Российского Дальнего Востока обнаружены впервые. Выявлены две разнонаправленные тенденции географической изменчивости морфотипов В-хромосом. Первая обусловлена присутствием—отсутствием мини и/или микро, помимо макро-В-хромосом, у животных правого и левого берега р. Зея в северо-восточной части Верхнезейской равнины, а также в северной части Амурско-Зейской равнины. Вторая — клинальная изменчивость, характеризуется постепенным возрастанием в трех географических популяциях *A. peninsulae*, в направлении с севера на юг долины р. Зея, количественных характеристик В-хромосом: индекса $\bar{x}V$ Мах микро, $\bar{x}V$ Мах макро, числа морфотипов, числа клонов у особей-мозаиков, а также доли особей-мозаиков. Обнаруженное разнообразие морфотипов В-хромосом *A. peninsulae* для 13 регионов позволяет по-новому оценить географическую изменчивость добавочных хромосом этого вида на Дальнем Востоке России и предположить их адаптивную значимость для вида.

Ключевые слова: В-хромосомы, полиморфизм, мозаицизм, *Apodemus peninsulae*, клинальная изменчивость, морфотипы, модальное число, индекс $\bar{x}V$.

DOI: 10.31857/S0016675823070093, **EDN:** QPQAEZ

В геноме более чем 2828 видов эукариот присутствуют, помимо хромосом основного набора (А), добавочные (или В-) хромосомы [1]. К настоящему времени полиморфизм по В-хромосомам известен у 85 видов млекопитающих, более 2/3 из которых принадлежат к отряду Rodentia [2]. Часто В-хромосомы имеют гетерохроматиновую природу и состоят из повторяющихся последовательностей. Они не являются обязательными элементами генома, не подчиняются наследованию по законам Менделя, не оказывают существенного влияния на развитие организма [3–5]. В последнее время обсуждаются вопросы происхождения, эволюции, поведения в митозе и мейозе, молекулярного состава, пространственного расположения и вклада В-хромосом в архитектуру интерфазного ядра у млекопитающих [2, 6–13 и др.]. Тем не менее исследования числового и морфотипического разнообразия В-хромосом остаются первостепенными и не утрачивают своей актуальности при изучении кариотипов.

Числа В-хромосом у большей части видов млекопитающих варьируют от 1 до 17 [2]. Однако у двух видов — восточноазиатской мыши *Apodemus peninsulae* Thomas, 1906 и копытного лемминга *Dicrostonyx torquatus* Pall., 1789 выявлены максимальные для млекопитающих числа В-хромосом. Так, у первого вида в некоторых популяциях Сибири это число доходит до 30 [14], а у второго вида на Чукотке (кроме о-ва Врангеля, где $V = 0$) — до 42 [15]. Как правило, размеры В-хромосом млекопитающих либо меньше (почти у одной трети видов это микро-В-хромосомы), либо сопоставимы с А-хромосомами набора. Их морфология весьма разнообразна (от акро- до метацентрической и/или точкоподобной — в случае микро-В-хромосом). Крайне редко В-хромосомы превышают по размеру А-хромосомы, как, например, у бразильского перепончатопалого хомяка *Holochilus brasiliensis* и белохвостой чешуехвостой крысы *Uromys caudimaculatus* [2]. Наиболее широкий спектр разнообразия размерных и морфологических типов В-

хромосом отмечен у восточноазиатской мыши. К тому же вид распространен в Центральной, Южной Сибири, Прибайкалье, Дальнем Востоке России, Северной Монголии, Центральном, Восточном Китае, п-ове Корея, на севере Японии (о-ве Хоккайдо) [16].

В силу вышеуказанных кариотипических особенностей и широкого распространения этот вид часто используется как модельный объект для изучения хромосомного полиморфизма по В-хромосомам у млекопитающих.

Изменчивость по В-хромосомам *A. peninsulae* известна более 50 лет [17–19]. В литературе накоплены данные по изменчивости числа и морфологии В-хромосом у животных Сибири, Прибайкалья [20], Забайкалья, юга Дальнего Востока России, в том числе на островах Тихого океана, а также Китая, севера Японии (о-ве Хоккайдо), Ю. Кореи [21].

Спектр вариаций чисел В-хромосом в кариотипе восточноазиатской мыши разных регионов имеет широкий разброс. Так, вариации модальных чисел В-хромосом у животных Сибири 1–30 [14, 20], а на Дальнем Востоке России – 1–7 [21–24]. Объединение данных по регионам Дальнего Востока не выявило значительных различий по модальному числу В-хромосом, и среднее число В-хромосом на особь (индекс $\bar{x}V$), изменяясь в разных точках отлова от 0 до 4, составило для региона 1.67 [23]. В объединенных выборках разных регионов Сибири, Бурятии и Монголии индекс $\bar{x}V$ изменялся в более широких пределах, по сравнению с Дальним Востоком, варьируя от 5.9 до 23.0 [20].

Нередко исследователи упрощенно делят В-хромосомы на макро (структуры видимой морфологии) и микро (элементы без распознаваемой морфологии). Ранее была рассчитана частота встречаемости *A. peninsulae* с макро- и микро-В-хромосомами в разных регионах по ареалу [21]. При этом отмечено увеличение общего числа В-хромосом и частоты микро-, по сравнению с макро-В-хромосомами – у мышей Сибири [14, 20], Забайкалья, Японии [21]. По составу ДНК макро- и микро-В-хромосомы имеют повторы, сходные с разными районами плеч или прицентромерных районов хромосом основного набора. Сравнительный анализ макро- и микро-В-хромосом *A. peninsulae*, выполненный при помощи метода микродиссекции хромосом и FISH-анализа, не выявил в В-хромосомах особей Дальнего Востока России слабоконденсированных повторов ДНК, характерных для микро-В-хромосом Сибири [10, 25]. Поэтому была введена еще одна группа – мини-В-хромосомы, к которой отнесли

очень мелкие структуры особей дальневосточных популяций (первоначально классифицированных как микро), встречающиеся у них с небольшой частотой [11, 23, 26].

От акроцентрических хромосом основного (А-) набора В-хромосомы *A. peninsulae* резко отличаются как разнообразной морфологией – от акро- до метацентрических и микро-В-хромосом, так и размерами – от крупных, превышающих А-хромосомы, до мелких и точкоподобных. Создано несколько систем классификации морфотипов В-хромосом. Ю.М. Борисов [27] разделяет В-хромосомы на пять классов на основе размерно-морфологических характеристик. Мы рассматриваем шесть групп морфотипов, с учетом выделения “мини” В-хромосом [26].

На юге Дальнего Востока России разнообразие морфотипов В-хромосом *A. peninsulae* наиболее хорошо изучено для Приморского, Хабаровского краев и Еврейской автономной области [23, 24, 26, 28]. В этих регионах описаны преобладающие и редко встречающиеся морфотипы В-хромосом. Так, метацентрические В-хромосомы средних и мелких размеров отмечены здесь чаще всего, в то время как другие макро (крупные мета-, субмета-, субтелоцентрические; средние и мелкие субмета-, субтелоцентрические) и мини-В-хромосомы отмечены реже.

По морфотипическому многообразию выявлена клинальная изменчивость, связанная с сокращением числа морфотипов в направлении с востока ареала Приморского края на северо-запад – в Хабаровский край, Еврейскую АО и предположительно далее на запад, в Амурскую область [24]. В силу неравномерности кариологических исследований кариотипы *A. peninsulae* остаются малоизученными на обширной территории Амурской области. Этот регион фактически является белым пятном, так как описания кариотипов проведены лишь для пяти особей из двух удаленных точек [29, 30]. Настоящая работа является продолжением исследования морфотипов В-хромосом восточноазиатской мыши из ранее неизученных регионов Дальнего Востока России.

Цель настоящей работы – получить информацию о морфотипической изменчивости В-хромосом *A. peninsulae* в Амурской области и сравнить ее с имеющимися данными для мышей дальневосточной части ареала.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованы В-хромосомы у 19 особей восточноазиатской мыши, отловленных в летние месяцы

Таблица 1. Пункты, биотоп и годы отлова *Apodemus peninsulae* в долине р. Зея Амурской области

Номер пункта отлова	Месяц и год отлова	Число особей	Географическое расположение/биотоп (координаты)	Источник
Северо-восток Верхнезейской равнины, географическая популяция I				
1	Июнь 2014 г.	1 ♀	Зейский р-н, правый (или западный) берег Зейского водохранилища, окр. с. Бомнак/разнотравная поляна широколиственного леса (54°43'07" с. ш., 128°53'00" в. д.)	[30]
2	Июль 2015 г.	5 ♂♂	Зейский р-н, левый (или восточный) приток р. Зея, долина р. Арги/участок широколиственного леса (54°40'17" с. ш., 129°6'36" в. д.)	Наши данные
Север Амурско-Зейской равнины, географическая популяция II				
3	Август 2013 г.	3 ♂♂	Зейский р-н, правый (или западный) берег р. Зея, 32 км по дороге на запад от г. Зея/граница заболоченного участка и широколиственного леса (53°40'37" с. ш., 126°55'32" в. д.)	»
4	Август 2013 г.	3 (1 ♂/2 ♀♀)	Зейский р-н, правый (или западный) берег р. Зея, 11 км по дороге на юг от г. Зея/лесополоса вдоль дороги (53°40'20" с. ш., 127°03'40" в. д.)	»
5	Август 2013 г.	4 (1 ♂/3 ♀♀)	Зейский р-н, левый (или восточный) берег р. Зея, 9 км на юг по дороге от г. Зея/заболоченный участок вдоль дороги (53°41'15" с. ш., 127°16'01" в. д.)	»
Юго-восток Амурско-Зейской равнины, географическая популяция III				
6	Август 2012 г.	4 ♂♂	Свободненский р-н, правый (или западный) берег р. Зея, близ с. Желтоярово/разнотравный луг (51°31'09" с. ш., 128°25'46" в. д.)	»
7	Июль 1986 г.	4 ♂♂	Благовещенский р-н, правый (или западный) берег р. Зея, 30 км на северо-восток от г. Благовещенск, близ с. Белогорье/овраг вблизи широколиственного леса (50°29' с. ш., 127°39' в. д.)	[29]
1–7	Всего	24 (18 ♂♂/6 ♀♀)		

2012, 2013 и 2015 гг. в пяти пунктах (№ 2–6) долины р. Зея Амурской области (табл. 1, рис. 1). Также нами использованы характеристики кариотипов от пяти ранее изученных особей Амурской области из двух пунктов № 7 и 1 [29, 30].

В работе точки отлова объединены в географические популяции I–III, с учетом географических преград, климата и человеческой деятельности. Семь пунктов отлова находятся в долине р. Зея Амурской области на территории двух равнин – Верхнезейской и Амурско-Зейской. Верхнезейская равнина со всех сторон ограничена горными

хребтами: на севере – хребет Становой, на юге – система хребтов Тукурингра–Соктахан–Джагды. Территория равнины относится к зоне средней тайги, с характерными неблагоприятными условиями сурового климата, многолетней мерзлотой. Биотоп, пригодный для восточноазиатской мыши, здесь стал резко ограничен после образования Зейского водохранилища. После 1974 г. и до недавнего времени считали, что этот вид на Верхнезейской равнине отсутствует. Отлов *A. peninsulae* в пунктах № 1 и 2 [30, 31] позволил восстановить вопрос ее обитания на этой территории и сделать

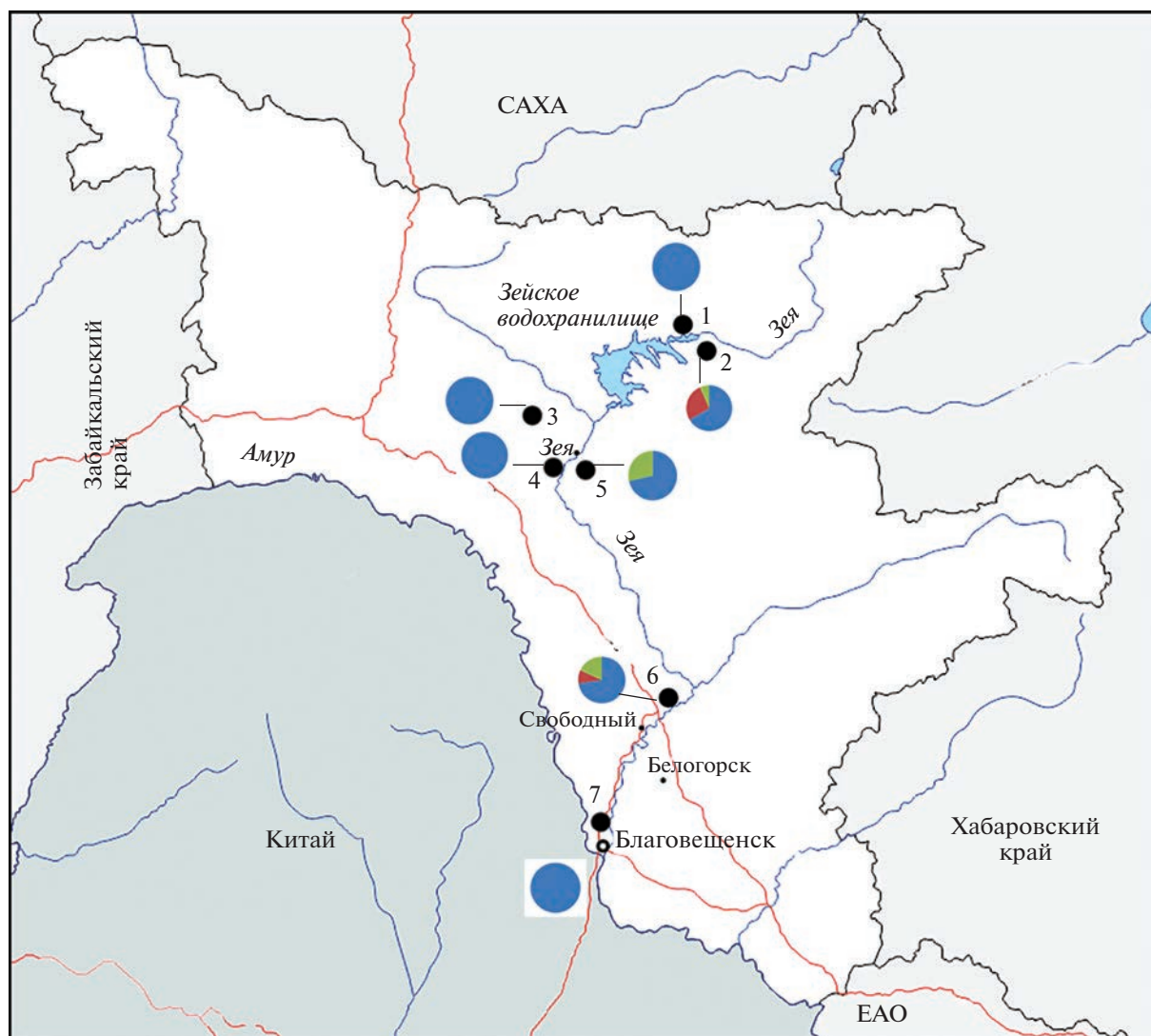


Рис. 1. Пункты отлова и частота морфотипов макро (синий), мини (красный) и микро (зеленый) В-хромосом *A. peninsulae* в долине р. Зейя. Цифры соответствуют пунктам отлова, приведенным в табл. 1–3.

вывод, что вид в этом районе изолирован от основного ареала [32]. Обе выборки расположены в северо-восточной части Верхнезейской равнины, недалеко друг от друга, поэтому мы рассматривали их как единую географическую популяцию I.

Остальные выборки сделаны в северной и юго-восточной частях Амурско-Зейской равнины долины р. Зейя. Северная часть выборок, расположенных близко друг от друга, на правом и левом берегу р. Зейя, взята в аграрных биотопах, близ широколиственных зон растительности. Считается, что Зейское водохранилище оказывает влияние на климат, растительность и распространение краеарейальных видов грызунов. Здесь восточноазиатская мышь находится близко к северной границе ареала [32]. Обитает в березняках, сфор-

мировавшихся в результате антропогенного воздействия на лесные экосистемы южной тайги. Эти выборки (№ 3, 4, 5) мы рассматривали как географическую популяцию II.

В юго-восточной части Амурско-Зейской равнины исследованы две точки (№ 6 и 7), расположенные в зоне луговой экосистемы, часто являющиеся вторичными как следствие уничтожения лиственных лесов. Климат здесь мягче, чем в северной части равнины, с более разнообразной растительностью [33]. Поэтому мы объединили эти точки в единую географическую популяцию III.

Суспензии хромосом получены из клеток костного мозга в полевых условиях по стандартной методике [34]. Для идентификации числа и

морфологии хромосом использованы методы рутинного окрашивания (ацето-орсеином или красителем Гимза), а для окраски на структурный гетерохроматин (С-бэндинг) метод, предложенный А.Т. Самнером [35]. Для кариотипирования каждой особи проанализировано не менее 21 метафазы. Хромосомные препараты просмотрены под микроскопом Axioskop 40 (Carl Zeiss, Германия). Для регистрации и обработки микроизображений использованы CCD-камера AxioCam HR и программное обеспечение Axiovision (Carl Zeiss) ЦКП “Биотехнология и генетическая инженерия” ФНЦ биоразнообразия ДВО РАН.

По размерам и морфологии выделены шесть групп морфотипов В-хромосом [26]: 1 – крупные (L) мета- (L-m), субмета- (L-sm), субтелоцентрические (L-st); 2 – средние (M) мета- (M-m), субмета- (M-sm), субтелоцентрические (M-st); 3 – мелкие (S) мета- (S-m), субмета- (S-sm), субтелоцентрические (S-st); 4 – мелкие (S) акроцентрические (S-a); 5 – очень мелкие (SS) мини-В-хромосомы (SS-mini), в 2–3 раза мельче мелких аутосом и имеющие хотя бы одно видимое плечо; 6 – очень мелкие микро (SS-micro) В-хромосомы, точкообразные, без распознаваемой морфологии, в 5–6 и более раз мельче мелких хромосом основного набора.

В сравнительном анализе использовано разное деление В-хромосом на макро (структуры из групп морфотипов 1–4), мини (группа 5) и микро (группа 6).

При оценке характера мозаицизма использован критерий учета клеточных клонов, ранее разработанный Д.К. Беляевым с коллегами для исследования клеток костного мозга серебристо-черных лисиц с В-хромосомами [36]. Клоном считали клетки, когда гипоплоидный класс клеток был равен или превышал 10%, а гиперплоидный составлял не менее 5% от модального числа. Животные с двумя и более клонами клеток классифицировали как мозаиков, а с одним клоном – как имеющих стабильный кариотип.

Для особей из каждой точки отлова приведены числовые параметры В-хромосом (M_0 – мода, или модальное число, \bar{x}_V – среднее число В-хромосом на особь, Max – максимальное число В-хромосом и SE – стандартная ошибка средних), которые вычислены с использованием пакета статистических программ Statistica TIBCO Software Inc. [37]. Индекс $\bar{x}_V M_0$ рассчитан по модальным хромосомным числам для каждого пункта отлова как суммарное отношение чисел В-хромосом в модальных клонах животных к числу особей, вслед за другими исследователями [38].

Для учета информации об изменчивости числовых и морфологических характеристик В-хромосом дополнительно приведен индекс $\bar{x}_V Max$ – среднее число В-хромосом на особь по клону с максимальным числом В-хромосом, так как у животных с мозаицизмом он отличен от индекса $\bar{x}_V M_0$, а у мышей со стабильным кариотипом эти индексы имеют равные значения.

Для расчета доли особей с макро-, мини- и микро-В-хромосомами, а также для оценки разнообразия морфотипов В-хромосом у животных разных регионов Дальнего Востока России использовали пакет программы xls для Windows 10. Частоту каждого морфотипа В-хромосом (в %) рассчитывали относительно общей суммы В-хромосом, найденных в кариотипах всех животных региона. В сравнительном анализе характеристик В-хромосом юга Дальнего Востока России, помимо 24 изученных экземпляров из Амурской области, дополнительно привлечены данные кариотипов 503 животных ЕАО, Хабаровского, Приморского краев и Сахалинской области [21, 23, 24, 28]. При составлении дендрограмм частоты встречаемости морфотипов В-хромосом мы заново перераспределили географически близкие выборки по 13 регионам Дальнего Востока России (10 – с континентальной части и 3 – с островов).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Кариотипы *A. peninsulae* долины р. Зея Амурской области (групп I–III) включали 48 убывающих по величине акроцентрических хромосом основного набора (А-хромосомы), а также варьирующие от 0 до 5 добавочные (В-) хромосомы ($2n = 48–53$). Всего у животных из Амурской области обнаружено семь морфотипов В-хромосом. Индивидуальные кариотипы особей представлены разнообразными сочетаниями одного–трех морфотипов В-хромосом (рис. 2,а). Найдены здесь следующие В-хромосомы: 0–5 макро (L-m, M-m, M-sm, S-m, S-sm), 0–3 мини (SS-mini) и впервые для Амурской области (а также для Дальнего Востока России) 0–2 микро (SS-micro). Одна половина исследованных животных имела мозаичные (среди них 8 самцов и 4 самки), другая половина – стабильные кариотипы (10 самцов и 2 самки).

При дифференциальном С-окрашивании В-хромосом большая часть двуплечих макро и мини элементов не имела С-блоков в прицентромерных районах. У них, как правило, с разной интенсивностью окрашивались дистальные районы плеч или плечи почти целиком, без прицентромерной области. В целом сигнал их окраски был

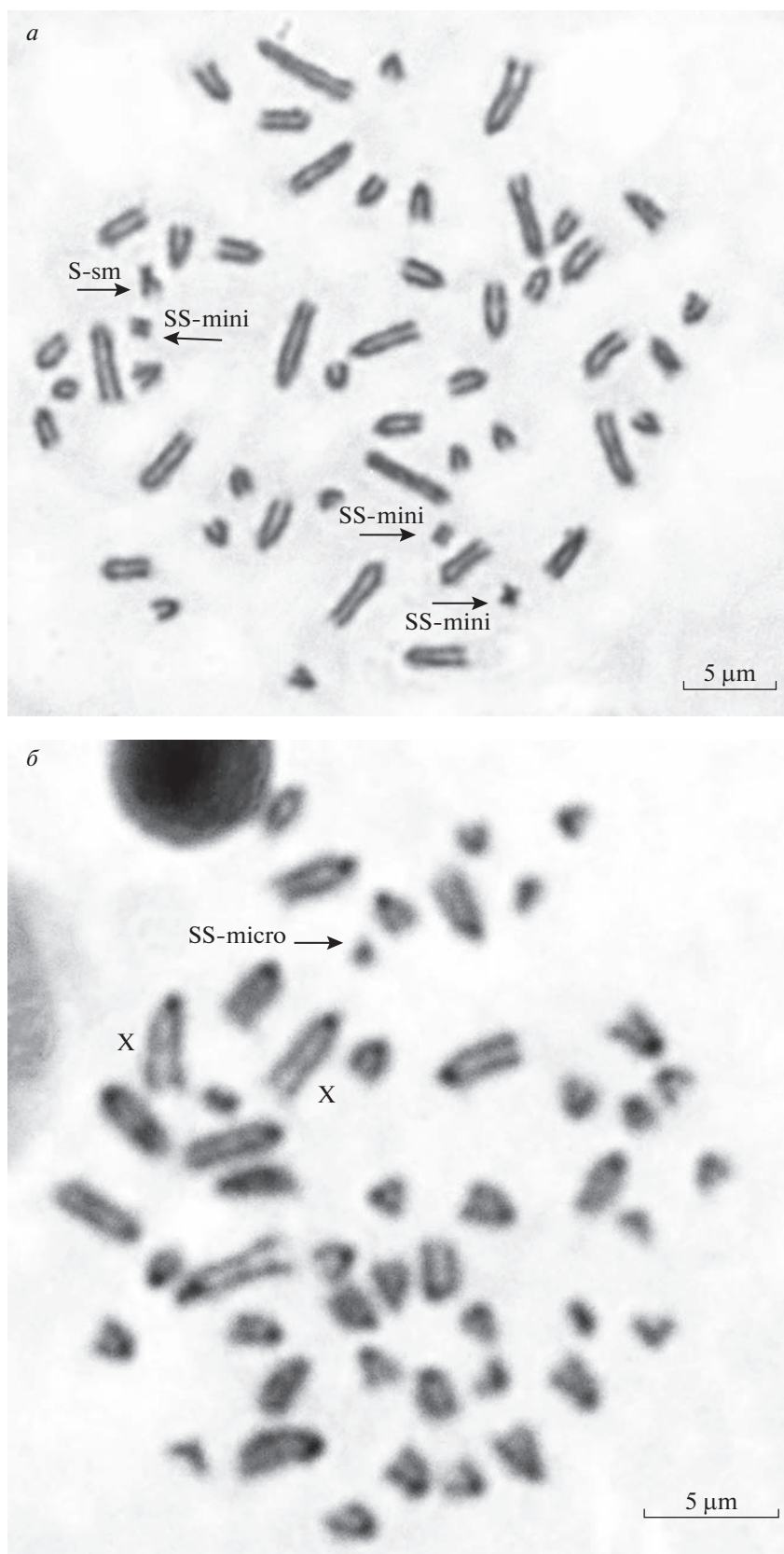


Рис. 2. Метафазные пластинки *A. peninsulae*: *a* – рутинная окраска ацето-орсеином самца № 3952 из пункта № 2, долина р. Арги, $2n = 48 + 4Bs$ (1 S-sm + 3 SS-mini-m); *б* – С-окрашивание хромосом самки № 3314 из пункта № 5, левый берег р. Зeya, $2n = 48 + 1B$ (1 SS-micro). Стрелками указаны В-хромосомы, X – половые X-хромосомы.

Таблица 2. Индивидуальные вариации чисел и частота морфотипов В-хромосом (Bs) трех групп *A. peninsulae* долины р. Зезя

Номер пункта отлова	№ особи	Пол	Морфотипы Bs (по В Max)										Число Bs		x̄B Mo ± SE		
			тасто					SS-mini	SS-micro	B	Mo	Max	x̄B Max ± SE				
			L-m	M-m	M-sm	S-m	S-sm										
Географическая популяция I																	
1	3627	♀	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2.00	2.00
2	3951	♂	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	2	2	2	3.00 ± 0.63	3.00 ± 0.63
2	3952	♂	0	0	0	0	1	3	0	0	0	4	4	4	4		
2	3953	♂	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2	2	2	2		
2	3955	♂	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	2	2	2		
2	3956	♂	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	5	5	5		
x̄B Max ± SE по морфотипам (I)			0	0	0	1.83 ± 0.70	0.17 ± 0.17	0.67 ± 0.49	0.17 ± 0.17	2, 4, 5	2	2	2.83 ± 0.54	2.83 ± 0.54	2.83 ± 0.54	2.83 ± 0.54	2.83 ± 0.54
Географическая популяция II																	
3	3348	♂	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2.00 ± 1.00	2.00 ± 1.00
3	3349	♂	0	1	0	3	0	0	0	0	0	4	4	4	4		
3	3351	♂	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1		
4	3318	♀	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	2	2	2	2.67 ± 0.33	2.67 ± 0.33
4	3319*	♀	1	0	0	2	0	0	0	0	0	1-3	3	3	3		
4	3321	♂	1	1	0	1	0	0	0	0	0	3	3	3	3		
5	3311*	♂	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0-3	1	3	3	1.75 ± 0.48	0.75 ± 0.25
5	3312*	♀	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1-2	1	2	2		
5	3313*	♀	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0-1	0	1	1		
5	3314*	♀	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0-1	1	1	1		
x̄B Max ± SE по морфотипам (II)			0.20 ± 0.13	0.50 ± 0.17	0	1.00 ± 0.30	0.20 ± 0.13	0	0.20 ± 0.13	0	0.20 ± 0.13	0-4	1	4	2.10 ± 0.34	1.70 ± 0.40	
Географическая популяция III																	
6	3165*	♂	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2-4	2	4	4	2.75 ± 0.48	2.00 ± 0.00
6	3166	♂	0	1	0	1	0	0	0	0	0	2	2	2	2		
6	3167*	♂	0	0	0	2	0	1	0	0	0	2-3	2	3	3		
6	3168*	♂	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1-2	2	2	2		
7	18-86*	♂	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0-2	1	2	2	3.00 ± 0.58	2.00 ± 0.41
7	19-86*	♂	1	1	0	2	0	0	0	0	0	2-4	3	4	4		
7	20-86*	♂	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1-2	2	2	2		
7	21-86*	♂	0	2	0	2	0	0	0	0	0	1-4	2	4	4		
x̄B Max ± SE по морфотипам (III)			0.25 ± 0.16	1.00 ± 0.27	0.13 ± 0.13	1.25 ± 0.31	0	0.13 ± 0.13	0.25 ± 0.25	0.25 ± 0.25	0.25 ± 0.25	0-4	2	4	3.00 ± 0.33	2.00 ± 0.19	
x̄B max ± SE по морфотипам (все)			0.17 ± 0.08	0.54 ± 0.13	0.04 ± 0.04	1.29 ± 0.24	0.13 ± 0.07	0.21 ± 0.13	0.21 ± 0.10	0.21 ± 0.10	0.21 ± 0.10	0-5	2	5	2.58 ± 0.23	2.08 ± 0.23	

Примечание. Номер пунктов отлова см. в табл. 1; * отмечены особи-мозанки, для них в столбцах "Морфотипы Bs" указано максимальное число В-хромосом в клоне. Мо – мода (модальное число Bs в клоне); Max – максимум (максимальное число Bs в клоне); x̄B Mo – среднее число Bs на особь, по модальным значениям Bs; x̄B Max – средние значения индекса на особь, рассчитанные по максимальным числам Bs, ±SE – стандартные ошибки средних.

Таблица 3. Характер мозаицизма кариотипов *A. peninsulae* долины р. Зея Амурской области

Номер пункта отлова	Число особей	Вариации чисел В-хромосом с учетом клонов	Доля животных с числом клонов 1–4				Доля особей с мозаицизмом
			1	2	3	4	
1	1	2	1.00	0	0	0	0
2	5	2, 4, 5	1.00	0	0	0	0
<i>I всего</i>	6	2–5	1.00	0	0	0	0
3	3	1, 4	1.00	0	0	0	0
4	3	1–3	0.67	0	0.33	0	0.33
5	4	0–3	0	0.75	0.25	0	1.00
<i>II всего</i>	10	0–4	0.50	0.30	0.20		0.50
6	4	1–4	0.25	0.50	0.25	0	0.75
7	4	0–4	0	0.25	0.50	0.25	1.00
<i>III всего</i>	8	0–4	0.12	0.38	0.38	0.12	0.88

Примечание. Номера пунктов отлова (арабские цифры) или объединенных локальных популяций (римские цифры) соответствуют номерам на рис. 1 и в табл. 1 и 2; 1 клон – животные со стабильным кариотипом (=с одним клеточным клоном).

размытым и более слабым, чем у С-блоков прицентромерных районов плеч аутосом, что характерно для С-окрашивания В-хромосом животных Дальнего Востока [22, 29]. Однако у некоторых особей на крупных и мелких двуплечих В-хромосомах, а также на части очень мелких В-хромосом имелись С-блоки в прицентромерном районе. Следует заметить, что по сравнению с аутосомами на двуплечих В-хромосомах эти С-блоки окрашивались слабее. Напротив, часть очень мелких В-хромосом были ярко окрашены при С-бэндинге и были определены нами как микро-В-хромосомы (рис. 2, б). Характер их окраски был аналогичен С-окрашиванию многих мелких микро-В-хромосом животных из популяций Сибири и о. Хоккайдо Японии [21].

Количественные и морфотипические характеристики В-хромосом (табл. 2), а также характер мозаицизма (табл. 3) были изменчивы в I–III географических популяциях *A. peninsulae* долины р. Зея.

В кариотипах мышей географической популяции I из Верхнезейской равнины (пункты № 1 и 2) выявлено наибольшее число В-хромосом, равное 5, которое представлено сочетаниями 1–5 макро, 0–3 мини и 0–1 микро добавочных хромосом. Среднее число В-хромосом на особь ($\bar{x}V Mo$) со-

ставляло 2 и 3, в пунктах № 1 и 2 соответственно. Суммарно для этих животных индекс $\bar{x}V Mo = \bar{x}V Max = 2.83$. Выявлено четыре морфотипа В-хромосом, где преобладал клон с двумя мелкими метацентрическими (S-m) В-хромосомами. Реже встречены мини, S-sm и микро-В-хромосомы. Мозаицизма среди шести особей не обнаружено.

В кариотипах мышей географической популяции II сочетания В-хромосом составили: 0–4 макро, 0 мини и 0–1 микро. Пределы варьирования индекса $\bar{x}V Mo$ были широкие – от 0.75, 2.00 и до 2.67, в пунктах отлова № 5, 3, 4 соответственно. Для этих мышей $\bar{x}V Mo$ составил 1.70, а $\bar{x}V Max = 2.10$ (табл. 2). Обнаружено пять морфотипов В-хромосом. Чаще всего отмечены животные, имеющие в модальном клоне 1 S-m или 1 M-m В-хромосому. Редко зарегистрированы L-m, S-sm из группы макро-В-хромосом, а также микро-В-хромосомы. Среди мышей популяции II обнаружено четыре самца и одна самка со стабильными кариотипами (№ 3, 4). Одна самка 3319 из точки № 4 и все особи (1 самец и 3 самки) из точки № 5 были двух- или трехклоновыми особями-мозаиками (табл. 2, 3).

Сочетания В-хромосом в кариотипах мышей географической популяции III (№ 6 и 7) Амур-

ско-Зейской равнины были: 2–4 макро, 0–1 мини, 0–2 микро. Индекс $\bar{x}V$ Мо равнялся 2.00 в обеих точках отлова. Для мышей $\bar{x}V$ Мах = 3.00 (табл. 2). Найдено шесть морфотипов В-хромосом. Как и в популяции II, здесь преобладали мыши, имеющие в модальном клоне 2 S-m и/или M-m В-хромосомы. Кроме того, из макро-В-хромосом редко отмечены L-m, M-sm, а также мини- и микро-В-хромосомы. Среди исследованных восьми самцов выявлены преимущественно особи-мозаики с двумя, тремя и четырьмя клонами клеток (табл. 3). Лишь один самец 3166 из пункта № 6 имел стабильный кариотип.

У животных географических популяций II и III Амурско-Зейской равнины вариации чисел В-хромосом в кариотипе зверьков были схожи – от 0 до 4.

Объединение хромосомных данных от мышей с левого и правого берега р. Зeya показало, что у первых (№ 2, 5) отсутствовали некоторые морфотипы макро-В-хромосом (M-m, L-m). Однако у них имелись SS-micro и/или SS-mini В-хромосомы, которые не обнаружены у большинства животных с правого берега (№ 1, 3, 4, 7) р. Зeya. Исключение составили два правобережных самца-мозаика 3165 и 3167 из точки № 6, которые содержали либо микро-, либо мини-В-хромосомы соответственно (см. рис. 1 и табл. 2).

Сопоставление полученных данных выявило две тенденции географической изменчивости в Амурской области. Одна связана с наличием у *A. peninsulae* географических популяций I и II с левого берега р. Зeya (пункты № 2 и 5) всех типов В-хромосом (макро, мини, микро), а с правого берега (№ 1, 3, 4) только макро-В-хромосом (рис. 1, табл. 2). В географической популяции III нижнего течения р. Зeya такой изменчивости нет, зверьки из двух пунктов правого берега р. Зeya имели разнородные кариотипы: в пункте № 7 присутствовали только макро-В-хромосомы, в № 6 – макро-, мини- и микро-В-хромосомы.

Также у изученных *A. peninsulae* была отмечена клинальная изменчивость в направлении с севера на юг долины р. Зeya (от I ко II и III географическим популяциям), обусловленная постепенным возрастанием пяти количественных показателей В-хромосом: 1) индекса $\bar{x}V$ Мах микро – от 0.17, 0.20 до 0.25; 2) индекса $\bar{x}V$ Мах макро – от 2.00, 1.90 до 2.63; 3) числа морфотипов – от 4, 5 до 6; 4) числа клонов у особей-мозаиков – от 1, 1–3 до 1–4; 5) доли особей-мозаиков – от 0. 0.50 до 0.88 (см. табл. 2 и 3).

Выше показано плавное возрастание значений индекса $\bar{x}V$ Мах для микро и для всех макро-В-

хромосом. Вклад определенного морфотипа в процесс нарастания суммарного индекса $\bar{x}V$ Мах макро-В-хромосом не равномерен в географических популяциях I–III. Так, превалирующий морфотип – мелкие метацентрические В-хромосомы имеет везде высокие значения $\bar{x}V$ Мах S-m – 1.83, 1.00, 1.29. Наиболее ярко возрастание индекса $\bar{x}V$ Мах от популяций I к III проявляется в нескольких морфотипах макро-В-хромосом: M-m (0, 0.50, 1.00), L-m (0, 0.20, 0.25), M-sm (0, 0, 0.13). Напротив, значение $\bar{x}V$ Мах морфотипа S-sm имеет тенденцию к понижению в вышеуказанных популяциях – 0.17, 0.20, 0. Также снижение $\bar{x}V$ Мах наблюдается у морфотипа SS-mini – 0.67, 0, 0.13.

ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ представленных выше кариотипических характеристик В-хромосом мышей Амурской области и имеющих к настоящему времени сведений о В-хромосомах животных Дальнего Востока России позволил выявить ряд сходств и различий между географическими регионами.

Оценка числовых параметров В-хромосом

Наибольшие сходства выявлены по количественным параметрам В-хромосом (общее число, модальное число, индекс $\bar{x}V$ Мо) у животных Амурской области и Еврейской автономной области (ЕАО). Вариации чисел В-хромосом в кариотипах мышей этих двух регионов были схожи (0–5). Модальное число В-хромосом в Амурской области было 2, а в ЕАО – 1. В разных пунктах отлова долины р. Зeya разброс $\bar{x}V$ Мо был от 0.75 до 3.00, обобщенный $\bar{x}V$ Мо для всех особей = 2.08. В ЕАО разброс $\bar{x}V$ Мо для разных мест отлова составлял от 1.0 до 2.25, итоговый для всех $\bar{x}V$ Мо = 2.0 [24]. В Хабаровском и Приморском краях по сравнению с долиной р. Зeya и ЕАО вариации чисел В-хромосом были немного выше – от 0 до 7, размах $\bar{x}V$ Мо составил от 0 до 4, а итоговый $\bar{x}V$ Мо был, наоборот, ниже – 1.55 и 1.68 соответственно [23].

Характер мозаицизма

Как известно, доля животных Дальнего Востока с мозаицизмом довольно высока – 61.70 [23]. В регионах доли особей-мозаиков составили: 0.53 – в ЕАО [24], 0.57 – в Приморском, 0.67 – в Хабаровском крае [21]. Изученные животные долины р. Зeya по степени мозаицизма (его доля 0.50) близки с особями из ЕАО. Стабильность кариотипов мышей Приморского и Хабаровского краев

чаще всего связана с наличием особей без В-хромосом, а не с постоянным числом $2n + Bs$ [26, 29].

Исследованные животные также схожи с другими особями Дальнего Востока по характеру мозаицизма и преобладанию двух- и трехклоновых мозаиков [23, 39]. Более высокие клоны клеток (от 4 и более) ранее выявлены у мышей из точки № 7 Амурской области, а также из Забайкалья, Алтая и Республики Тыва [39].

Сравнительный анализ количественных характеристик стабильных и мозаичных кариотипов *A. peninsulae* показал увеличение числовых спектров В-хромосом у особей-мозаиков [22–24, 26]. Ранее выявлено, что в Среднем (ЕАО) и Нижнем (Хабаровский край) Приамурье, а также в Приморском крае редкие морфотипы макро- и мини-В-хромосом чаще всего встречены в кариотипах особей-мозаиков, по сравнению с животными со стабильным кариотипом. Этот факт, по-видимому, свидетельствует о большей пластичности кариотипов особей-мозаиков.

Также имеются сведения, что в объединенных популяциях разных регионов Дальнего Востока редкие морфотипы В-хромосом чаще всего найдены в кариотипах самцов [24]. Последние вносят наибольший вклад в появление как редких вариантов макро-, так и мини-В-хромосом — в Приамурье и редких макро-В-хромосом — в Приморском крае. Для животных Амурской области преждевременно проводить подобный анализ, так как самцы составили 3/4 выборки.

Частота особей с макро-, мини- и микро-В-хромосомами

Выше показано, что В-хромосомы присутствовали в кариотипах особей всех изученных групп мышей долины р. Зея. Обычно в кариотипе животных с В-хромосомами представлено несколько морфотипов В-хромосом. Как правило, обязательно присутствуют макро, иногда в сочетаниях с мини- или микро-В-хромосомами. Распределение животных с макро-, мини- и микро-В-хромосомами неравнозначно (табл. 2). Так, частота особей с макро-В-хромосомами равнялась 1.0 почти во всех пунктах, за исключением № 5, где эта частота составила 0.75 из-за того, что в мозаичном кариотипе самки № 3314 выявлена только 0–1 микро-В-хромосома, а макро-В-хромосомы отсутствовали. Доля всех животных с макро-В-хромосомами в долине р. Зея составила 0.96. В разных регионах Дальнего Востока России доли особей с макро-В-хромосомами были высокие и изменялись от 0.78 до 1.00 [21]. Этот факт свидетельствует в пользу того, что макро-В-хромосомы

являются основными элементами, вносящими вклад в общую составляющую числа В-хромосом, характеризующую кариотипы мышей дальневосточного региона в целом.

Частоты мини- и микро-В-хромосом в половине точек исследования равнялись 0 (№ 1, 3, 4, 7). В точке № 5 отсутствовали лишь мини-В-хромосомы, а частота микро была 0.50. Частоты мини и микро составили в точке № 2 — по 0.25, а в точке № 6 — 0.40 и 0.20 соответственно. В целом для всех животных долины р. Зея частоты особей с мини- и микро-В-хромосомами были 0.13 и 0.17 соответственно, а суммарно доля мышей с мини- плюс микро-В-хромосомами составила здесь 0.30. Для ранее изученных *A. peninsulae* Дальнего Востока мини- и микро-В-хромосомы отмечены реже. Так, в ЕАО доля особей с мини-В-хромосомами составила 0.17, с микро — 0, в то время как в кариотипах мышей Хабаровского и Приморского краев мини плюс ранее описанные как микро, но предположительно тоже мини-В-хромосомы [11], встречены реже в 2 и более раз — с частотой 0.06 и 0.14 соответственно [21, 24, 26].

Географическая изменчивость морфотипов В-хромосом

Обнаруженные выше две разнонаправленные тенденции географической изменчивости морфотипов В-хромосом *A. peninsulae* в Амурской области заслуживают особого внимания.

С одной стороны, изменчивость обусловлена присутствием–отсутствием мини и/или микро, помимо макро, В-хромосом у животных географических популяций I и II правого и левого берега р. Зея в северо-восточной части Верхнезейской равнины, а также в северной части Амурско-Зейской равнины. По-видимому, для мышей локальных популяций I и II р. Зея выступает физическим барьером, разделяющим особей с макро- и мини- или микро-В-хромосомами. Различия по морфологии В-хромосом у *A. peninsulae*, обитающих на противоположных берегах других крупных рек, ранее также наблюдали исследователи, хотя и не во всех случаях. Аналогичная ситуация известна для животных из мест отлова близ рек Енисей, Ангара. Например, в среднем течении левого берега р. Енисей описаны только микро-В-хромосомы [14], тогда как на правом берегу р. Енисей (и его притоков р. Кан, р. Ангара), а также близ г. Красноярска на левом берегу имелись особи или только с макро- или с сочетаниями макро- и микро-В-хромосом. Долина р. Ангара в Байкальском регионе также разделяет мышей с макро- и микро-В-хромосомами [40]. По описа-

Таблица 4. Дендрограммы разнообразия морфотипов Vs в объединенных выборках *A. peninsulae* из 13 регионов Дальнего Востока России

Номер пункта отлова	Регион и число: точек отлова/особей, n//морфотипов	Дендрограмма	Номер пункта отлова	Регион и число: точек отлова/особей, n//морфотипов	Дендрограмма
1	Приморский край (ПК), запад, 8/n = 32//7		8	Хабаровский край (ХК), правый берег р. Амур, 3/n = 8//5	
2	ПК, о. Стенина, 1/n = 16//1		9	ХК, низовья р. Амур, 1/n = 16//5	
3	ПК, о. Русский, 2/n = 15//3		10	ХК, левый берег р. Амур, 6/n = 47//6	
4	ПК, юг, 14/n = 168//11		11	Еврейская автономная обл. (ЕАО), 4/n = 30//5	
5	ПК, восток, 5/n = 72//11		12	Амурская обл. (АО), левый берег р. Зея, 2/n = 9//5	
6	ПК, центр, 4/n = 44//9		13	АО, правый берег р. Зея, 5/n = 15//7	
7	Сахалинская обл., о. Сахалин, 6/n = 55//1		<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <ul style="list-style-type: none"> ■ Large M ■ Large ST ■ Middle SM ■ Small M ■ Small ST ■ Micro <ul style="list-style-type: none"> □ Large SM ■ Middle M ■ Middle ST ■ Small SM ■ Mini ■ B = 0 </div>		

Примечание. № 1–11 – данные по ранее опубликованным работам [21, 22, 24, 28, 44]; № 12, 13 – настоящая статья. Секторы мини (серый цвет) и микро (желтый цвет) вынесены за границы дендрограмм. Все остальные секторы (кроме B = 0) принадлежат к макро-V-хромосомам.

нию авторов, в кариотипе мышей их трех точек отлова на западном побережье оз. Байкал присутствовали только макро-В-хромосомы, а у мышей из восьми точек отлова с юго-восточного побережья оз. Байкал имелись макро- и микро-В-хромосомы. Напротив, проведенный нами ранее сравнительный анализ кариотипов восточноазиатской мыши с левого, правого берегов и низовьев р. Амур (см. табл. 4) выявил между ними только частотные отличия по встречаемости одних и тех же морфотипов В-хромосом [26].

С другой стороны, описанная здесь клинальная изменчивость в направлении с севера на юг долины р. Зея связана с постепенным возрастанием в географических популяциях объединенных выборок ряда количественных показателей В-хромосом. Ранее клинальная изменчивость за счет возрастания только числа микро (точечных) В-хромосом, но в направлении с юга на север была описана для этого вида в Западных Саянах [41], Бурятии, Монголии [42] и Тыве [43]. Можно предположить, что эта изменчивость может играть адаптивную роль для популяций *A. peninsulae*.

Сравнительный анализ морфотипического разнообразия В-хромосом на Дальнем Востоке

Анализ новых и ранее полученных данных позволил построить дендрограммы морфотипического разнообразия В-хромосом для 13 регионов юга Дальнего Востока (табл. 4). Из распределения морфотипов В-хромосом, представленного на дендрограммах, следует, что на юге Дальнего Востока России выявлены животные, хромосомные наборы которых имеют разнообразные морфотипы В-хромосом, их частота и количество различаются в выборках из регионов. Так, в кариотипах *A. peninsulae* из исследованных точек Амурской области и всего Дальнего Востока России [24, 28, 44] наиболее часто встречены средние и/или мелкие метацентрические (M-m и/или S-m) макро-В-хромосомы. Редкие морфотипы в каждом регионе имели отличия по частоте и числу.

В кариотипах животных из большинства регионов присутствовали В-хромосомы. Исключение составили лишь выборки, собранные на двух островах — Стенина и Сахалин (дендрограммы № 2, 7 в табл. 4), где В-хромосомы отсутствовали в кариотипах всех особей. В регионах континентальной части Хабаровского и Приморского краев доли особей без В-хромосом были невысокие — 0.03–0.05. Распределение В-хромосом *A. peninsulae* по морфотипам в регионах имело свои особенности. У животных из большинства регионов Дальнего Востока (№ 3, 5, 6, 8, 10, 11, 13) более 90% доба-

вочных хромосом принадлежали к группам макро-, и от 2 до 8% — к мини- или микро-В-хромосомам. В кариотипах животных трех регионов (№ 1, 9 и 12) частота макро-В-хромосом снижалась до 79, 62 и 68% соответственно. Причины понижения частоты макро-В-хромосом в каждом случае различные. В западных выборках Приморского края (дендрограмма № 1) они связаны с появлением мини-В-хромосом, на левом берегу р. Зея (№ 12) — с мини- плюс микро-В-хромосомами, в низовьях р. Амур Хабаровского края (№ 9) — с выявлением 33% животных без В-хромосом.

На Дальнем Востоке России наибольшее морфотипическое разнообразие обнаружено в кариотипах *A. peninsulae* юга (№ 4) и востока (№ 5) Приморского края, где максимально найдено 11 морфотипов (табл. 4). В центральной (№ 6) и западной (№ 1) частях Приморского края число морфотипов снижалось — до девяти и семи соответственно. Далее при движении на северо-запад это число еще ниже: шесть — в Хабаровском крае (суммарно для № 8, 9, 10) и пять — в ЕАО (№ 11) [24, 28]. В настоящем исследовании в Амурской области выявлено семь морфотипов В-хромосом, аналогично животным западной части Приморского края. Причем эти морфотипы найдены у мышей правого берега р. Зея (№ 13 в табл. 4). Напротив, животные левого берега р. Зея Амурской области (№ 12) имели пять морфотипов, аналогично числу морфотипов В-хромосом для мышей соседних близких регионов: ЕАО (№ 11), правого берега р. Амур (№ 8), а также низовьев р. Амур Хабаровского края (№ 9).

Оценивая картину географической изменчивости морфотипов В-хромосом *A. peninsulae* в изученных регионах Дальнего Востока России в целом, следует отметить, что характер изменчивости В-хромосом в Амурской области, по-видимому, несколько иной. Несмотря на сходство в количестве морфотипов между вышеупомянутыми регионами, имеются различия в частоте встречаемости основных, редких, а также новых морфотипов (микро) В-хромосом. Животные каждой из исследованных точек отлова имели свои вариации чисел и свой набор макро-, мини- и микро-В-хромосом, которые отличали их от соседних пунктов отлова. В Амурской области особенность полиморфизма связана с появлением в кариотипе животных микро-В-хромосом и как следствие этого — с различиями в превалирующих морфотипах между право и левобережными популяциями и общим числе морфотипов. Для разных регионов Дальнего Востока морфотипические характеристики В-хромосом, вероятно, важнее, чем количественные, и могут выступать фактором,

дифференцирующим популяции или группы популяций.

Наблюдаемая географическая дифференциация популяций *A. peninsulæ* по морфотипам В-хромосом на Дальнем Востоке России предположительно, связана с адаптацией различных популяций к разным условиям обитания, меняющимся климатическим условиям, спектру зоонозных инфекций у мышей-носителей и в целом может иметь большое значение для вида.

Авторы выражают благодарность сотрудникам ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН И.Н. Шереметьевой, У.В. Горобейко за оказанную помощь в отлове *A. peninsulæ* в долине р. Зея. Также искренне признательны за помощь в организации проживания и перемещения на территории Зейского заповедника сотрудникам ФГБУ “Зейский государственный природный заповедник” Е.В. Игнатенко и С.Ю. Игнатенко.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 121031500274-4).

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. D'Ambrosio U., Alonso-Lifante M.P., Barros K. et al. B-chrom: A database on B-chromosomes of plants, animals and fungi // *New Phytol.* 2017. P. 635–642. <https://doi.org/10.1111/nph.14723>
2. Vujošević M., Rajičić M., Blagojević J. B chromosomes in populations of mammals revisited // *Genes.* 2018. V. 9. № 10. P. 110–136. <https://doi.org/10.3390/genes9100487>
3. Jones R.N., Rees H. *B Chromosomes.* L.; N.Y.; Paris: Acad. Press, 1982. 266 p.
4. Camacho J.P.M., Sharbel T.F., Beukeboom L.W. B-chromosome evolution // *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2000. V. 355. P. 163–178.
5. Camacho J.P.M. Chapter 4. B chromosomes // *The Evolution of the Genome* / Ed. Gregory T. Burlington, USA: Acad. Press, 2005. P. 223–286.
6. Vujošević M., Blagojević J. B-chromosomes in populations of mammals // *Cytogenet. Genome Res.* 2004. V. 106. № 2–4. P. 247–256. <https://doi.org/10.1159/000079295>
7. Makunin A.I., Dementyeva P.V., Graphodatsky A.S. et al. Genes on B chromosomes of vertebrates // *Mol. Cytogenet.* 2014. V. 7. P. 99. <https://doi.org/10.1186/s13039-014-0099-y>
8. Rajičić M., Romanenko S.A., Karamysheva T.V. et al. The origin of B chromosomes in yellow-necked mice (*Apodemus flavicollis*) – Break rules but keep playing the game // *PLoS One.* 2017. V. 12. № 3. e0172704. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172704>
9. Houben A., Jones N., Martins C., Trifonov V. Evolution, composition and regulation of supernumerary B chromosomes // *Genes.* 2019. V. 10. P. 161. <https://doi.org/10.3390/genes10020161>
10. Rubtsov N.B., Karamysheva T.V., Andreenkova O.V. et al. Comparative analysis of micro and macro B chromosomes in the Korean field mouse *Apodemus peninsulæ* (Rodentia, Murinae) performed by chromosome microdissection and FISH // *Cytogenet. Genome Res.* 2004. V. 106. № 2–4. P. 289–294. <https://doi.org/10.1159/000079301>
11. Рубцов Н.Б., Картавецова И.В., Рослик Г.В. и др. Особенности В-хромосом восточноазиатской мыши *Apodemus peninsulæ* (Thomas, 1906) Забайкалья и Дальнего Востока, выявленные FISH-методом // *Генетика.* 2015. Т. 51. № 3. С. 341–350.
12. Rubtsov N.B., Borisov Yu.M. Sequence composition and evolution of mammalian B chromosomes // *Genes.* 2018. V. 9. № 10. P. 91–109. <https://doi.org/10.3390/genes9100490>
13. Karamysheva T., Romanenko S., Makunin A. et al. New Data on organization and spatial localization of B-chromosomes in cell nuclei of the yellow-necked mouse *Apodemus flavicollis* // *Cells.* 2021. V. 10. P. 1819. <https://doi.org/10.3390/cells10071819>
14. Борисов Ю.М., Афанасьев А.Г., Лебедев Т.Т., Бочкарев М.Н. Множество микро-В-хромосом в сибирской популяции мышей *Apodemus peninsulæ* ($2n = 48 + 4-30$ В-хромосом) // *Генетика.* 2010. Т. 46. № 6. С. 798–804.
15. Чернявский Ф.Б., Козловский А.И. Видовой статус и история копытных леммингов (*Dicrostonyx*, Rodentia) острова Врангеля // *Зоол. журн.* 1980. Т. 59. Вып. 2. С. 266–273.
16. Громов И.М., Ербаева М.А. Млекопитающие фауны России и сопредельных территорий. Зайцеобразные и грызуны. СПб.: ЗИН РАН, 1995. 522 с.
17. Kral B. Chromosome characteristics of certain murine rodents (Muridae) of the Asiatic part of the USSR // *Zool. Listy.* 1971. V. 20. № 4. P. 331–347.
18. Hayata J. Chromosomal polymorphism caused by supernumerary chromosomes in field mouse, *Apodemus giliacus* // *Chromosoma.* 1973. V. 42. № 4. P. 403–414. <https://doi.org/10.1007/BF00399408>
19. Bekasova T.S., Vorontsov N.N., Korobitsyna K.V., Korablev V.P. B-chromosomes and comparative karyology of the mice of the genus *Apodemus* // *Genetica.* 1980. V. 52–53. P. 33–43.
20. Borisov Y.M., Zhigarev I.A. B chromosome system in the Korean field mouse *Apodemus peninsulæ* Thomas, 1907 (Rodentia, Muridae) // *Genes.* 2018. V. 9. № 10.

- P. 147–158.
<https://doi.org/10.3390/genes9100472>
21. Kartavtseva I.V., Roslik G.V. A complex B chromosome system in the Korean field mouse, *Apodemus peninsulae* // Cytogenet. Genome Res. 2004. V. 106. № 2–4. P. 271–278.
<https://doi.org/10.1159/000079298>
 22. Картавцева И.В. Кариосистематика лесных и полевых мышей (Rodentia, Muridae). Владивосток: Дальнаука, 2002. 142 с.
 23. Рослик Г.В., Картавцева И.В. Полиморфизм и мозаицизм по числу В-хромосом у восточноазиатской мыши *Apodemus peninsulae* (Rodentia) Дальнего Востока России // Цитология. 2009. Т. 51. № 11. С. 929–939.
 24. Рослик Г.В., Картавцева И.В., Фрисман Л.В., Горобейко У.В. Сравнительное исследование морфотипов В-хромосом восточноазиатской мыши (*Apodemus peninsulae*) Приамурья // Региональные проблемы. 2016. Т. 19. № 3. С. 113–122.
 25. Рубцов Н.Б., Карамышева Т.В., Картавцева И.В. и др. В хромосомы: ДНК, происхождение, эволюция // Биол. мембраны. 2005. Т. 22. № 3. С. 196–211.
 26. Рослик Г.В., Картавцева И.В. Морфотипы В-хромосом *Apodemus peninsulae* (Rodentia) Дальнего Востока России // Цитология. 2012. Т. 54. № 1. С. 66–77.
 27. Борисов Ю.М. Система В-хромосом восточноазиатской мыши как интегрирующий и дифференцирующий признак популяций // Докл. АН СССР. 1986. Т. 288. № 3. С. 720–724.
 28. Рослик Г.В., Картавцева И.В. Изменчивость редких морфотипов В-хромосом *Apodemus peninsulae* Центрального Приморья // Изв. Иркутского гос. ун-та. Серия Биология. Экология. 2017. Т. 22. С. 96–102.
 29. Kartavtseva I.V., Roslik G.V., Pavlenko M.V. et al. The B-chromosome system of the Korean field mouse *Apodemus peninsulae* in the Russian Far East // Chromosome Sci. 2000. V. 4. P. 21–29.
 30. Картавцева И.В., Шереметьева И.Н., Горобейко У.В., Васильева Т.В. Находки полевки-экономки и восточноазиатской мыши (*Alexandromys oeconomus* и *Apodemus peninsulae*, Rodentia), а также их хромосомные характеристики (Верхнезейская равнина) // Зоол. журн. 2015. Т. 94. № 11. С. 1351–1355.
<https://doi.org/10.7868/S0044513415080085>
 31. Шереметьева И.Н., Картавцева И.В., Васильева Т.В. Обитает ли эвронская полевка (*Alexandromys evronensis*) на северо-востоке Верхнезейской равнины? // Зоол. журн. 2017. Т. 96. № 4. С. 477–484.
<https://doi.org/10.7868/S0044513417020076>
 32. Подольский С.А., Левик Л.Ю., Павлова К.П., Красикова Е.К. Редкие и краеарейные виды грызунов бассейна р. Зеи в условиях влияния гидростроительства // Амурский зоол. журн. 2016. Т. VIII. № 2. С. 154–167.
 33. Куренцова Г.Э. Очерк растительности Еврейской автономной области. Владивосток: Дальневосточное кн. изд-во, 1967. 64 с.
 34. Ford C.F., Hamerton J.L. A colchicine hypotonic citrate squash preparation for mammalian chromosomes // Stain Technol. 1956. V. 31. P. 247–251.
<https://doi.org/10.3109/10520295609113814>
 35. Sumner A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin // Exp. Cell Res. 1972. V. 75. № 1. P. 304–306.
[https://doi.org/10.1016/0014-4827\(72\)90558-7](https://doi.org/10.1016/0014-4827(72)90558-7)
 36. Беляев Д.К., Волобуев В.Т., Раджабли С.И., Трут Л.Н. Полиморфизм и мозаицизм по добавочным хромосомам у серебристо-черных лисиц // Генетика. 1974. Т. 10. № 2. С. 58–67.
 37. TIBCO Software Inc. Statistica (программный продукт для анализа данных), версия 13. 2017. <http://www.tibco.com/products/tibco-statistica>
 38. Zima J., Macholán M. B chromosomes in the wood mice (genus *Apodemus*) // Acta Theriologica. 1995. V. 3. P. 75–86.
 39. Рослик Г.В. Характер мозаицизма кариотипов восточноазиатской мыши *Apodemus peninsulae*: Матер. I-го съезда ВОГИС, Саратов // Генетика. 1994. Т. 30. Приложение. С. 134.
 40. Борисов Ю.М., Моролдоев И.В., Шефтель Б.И. и др. Дифференциация популяционных систем В-хромосом восточноазиатской мыши *Apodemus peninsulae* Байкальского региона // Изв. Иркутского гос. ун-та. Серия Биология. Экология. 2017. Т. 21. С. 41–49.
 41. Борисов Ю.М. Изменчивость цитогенетической структуры популяций *Apodemus peninsulae* (Rodentia, Muridae) в Западных Саянах // Генетика. 1990. Т. 26. № 8. С. 1484–1491.
 42. Борисов Ю.М., Малыгин В.М. Клиальная изменчивость системы В-хромосом восточноазиатской мыши *Apodemus peninsulae* из Бурятии и Монголии // Цитология. 1991. Т. 33. № 1. С. 106–111.
 43. Борисов Ю.М., Кришук И.А., Борисова З.З. Клиальная изменчивость числа точечных микро-В-хромосом в кариотипах *Apodemus peninsulae* (Mammalia, Rodentia) в Республике Тыва с юга на север // Генетика. 2022. Т. 58. № 3. С. 311–318.
<https://doi.org/10.31857/S0016675822030043>
 44. Рослик Г.В., Картавцева И.В. Географическая изменчивость морфотипов В-хромосом *Apodemus peninsulae* на Дальнем Востоке России // Актуальные проблемы зоогеографии и биоразнообразия Дальнего Востока России: Матер. Всерос. симп., посв. 150-летию со дня рождения В.К. Арсеньева (Хабаровск, 29–31 марта 2022 г.) / Под ред. Рожнова В.В. Хабаровск: БФ “Биосфера”, 2022. С. 231–235.

Variability of Supernumerary Chromosome Morphotypes and the Emergence of Micro-B-Chromosomes in the Karyotype of *Apodemus peninsulae* (Rodentia) in the Russian Far East

G. V. Roslik^{a, *} and I. V. Kartavtseva^a

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

*e-mail: roslik_g@mail.ru

Variability in the number and morphotypes of macro, as well as mini and micro B-chromosomes of *Apodemus peninsulae* in the valley Zeya River from Amur region is described. Micro B chromosomes were found in the karyotypes of the Korean field mice from the Far East of Russia for the first time. Two opposite trends in the geographic variability of B chromosome morphotypes have been identified. The first one is due to the presence/absence of mini and/or micro, in addition to macro B-chromosomes, in animals from the right and left river banks in the northeastern part of the Upper Zeya Plain, as well as in the northern part of the Amur-Zeya Plain. The second is a clinal variability is characterized by a gradual increase in three combined geographic populations of *A. peninsulae* of numerical parameters of B-chromosomes: index $\bar{x}B$ Max micro, $\bar{x}B$ Max macro, the number of morphotypes, the number of clones in mosaics, and the proportion of mosaics in the direction from north to south of the Zeya River valley. The revealed diversity of *A. peninsulae* B-chromosome morphotypes for 13 regions allows us to re-evaluate the geographical variability of additional chromosomes of this species in the Russian Far East Adaptive value of B-chromosome morphotypes for the species has been also assumed.

Keywords: B chromosomes, polymorphysm, morphotypes, mosaicism, *Apodemus peninsulae*, cline variability, modal number, $\bar{x}B$ index.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ РЕЧНОЙ ВЫДРЫ (*Lutra lutra*) ЕВРОПЕЙСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ И СТРАН ЗАКАВКАЗЬЯ (ПО ДАННЫМ ПОЛИМОРФИЗМА ФРАГМЕНТА мтДНК)

© 2023 г. Н. А. Соколова¹*, Н. П. Кораблев², П. Н. Кораблев³, Х. А. Эрнандес-Бланко¹,
Г. А. Калоян⁴, А. А. Гёнджян⁴, А. Г. Малхасян⁵, П. А. Сорокин¹

¹Институт проблем экологии и эволюции им А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

²Государственный природный заповедник “Полистовский”, Псковская область, пос. Бежаницы, 182840 Россия

³Центрально-Лесной государственный природный биосферный заповедник,
Тверская область, пос. Заповедный, 172521 Россия

⁴Научный центр зоологии и гидрoэкологии Национальной академии наук Республики Армения, Ереван, 0014 Армения

⁵Армянский филиал Всемирного фонда дикой природы, Ереван, 0019 Армения

*e-mail: nadezhdasklva@gmail.com

Поступила в редакцию 17.01.2023 г.

После доработки 27.02.2023 г.

Принята к публикации 02.03.2023 г.

Проведен анализ генетической структуры группировок выдры европейской части России (ЕЧР) и ее сравнение с известной по литературным данным генетической структурой выдры в Европе. Проанализированы данные на основе гаплотипов фрагмента контрольного региона мтДНК (255 пн), в том числе представленных в NCBI. Для выборки ($N = 75$) из европейской части России описано шесть гаплотипов мтДНК. 62.1% животных принадлежат общему европейскому гаплотипу, 17.6% – гаплотипу, отмеченному в Великобритании и Финляндии, остальные четыре гаплотипа описаны впервые. Гаплотипическое разнообразие для выборки по России и Закавказью составило $h = 0.56 \pm 0.054$, нуклеотидное разнообразие $\pi = 0.0016 \pm 0.002$. При увеличении длины фрагмента мтДНК до 820 пн у выдр из ЕЧР наблюдается увеличение как гаплотипического разнообразия h до 0.85 ± 0.03 , так и нуклеотидного $\pi = 0.002 \pm 0.001$, число гаплотипов увеличилось до 14. Географическое распределение гаплотипов не зависит ни от региона, ни от системы рек. Имеется как центральный гаплотип, распространенный по всей ЕЧР, так и второстепенные, объединяющие меньшее число регионов. Таким образом, генетическое разнообразие выдры ЕЧР выше, чем в Европе, при этом структура популяций повторяет общеевропейский паттерн, но с региональными особенностями.

Ключевые слова: *Lutra lutra*, митохондриальная ДНК, контрольный регион, генетическое разнообразие, европейская часть России.

DOI: 10.31857/S0016675823070111, **EDN:** QQMBRV

Речная выдра (*Lutra lutra* L., 1758) – один из широко распространенных палеарктических видов хищных млекопитающих. Это практически единственный вид семейства куньи, имеющий настолько обширный ареал, к тому же ведущий околотовидный образ жизни. Популяция выдры в Европе претерпевала ряд резких снижений численности, в особенности во второй половине XX в. Основными причинами были пушной промысел, охрана рыбных ферм, нарушение местобитаний (например, прокладка каналов, установка дамб, осушение заливных лугов и вырубка прибрежных лесов), а также загрязнение вод тяжелыми металлами и удобрениями. Сейчас вид имеет охранный статус “близкий к уязвимому” (near threatened) (IUCN), а практически в каждой

из европейских стран находится под строгой охраной ввиду низкой численности. На территории России речная выдра распространена широко, однако ее численность всегда была невелика [1]. По данным Центрохотконтроля [2] численность выдры на 2019 г. составила 102.0 тыс. особей. Кавказский подвид выдры *L. l. meridionalis* внесен в Красную книгу Российской Федерации как редкий и малоизученный [3]. На территории России численность кавказского подвида оценивается приблизительно в 1000 особей [3], в Армении – 300 особей, в Азербайджане – 1200 особей [4].

Несмотря на широкий палеарктический ареал, генетическое разнообразие речной выдры было достаточно изучено только в ряде европейских стран [5–13] и на начальных этапах проведены

Таблица 1. Количество и происхождение используемых образцов выдры

Регион	Тип пробы	Объем выборки	Год сбора	Источник
Псковская обл.	Мышцы	8	2018–2019	Коллекция ИПЭЭ РАН, № 4948–4955
Тверская обл.	Мышцы	4	2018	Коллекция ИПЭЭ РАН, № 4956–4959
	Кости	6	1989–1995	Коллекция ЦЛГПБЗ, № 5.1.1, 5.4.1, 5.5.1, 5.11.1, 5.13.1, 5.17.1
	Экскременты	4	2020	Центрально-Лесной ГПБЗ
Калужская обл.	Экскременты	25	2018–2020	ГПЗ “Калужские засеки”
	Мышцы	1	2021	ГПЗ “Калужские засеки”, коллекция ИПЭЭ РАН, № 4960
Вологодская обл.	Кости	1	1990	Дарвиновский заповедник, коллекция ЦЛГПБЗ, № 3Д
Брянская обл.	Экскременты	3	2020	ГПБЗ “Брянский лес”
Архангельская обл.	Мышцы	4	2021	Коллекция ИПЭЭ РАН, № 4961–4964
	Кости	1	1950	ЗМ МГУ, № S-52031
Респ. Коми	Кости	5	1938–1948	ЗМ МГУ, № S-66726, S-48774, S-48783, S-48776, S-48751
Владимирская обл.	Кости	3	1965–2016	ЗМ МГУ, № S-200521, S-75381, S-75382
Пензенская обл.	Мышцы	1	2021	Коллекция ИПЭЭ РАН, № 4965
Респ. Карелия	Мышцы	1	2022	Коллекция ИПЭЭ РАН, № 4966
Воронежская обл.	Мышцы	1	2021	Коллекция ИПЭЭ РАН, № 4967
Респ. Северная Осетия	Кости	1	1921	ЗМ МГУ, № S-12960
Осетия	Экскременты	1	2022	Кавказский ГПБЗ
Армения	Мышцы	3	2022	Коллекция ИПЭЭ РАН, № 4968–4970
Азербайджан	Кости	1	–	ЗМ МГУ, № S-179914
Узбекистан	Мышцы	1	2022	Коллекция ИПЭЭ РАН, № 4971

исследования в Южной Корее [14]. В результате анализа контрольного региона мтДНК речной выдры для европейской популяции отмечается низкое генетическое разнообразие и “звездообразная” генетическая структура мтДНК. Это может свидетельствовать о прохождении вида через ряд бутылочных горлышек в связи с резким падением численности [11]. В европейских странах выявлено 15 гаплотипов данного фрагмента мтДНК [8, 10, 13, 15], из которых один является доминирующим для всей территории Европы. Для европейской части России подобных резких снижений численности зафиксировано не было, и в целом выдра попадала в фокус исследователей в основном как ценный пушной ресурс. Отсутствие резких снижений численности и умеренные квоты на добычу этого вида могут указывать на другую историю, а, следовательно, несколько иную генетическую структуру популяции выдры, чем для европейских стран.

В настоящей работе мы представляем первые результаты исследования генетической структуры популяции выдры для европейской части России (далее – ЕЧР), а также проводим сравнение с генетической структурой европейской популяции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании были использованы 75 образцов различных тканей выдры (табл. 1). Образцы мышечной ткани были получены из коллекции кабинета методов молекулярной диагностики ИПЭЭ РАН. Костный материал из коллекций Зоологического музея МГУ и Краниологической лаборатории Центрально-Лесного заповедника был взят из нижней челюсти, а также ткани пульпы зуба. Образцы экскрементов были собраны на территории заповедников: ГПЗ “Калужские засеки”, ГПБЗ “Брянский лес”, Центрально-Лесной ГПБЗ, Кавказский ГПБЗ. При сборе проб экскрементов ориентировались на протокол, прописанный в “Мониторинге переднеазиатского леопарда...” [16].

Молекулярно-генетический анализ проводили в кабинете методов молекулярной диагностики ИПЭЭ РАН. Выделение ДНК проводили с использованием наборов QIAAmp Stool Mini Kit, QIAAmp Investigator kit, QIAAmp Blood & Tissue kit (Qiagen, США) по протоколам, указанным производителем. Были проанализированы последовательности левого участка контрольного региона мтДНК (D-петля, CR) 1) длиной 255 пар нуклеотидов (пн), 2) длиной 820 пн. Для этого использовали две пары праймеров: L1ucybl996/H16498 [11] (цикл ПЦР взят из оригинальной статьи) и разра-

Таблица 2. Распространенность гаплотипов контрольного региона мтДНК (255 пн) выдры в исследуемых выборках

Гаплотип	UK	IRL	ESP	CENT	SCA	RUS + CAU
Lut1	33	19	84	92	166	46
Lut2	0	1	0	1	0	0
Lut3	12	16	2	46	5	0
Lut4	2	0	0	0	1	13
Lut5	0	1	0	1	0	0
Lut6	24	0	6	0	0	0
Lut7	12	0	0	0	0	0
Lut8	0	1	0	0	0	0
Lut9	0	3	0	0	0	0
Lut10	0	3	0	0	0	0
Lut12	0	1	0	0	0	0
Lut11	0	4	0	0	0	0
Lut13	0	0	0	0	1	0
Lut14	0	0	0	0	9	0
Lut15	0	0	0	0	1	0
RU1*	0	0	0	0	0	12
RU2*	0	0	0	0	0	1
ARM1*	0	0	0	0	0	1
ARM2*	0	0	0	0	0	1
UZ1*	0	0	0	0	0	0

Примечание. UK – Великобритания, IRL – Ирландия, ESP – Испания, CENT – Центральная Европа (Нидерланды, Германия, Австрия), SCA – Северная Европа (Швеция, Финляндия), RUS + CAU – ЕЧР и Закавказье; * – новые гаплотипы.

ботанную пару праймеров: Lut4F TCACCATG-CCTCGAGAAACC, Lut4R TGTATACGTACGTG-CACGGG (цикл ПЦР: 94°C 2 мин, (94°C 40 с, 57°C 40 с, 72°C 40 с) – 40 циклов, 72°C 10 мин). ПЦР-смесь объемом 20 мкл включала в себя 4 мкл 5x-Mas^{DD}TaqMIX-2025 (Диалат Лтд, Россия), по 1.5 мкл прямого и обратного праймеров с концентрацией 5 пкМ, 1 ед. Hot Start Taq ДНК-полимеразы (SibEnzyme, Россия), 4 мкл выделенной ДНК и H₂O. Амплификацию проводили в MiniAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems, США), контроль качества ПЦР-продукта проводили электрофорезом в 1.5%-ном агарозном геле.

Таблица 3. Распространенность гаплотипов контрольного региона мтДНК (255 и 820 пн) выдры в исследуемых выборках в европейской части России и в странах Закавказья

	PSK	TVR	BRN	KLG	VOR	VLD	PNZ	ARH	VOL	KOMI	KAR	CAU	Σ
255 пн	8	14	3	26	1	3	1	6	1	5	1	5	74
820 пн	8	14	3	19	1	0	1	5	1	2	1	4	59

Примечание. PSK – Псковская обл., TVR – Тверская обл., BRN – Брянская обл., KLG – Калужская обл., VOR – Воронежская обл., VLD – Владимирская обл., PNZ – Пензенская обл., ARH – Архангельская обл., VOL – Вологодская обл., KOMI – Республика Коми, KAR – Республика Карелия, CAU – Кавказ (Северная Осетия, Азербайджан, Армения).

ПЦР-продукты очищали переосаждением в спирте или набором Cleanup Mini (Евроген, Россия). Секвенирование проводили на автоматическом секвенаторе ABI 3130 (Applied Biosystems) с наборами BigDye Terminator kit v 3.1/1.1 (Applied Biosystems). Выравнивание и редактирование последовательностей проводили в программе BioEdit 7.05 [17]. Гаплотипическую сеть (Median-Joining Network) строили в программе PopART 1.7 [18]. Расчет нуклеотидного π и гаплотипического (h) разнообразия, молекулярный дисперсионный анализ (AMOVA) с эволюционной моделью Кимура-2-параметр (K2P) проводили в программе Arlequin 3.5 [19]. Сравнение проводили с гаплотипами мтДНК речной выдры, представленными в NCBI (№ AJ006174–AJ006178, EU294255–EU294258, AM982528, FJ971618–FJ971622, HQ113947, KC823048–KC823049).

Объединенную выборку из 621 образца по фрагменту контрольного региона мтДНК в 255 пн составили на основе гаплотипов, представленных в NCBI. Размер выборки для каждого гаплотипа и их распределение по странам составили на основе работ европейских исследователей [8, 10, 13]. Таким образом, получили шесть выборок: Ирландия ($n = 49$) [8], Великобритания ($n = 83$) [10], Испания ($n = 92$), Центральная Европа (Нидерланды, Германия, Австрия) ($n = 140$) [10], Северная Европа ($n = 183$) (Финляндия, Швеция) [13], ЕЧР и Закавказье ($n = 74$) (табл. 2). Образец из Узбекистана (подвид *L. l. seistanica*) использовали как внешнюю группу для укоренения медианной сети и в анализе он не участвовал.

Выборка для фрагмента контрольного региона мтДНК длиной 820 пн составила 59 образцов. Также мы разделили образцы из России и стран Закавказья согласно регионам происхождения (табл. 3).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для фрагмента 255 пн в популяции выдры европейской части России и стран Закавказья выявлено шесть гаплотипов мтДНК. Медианная сеть анализируемых гаплотипов (Median-Joining Network) [5, 6, 8, 10, 13, 15, 20] представлена на рис. 1. 46 образцов (62.1%) принадлежат общеевропейскому гаплотипу Lut1, 13 образцов (17.6%) принадлежат гаплотипу Lut4, остальные четыре

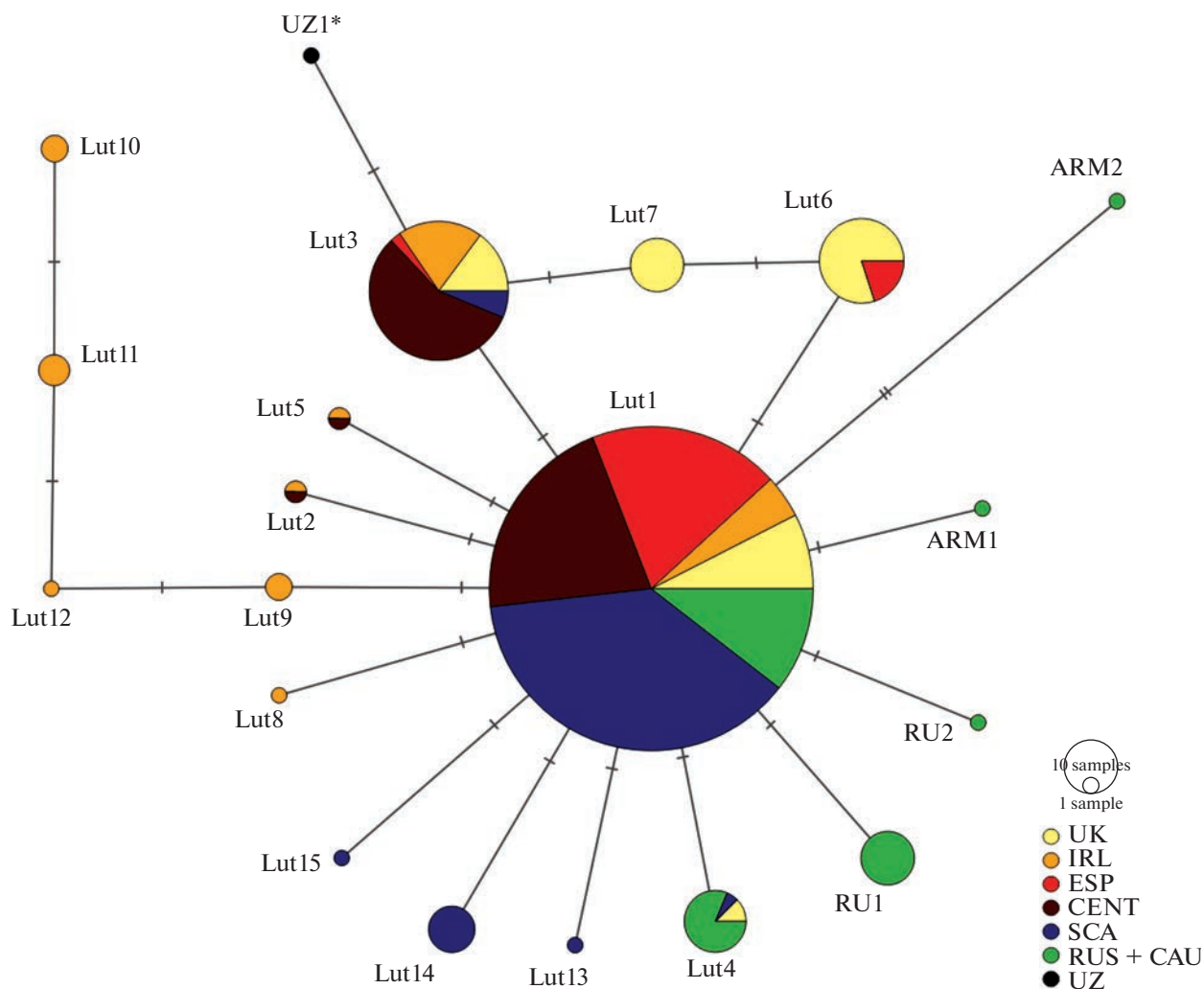


Рис. 1. Медианная сеть гаплотипов фрагмента в 255 пн контрольного региона мтДНК выдры. UK – Великобритания, IRL – Ирландия, ESP – Испания, CENT – Центральная Европа (Нидерланды, Германия, Австрия), SCA – Северная Европа (Швеция, Финляндия), RUS + CAU – ЕЧР и Закавказье, UZ – Узбекистан. Гаплотипы обозначены кругами, их размер пропорционален выборке. Вертикальные черточки отражают число мутаций между гаплотипами.

гаплотипа ранее не были описаны (RU1–4, NCBI № OQ059030–OQ059034). Гаплотип RU1 представлен в 12 образцах (16.2%), гаплотипы RU2, ARM1, ARM2 обнаружены в единичном экземпляре (по 1.3% соответственно). Обнаружено семь полиморфных сайтов: три транзиции, три трансверсии, один индель.

Гаплотипическое разнообразие для выборки по России и Закавказью (RUS + CAU) составило $h = 0.56 \pm 0.054$, нуклеотидное разнообразие $\pi = 0.0016 \pm 0.002$. Для объединенной с европейскими гаплотипами выборки гаплотипическое разнообразие $h = 0.48 \pm 0.024$, нуклеотидное разнообразие $\pi = 0.025 \pm 0.022$.

Значение генетической дистанции F_{st} варьирует в диапазоне 0.03–0.39 ($p < 0.05$). Наибольшие различия наблюдаются между исследуемой нами и британской выборками (0.30, $p < 0.05$), наименьшие –

между исследуемой нами и испанской (0.09, $p < 0.05$). Молекулярный дисперсионный анализ (AMOVA) показал, что различия между популяциями составили 21.67%, различия внутри популяций – 78.33% ($p < 0.05$).

Географическое распространение гаплотипов представлено на рис. 2. Несмотря на доминирование гаплотипа Lut1, в представленных группировках частоты остальных встречаемых гаплотипов различаются. Так, в группировке центральной Европы и Ирландии второй по встречаемости гаплотип это Lut3 (32.9 и 32.6% соответственно), а в Великобритании Lut6 (28.9%). М. Перес-Аро с соавт. [20] отметили, что особи с гаплотипами Lut3 и Lut6 в испанской группировке ведут свое происхождение из Франции и Великобритании соответственно. В скандинавской группировке доля гаплотипов Lut3 и Lut9 составляет 3 и 5% соответ-

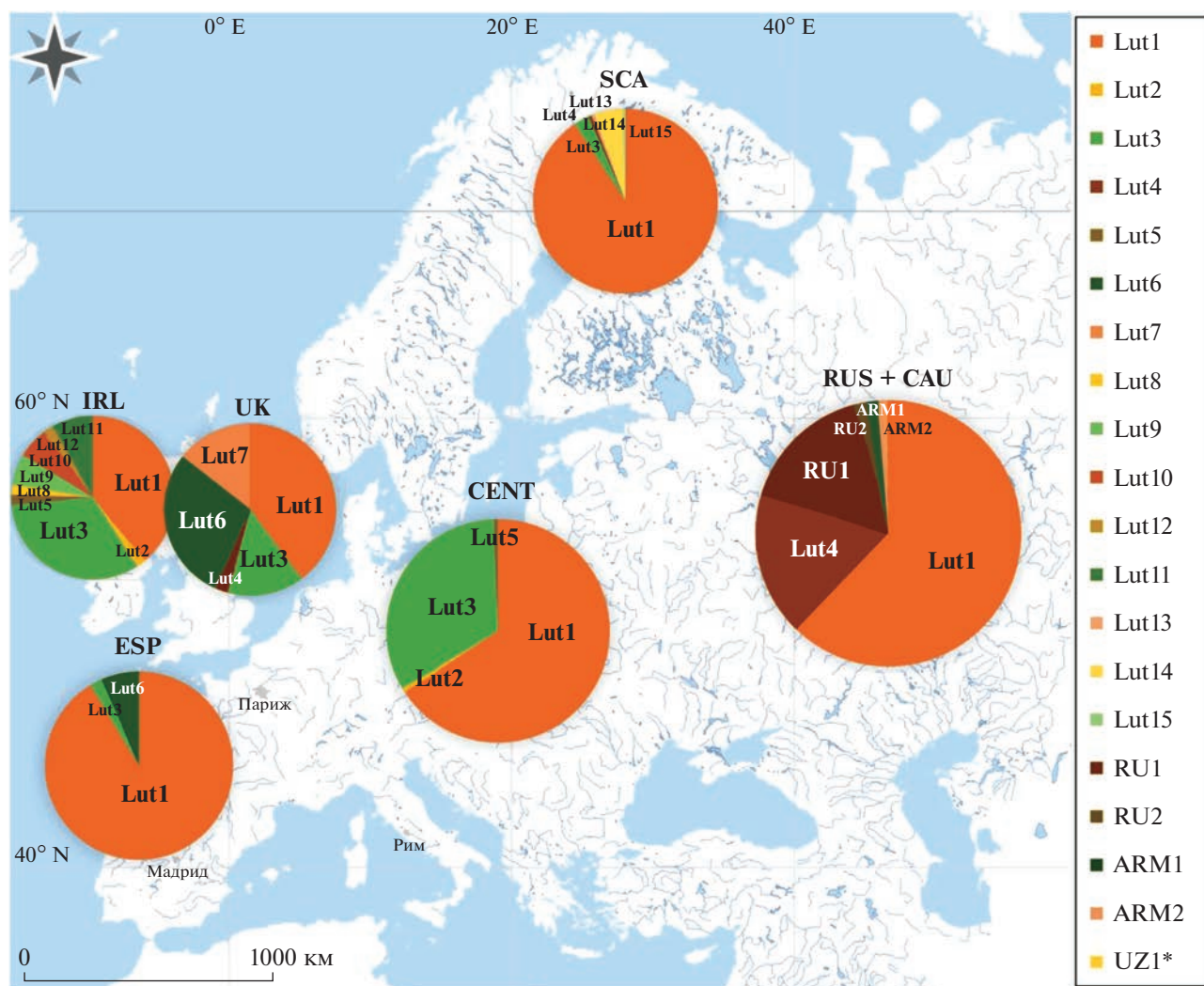


Рис. 2. Географическое распространение гаплотипов фрагмента контрольного региона (255 пн) мтДНК выдры.

ственно. В группировке ЕЧР гаплотипы Lut4 и RU1 встречаются в 19.6 и 16.6% образцов. При этом гаплотип Lut4 помимо России отмечен также в Великобритании и Финляндии [13].

Медианная сеть из шести гаплотипов фрагмента в 255 пн для 75 образцов из ЕЧР, стран Закавказья и Узбекистана представлена на рис. 3. Гаплотип Lut1 встречается в 9 из 12 представленных регионов (кроме Брянской, Пензенской и Воронежской областей, что, вероятно, связано с малым количеством образцов), гаплотип RU1 – в четырех регионах, гаплотип Lut4 – в двух. Для Калужской области отмечено три гаплотипа из шести. В Тверской области гаплотип RU1 встречается наравне с Lut1, практически в половине исследованных образцов (семь из 13). В Псковской области RU1 также присутствует (три из восьми). Два образца выдры из Армении образуют новые гаплотипы ARM1 и ARM2, отличающиеся от Lut1 на одну и две замены соответственно.

Единственный образец из Узбекистана (UZ1*) отличается от доминирующего Lut1 на две замены.

При увеличении длины анализируемого фрагмента до 820 пн медианная сеть разветвляется (рис. 4), в 60 образцах выделяется 14 гаплотипов (NCBI № OQ059035–OQ059049). Обнаружено 15 полиморфных сайтов: девять транзиций, три трансверсии, три инделя. Гаплотипическое разнообразие составило $h = 0.85 \pm 0.03$, нуклеотидное разнообразие $\pi = 0.002 \pm 0.001$. Так же, как и описано выше, выделяется доминирующий центральный гаплотип (820-4, 28.8% образцов), распространенный в семи регионах ЕЧР. Второстепенные гаплотипы объединяют меньшее количество регионов (820-2 и 820-13 по три региона, 820-5 – четыре региона). Десять гаплотипов уникальны и встречаются только в одном регионе. При этом географическое распределение данных гаплотипов не показывает зависимости ни от региона, ни от системы рек. Образцы из Армении представлены на

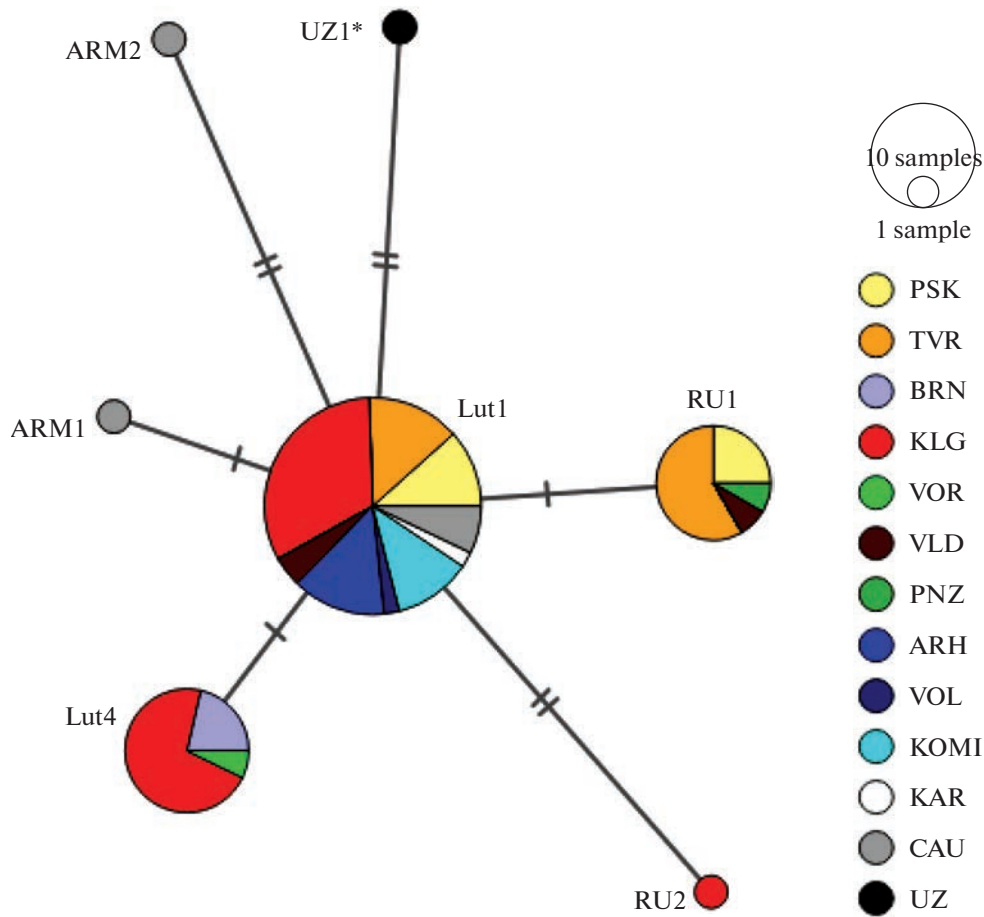


Рис. 3. Медианная сеть гаплотипов фрагмента в 255 пн контрольного региона мтДНК выдры в европейской части России, странах Закавказья, Узбекистане. Для рис. 3, 4: PSK – Псковская обл., TVR – Тверская обл., BRN – Брянская обл., KLG – Калужская обл., VOR – Воронежская обл., VLD – Владимирская обл., PNZ – Пензенская обл., ARH – Архангельская обл., VOL – Вологодская обл., KOMI – республика Коми, KAR – республика Карелия, CAU – Кавказ (респ. Северная Осетия, Азербайджан, Армения), UZ – Узбекистан. Гаплотипы обозначены кругами, их размер пропорционален выборке. Вертикальные черточки отражают число мутаций между гаплотипами.

медианной сети гаплотипами 820-11, 820-12, 820-13 и отличаются от 820-4 на 1–3 замены. Образец из Узбекистана (UZ1*) отличается от доминирующего на пять замен.

ОБСУЖДЕНИЕ

В соответствии с предыдущими исследованиями [6, 8, 10, 11, 13, 15, 20] для фрагмента контрольного региона в 255 пн гаплотип Lut1 является также доминирующим и для территории России. При этом он встречен также и у образцов из Армении и Азербайджана, что свидетельствует о его широком распространении и, как минимум, на территории Закавказья. Второстепенные гаплотипы схожим образом отличаются от основного на 1–2 замены. Таким образом, наблюдаемое звездообразное строение медианной сети не позволяет обозначить какие-либо четкие филогеографические паттерны, а указывает на прохождение вида на

данной территории через “бутылочное горлышко” [11] в позднеплейстоценовых рефугиумах [21] и, видимо, быстрое дальнейшее увеличение численности в раннем голоцене.

При этом следует отметить и наличие уникальных региональных гаплотипов. Так, гаплотип RU1 был встречен только для территории России, причем с большой долей от общей выборки (16.1%). Наравне с ним представлен и гаплотип Lut4, описанный прежде в Великобритании и Финляндии.

При увеличении длины фрагмента количество замен и разветвленность сети закономерно увеличиваются. Имеются как центральный гаплотип (820-4), распространенный по всей ЕЧР, так и второстепенные, объединяющие меньшее количество регионов (820-2, 820-4, 820-14). При этом не наблюдается территориальной зависимости в распространении гаплотипов от речных систем, как можно было бы предположить исходя из эко-

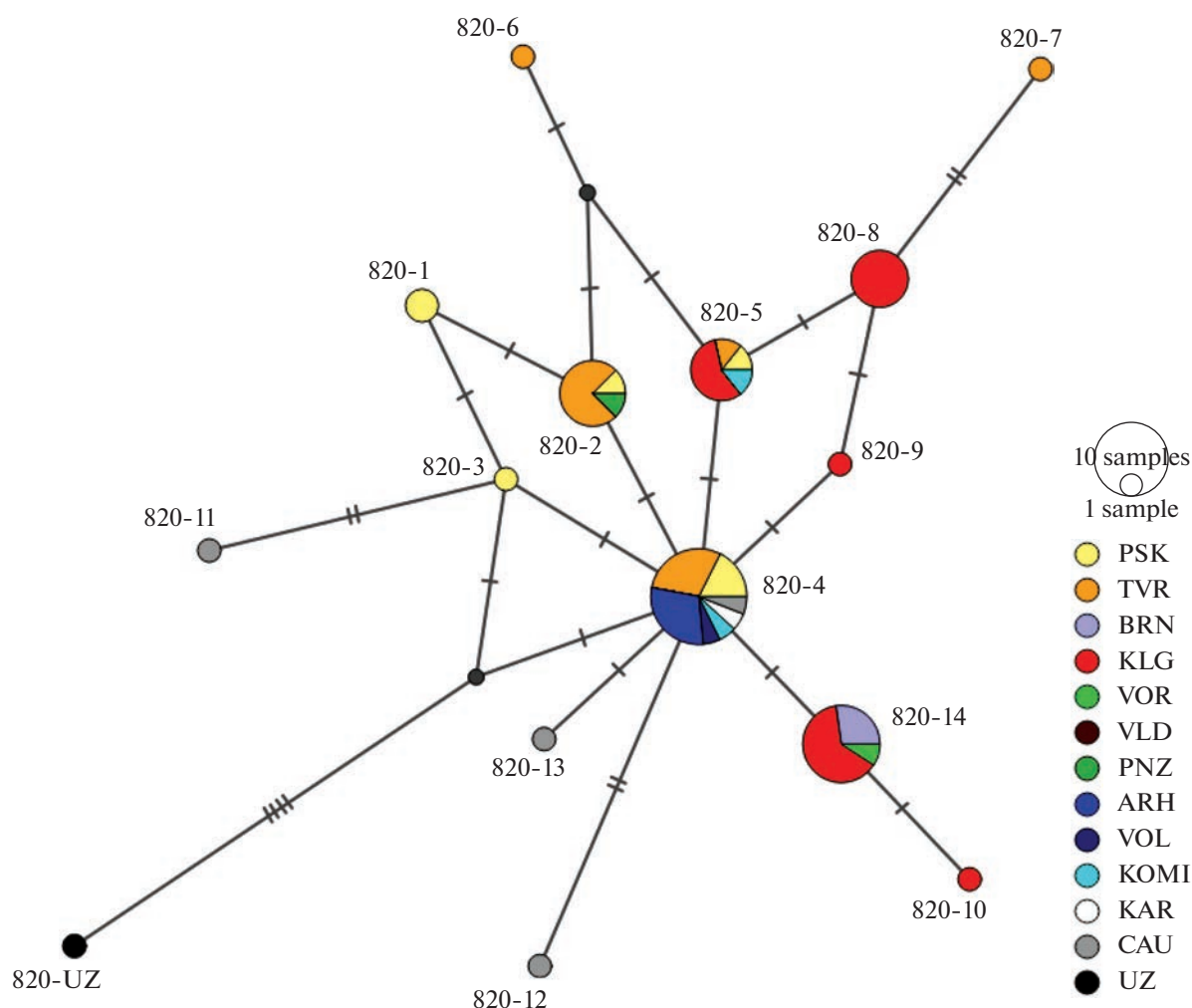


Рис. 4. Медианная сеть гаплотипов фрагмента в 820 пн контрольного региона мтДНК выдры в европейской части России, странах Закавказья, Узбекистане.

логии выдры, а именно наличия у них линейных индивидуальных участков. Так, гаплотип 820-2 представлен как в речной системе Волги, так и Дона, гаплотип 820-5 – в системах Волги, Северной Двины и Шелони, а гаплотип 820-14 – в системах Волги, Десны и Дона. Известно, что расселение молодых особей выдры может проходить на достаточно большие территории, при этом не обязательно вдоль водотоков [22]. К тому же отсутствие резкого снижения численности особей в восточной части Европы, как это было в середине XX в. в Западной Европе, позволило сохранить более высокое генетическое разнообразие особей.

Кавказские образцы, принадлежащие к подвиду *L. l. meridionalis* [23], включаются как в общий гаплотип Lut1 (а именно по одному из Северной Осетии, Азербайджана, Армении), так и образуют два новых гаплотипа из Армении. На более длинном фрагменте образец из Северной Осетии представлен доминирующим гаплотипом

820-4, а образцы из Армении отделяются. Таким образом, несмотря на то что некоторые различия от номинативного подвида присутствуют, они незначительны и полученные гаплотипы в отдельный кластер не выделяются. Схожие результаты получены и по морфологическим исследованиям [24]. Авторами отмечается низкое морфологическое разнообразие вида и слабые морфологические различия по краниометрическим и одонтологическим показателям между выдрами Европы и Кавказа (Северная Осетия, Грузия, Армения). Также авторами предполагается, что выдры с этих территорий относятся к номинативному подвиду *L. l. lutra*, и полученные нами результаты по изменчивости фрагмента контрольного региона мтДНК на данном этапе исследования такому предположению не противоречат.

Единственный образец из Узбекистана, принадлежащий к подвиду *L. l. seistanica*, по короткому фрагменту (255 пн) оказывается ближе всего

ко второму по распространенности в Европе гаплотипу Lut3, при этом на более длинном фрагменте (820 пн) занимает обособленное положение на медианной сети. Это может свидетельствовать о более сложной филогеографической структуре и, вероятно, большем генетическом разнообразии вида в Сибири и Средней Азии, чем это наблюдается для территории Европы, что не противоречит известным морфологическим и экстерьерным особенностям популяций *Lutra lutra*, населяющих территорию России [23].

Авторы благодарят за предоставленный материал для генетического анализа А.Д. Пояркова, В.В. Осипова, М.А. Грицыну, В.С. Лебедева, О.Г. Нанову, Е.Ф. Ситникову.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-24-00411).

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. Гимранов Д.О., Косинцев П.А. Географическое распределение морфотипов зубов речной выдры (*Canivora*, *Mustelidae*, *Lutra lutra* L., 1758) в Северной Евразии // ДАН. 2012. Т. 443. № 1. С. 130–139. <https://doi.org/10.1134/S0012496612020019>
2. <http://www.ohotcontrol.ru/resource/number/>
3. Красная книга Российской Федерации. Животные. 2-е изд. М.: ВНИИ Экологии, 2021. 1128 с.
4. Туманов И.Л. Редкие хищные млекопитающие России (мелкие и средние виды). СПб.: Бранко, 448 с.
5. Mucci N., Pertoldi C., Madsen A.B. et al. Extremely low mitochondrial DNA control region sequence variation in the otter *Lutra lutra* population of Denmark // Heredity. 1999. V. 130. № 3. P. 331–336.
6. Ferrando A., Ponsà M., Marmi J., Domingo-Roura X. Eurasian otters, *Lutra lutra*, have a dominant mtDNA haplotype from the Iberian Peninsula to Scandinavia // J. Heredity. 2004. V. 95. № 5. P. 430–435. <https://doi.org/10.1093/jhered/esh066>
7. Kalz B., Jewgenow K., Fickel J. Structure of an otter (*Lutra lutra*) population in Germany—results of DNA and hormone analyses from faecal samples // Mamm. Biol. 2006. V. 71. № 6. P. 321–335. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2006.02.010>
8. Finnegan L.A., Néill L.Ó. Mitochondrial DNA diversity of the Irish otter, *Lutra lutra*, population // Conserv. Gen. 2010. V. 11. № 4. P. 1573–1577. <https://doi.org/10.1007/s10592-009-9955-4>
9. Lanszki J., Hidas A., Szentes K. et al. Genetic structure of otter (*Lutra lutra*) populations from two fishpond systems in Hungary // Mamm. Biol. 2010. V. 75. № 5. P. 447–450. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2009.09.006>
10. Stanton D.W.G., Hobbs G.I., Chadwick E.A. et al. Mitochondrial genetic diversity and structure of the European otter (*Lutra lutra*) in Britain // Conserv. Gen. 2009. V. 10. № 3. P. 733–737. <https://doi.org/10.1007/s10592-008-9633-y>
11. Mucci N., Arrendal J., Ansorge H. et al. Genetic diversity and landscape genetic structure of otter (*Lutra lutra*) populations in Europe // Conserv. Gen. 2010. V. 11. № 2. P. 583–599. <https://doi.org/10.1007/s10592-010-0054-3>
12. Geboes A.L., Rosoux R., Lemarchand C. et al. Genetic diversity and population structure of the Eurasian otter (*Lutra lutra*) in France // Mamm. Res. 2016. V. 61. № 2. P. 121–129. <https://doi.org/10.1007/s13364-015-0258-5>
13. Honnen A.C., Roos A., Stjernberg T., Zachos F.E. Genetic analysis of Eurasian otters (*Lutra lutra*) reveals high admixture in Finland and pronounced differentiation in Sweden // Mamm. Biol. 2015. V. 80. № 1. P. 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2014.09.005>
14. Jo Y.S., Won C.M., Jung J. Testing microsatellite loci and preliminary genetic study for Eurasian otter in South Korea // J. Spec. Research. 2012. V. 1. № 2. P. 240–248. <https://doi.org/10.12651/JSR.2012.1.2.240>
15. Cassens I., Tiedeman R., Suchentrunk F., Hartle G.B. Brief communication. mitochondrial DNA variation in the European otter (*Lutra lutra*) and the use of spatial autocorrelation analysis in conservation // J. Hered. 2000. V. 91. № 1. P. 31–35. <https://doi.org/10.1093/jhered/91.1.31>
16. Рожнов В.В., Ячменникова А.А., Найдено С.В. и др. Мониторинг переднеазиатского леопарда и других крупных кошек. М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2018. 121 с.
17. Bandelt H.J., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Biol. Evol. 1999. V. 16. № 1. P. 37–48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
18. Leigh J.W., Bryant D. PopART: Full-feature software for haplotype network construction // Methods Ecol. Evol. 2015. V. 6. № 9. P. 1110–1116. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>
19. Excoffier L., Lischer H.E.L. Arlequin suite ver. 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // Mol. Ecol. Res. 2010. V. 10. P. 564–567.
20. Pérez-Haro M., Vinas J., Manas F. et al. Genetic variability in the complete mitochondrial control region of the Eurasian otter (*Lutra lutra*) in the Iberian Peninsula // Biol. J. Linnean Soc. 2005. V. 86. № 4. P. 397–403.
21. Sommer R., Benecke N. Late and post glacial history of the Mustelidae in Europe // Mamm. Rev. 2004. V. 34. № 4. P. 249–284.
22. Данилов П.И., Туманов И.Л. Куны Северо-Запада СССР. Л.: Наука, 1976. 256 с.
23. Гептнер В.Г., Наумов Н.П., Юргенсон П.Б. Млекопитающие СССР. Т. 2. Морские коровы и хищные. М.: Высш. шк., 1967. С. 553–584.
24. Барышников Г.Ф., Пузаченко А.Ю. Краниометрическая изменчивость речной выдры (*Lutra lutra*: *Canivora*: *Mustelidae*) в Северной Евразии // Тр. ЗИН РАН. 2012. Т. 316. № 3. С. 203–222. <https://doi.org/10.31610/trudyzin/2012.316.3.203>

Mitochondrial Genetic Diversity of Eurasian Otter (*Lutra lutra*) from European Part of Russia and Transcaucasian Countries

N. A. Sokolova^{a, *}, N. P. Korablev^b, P. N. Korablev^c, J. A. Hernandez-Blanco^a, G. A. Kaloyan^d,
A. A. Gyonjyan^d, A. H. Malkhasyan^e, and P. A. Sorokin^a

^aSevertsov Institute of Ecology and Evolution Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

^bPolistovsky National Nature Reserve, Pskov oblast, pos. Bezanitsy, 182840 Russia

^cCentral-Forest State Nature Biosphere Reserve, Tver oblast, pos. Zapovednyi, 172521 Russia

^dScientific Center of Zoology and Hydroecology of National Academy of Science of Republic Armenia, Yerevan, 0014 Armenia

^eWorld Wildlife Fund, Armenia Office, Yerevan, 0019 Armenia

*e-mail: nadezhdasklva@gmail.com

In this study we examined mitochondrial DNA diversity of Eurasian otter from European part of Russia and Transcaucasian countries and compared it with other European populations. We used a fragment of mtDNA control region (255 bp) and also included previously detected haplotypes from NCBI. Six haplotypes were found in 75 samples from European part of Russia and Transcaucasian countries. Lut1 was the most common haplotype (62.1% of samples), Lut4 was detected in 17.6% of samples, other 4 haplotypes were newly detected. Haplotype diversity for European part of Russia and Transcaucasian countries were $h = 0.56 \pm 0.054$, nucleotide diversity were $\pi = 0.0016 \pm 0.002$. When we elongated the fragment of mtDNA (820 bp), haplotype (0.85 ± 0.03) and nucleotide diversity ($\pi = 0.002 \pm 0.001$) were increased and 14 haplotypes were found. Geographic distribution of haplotypes depends neither on region, nor on river system. Central haplotype was detected throughout European part of Russia and Transcaucasian countries, as well as minor haplotypes, observed in lesser number of regions. Therefore, genetic diversity of Eurasian otters from European part of Russia and Transcaucasian countries is higher than in the rest of Europe. Besides, the population structure repeats European pattern with several regional features.

Keywords: *Lutra lutra*, mitochondrial DNA, control region, genetic diversity, European part of Russia.

УДК 577.212.3:616.12-07:575.224.22

**ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ГЕНА ТИТИНА У ПАЦИЕНТОВ
С ГИПЕРТРОФИЧЕСКОЙ И НЕКОМПАКТНОЙ КАРДИОМИОПАТИЕЙ**© 2023 г. Н. Н. Чакова¹*, Р. С. Шулинский¹, С. М. Комиссарова², Т. В. Долматович¹,
С. С. Ниязова¹, О. Ч. Мазур¹, А. С. Иванова¹, О. Д. Левданский¹¹Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, 220072 Республика Беларусь²Республиканский научно-практический центр “Кардиология”, Минск, 220036 Республика Беларусь

*e-mail: n.chakova@igc.by

Поступила в редакцию 12.12.2022 г.

После доработки 09.02.2023 г.

Принята к публикации 14.02.2023 г.

С использованием NGS секвенирована кодирующая последовательность гена *TTN* у пациентов с некомпактным миокардом левого желудочка (НКМ, 44 человека) и гипертрофической кардиомиопатией (ГКМП, 74 человека), а также в контрольной группе (194 человека) и выявлено девять нуклеотидных вариантов, приводящих к укороченному титину (*TTNtv*), и 372 миссенс-варианта. Проведен сравнительный анализ генетической изменчивости титина между группами пациентов с НКМ и ГКМП и контрольной выборкой по типу мутаций и их локализации в экзонах гена, а также в саркомерных и функциональных доменах белка. Подтверждена роль *TTNtv* в развитии НКМ, а также показана значимость дополнительных вариантов в этом же гене или в других генах, ассоциированных с различными кардиомиопатиями, для фенотипической реализации *TTNtv*. У 75% пациентов с *TTNtv* наблюдался дилатационный фенотип НКМ. Миссенс-замены в гене *TTN* обнаружены как среди пациентов с НКМ и ГКМП, так и у людей в контрольной выборке, что косвенно подтверждает доброкачественность большинства миссенс-вариантов в этом гене. В работе определены и перечислены экзоны гена *TTN* с нуклеотидными заменами и без них, а также представлен перечень миссенс-вариантов с возможной клинической значимостью в отношении структурной патологии миокарда, включая новые. Показано, что большинство патогенных и потенциально значимых вариантов находились в А-зоне саркомера. Во всех группах выявлено порядка 30–50% новых, ранее не описанных вариантов. Вероятно, многие из них являются нейтральными и представляют исключительно популяционный интерес.

Ключевые слова: ген *TTN*, укорачивающие титин мутации, миссенс-мутации, патогенная значимость нуклеотидных вариантов, гипертрофическая кардиомиопатия, некомпактная кардиомиопатия левого желудочка.

DOI: 10.31857/S0016675823070032, EDN: QJIMJH

Ген *TTN* кодирует титин – самый большой белок человека, третий по распространенности мышечный протеин после миозина и актина. Титин содержится в сердечной и скелетной мышцах и играет ключевую роль в организации и структурной целостности саркомеров, а также участвует в формировании пассивной жесткости миокарда и в передаче внутриклеточных сигналов, инициируемых стрессом [1].

Ген *TTN* расположен на хромосоме 2q31 и содержит 363 экзона, кодирующих 38 138 аминокислотных остатков. Титин имеет многодоменную структуру и включает протеин-киназный домен, 152 повторяющихся иммуноглобулин-подобных домена (Ig), 132 фибронектин III-подобных домена (FnIII), 31 домен PEVK, 7 Z-повторов и 33 неидентифицированных домена (по базе UniProt).

Одна молекула титина охватывает половину длины саркомера и простирается от Z-диска (N-конец) до M-диска (C-конец). Z1/Z2, самые N-концевые домены области связывания Z-диска титина, действуют как механосенсоры. Растяжимая область I-зоны титина в некоторых участках взаимодействует с актиновыми (тонкими) нитями и имеет функцию молекулярной пружины [2]. Область А-зоны титина связана с миозином (толстые нити) через домены FnIII и функционально нерастяжима. M-диск титина содержит множественные структурные и сигнальные комплексы [1, 3–5].

В области, соответствующей I-зоне белка, происходят дифференциальные события сплайсинга мРНК, что приводит к возникновению шести различных изоформ титина у взрослого чело-

века. Изоформа N2A (3.7 МДа) присутствует в скелетных мышцах, ее I-область различается по размеру в разных типах мышц. Наиболее представленными изоформами кардиального титина у взрослых являются N2BA (3.3 МДа) и N2B (2.97 МДа) [2, 6, 7]. N2B известна как более жесткая изоформа титина, поскольку она короче и для ее растяжения требуется больше силы [8]. У взрослого здорового человека соотношение экспрессии N2BA : N2B составляет примерно 40 : 60 [9]. У пациентов с ишемической и дилатационной кардиомиопатиями соотношение меняется в пользу N2BA. Это, по всей вероятности, приводит к снижению жесткости и пассивного напряжения миокарда и тем самым выступает в качестве механизма, компенсирующего повышение пассивной жесткости вследствие фиброза [9, 10].

Полная (каноническая) последовательность гена *TTN* человека содержит также три изоформ-специфичных взаимоисключающих экзона, называемых новыми экзонами (*novex*), кодирующей последовательность I-зоны, названную *novex-1* (экзон 45), *novex-2* (экзон 46) и *novex-3* (экзон отсутствует в метатранскрипте [11]). Транскрипты, содержащие эти экзоны, кодируют три минорные изоформы титина *novex-1* (*Nvx-1*), *novex-2* (*Nvx-2*) и *novex-3* (*Nvx-3*). Изоформа *Nvx-3* регулирует кальциевые миофибриллярные сигнальные пути и вовлечена в инициированную стрессом реструктуризацию саркомеров.

В гене *TTN* насчитывается несколько десятков тысяч редких миссенс-вариантов и более 1000 мутаций, преимущественно нонсенс, приводящих к укороченной форме титина. На данный момент можно считать доказанным, что укорачивающие титин мутации (*TTNtv*) являются наиболее распространенной генетической причиной как дилатационной (ДКМП), так и некомпактной кардиомиопатий (НКМ), поскольку они встречаются у 15–25% пациентов с данными патологиями. При этом при гипертрофической кардиомиопатии (ГКМП) или в популяционных выборках этот показатель составляет 1–2% [12]. Что касается миссенс-вариантов гена *TTN*, то их роль в развитии кардиомиопатий трудно выяснить из-за неполной пенетрантности и наличия фоновых вариаций в этом гене в количестве 2–3% практически у каждого индивида [11]. Предполагается, что большинство выявляемых миссенс-вариантов могут быть либо доброкачественными, либо недостаточными, чтобы вызывать заболевание без дополнительных факторов, поскольку их доля в популяционных исследованиях превышает распространенность наследственных типов кардиомиопатий [13]. Дополнительные доказательства модифицирующей роли миссенс-мутаций в гене *TTN* получены R. Roncarati с соавт. [14]: родственники с мутацией в гене *LMNA* и дополнительным вариантом в гене *TTN* демонстрировали

более тяжелый фенотип дилатационной кардиомиопатии с ранней манифестацией заболевания по сравнению с носителями только одного варианта в гене *LMNA*.

В связи с вышесказанным целью исследования было изучение спектра и распространенности нуклеотидных вариантов в гене *TTN* у пациентов с некомпактной и гипертрофической кардиомиопатиями и индивидуумов контрольной выборки, принадлежащих к одной и той же популяции, для выявления потенциально патогенных генетических изменений в отношении структурной патологии миокарда.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 118 неродственных пациентов: 44 – с некомпактной кардиомиопатией левого желудочка (54.5% мужчин; средний возраст 43.07 ± 12.52 лет) и 74 – с гипертрофической кардиомиопатией (66.2% мужчин; средний возраст 39.3 ± 12.9 лет), обследованных и наблюдаемых в РНПЦ “Кардиология” в течение длительного времени. Диагноз ГКМП ставился в соответствии с рекомендациями Международного комитета экспертов по ГКМП (ESC 2014). Диагноз НКМ устанавливали на основании: 1) ЭхоКГ-критериев R. Jenni [15]; 2) МРТ-критериев S. Petersen и A. Jacquier [16, 17]. Группу сравнения в виде популяционной выборки составили 194 человека (57.2% мужчин; средний возраст 16.6 ± 15.9 лет) без структурных заболеваний миокарда (далее по тексту обозначена как “контрольная группа”). Все участники подписали информированное согласие на использование соответствующих биоматериалов для научных исследований.

Выделение тотальной ДНК из замороженной цельной крови выполняли фенол-хлороформным методом. Определение однонуклеотидных вариантов в гене *TTN* проводили методом высокопроизводительного секвенирования (NGS) на генетических анализаторах MiSeq или NextSeq 550 (Illumina). Пробоподготовку образцов в группе пациентов осуществляли с использованием набора TruSight Cardio Sequencing Kit (Illumina), в контрольной выборке – TruSight One Sequencing и TruSight One Expanded Panels (Illumina). Все перечисленные наборы включали панели, содержащие зонды для гибридизации к экзонам, как минимум, 174 генов, ассоциированных с наследственными заболеваниями сердечно-сосудистой системы.

Выравнивание прочтений проводилось на сборку генома человека GRCh37. Индексация файлов, а также работа с форматами нуклеотидных данных проводились в программе samtools. Определение однонуклеотидных вариантов (SNP-calling) осуществлялось с использованием пакета про-

грамм GATK в режиме GVCF (программы AddOrReplaceReadGroups, HaplotypeCaller, CombineGVCFs, GenotypeGVCFs). Фильтрация SNP в файле gVCF по покрытию ($DP > 10$) и качеству ($QUAL > 20$) выполнялась с использованием VCFtools. Для оценки ассоциаций выявленных вариантов с исследуемыми патологиями использовали программу plink. Полученный vcf файл конвертировали в .bed.bim.fam формат с последующим добавлением информации о фенотипической принадлежности и родственных связях. Далее варианты фильтровали по следующим параметрам: полиморфный сайт генотипирован не менее чем в 98% образцов; соответствие закону равновесия Харди–Вайнберга ($p < 0.0000001$). Также оценивали популяционную стратификацию с использованием данных генотипирования проекта “1000 Genomes” для добавления значений главных компонент в анализ в качестве ковариат и статистической коррекции возможной неоднородности популяционной структуры выборки.

Эффект и классификацию вариантов рассчитывали с использованием программы Variant Effect Predictor, используя транскрипты, которые приведены в https://www.cardiodb.org/titin/titin_transcripts.php [11]. С этого же ресурса использовалась информация о локализации функциональных доменов (FnIII, Ig и др.) и бэндов саркомера (A-, I-, Z-, M- и др.). Варианты последовательности в *TTN* описаны в соответствии с эталонной последовательностью, кодирующей ДНК (метатранскрипт). Визуализацию полученных результатов, а также работу с матрицами данных проводили с использованием интерпретируемых языков программирования Python (библиотеки pandas, numpy, seaborn, matplotlib, itertools, venn) и bash. Разработанные скрипты находятся в репозитории github по ссылке: https://github.com/IGC-bioinf/TTN_scripts.

Аннотирование нуклеотидных вариантов проводили с помощью специального программного обеспечения ANNOVAR rev. 527 [18]. Для определения диагностической значимости выявленных генетических вариантов проводилось сравнение их частоты встречаемости между группами пациентов (НКМ и ГКМП) и контрольной выборкой. Оценку патогенности нуклеотидных вариантов проводили в соответствии с критериями Американского колледжа медицинской генетики (ACMG, 2015) [19]. К потенциально патогенным относили нуклеотидные варианты, которые не встречались в контрольной группе или статистически значительно чаще обнаруживались в группах пациентов, чем в контроле, а значение MAF (minor allele frequency) для них не превышало 0.00001. Рассчитанные значения p -уровня значимости при сравнении с контрольной группой были скорректированы с помощью поправки Бонферрони для множественного тестирования.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У 118 неродственных пациентов с кардиомиопатиями (44 пробандам с НКМ, 74 – с ГКМП) и у 194 человек из контрольной группы с помощью NGS проводили секвенирование 364 экзонах гена *TTN*, кодирующего сердечные изоформы титина (N2B, N2BA, Nvx-1, -2, -3) и мышечную изоформу N2A. Всего в трех группах выявлено 372 миссенс-варианта и девять укорачивающих титин вариантов (*TTNtv*).

Спектр и распространенность TTNtv у пациентов с кардиомиопатиями (НКМ и ГКМП)

В результате генотипирования 44 пациентов с НКМ у восьми (18.2%: 6 мужчин/2 женщины) выявлены нуклеотидные варианты в гене *TTN*, приводящие к возникновению преждевременного стоп-кодона: семь нонсенс-мутаций (p.Glu4095*, p.Gln4566*, p.Gly15531*, p.Arg16766*, p.Gly17830*, p.Trp24578*, p.Tyr25971*) и одна делеция, вызывающая сдвиг рамки считывания p.Arg19172fs (табл. 1). Три нонсенс-мутации p.Gln4566* (rs775072385), p.Arg16766* (rs754866489), p.Gly17830* (rs759231562) описаны ранее у пациентов с ГКМП [11, 12, 20], остальные варианты обнаружены впервые. *TTNtv* находились в 48-м (два пациента), 250-, 267-, 278-, 294-, 326-м (два пациента) экзонах метатранскрипта и присутствовали во всех изоформах сердечного титина, кроме Nvx-3.

Пять (62.5%) из восьми вариантов приводили к преждевременной остановке синтеза титина в области А-зоны саркомера, остальные затрагивали I-зону.

У шести (№ 548, 557, 570, 579, 583 и 690) из восьми пациентов нонсенс-мутация в гене *TTN* сочеталась с одним или несколькими дополнительными вариантами неопределенного значения (VUS) в этом же гене или других генах, ассоциированных с различными кардиомиопатиями: *MYBPC3*, *TMPO*, *DSP*, *LDB3*, *RBM20*, *JPH2* и *RYR2*.

У шести (75.0%) из восьми пациентов с *TTNtv* диагностирован дилатационный фенотип НКМ, у остальных (№ 557 и 593) наблюдалась изолированная форма НКМ с признаками дилатации ЛЖ.

В контрольной группе у двух (1.0%) из 194 человек выявлен новый вариант с.10927C>A (p.Glu3643*) в 46-м экзоне метатранскрипта, который приводит к преждевременному стоп-кодону только в 44-м экзоне Nvx-2 (табл. 2). Все остальные изоформы титина (N2BA, N2B, Nvx-1, -3) не включают данную замену и, следовательно, полностью сохраняют свои функции.

Ни один из 74 пробандов с ГКМП не имел укорачивающих титин вариантов.

Таблица 1. Характеристика *TTNv* в группе пациентов с НКМ и контрольной выборке

Код	Пол, возраст ^а	Замена в ДНК (экзон в метатранскрипте)	Замена в белке, гс	Область/домен	MAF (gnomAD)	Варианты в других генах (класс ACMG)	Фенотип
Пациенты с НКМ							
548	м, 62	c.12283G>T (48)	p.Glu4095*	I-band/Ig-like 21	0	<i>TMPO</i> (III), <i>DSP</i> (III), <i>RYR2</i> (III)	Дилатационный
570	ж, 45	c.13696C>T (48)	p.Gln4566*, rs75072385	I-band/Ig-like 23	0.000036	<i>RBM20</i> (III), <i>RYR2</i> (III)	»
583	ж, 52	c.46591G>T (250)	p.Gly15531*	I-band /—	0	<i>MYP3C3</i> (IV)	»
557	м, 40	c.50296C>T (267)	p.Arg16766*, rs754866489	A-band/Fn type-III 10	0.000004	<i>MYP3C3</i> (IV)	Изолированный
593	м, 51	c.53488G>T (278)	p.Gly17830*, rs759231562	A-band/Fn type-III 17	0.000004	—	»
560	м, 29	c.57514delA (294)	p.Arg19172fs	A-band/Ig-like 103	0	—	Дилатационный
579	м, 22	c.73734G>A (326)	p.Trp24578*	A-band/Fn type-III 66	0	<i>LDB3</i> (III)	»
690	м, 40	c.77913T>G (326)	p.Tyr25971* , rs72648203	A-band/Fn type-III 76	0	<i>JPH2</i> (III)	»
Контрольная группа							
111, 112	ж, 47 м, 27	c.10927G>T (46)	p.Glu3643*	Nvx-2 (экзон 44)	0	—	—

Примечание. м — мужской пол, ж — женский пол; ^а — возраст манифестации; жирный шрифт — новая, ранее неопиcанная мутация.

Таблица 2. Локализация миссенс-вариантов в экзонах гена *TTN* в группах пациентов и в контроле

Группа	Номер экзона в канонической форме гена <i>TTN</i> (метатранскрипт)		
	с несколькими уникальными вариантами	с общими вариантами	без нуклеотидных вариантов
НКМ	I (2 экзона): 61, 127 A (2 экзона): 326 , 339 M (1 экзон): 358	Z (8 экзонов): 7, 9, 15, 21, 22, 24, 27, 28 I (40 экзонов): 31, 33, 36, 40, 42–44, 48, 50, 51, 55, 58, 61, 66, 72–74, 77, 78, 80, 84, 87, 88, 90–92, 98, 105, 107, 119, 123, 130, 132, 138, 173, 209, 229, 233, 245, 248	Z (13 экзонов): 1, 4–6, 8, 10–13, 17, 19, 20, 23 I (153 экзона): 30, 32, 34, 35, 37–39, 41, 47, 53, 54, 57, 59, 62, 65, 75, 79, 82, 83, 85, 89, 93–96, 101–104, 106, 108–112, 114–118, 120–122, 124–126, 129, 131, 133–137, 139–172, 174–201, 203–208, 210–224, 226–228, 231, 232, 234–236, 240–244, 247, 249–251
ГКМП	A (2 экзона): 310, 326 M (1 экзон): 358	A (25 экзонов): 260, 266, 272, 277, 286, 289, 294, 298, 301, 304, 308, 311, 316, 326 , 330, 331, 337, 338, 342, 346, 350, 352, 353, 356, 357 M (4 экзона): 358 –361	A (46 экзонов): 255, 258, 259, 261, 262, 267, 268, 270, 271, 276, 280–285, 288, 290, 292, 296, 297, 299, 302, 303, 307, 309, 312–315, 317–319, 321, 323, 324, 329, 332, 336, 341, 343, 345, 347, 348, 351, 354 M (1 экзон): 363
Контроль	Z (2 экзона): 3, 28 I (10 экзонов): 29, 46, 48, 70, 74, 76, 86, 88, 229, 245 A (13 экзонов): 256, 277, 293, 304, 310, 326 , 327, 334, 335, 337, 343, 344, 350 M (2 экзона): 358 , 360		
Всего	30 экзонов	77 экзонов	213 экзонов

Примечание. Жирным шрифтом выделены наиболее варибельные экзоны.

Оценка разнообразия и патогенной значимости миссенс-вариантов у пациентов с кардиомиопатиями (НКМ и ГКМП)

В группах пациентов с НКМ и ГКМП и в контрольной выборке всего выявлено 372 отличающихся от референсных нуклеотидных варианта, из которых 249 (66.9%) были уникальными и встречались только в одной из трех анализируемых групп, 75 (20.2%) встречались во всех трех группах, 48 (12.9%) были общими только для каких-либо двух групп (рис. 1).

Сравнительный анализ распространенности уникальных миссенс-вариантов в группах пациентов показал, что их доли составили 30.0% (42 из 140 мутаций, выявленных в этой группе) и 20.7% (28 из 135) в группах с НКМ и ГКМП соответственно и статистически значимо не различались ($\chi^2 = 2.64$; $p = 0.104$). Частота встречаемости уникальных замен в контрольной выборке равнялась 60.7% (179 из 295) и существенно превышала этот показатель в обеих группах пациентов ($p < 0.00001$).

Из табл. 2 следует, что распределение миссенс-вариантов в гене *TTN* по экзонам было неравномерным. В 213 (58.5%) из 364 экзонов вообще не обнаружено каких-либо нуклеотидных замен, а в 30 (8.2%) экзонах наблюдалось по несколько уникальных вариантов. Общие во всех группах нуклеотидные замены локализовались в 77 (21.2%) экзонах, при этом в 13 из них (28, 48, 61, 74, 229, 245, 277, 304, 326, 337, 350, 358, 360) встречались также и уникальные нуклеотидные замены. Самыми “нагруженными” по наличию уникальных

и общих вариантов во всех группах были 326-й (54 варианта) и 358-й (26 вариантов) экзоны. Они же были и самыми большими: 17 106 и 5609 пн соответственно. Однако прямой зависимости частоты замен от протяженности экзонов не наблюдалось, что, вероятно, связано с функциональной значимостью кодируемых ими областей белка и требует дополнительного изучения.

При анализе распределения общих и уникальных миссенс-вариантов в зонах саркомера (A-, I-зоны), представленного в табл. 3 и на рис. 2, выявлены следующие различия: половина уникальных замен во всех рассматриваемых группах, включая контрольную, сосредоточена в A-области, что в среднем в 1.5 раза выше по сравнению с I-зоной. При этом общие варианты, наоборот, статистически значимо чаще регистрировались в I-полосе, чем в A-области ($p = 0.0005$) (табл. 3).

Распределение уникальных и общих миссенс-вариантов в функциональных доменах белка (FnIII, Ig и др.) также имело свои особенности (табл. 4, рис. 3). 70–80% уникальных замен в каждой из рассматриваемых групп были практически поровну распределены между FnIII и Ig доменами. Общие варианты находились в FnIII и Ig доменах в 67% случаев, а их присутствие в Ig было в 2 раза выше, чем в FnIII, что статистически значимо отличалось от распределения уникальных миссенс-вариантов ($p = 0.01$).

В табл. 5 и 6 представлено распределение уникальных миссенс-вариантов в сердечных изоформах титина (N2BA, N2B, Nvx-1, Nvx-2 и Nvx-3) в

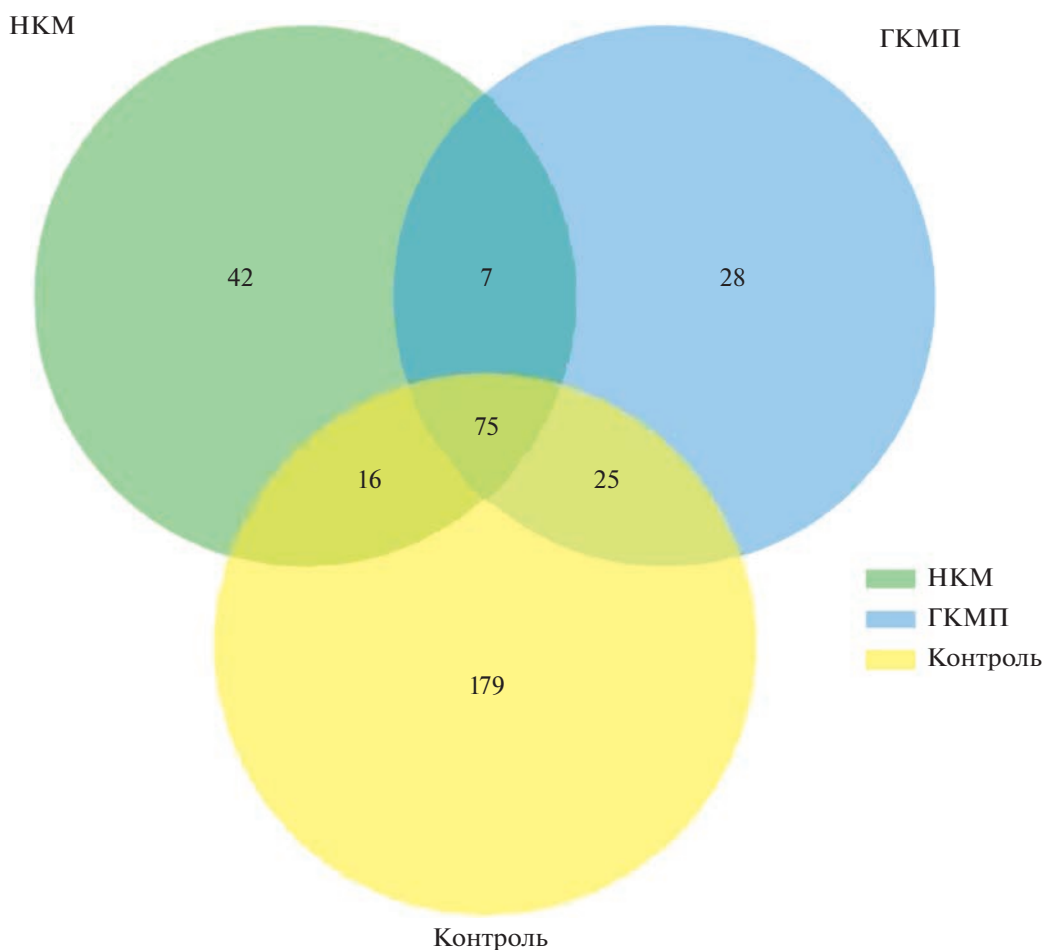


Рис. 1. Соотношение общих и уникальных миссенс-вариантов в гене *TTN* в группах пациентов с ГКМП и НКМ и в контрольной выборке (диаграмма Венна).

трех анализируемых группах для оценки представленности выявленных нуклеотидных замен в различных изоформах белка у пациентов с кардиомиопатиями в сравнении с контрольной выборкой.

В группе из 44 пациентов с НКМ обнаружено 42 уникальных миссенс-варианта (табл. 5, 6):

39 замен – в метатранскрипте и 3 (7.1%) – в 46-м экзоне *Nvх-3*, отсутствующего в метатранскрипте. Только одна замена (2.4%) в 28-м экзоне присутствовала во всех изоформах; еще 25 (59.5%) вариантов в 14 экзонах метатранскрипта присутствовали во всех изоформах, кроме *Nvх-3* (табл. 6). Тринадцать (31.0%) миссенс-вариантов в 11 экзонах ме-

Таблица 3. Распределение уникальных и общих миссенс-вариантов метатранскрипта гена *TTN* относительно А-, I-, М-областей саркомера у пациентов и в контроле

Область	Уникальные замены, <i>n</i> (%)			Общие замены, <i>n</i> (%)
	НКМ	ГКМП	контроль	
М-полоса	1 (2.6)	2 (7.1)	20 (11.9)	8 (11.0)
А-зона	22 (57.9)	14 (50.0)	90 (53.6)	24 (32.9)
I-зона	13 (34.2)	11 (39.3)	45 (26.8)	34 (46.6)
Z-диск	–	1 (3.6)	13 (7.7)	6 (8.2)
Другая	2 (5.3)	–	–	1 (1.4)
Всего	38	28	168	73

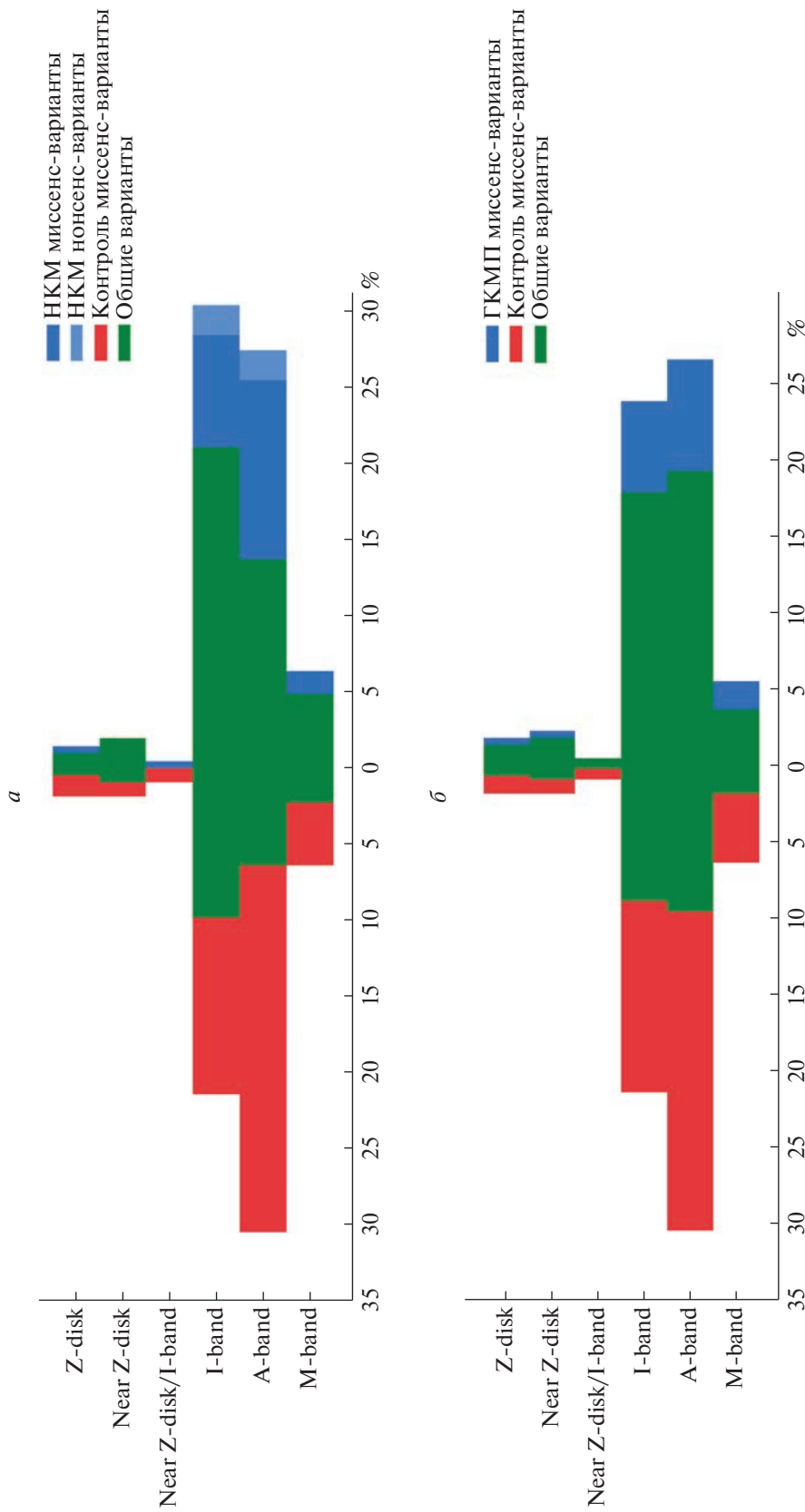


Рис. 2. Схематичное изображение распределения уникальных и общих миссенс-вариантов в зонах саркомера между анализируемыми группами: *а* – НКМ и контроль; *б* – ГКМП и контроль. Вправо отложена доля вариантов в группе пациентов, влево – в контрольной выборке.

Таблица 4. Распределение уникальных и общих миссенс-вариантов метатранскрипта гена *TTN* в функциональных доменах титина у пациентов и в контроле

Домен	Уникальные замены, <i>n</i> (%)			Общие замены, <i>n</i> (%)
	НКМ	ГКМП	контроль	
FnIII	15 (39.5)	12 (42.8)	70 (41.6)	15 (20.5)
Ig	17 (44.7)	9 (32.2)	62 (36.9)	34 (46.6)
Protein kinase	—	1 (3.6)	2 (1.2)	—
PEVK	—	—	3 (1.8)	1 (1.4)
Другие	6 (15.8)	6 (21.4)	31 (18.5)	23 (31.5)
Всего	38	28	168	73

Таблица 5. Представленность выявленных уникальных миссенс-вариантов в различных транскриптах (изоформах) титина в изучаемых группах

Группа	Всего мутаций	Мета, <i>n</i> (%) (364 ex)	Кол-во мутаций в изоформах титина, <i>n</i> (%)				
			N2BA (313 ex)	N2B (191 ex)	Nvx-1 (192 ex)	Nvx-2 (192 ex)	Nvx-3 (46 ex)
НКМ	42	39 (92.9)	38 (90.4)	25 (59.5)	25 (59.5)	25 (59.5)	3 (7.1)
ГКМП	28	2 (100)	28 (100)	22 (78.6)	22 (78.6)	22 (78.6)	5 (17.8)
Контроль	179	168 (93.9)	164 (91.6)	132 (73.7)	132 (73.7)	136 (75.95)	26 (14.5)

Таблица 6. Распределение встречаемости уникальных миссенс-вариантов и их локализация с учетом различных изоформ титина в группах пациентов и в контроле

Изоформы <i>TTN</i>	НКМ		ГКМП		Контроль	
	<i>n</i> (%)	экзоны*	<i>n</i> (%)	экзоны	<i>n</i> (%)	экзоны
N2BA, N2B, Nvx-1, Nvx-2, Nvx-3	1/42 (2.4)	1 : 28	5/28 (17.9)	5 : 16, 29, 36, 42, 48	15/179 (8.4)	12 : 2, 3 (2), 7, 14, 18, 25, 26, 28 (3), 29, 39, 42, 44
N2BA, N2B, Nvx-1, Nvx-2	25/42 (59.5)	14 : 238, 254, 273, 308, 310, 311, 326 (9)**; 333, 335, 338, 339 (2), 349, 357 (2), 358 (2)	17/28 (60.7)	16 : 49, 237, 253, 257, 263, 264, 278, 287, 306, 310, 316, 326 (2), 340, 352, 356, 358	117/179 (65.4)	49 : 48 (3), 225, 229 (2), 230, 239, 245 (2), 252, 253, 254, 256 (5), 265, 266, 269, 272, 275, 277 (3), 279, 286, 287, 289, 291, 293 (4), 295, 300, 301, 304 (3), 305, 310 (3), 316, 320, 322, 325, 326 (26), 327 (2), 328, 334 (3), 335 (2), 337 (3), 339, 343 (2), 344 (3), 350 (2), 352, 353, 355, 358 (14), 359, 360 (2), 362 (2)
N2BA	13/42 (31.0)	11 : 50, 56, 61 (2), 67, 69, 71, 80, 86, 99, 107, 127 (2)	6/28 (21.4)	5 : 52, 66, 93, 113 (2), 207	32/179 (17.9)	26 : 50, 58, 60, 61, 63, 64, 68, 69, 70 (2), 71, 73, 74, 76 (2), 78, 81, 86 (2), 88 (4), 91, 92, 97, 100, 117, 128, 131, 136, 202
Nvx-3	3/42 (7.1)	1 : 46***	—	—	11/179 (6.1)	1 : 46***
Nvx-2	—	—	—	—	4/179 (2.2)	1 : 46

Примечание. * — нумерация экзонов в метатранскрипте; ** — в скобках указано число уникальных нуклеотидных вариантов в экзоне; *** — 46-й экзон Nvx-3 (отсутствует в метатранскрипте); жирным шрифтом выделены число экзонов и доля вариантов.

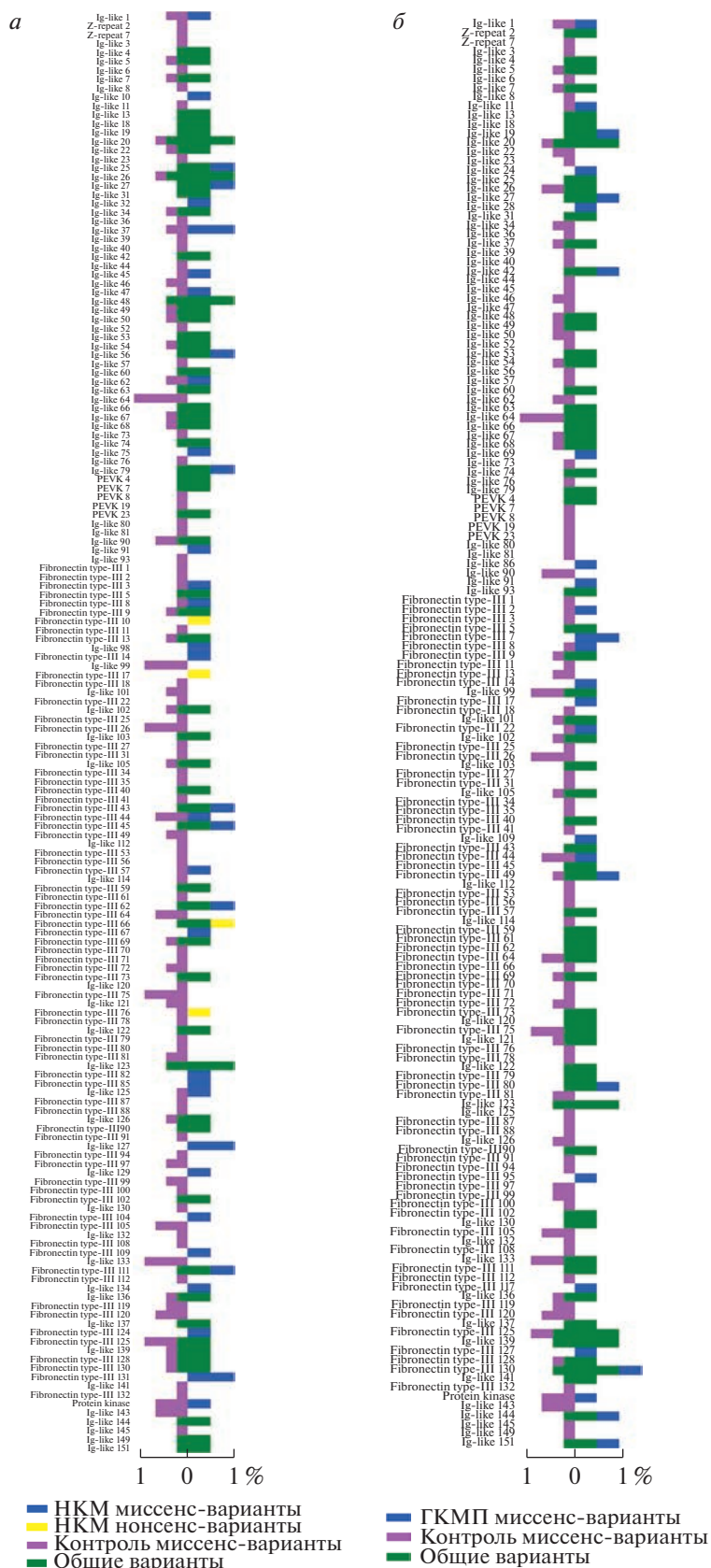


Рис. 3. Схематичное изображение распределения уникальных и общих миссенс-вариантов в функциональных доменах между анализируемыми группами: *а* – НКМ и контроль; *б* – ГКМП и контроль. Вправо отложена доля вариантов в группе пациентов, влево – в контрольной выборке.

татранскрипта затрагивали только сердечную изоформу N2BA и отсутствовали в других изоформах в результате альтернативного сплайсинга. Один вариант (2.4%) находился в 199-м экзоне метатранскрипта и не идентифицировался в анализируемых изоформах.

Все варианты были единичными, за исключением нуклеотидной замены с.200T>C (p.I67T, rs952685437) в третьем экзоне, которая встретилась у двух пациентов с НКМ (табл. 7).

В группе из 74 пациентов с ГКМП в метатранскрипте обнаружено 28 уникальных миссенс-вариантов (табл. 5, 6). Пять из 28 (17.9%) вариантов в пяти экзонах присутствовали во всех сердечных изоформах, 17 (60.7%) замен в 16 экзонах метатранскрипта присутствовали во всех изоформах, кроме Nvx-3 (табл. 6). В сердечной изоформе N2BA насчитывалось еще шесть (21.4%) уникальных миссенс-вариантов в пяти экзонах метатранскрипта, которые отсутствовали в других сердечных изоформах. У пациентов с ГКМП в отличие от группы с НКМ не выявлено миссенс-мутаций, локализованных в 46-м экзоне Nvx-3.

Нуклеотидная замена в третьем экзоне, обнаруженная у двух пациентов с НКМ, также дважды встретилась в группе с ГКМП (табл. 7), при этом отсутствовала в нашей группе сравнения и в других популяциях мира.

В контрольной выборке (194 человека) в метатранскрипте установлено 179 миссенс-вариантов (табл. 5, 6), не встретившихся у пациентов: 168 (93.8%) замен – в метатранскрипте и 11 (6.2%) – в 46-м экзоне Nvx-3. 15 (8.4%) из 179 миссенс-вариантов в 12 экзонах присутствовали во всех сердечных изоформах (N2BA, N2B, Nvx-1, Nvx-2 и Nvx-3), а 117 (65.4%) мутаций в 49 экзонах метатранскрипта присутствовали во всех изоформах, кроме Nvx-3. В сердечной изоформе N2BA насчитывалось еще 32 (17.9%) уникальных миссенс-варианта в 26 экзонах, характерных исключительно для этой изоформы титина. Выявлено также четыре (2.2%) миссенс-мутации в 46-м экзоне метатранскрипта, соответствующего 44-му экзону Nvx2 (табл. 6).

Более одного раза выявлен 31 (17.3%) вариант в 24 экзонах (2, 3, 14, 25, 26, 29, 46, 70 (2 мутации), 71, 86, 254, 256, 269, 277 (2 мутации), 304, 310, 325, 326 (3 мутации), 335, 339, 344, 352, 358 (4 мутации), 360). Эти замены с большой долей вероятности являются доброкачественными и не вызывают структурных нарушений миокарда.

Характеристика потенциально патогенных миссенс-мутаций в гене TTN у пациентов со структурными нарушениями миокарда

В группе с НКМ (44 пациента) у 16 (36.4%) человек идентифицировано 17 (40.5%) уникальных мис-

сенс-вариантов, характеризующихся $MAF < 0.00001$ (табл. 7). 12 (70.6%) нуклеотидных замен приводили к изменению А-зоны саркомера, три (17.6%) затрагивали I-зону, одна у двух пациентов находилась в Z-диске. Пять (29.4%) вариантов находились в 326-м экзоне, два – в 339-м экзоне.

Трое (№ 577, 614, 583) из 16 пациентов с заменами в гене *TTN* были компаундными гетерозиготами (два редких варианта), у пациента № 583 второй была нонсенс-мутация в гене *TTN* (табл. 1). У семи (43.8%) пробандов найден дополнительный вариант в другом гене, ассоциированном с кардиомиопатией. Девять (52.9%) нуклеотидных вариантов были новыми (табл. 7).

В группе с ГКМП у 13 (17.6%) из 74 пациентов идентифицировали 13 (46.4%) из 28 миссенс-вариантов, имеющих $MAF < 0.00001$ (табл. 7). Все мутации были уникальными за исключением двух: p.Пе67Thr (два пациента) и p.R16524H (два пациента). Замена p.Пе67Thr была выявлена, как уже говорилось выше, и у двух пациентов с НКМ. Шесть (46.2%) нуклеотидных вариантов приводили к изменению А-зоны саркомера, пять (38.5%) затрагивали I-зону, одна локализована у двух пациентов в Z-диске и еще одна в M-области.

Два (№ 365, 493) из 13 пациентов были компаундными гетерозиготами. У троих (23.1%) пробандов обнаружен дополнительный вариант в другом гене, ассоциированном с ГКМП. Пять (38.5%) мутаций были новыми.

ОБСУЖДЕНИЕ

Секвенирование гена *TTN* независимо от клинической характеристики исследуемых групп приводит к идентификации большого количества нуклеотидных вариантов, что скорее всего обусловлено огромным размером гена, его структурой, а также потерей значительных участков в ходе альтернативного сплайсинга при образовании различных изоформ титина. Варианты в гене *TTN* описаны при различных патологиях скелетных мышц и сердца [21–24]. Доказано, что укороченные варианты (*TTNtv*) в большинстве случаев являются причиной ДКМП и НКМ [25], при этом их наследование является аутосомно-доминантное. *TTNtv* также обнаруживается у пациентов с мышечными миопатиями, но в данном случае в основном наблюдается рецессивное наследование [21, 24].

Интерпретация диагностической значимости миссенс-вариантов в гене *TTN*, представляющих подавляющее большинство идентифицированных вариантов, является более сложной задачей. М. Savarese и соавт. показали, что определить уровень их патогенности, опираясь исключительно на критерии руководства по классификации вариантов ACMG, затруднительно и предложили

Таблица 7. Характеристика редких потенциально патогенных миссенс-мутаций (MAF < 0.00001) в гене *TTN* в группах пациентов

№ п/п	Шифр пациента	Экзон (зона саркомера)	Домен	Замена в ДНК (rs)	Замена в белке	MAF (gnomAD)	Дополнительные варианты (класс ACMG)
Пациенты с НКМ							
1	614 (1)	339 (A)	Ig-134	c.93002A>G rs1308531791	p.N31001S	4.025e-06	<i>KCNJ2 (III)</i>
2	550	339 (A)		c.92756G>C	p.R30919P	—	—
3	581	338 (A)	Fn-111	c.92087C>A	p.A30696E	—	<i>LDB3 (III)</i>
4	594	333 (A)	Fn-104	c.88930A>G	p.K29644E	—	—
5	585	326 (A)	Ig-127	c.84092G>A rs1206516728	p.G28031E	4.045e-06	—
6	614 (2)	326 (A)	Fn-82	c.80258A>C rs1321131877	p.Y26753S	4.021e-06	<i>KCNJ2 (III)</i>
7	547	326 (A)	Fn-67	c.73858C>T rs1191890177	p.P24620S	4.035e-06	<i>RYR2 (III)</i>
8	575	326 (A)	Fn-62	c.71903A>C rs769320596	p.N23968T	2.017e-05	—
9	563	326 (A)	Fn-57	c.69992C>T	p.P23331L	—	<i>MYH7 (III)</i>
10	577 (1)	308 (A)	Fn-43	c.64151C>G	p.T21384S	—	—
11	555	273 (A)	Ig-98	c.51961C>T rs752764827	p.R17321C	2.02e-05	<i>CACNA1C (III)</i>
12	625	254 (A)	Fn-3	c.47691G>T	p.E15897D	—	—
13	577 (2)	199 (—)	—	c.38807A>G	p.K12936R	—	—
14	579	71 (I)	Ig-47	c.20583C>G	p.N6861K	—	<i>LDB3 (III), TTNtv</i>
15	585	69 (I)	Ig-45	c.20252G>T	p.C6751F	—	—
16	583	28 (near Z-disk/I)	Ig-10	c.6449T>C rs761352132	p.M2150T	1.594e-05	<i>MYBPC3 (IV), TTNtv</i>
17	331; 556	3 (Z-disk)	Ig-1	c.200T>C rs952685437	p.I67T	7.0 e-06	—
Пациенты с ГКМП							
1	237	360 (M)	Ig-151	c.107182G>A rs764891218	p.E35728L	1.216e-05	—
2	36	316 (A)	Fn-49	c.66589C>T rs774696610	p.R22197W	1.214e-05	—
3	71	310 (A)	Fn-44	c.64688C>G rs751700216	p.P21563R	8.1e-06	<i>TCAP (III)</i>
4	50	310 (A)	Fn-44	c.64860G>C rs373713828	p.R21620S	8.05e-06	<i>MYBPC3 (IV)</i>
5	408	306 (A)	Ig-109	c.63715G>C	p.D21239H	—	—
6	289	264 (A)	Fn-7	c.49571G>A rs757390152	p.R16524H	1.621e-05	—
7	493 (1)	257 (A)	—	c.48163C>T rs1012450335	p.R16055C	4.051e-06	—
8	340	237 (I)	Ig-86	c.43883C>T	p.S14628F	—	—
9	365 (1)	113 (I)	—	c.30801A>T	p.K10267N	—	—
10	365 (2)	113 (I)	—	c.30794C>T rs1333544444	p.P10265L	0	—
11	493 (2)	52 (I)	Ig-28	c.15378G>T	p.Q5126H	—	—
12	213	29 (I)	Ig-11	c.6560A>G	p.E2187G	—	—
13	101	3 (Z-disk)	Ig-1	c.200T>C rs952685437	p.I67T	7.0 e-06	<i>MYH7 (IV)</i>
	59						—

Примечание. Жирным шрифтом выделены новые нуклеотидные варианты; MAF — частота минорного аллеля; * — в скобках указан № п/п нуклеотидного варианта для пациентов с компаундной гетерозиготой.

поправки классификации вариантов гена *TTN* в контексте конкретных заболеваний скелетных мышц [26].

В ходе нашего исследования секвенирована кодирующая последовательность гена *TTN* методом NGS у пациентов с НКМ (44 человека) и ГКМП (74 человека), а также в контрольной группе (194 человека) и выявлено девять нуклеотидных вариантов, приводящих к укороченному титину (*TTNtv*), и 372 миссенс-варианта. Проведен сравнительный анализ генетической изменчивости титина между группами пациентов с НКМ и ГКМП и контрольной выборкой по типу мутаций и их локализации в экзонах гена, а также в саркомерных и функциональных доменах белка.

Варианты *TTNtv* были сосредоточены в группе пациентов с НКМ, что подтверждает их значимую роль в патогенезе этого заболевания (табл. 1). Их доля в этой группе составила 18.2% и была в 18 раз выше, чем в контроле (1.1%; $p < 0.00004$). Важно отметить, что *TTNtv* у пациентов были уникальными, локализовались в конститутивных экзонах, не подвергающихся альтернативному сплайсингу, и присутствовали во всех сердечных изоформах, за исключением *Nvx-3*. В противоположность этому обнаруженная у двух человек контрольной группы новая нонсенс-мутация *c.10927C>A* (*p.Glu3643**) находилась в 46-м экзоне метатранскрипта и приводила к преждевременному стоп-кодону только в 44-м экзоне *Nvx-2*. Уровень транскрипции (*PSI – proportion spliced-in*) в этом экзоне по литературным данным составляет только 7–14% [23]. Поскольку мутация *p.Glu3643** затрагивает всего лишь одну изоформу титина с низким уровнем экспрессии, можно предположить, что данное нарушение является не столь критичным для функционирования кардиомиоцитов. У пациентов с ГКМП такой тип мутаций вообще отсутствовал. Полученные данные подтверждают важность поиска мутаций в гене *TTN* при НКМ. Интересно, что в нашей когорте *TTNtv* в 75.0% случаев сочетались с одним или несколькими вариантами с неустановленной клинической значимостью (*VUS*) в этом же гене или в других генах, ассоциированных с кардиомиопатиями (табл. 1). В исследовании К. Miszalski-Jamka и соавт. [25] также продемонстрировано значительное превышение совместного наследования *TTNtv* с другими нуклеотидными заменами, что позволяет предположить необходимость дополнительных генетических факторов для фенотипического проявления *TTNtv* в большинстве случаев. У 75% носителей мутаций *TTNtv* наблюдался дилатационный фенотип НКМ (табл. 1). Ранее в ряде работ учеными установлена связь *TTNtv* с ДКМП, но при этом ими не проводилась оценка некомпактности миокарда в этой когорте пациентов [11]. На сегодняшний день считается, что основным механизмом действия *TTNtv* является гаплонедостаточ-

ность, которая проявляется дезорганизацией саркомера и подавлением сигнальных путей [23].

Миссенс-замены в гене *TTN* обнаружены как среди пациентов с НКМ и ГКМП, так и у людей в контрольной выборке без структурных нарушений миокарда, при этом две третьих от 372 отличающихся от референсных нуклеотидных вариантов были уникальными и встречались только в одной из трех анализируемых групп (рис. 1). Одна треть нуклеотидных замен представляла общие полиморфные варианты, установленные либо во всех трех группах (20.2%), либо в каких-либо двух (12.9%). Наибольшая доля уникальных миссенс-вариантов (71.9%) была сконцентрирована в контрольной выборке. На втором месте по данному типу мутаций стояла выборка пациентов с НКМ (16.9%), а наименьшее число наблюдалось в группе пациентов с ГКМП (11.2%), несмотря на то, что количество пациентов в этой группе было практически в 1.7 раз больше, чем в группе пациентов с НКМ. Существенные различия касались также доли частых уникальных вариантов, встречающихся более чем у одного человека. Наибольшим этот показатель также был в контрольной выборке. Повышенный уровень уникальных миссенс-вариантов в контроле, по-видимому, в какой-то мере объясняется большим объемом этой группы (194 человека), а также является косвенным подтверждением существующего на данный момент предположения о доброкачественности большинства миссенс-вариантов в гене *TTN*. В пользу этого свидетельствует и наличие существенной доли частых уникальных вариантов в контрольной группе, которые распространяются в популяции в силу их нейтральности.

Следует отметить, что распределение миссенс-вариантов по экзонам гена *TTN* и соответственно по областям саркомера и функциональным доменам не было равномерным (табл. 2–4, рис. 2, 3) и характеризовалось межгрупповой вариабельностью. Более половины (58.5%) экзонов характеризовалось отсутствием каких-либо нуклеотидных замен, что, вероятно, указывает на критическую значимость кодируемых ими областей белка. Несколько уникальных нуклеотидных замен имела небольшая часть экзонов (8.2%): 61 и 127 экзоны – в группе НКМ; 310, 326, 358 экзоны – у пациентов с ГКМП; 3, 28, 29, 46, 48, 70, 74, 76, 86, 88, 229, 245, 256, 277, 293, 304, 310, 326, 327, 334, 335, 337, 343, 344, 350, 358, 360 экзоны – в контрольной выборке. 21.2% экзонов были богаты полиморфными сайтами, в них концентрировались общие для всех трех групп варианты. Таким образом, данные, представленные в табл. 2–7, могут быть полезными при оценке патогенного статуса выявляемых миссенс-вариантов в гене *TTN*: варианты в экзонах без нуклеотидных замен, а также в экзонах с большим количеством уникальных мутаций, выявленных у пациентов со

структурными изменениями миокарда, имеют больше шансов оказаться патогенными.

В ходе анализа было показано, что уникальные варианты у пациентов с кардиомиопатиями чаще локализовались в А-зоне саркомера (рис. 2, табл. 1, 7): 62.5% *TTNtv* (НКМ); 70.6 и 46.2% миссенс-мутаций у пациентов с НКМ и ГКМП соответственно. Среди вероятно доброкачественных вариантов, которые встречались как среди пациентов, так и в контрольной выборке, доля мутаций в А-зоне составила лишь около 32.9%, а основная часть была сосредоточена в I-зоне. Это согласуется с данными других исследователей, также установивших, что мутации в гене *TTN* в условно здоровой популяции локализуются обычно в экзонах, соответствующих I-зоне саркомера и имеющих низкий показатель PSI, в отличие от пациентов с кардиомиопатиями (КМП), у которых они преимущественно находятся в экзонах с конститутивным уровнем экспрессии (PSI = 100%), кодирующих область А-зоны титина [23, 27].

Анализ присутствия уникальных миссенс-вариантов в сердечных изоформах (N2BA, N2B, Nvx-1, Nvx-2 и Nvx-3) титина в изучаемых группах (табл. 5, 6) не выявил существенных различий между пациентами и контролем. Доля вариантов, представленных во всех сердечных изоформах титина, составила только 2.4% в группе с НКМ и была несколько выше у пациентов с ГКМП (17.9%) и в контроле (8.4%). Еще порядка 60–65% нуклеотидных замен в анализируемых группах находились во всех изоформах, исключая Nvx-3. Варианты, локализованные в экзонах только сердечной изоформы титина N2BA, составили 20–30%, их число было выше в группе с НКМ: 31.0% (НКМ), 21.4% (ГКМП), 17.9% (контроль).

Во всех группах выявлено порядка 30–50% новых вариантов, не обнаруженных ранее. Поскольку они встречались практически с одинаковой частотой как среди пациентов, так и в контроле, трудно оценить степень патогенности этих нуклеотидных изменений, многие из них могут оказаться нейтральными и представлять исключительно популяционный интерес.

Таким образом, в ходе проведенного исследования показана роль укорачивающих титин вариантов *TTNtv* в развитии НКМ, преимущественно дилатационного фенотипа. В настоящей работе определены высокомутабельные и консервативные экзоны гена *TTN*, а также представлен перечень миссенс-мутаций с возможной клинической значимостью в отношении структурной патологии миокарда, включая новые варианты. Представленные данные могут быть дополнительным ориентиром в интерпретации патогенного статуса миссенс-вариантов в этом гене. При этом следует отметить, что на данный момент самым надежным методом определения и доказательства

патогенности выявленного миссенс-варианта в гене *TTN* у пациентов со структурными нарушениями миокарда остается, пожалуй, сегрегационный анализ в случае больших информативных семейств. Это подтверждается и результатами других исследований [28].

Значительный прорыв в понимании роли и патогенной значимости вариантов титина при сердечной и мышечной патологии лежит в плоскости совместных усилий исследователей в изучении его генетической изменчивости с использованием больших когорт пациентов, а также в проведении сравнительных исследований случай–контроль, принадлежащих одной популяции.

Работа выполнена в рамках мероприятия 2.2.6 “Изучение спектра и распространенности мутаций в гене титина у белорусских пациентов с наследственными моногенными заболеваниями миокарда и оценка их диагностической значимости” подпрограммы 1 “Геномика, эпигеномика, биоинформатика” ГПНИ “Биотехнологии 2” (2021–2025 гг.).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национально-го 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. *LeWinter M.M., Granzier H.L.* Titin is a major human disease gene // *Circulation*. 2013. V. 127. № 8. P. 938–944. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.139717>
2. *Granzier H.L., Irving T.C.* Passive tension in cardiac muscle: Contribution of collagen, titin, microtubules, and intermediate filaments // *Biophys. J.* 1995. V. 68. № 3. P. 1027–1044. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(95\)80278-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(95)80278-X)
3. *Bang M.L., Centner T., Fornoff F. et al.* The complete gene sequence of titin, expression of an unusual approximately 700-kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system // *Circ Res.* 2001. V. 89. № 11. P. 1065–1072. <https://doi.org/10.1161/hh2301.100981>
4. *Linke W.A.* Sense and stretchability: The role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction // *Cardiovasc. Res.* 2008. V. 77. № 4. P. 637–648. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.03.029>
5. *Musa H., Meek S., Gautel M. et al.* Targeted homozygous deletion of M-band titin in cardiomyocytes prevents sarcomere formation // *J. Cell Science*. 2006. V. 119. № 20. P. 4322–4331. <https://doi.org/10.1242/jcs.03198>

6. *Lahmers S., Wu Y., Call D.R. et al.* Developmental control of titin isoform expression and passive stiffness in fetal and neonatal myocardium // *Circ. Res.* 2004. V. 94. № 4. P. 505–513.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000115522.52554.86>
7. *Greaser M.L., Krzesinski P.R., Warren C.M. et al.* Developmental changes in rat cardiac titin/connectin: Transitions in normal animals and in mutants with a delayed pattern of isoform transition // *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 2005. V. 26. № 6–8. P. 325–332.
<https://doi.org/10.1007/s10974-005-9039-0>
8. *Cazorla O., Freiburg A., Helmes M. et al.* Differential expression of cardiac titin isoforms and modulation of cellular stiffness // *Circ. Res.* 2000. V. 86. № 1. P. 59–67.
<https://doi.org/10.1161/01.res.86.1.59>
9. *Neagoe C., Kulke M., del Monte F. et al.* Titin isoform switch in ischemic human heart disease // *Circulation.* 2002. V. 106. № 11. P. 1333–1341.
<https://doi.org/10.1161/01.cir.0000029803.93022.93>
10. *Nagueh S.F., Shah G., Wu Y. et al.* Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy // *Circulation.* 2004. V. 110. № 2. P. 155–162.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000135591.37759.AF>
11. *Roberts A.M., Ware J.S., Herman D.S. et al.* Integrated allelic, transcriptional, and phenomic dissection of the cardiac effects of titin truncations in health and disease // *Sci. Transl. Med.* 2015. V. 7. P. 270–276.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3010134>
12. *Herman D.S., Lam L., Taylor M.R. et al.* Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy // *N. Engl. J. Med.* 2012. V. 366. № 7. P. 619–628.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1110186>
13. *Golbus J.R., Puckelwartz M.J., Fahrenbach J.P. et al.* Population-based variation in cardiomyopathy genes // *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2012. V. 5. № 4. P. 391–399.
<https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.112.962928>
14. *Roncarati R., Viviani Anselmi C., Krawitz P. et al.* Doubly heterozygous LMNA and TTN mutations revealed by exome sequencing in a severe form of dilated cardiomyopathy // *Eur. J. Hum. Genet.* 2013. V. 21. № 10. P. 1105–1111.
<https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.16>
15. *Jenni R., Oechslin E., Schneider J. et al.* Echocardiographic and pathoanatomical characteristics of isolated left ventricular non-compaction: A step towards classification as a distinct cardiomyopathy // *Heart (British Cardiac Society).* 2001. V. 86. № 6. P. 666–671.
<https://doi.org/10.1136/heart.86.6.666>
16. *Petersen S.E., Selvanayagam J.B., Wiesmann F. et al.* // Left ventricular non-compaction: in sights from cardiovascular magnetic resonance imaging // *J. Am. College Cardiology.* 2005. V. 46. № 1. P. 101–105.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.03.045>
17. *Jacquier A., Thuny F., Jop B. et al.* Measurement of trabeculated left ventricular mass using cardiac magnetic resonance imaging in the diagnosis of left ventricular non-compaction // *Eur. Heart J.* 2010. V. 31. № 9. P. 1098–1104.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehp595>
18. *Wang K., Li M., Hakonarson H.* ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data // *Nucl. Acids. Res.* 2010. V. 38. № 16. e164.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkq603>
19. *Richards S., Aziz N., Bale S.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology // *Genet. Med.* 2015. V. 17. P. 405–424.
<https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
20. *Hazebroek M.R., Krapels I., Verdonschot J. et al.* Prevalence of pathogenic gene mutations and prognosis do not differ in isolated left ventricular dysfunction compared with dilated cardiomyopathy // *Circ. Heart Fail.* 2018. V. 11. № 3. e004682.
<https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.117.004682>
21. *Savarese M., Sarparanta J., Vihola A. et al.* Increasing role of titin mutations in neuromuscular disorders // *J. Neuromuscular Diseases.* 2016. V. 3. № 3. P. 293–308.
<https://doi.org/10.3233/JND-160158>
22. *Oates E.C., Jones K.J., Donkervoort S. et al.* Congenital titinopathy: Comprehensive characterization and pathogenic insights // *Ann. Neurol.* 2018. V. 83. № 6. P. 1105–1124.
<https://doi.org/10.1002/ana.25241>
23. *Hinson J.T., Chopra A., Nafissi N. et al.* HEART DISEASE. Titin mutations in iPSC cells define sarcomere insufficiency as a cause of dilated cardiomyopathy // *Science.* 2015. V. 349. № 6251. P. 982–986.
<https://doi.org/10.1126/science.aaa5458>
24. *Savarese M., Maggi L., Vihola A.* Interpreting genetic variants in titin in patients with muscle disorders // *JAMA Neurol.* 2018. V. 75. № 5. P. 557–565.
<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2017.4899>
25. *Miszalski-Jamka K., Jefferies J.L., Mazur W. et al.* Novel genetic triggers and genotype–phenotype correlations in patients with left ventricular noncompaction // *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2017. V. 10. № 4. e001763.
<https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.117.001763>
26. *Savarese M., Johari M., Johnson K. et al.* Improved criteria for the classification of titin variants in inherited skeletal myopathies // *J. Neuromuscul. Dis.* 2020. V. 7. № 2. P. 153–166.
<https://doi.org/10.3233/JND-190423>
27. *Akinrinade O., Koskenvuo J.W., Alastalo T.P.* Prevalence of titin truncating variants in general population // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 12. e0145284.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145284>
28. *Begay R.L., Graw S., Sinagra G. et al.* Familial cardiomyopathy registry. role of titin missense variants in dilated cardiomyopathy // *J. Am. Heart Assoc.* 2015. V. 4. № 11. e002645.
<https://doi.org/10.1161/JAHA.115.002645>

Genetic Variation in Titin in Patients with Hypertrophic and Non-Compact Cardiomyopathy

N. N. Chakova^{a, *}, R. S. Shulinski^a, S. M. Komissarova^b, T. V. Dolmatovich^a, S. S. Niyazova^a,
O. Ch. Mazur^a, A. S. Ivanova^a, and A. D. Liaudanski^a

^a*Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220072 Republic Belarus*

^b*Republican Scientific and Practical Centre "Cardiology", Minsk, 220036 Republic Belarus*

*e-mail: n.chakova@igc.by

Using NGS, the coding sequence of the *TTN* gene was sequenced in patients with left ventricular non-compaction cardiomyopathy (LVNC, 44 individuals) and hypertrophic cardiomyopathy (HCM, 74 individuals), as well as in the control (194 individuals), and 9 nucleotide variants leading to truncated titin (*TTNtv*) and 372 missense variants were identified. A comparative analysis of the genetic variability of titin between the groups of patients with LVNC and HCM and the control sample was carried out in terms of the type of mutations and their localization in the exons of genes, as well as in the sarcomeric and functional domains of the protein. The role of *TTNtv* in the development of LVNC was confirmed, and the significance of additional variants in the same gene or in other genes associated with various cardiomyopathies for the phenotypic implementation of *TTNtv* was demonstrated. 75% of patients with *TTNtv* had a dilated LVNC phenotype. Missense substitutions in the *TTN* gene were found both among the patients with LVNC and HCM, and in people in the control sample, which indirectly confirms that most missense variants in this gene are benign. The paper identifies and lists highly mutable and conserved exons of the *TTN* gene and also presents a list of missense mutations with possible clinical significance in relation to the structural pathology of the myocardium, including new variants. It was shown that the majority of pathogenic and potentially significant mutations were located in the A-zone of the sarcomere. In all the groups, about 30–50% of new variants were identified. Probably, many of them are neutral and are of exclusively population interest.

Keywords: *TTN* gene, titin-truncating variants (*TTNtv*), missense-mutations, pathogenic significance of mutations, hypertrophic cardiomyopathy, left ventricular non-compaction cardiomyopathy.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ВЫЯВЛЕНИЯ КРОСС-КОНТАМИНИРОВАННЫХ ОБРАЗЦОВ ДНК НА ОСНОВЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДАННЫХ¹

© 2023 г. Н. В. Фелиз^{1, *, #}, К. С. Грамматикати^{1, #}, С. И. Митрофанов^{1, #},
П. А. Гребнев¹, К. Д. Конуреева¹, Е. Д. Маралова¹, М. В. Ерохина¹, Т. А. Шпакова¹,
П. Г. Казакова¹, Ю. Н. Ахмерова¹, А. А. Мкртчян¹, Е. А. Снигирь¹, В. С. Юдин¹, А. А. Кескинов¹,
С. М. Юдин¹, В. И. Скворцова²

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение “Центр стратегического планирования
и управления медико-биологическими рисками здоровью” Федерального медико-биологического
агентства, Москва, 119121 Россия

²Федеральное медико-биологическое агентство, Москва, 123182 Россия

*e-mail: feliz08nv@gmail.com

Поступила в редакцию 15.12.2022 г.

После доработки 30.01.2023 г.

Принята к публикации 01.02.2023 г.

Проблемы кросс-контаминации и неправильной маркировки образцов биоматериала являются крайне актуальными при проведении массовых генетических исследований. В настоящем исследовании проведена экспериментальная оценка возможности выявления кросс-контаминированных образцов ДНК с использованием нескольких подходов: расчета отношения ридов, приходящихся на референсный или альтернативный аллель (allele ratio, AR); отношения количества гетерозиготных вариантов к гомозиготным; значения показателя CallRate для данных, полученных с помощью ДНК-микрочипов; программы Picard CrosscheckFingerprints (CrossCheck). Для проведения исследований были созданы контаминированные образцы (смеси) путем смешивания обычных “чистых” образцов ДНК в разных соотношениях. Показатели качества образцов проанализированы по данным полногеномного секвенирования и генотипирования с помощью ДНК-микрочипа Illumina microarray BeadArray technology CoreExome (CE). Экспериментально установлено, что все указанные подходы могут быть использованы для выявления ошибок генотипирования, связанных с контаминированием образцов.

Ключевые слова: полногеномное секвенирование, контаминация, ДНК-микрочипы, контроль качества.

DOI: 10.31857/S0016675823060061, EDN: SSSDAUO

Для получения точных и корректных результатов генетических исследований необходимо быть уверенным в высоком качестве секвенирования, в отсутствии неправильно маркированных образцов и контаминации. Использование алгоритмов, позволяющих выявлять образцы биоматериала, поступившие от одного и того же донора, а также оценивать степень загрязненности другими биообразцами, актуально и полезно в рутинной практике.

В то время как программы для оценки качества данных секвенирования на этапе прочтений (ридов, FASTQ-файлов) и выравнивания (BAM-файлов)

хорошо известны и широко применяются, распространенного метода для оценки качества итоговых данных (vcf-файлов) нет. В настоящей работе рассматриваются два подхода: расчет соотношения прочтений, приходящихся на референсный или альтернативный аллель, к общему числу прочтений (allele ratio, AR) и расчет соотношения количества гетерозиготных вариантов к гомозиготным (Het/Hom) [1]. Ранее было показано, что показатель Het/Hom различается в разных этносах, но постоянный для любых регионов генома [2]. В своей работе J. Wang и коллеги показали, что для европейцев отношение Het/Hom в среднем составляет 1.6, самое высокое значение Het/Hom наблюдается у африканцев (около 2.0), а самое низкое (около 1.4) свойственно азиатам.

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0016675823060061 для авторизованных пользователей.

[#] Вклад этих авторов в работу равнозначный.

Одной из программ, позволяющей выявить образцы биоматериала, поступившие от одного и того же донора, является программа Picard Cross-check Fingerprints (CrossCheck) от The Broad Institute (“Picard Toolkit” 2019, GitHub Repository <https://broadinstitute.github.io/picard/>). Отличительной особенностью этой программы является выдача результата в виде количественной характеристики — степени сходства образцов. При этом было показано, что CrossCheck точен и универсален для различных типов данных, таких как секвенирование РНК, ДНК и ChiP-seq [3]. Однако информация о корректности работы CrossCheck в случае контаминации отсутствует. В рамках настоящей работы мы оценили способность программы CrossCheck выявлять пары образцов биоматериала, поступивших от одного донора, при условии контаминации одного или обоих образцов.

Принцип работы программного обеспечения (ПО) CrossCheck состоит в следующем: из VCF-файлов отбираются генетические варианты и создается “генетический отпечаток”. Специально для CrossCheck был создан набор из 58 894 однонуклеотидных генетических вариантов (SNPs) (https://github.com/naumanjaved/fingerprint_maps/blob/master/map_files/hg38_chr.map). Эти варианты отобраны таким образом, чтобы частота встречаемости минорного аллеля (MAF) была больше 10% по данным проекта “1000 геномов”. В сформированный набор вошли только биаллельные SNPs. Кроме того, все отобранные SNPs находились в блоках неравновесного наследования (Linkage disequilibrium, LD) с высоким коэффициентом корреляции внутри блока ($r^2 > 0.85$) и низким процентом корреляции между блоками ($r^2 < 0.1$). Также в разных популяциях встречаемость этих SNPs различалась менее чем на 10% по данным проекта “1000 геномов”.

При сравнении “генетических отпечатков” между собой ПО CrossCheck рассчитывает метрику LOD (LOD Score) для каждой пары образцов, показывающую какие образцы с какой вероятностью имеют одинаковое биологическое происхождение. Авторами программы CrossCheck указаны следующие пороговые значения LOD: разные образцы ($LOD < -5$), дубли ($LOD > 5$), “сомнительные” ($-5 < LOD < 5$).

В рамках данного исследования была смоделирована контаминация выделенной ДНК и проанализированы показатели качества контаминированных образцов на данных WGS и при генотипировании с помощью технологии Illumina microarray BeadArray technology CoreExome (CE). В работе T. Dallavilla показано, что с помощью расчета AR можно выявить контаминацию свыше 10%, поэтому для данной работы нами были выбраны следующие значения контаминации: 10, 20, 30 и 50% [1]. Помимо того, что контаминацию ниже 10% нельзя

обнаружить с помощью расчета AR, следует отметить, что низкая степень контаминации окажет меньшее влияние на результаты секвенирования, нежели контаминация свыше 10%.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор биоматериала и метаданных

В настоящем исследовании использованы образцы цельной крови от семи доноров из коллекции ФГБУ “ЦСП” ФМБА России. Для всех биообразцов соблюдены следующие условия: наличие и корректность метаданных каждого донора (пол, возраст, регион проживания, национальность, анамнез); обеспечение правильного забора, транспортировки и хранения биоматериала (венозная кровь) в соответствии с ГОСТ Р 53079.4-2008. Все биообразцы прошли проверку на отсутствие признаков гемолиза и хилеза.

Выделение ДНК из цельной крови

Выделение геномной ДНК из образцов цельной крови проводилось с использованием автоматизированной станции Tecan Freedom EVO (Tecan, Швейцария) при помощи набора MagAttract HMW DNA Kit (Qiagen, Германия), а также применялась процедура ручного выделения с применением набора DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с протоколом производителя.

Концентрацию и чистоту выделенной ДНК определяли двумя методами: в автоматическом режиме на планшетном ридере Infinite 200 Pro (Tecan, Швейцария) с помощью программы Magellan, а также в ручном режиме с помощью флуориметра Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США), чистоту препаратов ДНК оценивали с помощью NanoDrop One C Microvolume UV-Vis (Thermo Fisher Scientific).

Для всех образцов выделенной ДНК отношение показателей поглощения 260/280 составляло 1.8–2.0, отношение 260/230 – 2.0–2.2.

Подготовка геномных библиотек и секвенирование образцов ДНК

Для приготовления библиотек использовали 150–500 нг геномной ДНК. Тагментацию ДНК, очистку и амплификацию тагментированной ДНК, очистку полученных библиотек проводили согласно протоколу Nextera DNA Flex Library Prep (Document #1000000025416 v07, Illumina, США). Полногеномные библиотеки готовили с использованием набора реагентов Nextera DNA Flex kit (Illumina, США) согласно рекомендациям производителя и набора индексов IDT-ILMN Nextera DNA UD Indexes Set A и Set B для предотвращения кросс-контаминации образцов. Концентра-

Таблица 1. Названия смесей, участвующих в эксперименте

Соотношение	Образцы			
	50022	50054	50027	50005
	50016	50027	50053	50008
10 : 90	50022_10_50016_90	50054_10_50027_90	50027_10_50053_90	50005_10_50008_90
20 : 80	50022_20_50016_80	50054_20_50027_80	50027_20_50053_80	50005_20_50008_80
30 : 70	50022_30_50016_70	50054_30_50027_70	50027_30_50053_70	50005_30_50008_70
50 : 50	50022_50_50016_50	50054_50_50027_50	50027_50_50053_50	50005_50_50008_50

ция библиотек измерялась на планшетном ридере Infinite F Nano Plus (Tecan, Швейцария). Размер полученных библиотек определяли при помощи набора реагентов Agilent D1000 на приборе Agilent 4200 TapeStation (Agilent Technologies, США). Пулирование производилось автоматически с использованием роботизированной станции Tecan Freedom EVO (Tecan). Пул библиотек перед секвенированием разводили до концентрации 1.5–2.0 нМ. Контроль качества пула проводили при помощи набора реагентов Agilent HS D1000 ScreenTape на приборе Agilent 4200 TapeStation (Agilent Technologies, США). Полногеномное секвенирование проводили на приборе Illumina NovaSeq 6000 (Illumina), используя набор реагентов S4, 300 циклов (Illumina) с парно-концевыми прочтениями 2 × 150 пн.

Генотипирование с помощью технологии Illumina microarray (BeadArray technology)

Микрочиповое генотипирование проводили с использованием набора Illumina Infinium CoreExome-24 v1.3 (Illumina) по протоколу производителя (документ Infinium HTS Assay Reference Guide (15045738 v04)). Пробоподготовка проводилась с помощью автоматизированной станции Tecan Freedom EVO. Микрочипы сканировали на системе Illumina iScan с модулем автоматической подачи Autoloader 2.x.

Создание контаминированных образцов

Для проведения исследования из семи образцов выделенной ДНК было сформировано четыре пары так, что один образец (50027) присутствовал в двух парах. Для каждой пары было приготовлено четыре смеси в соотношениях 10 : 90, 20 : 80, 30 : 70 и 50 : 50. В табл. 1 представлены названия получившихся смесей и соотношения, в которых смешивались исходные образцы.

Биоинформатическая обработка WGS

Первым этапом обработки сырых данных секвенирования является процесс демультиплика-

ции, при котором исходная выдача секвенатора NovaSeq 6000 из формата BCL конвертируется в формат FASTQ с помощью программного обеспечения bcl2fastq v2.20. Для проведения контроля качества секвенирования всей ячейки в целом использовалась программа Illumina Sequencing Analysis Viewer v2.4.7. Следующий этап биоинформатической обработки подразумевает выравнивание на референсный геном, что осуществлялось с помощью DRAGEN [4]. В качестве референсного генома использовалась последовательность GRCh38.d1.vd1 (GDC Reference Files, NCI Genomic Data Commons, <https://gdc.cancer.gov/about-data/gdc-data-processing/gdc-reference-files> (accessed: 21.02.2022)).

Малые генетические варианты (SNPs) определяли с помощью программы Strelka v2.9.10 [5] с фильтром “PASS”. Количество гомо- и гетерозигот рассчитывали с помощью программы bcftools v1.14 [6].

Биоинформатическая обработка SE

Алгоритм обработки данных SE и получения VCF-файлов из результатов сканирования Illumina microarray CoreExome сводился к следующему: для конвертации файлов формата idat в формат gtc использовали Illumina Array Analysis Platform gencall v1.1 с манифест-файлами, предоставленными компанией Illumina (v1.3); для конвертации файлов формата gtc в файлы формата VCF использовали программу GTcToVCF v1.2.1 (Illumina) с референсным геномом человека human_g1k_v37; для перевода координат SNPs с референса human_g1k_v37 на референс GRCh38.d1.vd1 использовали программу CrossMap v0.5.4 [7]. Из полученных VCF-файлов удаляли все мутации со значением 0 в поле GQ или с генотипом “.” и “./.”.

Расчет метрик для гетерозиготных вариантов

Расчет соотношения прочтений, приходящихся на референсный или альтернативный аллель, к общему числу прочтений (allele ratio, AR) и всех связанных с этим показателем метрик, а также фильтрацию мутаций проводили по методике, описанной в работе T. Dallavilla [1]. Из данных

WGS были отобраны только биаллельные гетерозиготные варианты с качеством выравнивания (map quality, MQ) более 18 и суммарным числом прочтений более 10. Для поиска AR для каждого гетерозиготного варианта рассчитали отношение количества прочтений с альтернативным аллелем к общему количеству прочтений в данной позиции.

Для 500 образцов WGS с покрытием более 30x и отношением Het/Hom в диапазоне 1.64–1.7 рассчитали стандартное отклонение AR (0.09). На основании этих данных определили “референсный” 95%-ный доверительный интервал (95%ДИ) для AR, равный $0.5 \pm 1.96 \times 0.09$.

Затем для каждого образца рассчитали процент гетерозигот с AR за пределами диапазона 0.32–0.68 и стандартное отклонение AR.

Запуск CrossCheck

Для VCF-файлов, полученных на данных WGS и SE, попарно во всех возможных комбинациях определили значение LOD Score с помощью программы PICARD CrosscheckFingerprints (v2.26.11). В качестве набора гаплотипов использовался файл, описанный в работе N. Javed [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для дальнейшего изложения введены следующие обозначения: чистый образец – образец, в котором присутствует ДНК только от одного человека; смесь образцов – образец, состоящий из биоматериала двух человек; мажорный компонент смеси – ДНК, содержание которой превышает 50% в смеси из двух образцов; минорный компонент смеси – ДНК, содержание которой менее 50% в смеси из двух образцов. В зависимости от содержания минорного компонента будем использовать термины: 10-, 20-, 30-, 50%-ная смесь. Процентное содержание минорного компонента в смеси будем называть концентрацией. Все образцы (и “чистые”, и смеси образцов) генотипировали с помощью двух технологий: WGS и SE.

Показатели качества контаминированных образцов

Для всех полученных файлов сравнили метрики качества. С помощью программы CrossCheck попарно сравнили VCF-файлы, полученные с применением только одной технологии (WGS–WGS, SE–SE) и с помощью двух разных технологий (WGS–SE). Выявление малых герминальных вариантов в данных полногеномного секвенирования образца состоит из нескольких этапов. На первом этапе данные, поступающие из секвенатора в формате BCL, конвертируются в формат FASTQ. В этом формате содержится информация

как о нуклеотидной последовательности каждого рида, так и о качестве, с которым определен каждый нуклеотид в прочтении. Мы оценили качество всех образцов (смесей и чистых) с помощью программы fastqc (FASTQC. A quality control tool for high throughput sequence data, BibSonomy [Electronic resource]. URL: <https://www.bibsonomy.org/bibtex/f230a919c34360709aa298734d63dca3> (accessed: 31.01.2022)). Как и ожидалось, в формате FASTQ показатели качества у смесей и чистых образцов не отличаются друг от друга (Приложение).

На втором этапе обработки данных осуществляется выравнивание прочтений на референсный геном. Выравнивание проводили при помощи программы DRAGEN. Сравнение метрик качества выравнивания у смесей и чистых образцов также не выявило различий (Приложение, табл. 1 и 2).

Для выявления малых герминальных генетических вариантов использовалась программа Strelka. Одним из показателей качества является отношение количества гетерозиготных вариантов к гомозиготным (Het/Hom).

У чистых образцов на данных WGS рассчитанное отношение Het/Hom находилось в интервале 1.6–1.8, что согласуется с ранее опубликованными результатами [2], поскольку все образцы в настоящем исследовании были получены от европейцев. Для 10%-ной смеси отношение Het/Hom равно 1.9, для 20% – превышает 2.1, для 30% – выше 3.0, для 50% – выше 3.5 (табл. 2). В случае с SE наблюдалась похожая ситуация: отношение Het/Hom у 10%-ных смесей незначительно выше, чем у чистых образцов, а у смесей с содержанием минорного компонента 20% и более отношение Het/Hom превышает 2.0. Так как значение Het/Hom в диапазоне 2–2.1 является нормой для африканцев, то без информации об этнической принадлежности доноров биоматериала считать образцы с $\text{Het/Hom} > 2.0$ контаминированными нельзя.

Еще одна метрика, которую можно использовать для определения контаминации, – это отношение прочтений, которые приходятся на референсный или альтернативный аллель, к общему числу прочтений в конкретной гетерозиготной мутации (allele ratio, AR). В данном исследовании в чистых образцах гетерозиготные варианты с AR вне 95%ДИ не превышает 10%, тогда как у 10%-ных смесей превышают 16%, для 20%-ных – 35%, для 30%-ных – 49.5%, а для 50%-ных – 61% (табл. 2). С увеличением количества примеси увеличивается и стандартное отклонение, принимающее значение 0.1 для чистых образцов и 0.2 для 50%-ных смесей; кроме того, меняется характер распределения AR (Приложение, рис. 1).

Для оценки качества результатов генотипирования с помощью SE производителем рекомен-

Таблица 2. Метрики Call Rate и AR, отношение количества гетерозиготных вариантов к гомозиготным в образцах

Образец	Het/Hom WGS	Het/Hom CE	Call Rate CE	Стандартное отклонение (SD)	Кол-во гетерозиготных вариантов	Кол-во гетерозиготных вариантов с AR, входящих в 95%ДИ	Процент гетерозиготных вариантов с AR, не входящих в 95%ДИ
50005	1.7	1.7	1.00	0.09	2203286	2032090	7.77
50008	1.7	1.6	1.00	0.09	2194958	2030601	7.49
50016	1.7	1.7	1.00	0.09	2311041	2137817	7.50
50022	1.6	1.7	0.99	0.07	2278578	2197124	3.57
50027	1.7	1.6	1.00	0.09	2215825	2076111	6.31
50053	1.7	1.6	1.00	0.08	2188256	2073102	5.26
50054	1.6	1.7	0.99	0.09	2279388	2133669	6.39
50005_10_50008_90	1.9	1.7	0.98	0.14	2410422	1927536	20.03
50022_10_50016_90	1.9	1.8	0.98	0.13	2465573	2059733	16.46
50027_10_50053_90	1.9	1.7	0.98	0.13	2332200	1943566	16.66
50054_10_50027_90	1.9	1.7	0.98	0.14	2408983	1967530	18.33
50005_20_50008_80	2.2	2.0	0.92	0.18	2781638	1798329	35.35
50022_20_50016_80	2.4	2.1	0.92	0.18	2902550	1863518	35.80
50027_20_50053_80	2.6	2.0	0.92	0.18	2846513	1750277	38.51
50054_20_50027_80	2.4	2.1	0.92	0.18	2894513	1814605	37.31
50005_30_50008_70	3.0	2.6	0.87	0.20	3235816	1613056	50.15
50022_30_50016_70	3.2	2.8	0.88	0.20	3322283	1676965	49.52
50027_30_50053_70	3.0	2.7	0.88	0.20	3254114	1608676	50.56
50054_30_50027_70	3.1	2.8	0.87	0.20	3383218	1618203	52.17
50005_50_50008_50	3.9	2.7	0.82	0.21	3712528	1435999	61.32
50022_50_50016_50	4.1	2.8	0.81	0.21	3798084	1447188	61.90
50027_50_50053_50	3.5	2.6	0.81	0.21	3709487	1425530	61.57
50054_50_50027_50	3.7	2.8	0.82	0.21	3789406	1442491	61.93

дован показатель Call Rate с минимальным пороговым значением 0.95. Call Rate 10%-ных смесей был близок к отметке 0.98, а образцов с большей долей примеси еще ниже. Таким образом, нижнее пороговое значение Call Rate 0.99 позволит выявить образцы с 10% примесей и более.

Результаты работы программы CrossCheck на образцах WGS

При сравнении программой CrossCheck VCF-файла самого с собой или с VCF-файлом, полу-

ченным для того же донора биоматериала при повторном секвенировании, значение LOD принимает значения около 5200 (Приложение, табл. 5). При сравнении разных файлов между собой среднее значение LOD составляет –5000. Для WGS данных проекта “1000 геномов” значения LOD несколько различались: так, при сравнении VCF-файла самого с собой LOD составлял в среднем 7594 ± 73 , а при сравнении VCF-файлов, полученных для разных образцов, значения LOD имели среднее -12198 ± 248 (данные проекта “1000 геномов”, <http://ftp.1000genomes.ebi.ac.uk/vol1/ftp/>

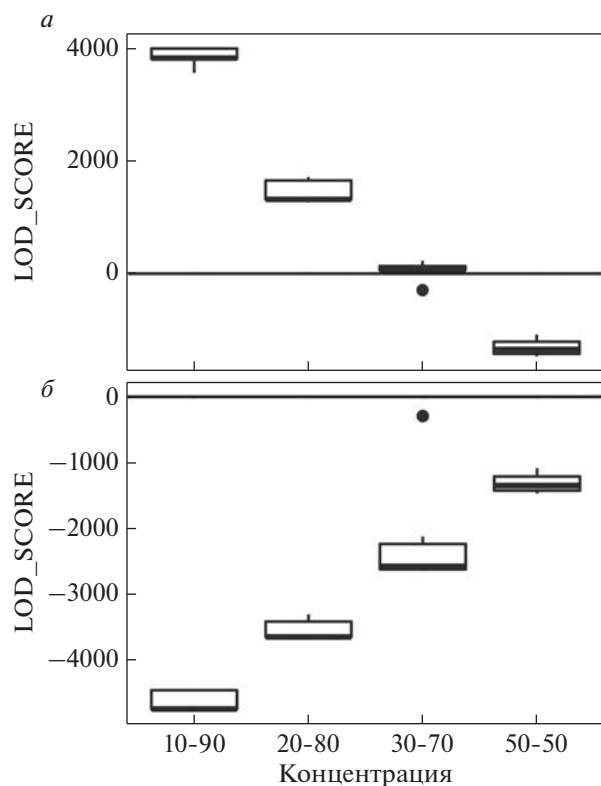


Рис. 1. Значение LOD Score в зависимости от концентрации смеси (процента контаминации) для результатов WGS, полученное при сравнении пар образцов, где один – “чистый” образец, второй – это смесь, где “чистый” образец выступает в роли мажорного (а) и минорного (б) компонентов в разном процентном соотношении.

data_collections/1000G_2504_high_coverage/working/20220422_3202_phased_SNV_INDEL_SV/). То есть значения LOD имеют узкий диапазон, что позволяет акцентировать внимание на парах образцов с выбивающимся LOD. Значения LOD, полученные для данных проекта “1000 геномов”, больше LOD, полученных на наших данных, за счет того, что в файле от проекта “1000 геномов” представлены SNPs, прошедшие фильтрацию, и набор SNPs у всех образцов получился одинаковым. В то время как в наших данных представлены все SNPs, обнаруженные в каждом конкретном образце.

Кроме того, мы дополнительно проверили, что CrossCheck не дает ложноположительных результатов, например при сравнении родственников первого колена LOD находится в диапазоне от –3800 до –1700.

В случае со смесями значение LOD становится ниже. У пар, состоящих из чистого образца и смеси того же образца и 10% контаминирующего агента, значение LOD снижается до 3500; если контаминирующего агента в смеси 20%, то LOD

снижается до 1200–1700 (рис. 1,а). Для 30%-ных смесей значения LOD попадают в диапазон от –300 до 200, т.е. такие пары могут быть определены и как разные ($LOD < -5$), и как дубли (если $LOD > 5$), и как “сомнительные” ($-5 < LOD < 5$). Пары чистого образца и 50%-ных смесей однозначно помечаются как разные. Пары, состоящие из чистого образца и смеси, где “чистый” образец является минорным компонентом, имеют LOD ниже –1000, т.е. помечаются как разные образцы (рис. 1,б).

Кроме того, в ходе выполнения исследования мы попарно сравнили смеси одних и тех же образцов с разным процентным соотношением компонентов (рис. 2,а). Чем больше схож процентный состав двух смесей, тем выше LOD. При сравнении файла самого с собой вне зависимости от процента примеси LOD получается около 5000 или выше, т.е. такой же, как у чистых образцов. Чуть меньшие значения (4500) принимает LOD при сравнении 30%-ных и 50%-ных смесей между собой. Во всех остальных случаях LOD ниже 4000. Таким образом, заниженное значение LOD может быть дополнительным признаком контаминации. Смеси с содержанием контаминирующего агента 30% и более при сравнении с образцом, соответствующим мажорному компоненту, могут не быть определены как поступившие от одного донора биоматериала (LOD близок к 0, а при 50% – ниже 0).

При сравнении смесей, состоящих из разных образцов, LOD возрастает вместе с долей контаминации (рис. 2,б). Однако LOD не превышает 0, т.е. даже 50%-ные смеси будут помечаться как разные. Выбросы выше 0 (рис. 2,б) обусловлены тем, что один и тот же образец использовался как основной компонент в одной смеси и как минорный компонент в другой смеси. В этом случае LOD не превышает 1000 и остается достаточно низким по сравнению со значением 5000, характерным для чистых образцов. Выбросы, расположенные ниже 0, обусловлены тем, что среди доноров образцов есть родственники первого колена.

Результаты работы программы CrossCheck на образцах CoreExome

Технология определения однонуклеотидных вариантов Illumina microarray BeadArray technology CoreExome позволяет провести генотипирование по 567 218 точкам, а не по всему геному, как в случае с WGS, причем только 2998 из них входят в референсный файл CrossCheck. Это приводит к тому, что LOD при сравнении файлов, полученных с помощью чипов CE, будет ниже, чем в случае WGS.

При сравнении файла самого с собой или с дублем среднее значение LOD составляет 1000, а для пары разных файлов –700 (Приложение,

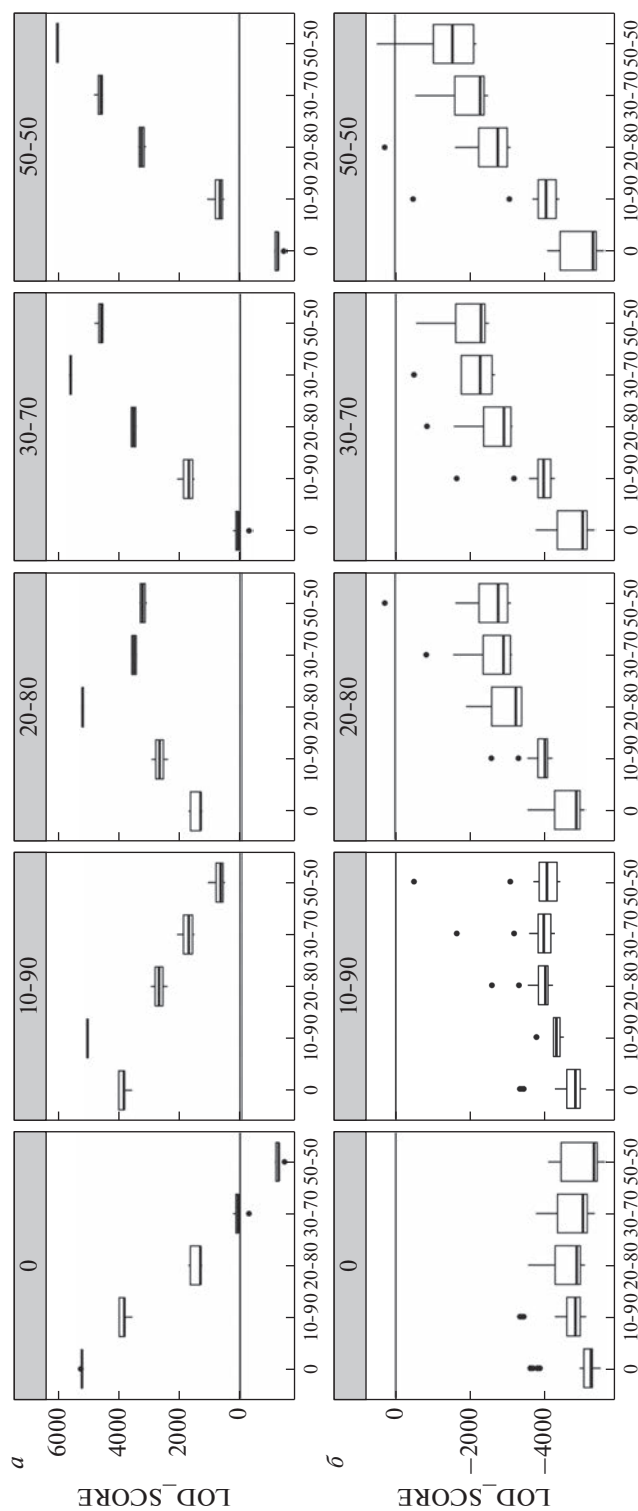


Рис. 2. Значение LOD при сравнении WGS смесей одних и тех же образцов между собой (а) и образцов из разных “партий” (б). По оси абсцисс отмечена концентрация (процент контаминации) одного из образцов из пары, в боксах сверху – процент контаминации второго образца из пары.

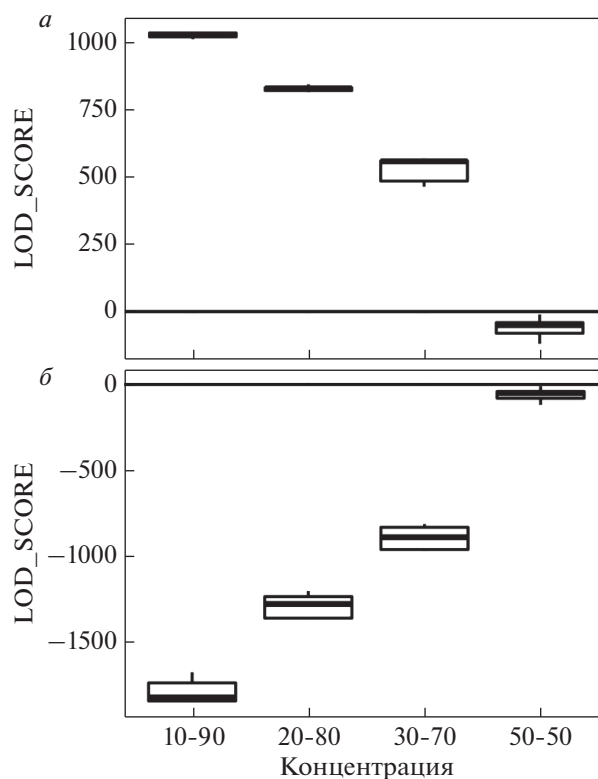


Рис. 3. Значение LOD Score в зависимости от концентрации смеси (процента контаминации) для результатов CE, полученное при сравнении пар образцов, где один – “чистый” образец, второй – это смесь, где “чистый” образец выступает в роли мажорного (а) и минорного (б) компонентов в разном процентном соотношении.

табл. 6). Также мы установили характерные значения LOD для данных проекта “1000 геномов”. Из WGS-данных проекта “1000 геномов” отфильтровали только SNPs, входящие в CE, и сравнили полученные файлы с помощью программы Cross-Check. При сравнении файла самого с собой LOD в среднем находится на отметке 1092 ± 16 , а при сравнении VCF-файлов, полученных для разных образцов, LOD равен -1980 ± 56 .

Для пары образцов, генотипированных с помощью CE, LOD составляет около 1000 в том случае, если доля примеси не превышает 10%. Во всех остальных случаях LOD будет ниже 900 (рис. 3,а; 4,а). Это позволяет распознать образцы, которые контаминированы или по какой-либо другой причине имеют низкое качество. Пары, включающие образец и смесь с этим же образцом в качестве минорного компонента, имеют LOD ниже 0 (рис. 3,б). Для пары смесей разных образцов LOD возрастает вместе с долей контаминации (рис. 4,б). Однако LOD не превышает 0, т.е. даже сильно контаминированные образцы будут помечаться как разные.

Работа CrossCheck с парой образцов CoreExome—WGS

Если в рамках эксперимента один и тот же образец был генотипирован с помощью CE и WGS, то необходимо убедиться, что не возникло путаницы и действительно результаты CE и WGS принадлежат одному и тому же образцу. Для этих целей также можно воспользоваться программой CrossCheck. Сравнение файлов CE и WGS происходит по 2998 точкам. Значения LOD для идентичных образцов составляет примерно 650, для пары разных образцов примерно –1500 (Приложение, табл. 7).

В отличие от сравнения результатов, полученных с помощью одной и той же технологии, в данном случае имеет значение какой из образцов (CE или WGS) контаминирован. Если контаминирован образец WGS, то обнаружить соответствующий ему образец на CE можно только при контаминации не выше 10% (рис. 5,а, б). Если же контаминирован образец CE, то обнаружить соответствующий ему WGS можно даже при контаминации в 30% (рис. 5,в, г). А при контаминации CE образца на 50% LOD будет принимать значения близкие к 0, т.е. возможны ситуации определения пары образцов как разных ($LOD < -5$), как дублей (если $LOD > 5$) или как “сомнительных” ($-5 < LOD < 5$).

В случае контаминации обеих проб образца (WGS до 10% и CE до 20%) LOD будет держаться на уровне 600 (рис. 6,а). При более высоком уровне контаминации LOD для пары, где хоть одна из проб контаминирована, будет принимать значения значительно ниже 600, т.е. по значению LOD можно предположить наличие контаминации, как минимум, в одном из образцов.

Смеси, состоящие из пар разных образцов, при сравнении друг с другом имеют LOD ниже 0, т.е. всегда однозначно помечаются как разные (рис. 6,б).

ОБСУЖДЕНИЕ

В рамках настоящего исследования были проанализированы метрики качества “чистых” и контаминированных образцов ДНК человека. Впервые показано, что метрики качества, рассчитанные по файлам с прочтениями (FASTQ) и выравниванием (BAM), между “чистыми” и контаминированными образцами не различались. Однако метрики, рассчитанные на базе файлов, содержащих информацию о SNPs (VCF-файлы), позволяют отличать контаминированные и “чистые” образцы друг от друга.

У всех способов контроля качества, использованных в данной работе, есть свой диапазон допустимых значений, именно поэтому целесообразно использовать несколько методов одновременно. Для WGS набор методов может включать в себя

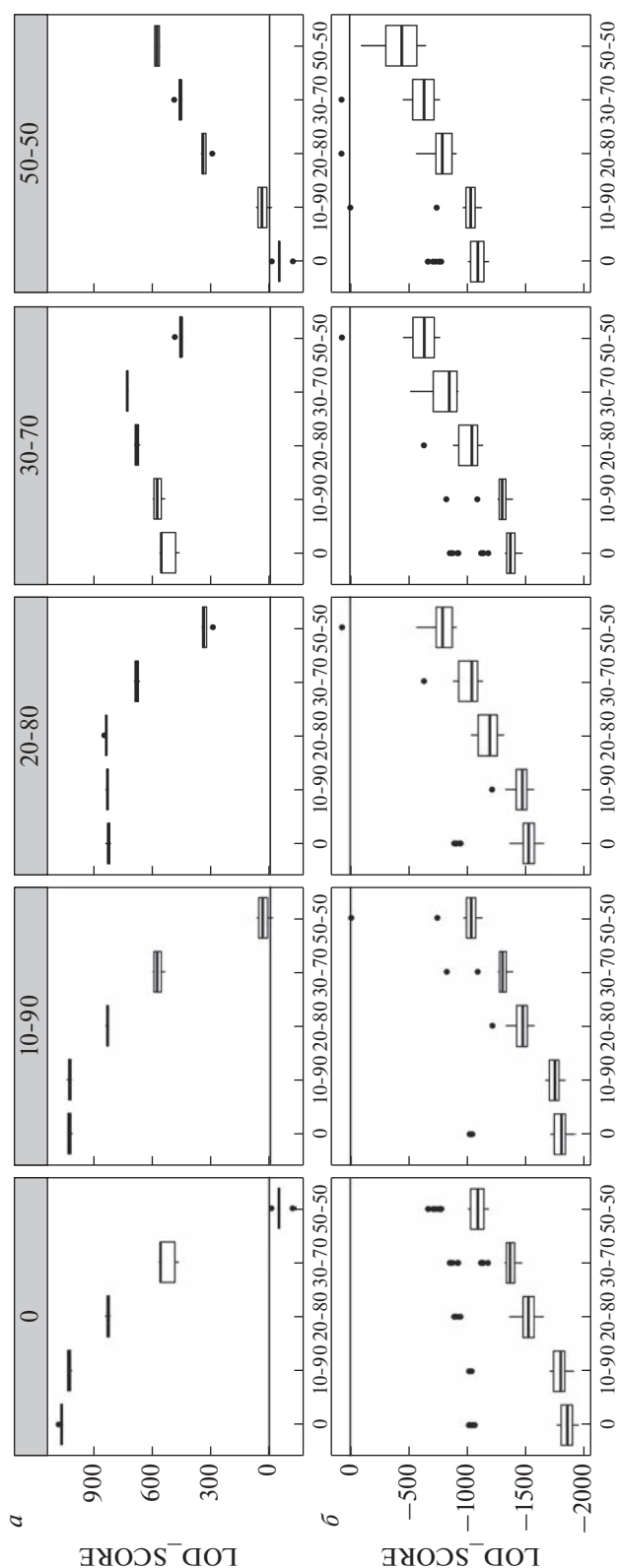


Рис. 4. Значение LOD при сравнении CE смесей одних и тех же образцов между собой (а) и образцов из разных “партий” (б). По оси абсцисс отмечена концентрация (процент контаминации) одного из образцов из пары, в боксах сверху — процент контаминации второго образца из пары.

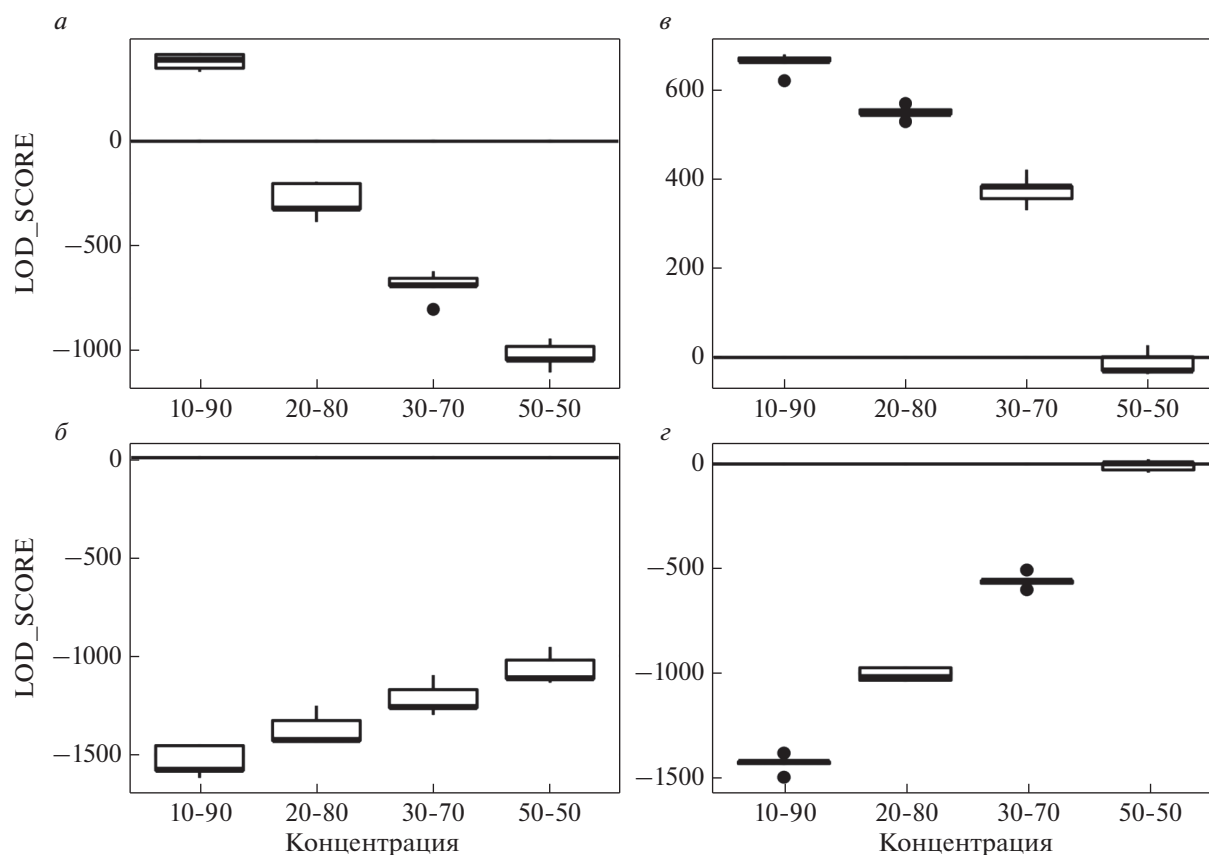


Рис. 5. Значение LOD Score, полученное при сравнении: *а* – “чистого” СЕ и контаминированного WGS для пары идентичных образцов; *б* – “чистого” СЕ и смеси, где “чистый” образец выступает в роли минорного компонента в разном процентном соотношении; *в* – “чистого” WGS и контаминированного СЕ для пары идентичных образцов; *г* – “чистого” WGS и смеси, где “чистый” образец выступает в роли минорного компонента в разном процентном соотношении.

определение процента гетерозиготных вариантов с AR вне диапазона $0.5 \pm 1.96 \times 0.09$ и стандартного отклонения AR, расчет Het/Ном и использование программы CrossCheck. Результаты, полученные в данной работе, подтверждают предыдущие результаты, опубликованные Dallavilla и соавт.: расчет AR позволяет выявлять контаминацию 10% и более [1]. Впервые рассчитана метрика Het/Ном для образцов с разной степенью контаминации. Повышенное значение Het/Ном может трактоваться только как косвенное свидетельство контаминации и только совместно с информацией об этнической принадлежности донора биоматериала. В настоящей работе проверили корректность работы программы CrossCheck с контаминированными образцами. Программа CrossCheck позволяет выявлять пары образцов биоматериала, поступивших от одного и того же донора и генотипированных с помощью СЕ и WGS. Впервые показано, что метрика схожести файлов, рассчитанная программой CrossCheck, зависит от степени контаминации образца. При этом разные контаминированные образцы при сравнении друг с другом имеют LOD

ниже 0, т.е. всегда однозначно помечаются как разные. Для того чтобы иметь возможность использовать LOD как дополнительную метрику качества образца, стоит оценить характерные для конкретного набора данных значения LOD для пары проб, поступивших от одного донора биоматериала, и для пары разных образцов.

Поскольку принципы генотипирования и секвенирования любых других диплоидных организмов не отличаются от подходов, используемых для расшифровки нуклеотидной последовательности ДНК человека, описанные в данной работе методы можно применять и для их контроля качества.

Исследование не имело спонсорской поддержки.

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

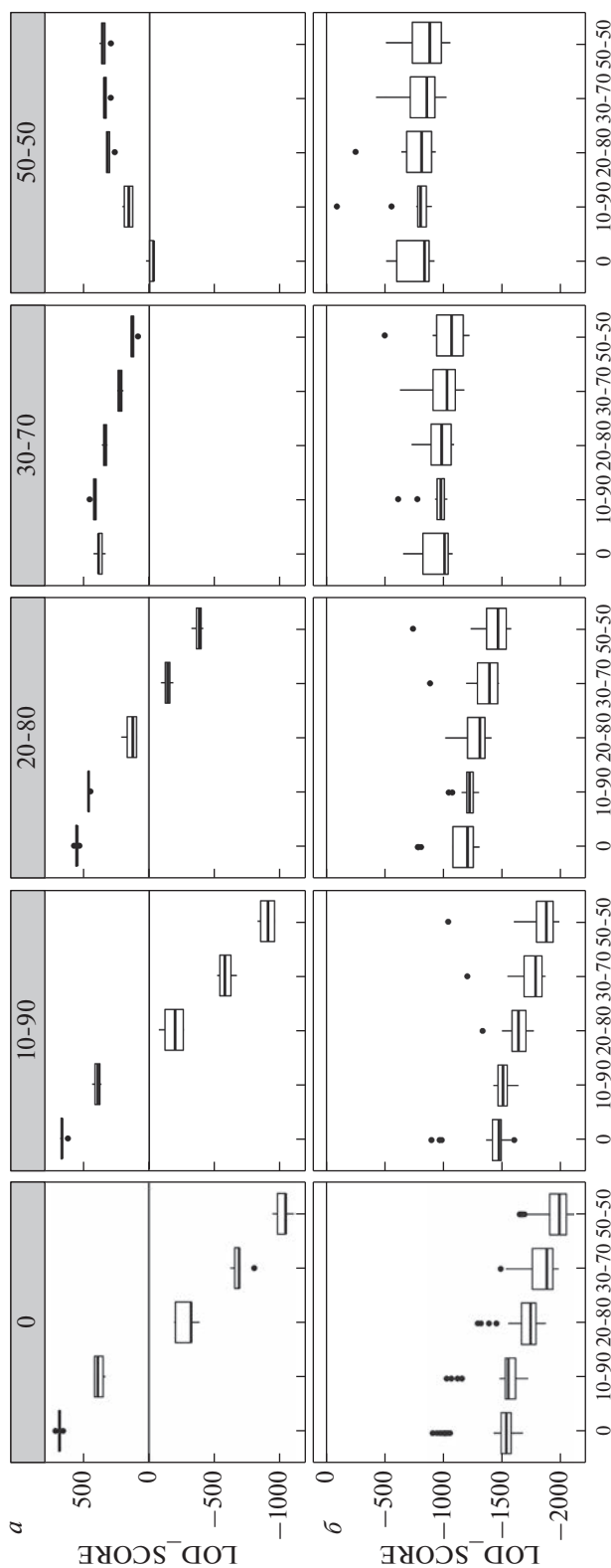


Рис. 6. Значение LOD при сравнении CE и WGS смесей одних и тех же образцов между собой (а) и загрязненных образцов из разных “партий” (б). По оси абсцисс отмечена концентрация (процент контаминации) WGS, в боксах сверху – процент контаминации CE.

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Dallavilla T., Marceddu G., Casadei A. et al.* A fast, reliable and easy method to detect within-species DNA contamination // *Acta Bio-Medica Atenei Parm.* 2020. V. 91. № 13-S. <https://doi.org/10.23750/abm.v91i13-S.10531>
2. *Wang J., Raskin L., Samuels D.C. et al.* Genome measures used for quality control are dependent on gene function and ancestry // *Bioinformatics.* 2015. V. 31. № 3. P. 318–323. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu668>
3. *Javed N., Farjoun Y., Fennell T.J. et al.* Detecting sample swaps in diverse NGS data types using linkage disequilibrium // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 3697. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17453-5>
4. *Miller N.A., Farrow E.G., Gibson M. et al.* A 26-hour system of highly sensitive whole genome sequencing for emergency management of genetic diseases // *Genome Med.* 2015. V. 7. № 1. P. 100. <https://doi.org/10.1186/s13073-015-0221-8>
5. *Kim S., Scheffler K., Halpern A.L. et al.* Strelka2: Fast and accurate calling of germline and somatic variants // *Nat. Methods.* 2018. V. 15. № 8. P. 591–594. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0051-x>
6. *Danecek P., Bonfield J.K., Liddle J. et al.* Twelve years of SAMtools and BCFtools // *GigaScience.* 2021. V. 10. № 2. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008>
7. *Zhao H., Sun Z., Wang J. et al.* CrossMap: A versatile tool for coordinate conversion between genome assemblies // *Bioinforma. Oxf. Engl.* 2014. V. 30. № 7. P. 1006–1007. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt730>

Experimental Evaluation of the Possibility to Detect Cross-Contaminated DNA Samples Based on Genetic Data

N. V. Feliz^{a, *}, K. S. Grammatikati^a, S. I. Mitrofanov^a, P. A. Grebnev^a,
K. D. Konureeva^a, E. D. Maralova^a, M. V. Erokhina^a, T. A. Shpakova^a,
P. G. Kazakova^a, Yu. N. Akhmerova^a, A. A. Mkrtchian^a, E. A. Snigir^a, V. S. Yudin^a,
A. A. Keskinov^a, S. M. Yudin^a, and V. I. Skvortsova^b

^a*Federal State Budgetary Institution “Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks” of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, 119121 Russia*

^b*The Federal Medical Biological Agency, Moscow, 123182 Russia*

*e-mail: feliz08nv@gmail.com

The problems of cross-contamination and swap samples are extremely relevant during large-scale genetic studies. In this study several approaches of detecting cross-contaminated DNA samples were checked: the ratio of reads per reference and alternative allele (allele ratio, AR), the amount of heterozygotes to homozygous variants ratio, the CallRate value for the DNA microarrays data, the Picard CrosscheckFingerprints (Cross-Check) program. Contaminated samples (mixtures) were created by mixing ordinary “pure” DNA samples in different ratios. Samples’ quality parameters were analyzed after whole genome sequencing and genotyping with the Illumina microarray BeadArray technology CoreExome (CE) DNA microarray. It has been experimentally established that all of these approaches can be used to detect genotyping errors associated with sample contamination.

Keywords: whole genome sequencing, contamination, microarray BeadArray technology, quality control.

ПОИСК ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ ДЛЯ МУТАЦИЙ, НАРУШАЮЩИХ ОБРАЗОВАНИЕ СИНАПТОНЕМНОГО КОМПЛЕКСА, В СЕКВЕНИРОВАННОМ ГЕНОМЕ РЖИ *Secale cereale*

© 2023 г. Ю. В. Сопова^{1, 2, *}, П. А. Зыкин², Т. В. Долматович³, С. П. Соснихина²

¹Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, 199034 Россия

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

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

*e-mail: y.sopova@spbu.ru

Поступила в редакцию 09.12.2022 г.

После доработки 28.02.2023 г.

Принята к публикации 02.03.2023 г.

Формирование синаптонемного комплекса между гомологичными хромосомами во время профазы I мейоза имеет первоочередное значение для нормального протекания процесса рекомбинации. Нарушения в образовании синаптонемного комплекса могут приводить как к асинапсису (при этом на стадии метафазы I будут присутствовать униваленты), так и гетерологичному синапсису (на стадии метафазы I будут выявляться как униваленты, так и мультиваленты). Ранее нами были получены мутанты ржи, у которых не наблюдалось образования синаптонемных комплексов (*sy1* и *sy9*) или синапсис был гетерологичным (*sy10*, *sy18* и *sy19*). Мы провели биоинформатический анализ аннотированного генома ржи и выявили потенциальные гены-кандидаты для каждого из этих мутантов. Выбор генов-кандидатов осуществляли на основе данных микросателлитного картирования и сопоставления их с аннотированными последовательностями генома ржи. В результате были выбраны следующие гены: *Mei2-like* для мутанта *sy1*, *MAD2* для мутанта *sy9*, *BUB3.3* и *BUB3.1* для *sy10* и *sy18* соответственно, а также *Meiosis 5* для *sy19*.

Ключевые слова: рождь, мейоз, синаптонемный комплекс, картирование мутаций.

DOI: 10.31857/S0016675823070123, **EDN:** QQPAKU

В 2021 г. были опубликованы результаты полного секвенирования генома *Secale cereale* [1, 2]. Доступность аннотированного генома ржи позволила провести биоинформатический анализ и выявить потенциальные гены-кандидаты, мутации в которых в гомозиготном состоянии, как было показано ранее [3–5], приводят к нарушению процессов синапсиса гомологичных хромосом. Для анализа были взяты гены, мутации в которых были ранее обозначены как *sy1*, *sy9*, *sy10*, *sy18* и *sy19*.

Выбор генов-кандидатов осуществляли на основе данных микросателлитного картирования [3–6] и сопоставления их с аннотированными последовательностями генома ржи. Гены *Sy9* и *Sy18* ранее были картированы на длинном плече 2R-хромосомы ржи вблизи центромеры. *Sy9* был картирован в непосредственной близости от микросателлитных локусов *Xscm43* и *Xrems1230* ржи и локуса *Xgwm132* пшеницы, тогда как *Sy18* был картирован относительно локусов *Xrems1130* и *Xrems1203* ржи. *Sy10* был локализован на длинном плече хромосомы 5R ржи вблизи микросателлит-

ных локусов *Xgwm126*, *Xgwm6* и *Xgwm538* пшеницы и *Xscm179* ржи. Мутации *sy1* и *sy19* были локализованы на длинном плече хромосомы 7R ржи рядом с локусами *Xrems1187*, *Xrems1135* и *Xrems1188* ржи (*sy1*) и локусом *Xrems1234* ржи (*sy10*). Биоинформатический анализ положения маркеров на хромосомах ржи (номер сборки генома в базе GenBank – GCA_902687465.1) производился с использованием программ: Ircress (из пакета Exonerate версии 2.4.0) и Blastn версии 2.12.0. Расположение мутаций *sy1*, *sy9*, *sy10*, *sy18* и *sy19* на хромосомах ржи и наиболее вероятные гены-кандидаты приведены на рис. 1.

Ранее было показано, что у гомозигот по мутации *sy1* наблюдается комплекс нарушений в ходе мейоза, в частности: в профазе I формируются только осевые элементы хромосом, отсутствует синаптонемный комплекс (СК), на стадии метафазы I мейоза в 96.8% случаев наблюдаются только униваленты, белок Asy1 выявлялся в виде непрерывных линейных сигналов вдоль каждой хромосомы [7].

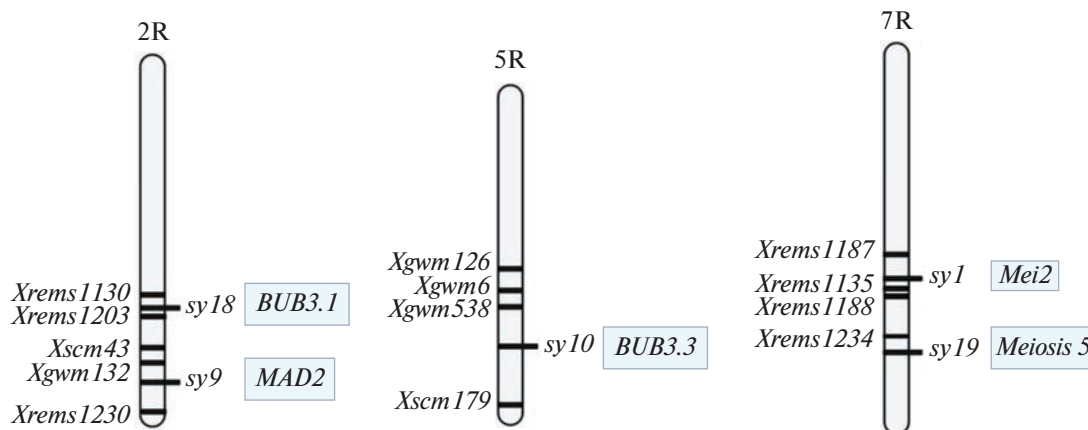


Рис. 1. Локализация мутаций *sy1*, *sy9*, *sy10*, *sy18* и *sy19* на хромосомах ржи. В прямоугольных рамках – предполагаемые гены-кандидаты для этих мутаций.

Результаты хромосомного картирования мутанта *sy1* показали, что наиболее вероятным геном-кандидатом в этом случае является ген, кодирующий Mei2-подобный белок (Mei2-like protein 6). Ранее у арабидопсиса было выявлено пять генов, относящихся к семейству Arabidopsis-meii2-Like (AML), мутации в которых приводят к нарушениям синапсиса, образованию унивалентов, фрагментации хромосом и формированию ацентриков [8]. Mei2-подобные белки содержат уникальный домен RRM, который отвечает за связывание с РНК [9], предполагается, что они могут как напрямую посттранскрипционно регулировать активность генов, так и быть вовлеченными в организацию и ремоделинг хроматина. Это согласуется с ранее полученными данными о том, что у мутанта *sy1* отсутствуют ранние ферменты рекомбинации Rad51/Dmc1 [10], что может быть связано с нарушениями на уровне посттранскрипционной регуляции соответствующих генов. Было показано, что белок Mei2 является главным регулятором мейоза у *Schizosaccharomyces pombe*, а гены, кодирующие его ортологи, были обнаружены у разных групп эукариот, поэтому считается, что MEI2-подобные гены возникли на ранних этапах эволюции эукариот [9]. Сравнение аминокислотных последовательностей белков Mei2-like protein 6 риса, кукурузы, пшеницы и ржи показывает, что наибольшая степень сходства между белками наблюдается именно в области С-терминального домена RRM, специфичного для Mei2-подобных белков (166–274 а.к. белка Mei2-like protein 6 ржи).

Асинаптический мутант *sy9* был схож с мутантом *sy1* по цитологической картине нарушений в мейозе, однако у мутанта *sy9* в 90% клеток белок Asy1 отсутствовал, в отличие от мутанта *sy1* [11]. Анализ генов-кандидатов для мутанта *sy9* выявил ген *MAD2*, продукт которого участвует в контроле

клеточного цикла. У кукурузы белок MAD2 локализуется во внешней части мейотического кинетохора [12], для его гомолога у нематоды *C. elegans* была показана роль в регуляции мейотического синапсиса [13]. Белок MAD2 вместе с белками Bub1, Bub3, Cdc20 образует комплекс, контролирующий соединение кинетохор с микротрубочками веретена деления. MAD2 играет ключевую роль в сборке этого комплекса благодаря домену NORMA, впервые обнаруженному у белков HOP1, REV7 и MAD2. Домен NORMA взаимодействует с осевыми элементами хромосом, а также участвует в образовании белковых гомо- и гетеродимеров [14]. Белок Asy1 относится к тому же семейству белков, содержащих NORMA-домен, что и MAD2 [15]. Сравнение аминокислотных последовательностей белков MAD2 риса, кукурузы, пшеницы и ржи показало практически полную их идентичность, что говорит о принципиальной важности этого белка для функционирования мейоцитов растений.

Предшествующий анализ показал, что мутации *sy10*, *sy18* и *sy19* вызывают частично негомологичный синапсис и варьирующее число унивалентов в метафазе I. У мутанта *sy10* белки Asy1 и Zyp1 образуют линейные треки, однако трехслойная структура СК не образуется, и синапсис проходит гетерологично [11]. У мутанта *sy19* вдоль хромосом наблюдается прерывистый сигнал белка Asy1 [16]. Мутанты *sy10* и *sy18*, как мы предполагаем, несут мутации в генах *BUB3.3* и *BUB3.1* соответственно. Белки BUB3.3 и BUB3.1 арабидопсиса взаимодействуют с белком MAD2 [17], у нематоды *C. elegans* была показана их роль в комплексе с белком MAD2 в регуляции синапсиса [18]. Эти белки содержат мотивы WD40, принципиальные для белок-белковых взаимодействий. Точковые мутации в консервативном мотиве

WD40 дрожжевого Bub3 нарушают его ассоциацию с Mad2, Mad3 и Cdc20 [19].

В качестве гена-кандидата для мутанта *sy19* нами был выбран ген *Meiosis 5*, продукт которого гомологичен белкам WM5 пшеницы и PDF1 арабидопсиса. У пшеницы этот ген экспрессируется на ранних стадиях мейоза, однако его роль в формировании синапсиса пока не изучена. Делеция одной из копий этого гена у пшеницы приводит к повышенному гомеологическому спариванию хромосом при межвидовом скрещивании [20]. Анализ аминокислотных последовательностей белков Mei5 из разных видов злаков выявил характерную последовательность, состоящую из остатков глицина, однако ее функциональная роль в настоящее время остается неизвестной.

Синапсис гомологичных хромосом в процессе мейотического деления является основой для генетической рекомбинации и сбалансированного расхождения хромосом в анафазе I. Нормальное протекание этих процессов зависит, в том числе, от правильного взаимодействия центромерных и теломерных областей хромосом. Изучение мутантов ржи, у которых в ходе мейоза наблюдаются различные нарушения, выявило ряд генов, продукты которых могут как посттранскрипционно регулировать активность генов, так и быть вовлеченными в организацию и ремоделинг хроматина, а также контролировать соединение кинетохор с микротрубочками веретена деления.

Работа выполнена в рамках госзадания ИОГен РАН (тема № 0092-2022-0002).

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. Rabanus-Wallace M.T., Hackauf B., Mascher M. et al. Chromosome-scale genome assembly provides insights into rye biology, evolution and agronomic potential // *Nat. Genet.* 2021. V. 53. P. 564–573. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00807-0>
2. Li G., Wang L., Yang J. et al. A high-quality genome assembly highlights rye genomic characteristics and agronomically important genes // *Nat. Genet.* 2021. V. 53. P. 574–584. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00808-z>
3. Соснихина С.П., Михайлова Е.И., Тихолиз О.А. и др. Генетическая коллекция мейотических мутантов ржи *Secale cereale* L. // *Генетика.* 2005. Т. 41. № 10. С. 1310–1321.
4. Долматович Т.В., Мальшиев С.В., Соснихина С.П. и др. Картирование мейотических генов ржи (*Secale cereale* L.). Локализация мутации *sy18*, нарушающей гомологичность синапсиса, с использованием микросателлитных маркеров // *Генетика.* 2013. Т. 49. № 4. С. 472–478. <https://doi.org/10.7868/S0016675813040036>
5. Долматович Т.В., Мальшиев С.В., Соснихина С.П. и др. Картирование мейотических генов ржи (*Secale cereale* L.). Локализация мутации *sy19*, нарушающей гомологичный синапсис, с помощью изозимных и микросателлитных маркеров // *Генетика.* 2013. Т. 49. № 5. С. 595–601. <https://doi.org/10.7868/S0016675813030053>
6. Мальшиев С.В., Долматович Т.В., Войлоков А.В. и др. Молекулярно-генетическое картирование асинхронических генов *sy1* и *sy9* ржи (*Secale cereale* L.) с использованием микросателлитных и изозимных маркеров // *Генетика.* 2009. Т. 45. № 12. С. 1634–1640.
7. Михайлова Е.И., Ловцюс А.В., Соснихина С.П. Некоторые особенности реализации ключевых событий мейоза у ржи и ее синаптических мутантов // *Генетика.* 2010. Т. 46. № 10. С. 1371–1375.
8. Kaur J., Sebastian J., Siddiqi I. The arabidopsis-meilike genes play a role in meiosis and vegetative growth in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 2006. V. 18. № 3. P. 545–559. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.039156>
9. Jeffares D.C., Phillips M.J., Moore S. et al. A description of the Mei2-like protein family; structure, phylogenetic distribution and biological context // *Dev. Genes Evol.* 2004. V. 214. P. 149–158. <https://doi.org/10.1007/s00427-004-0384-6>
10. Jenkins G., Mikhailova E.I., Langdon T. et al. Strategies for the study of meiosis in rye // *Cytogenet. Genome Res.* 2005. V. 109. P. 221–227.
11. Mikhailova E.I., Phillips D., Sosnikhina S.P. et al. Molecular assembly of meiotic proteins Asy1 and Zyp1 and pairing promiscuity in rye (*Secale cereale* L.) and its synaptic mutant *sy10* // *Genetics.* 2006. V. 174. P. 1247–1258.
12. Yu H.G., Muszynski M.G., Kelly Dawe R. The maize homologue of the cell cycle checkpoint protein MAD2 reveals kinetochore substructure and contrasting mitotic and meiotic localization patterns // *J. Cell Biol.* 1999. V. 145. P. 425–435. <https://doi.org/10.1083/jcb.145.3.425>
13. Devigne A., Bhalla N. Mad1's ability to interact with Mad2 is essential to regulate and monitor meiotic synapsis in *C. elegans* // *PLoS Genet.* 2021. V. 17. P. e1009598. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009598>
14. Prince J.P., Martinez-Perez E. Functions and regulation of meiotic HORMA-domain proteins // *Genes.* 2022. V. 13. <https://doi.org/10.3390/genes13050777>
15. Balboni M., Yang C., Komaki S. et al. COMET functions as a PCH2 cofactor in regulating the HORMA domain protein ASY1 // *Curr. Biol.* 2020. V. 30. № 21. P. 4113–4127. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.07.089>
16. Войлоков А.В., Соснихина С.П., Тихенко Н.Д. и др. Петергофская коллекция ржи и ее использование в генетических исследованиях // *Экол. генетика.* 2018. Т. 16. № 2. С. 40–49. <https://doi.org/10.17816/ecogen16240-49>
17. Caillaud M.C., Paganelli L., Lecomte P. et al. Spindle assembly checkpoint protein dynamics reveal con-

- served and unsuspected roles in plant cell division // PLoS One. 2009. V. 4. № 8. P. e6757. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006757>
18. Bohr T., Nelson C.R., Klee E., Bhalla N. Spindle assembly checkpoint proteins regulate and monitor meiotic synapsis in *C. elegans* // J. Cell Biol. 2015. V. 211. P. 233–242. <https://doi.org/10.1083/jcb.201409035>
19. Fraschini R., Beretta A., Sironi L. et al. Bub3 interaction with *Mad2*, *Mad3* and *Cdc20* is mediated by WD40 repeats and does not require intact kinetochores // Embo J. 2001. V. 20. P. 6648–6659.
20. Dong C., Thomas S., Becker D. et al. *WM5*: Isolation and characterisation of a gene expressed during early meiosis and shoot meristem development in wheat // Funct. Plant. Biol. 2005. V. 32. P. 249–258. <https://doi.org/10.1071/FP04198>

Search for Candidate Genes for Mutations Disrupting Synaptonemal Complex Formation in the Sequenced Genome of Rye *Secale cereale*

J. V. Sopova^{a, b, *}, P. A. Zykin^b, T. V. Dolmatovich^c, and S. P. Sosnikhina^b

^aVavilov Institute of General Genetics, Saint-Petersburg Branch, Saint-Petersburg, 199034 Russia

^bSaint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, 199034 Russia

^cInstitute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220072 Republic of Belarus

*e-mail: y.sopova@spbu.ru

The formation of a synaptonemal complex between homologous chromosomes during prophase I of meiosis is of great importance for the normal course of the recombination process. Disturbances in the formation of the synaptonemal complex can lead to both asynapsis (in this case, univalents will be present at the metaphase I stage) and heterologous synapsis (both univalents and multivalents will be detected at the metaphase I stage). Previously, we obtained rye mutants in which no formation of synaptonemal complexes (*sy1* and *sy9*) was observed or the synapsis was heterologous (*sy10*, *sy18* and *sy19*). We performed a bioinformatics analysis of the annotated rye genome and identified potential candidate genes for each of these mutants. The choice of candidate genes was carried out on the basis of microsatellite mapping data and their comparison with annotated sequences of the rye genome. As a result, the following genes were selected: *Mei2*-like for the *sy1* mutant, *MAD2* for the *sy9* mutant, *BUB3.3* and *BUB3.1* for *sy10* and *sy18*, respectively, and *Meiosis 5* for *sy19*.

Keywords: rye, meiosis, synaptonemal complex, mutation mapping.

АНАЛИЗ АЛЛЕЛОФОНДА ПОЛУТОНКОРУННЫХ ОВЕЦ ПЕЧОРСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ С ПОМОЩЬЮ STR-МАРКЕРОВ

© 2023 г. В. С. Матюков¹, *, Я. А. Жариков¹, Л. А. Канева¹

¹Институт агробиотехнологий Федерального исследовательского центра Коми,
Научный центр Уральского отделения Российской академии наук, Сыктывкар, 167023 Россия

*e-mail: nipiti38mail.ru

Поступила в редакцию 16.11.2022 г.

После доработки 28.11.2022 г.

Принята к публикации 29.11.2022 г.

Изучили полиморфизм микросателлитов у полутонкорунных овец в типе ромни-марш печорской популяции, выведенных с участием исчезнувшей ныне северной короткохвостой аборигенной овцы. Оценка дифференциации групп овец разного генезиса по частотам генов STR-локусов, идентификация приват-аллелей и кластерный анализ не позволили получить информацию об аллелофонде аборигенной овцы. Поглолительное скрещивание на улучшающую породу с селекцией кроссбредной популяции по целевым стандартам мясошерстных пород, по-видимому, привели к утрате печорскими полутонкорунными овцами генного пула, характерного для северной аборигенной овцы.

Ключевые слова: частота аллелей, гетерозиготность, приват-аллели, субпопуляция, аллелофонд, короткохвостая, полутонкорунная, овцы.

DOI: 10.31857/S0016675823060103, EDN: STXPYA

Ключевой проблемой сохранения генетического разнообразия является сохранение популяций и пород, генофонд которых пока безвозвратно не потерян [1]. Однако не менее важна проблема реконструкции аборигенных генофондов, ассимилированных в процессе создания новых пород или кроссбредных товарных популяций. В связи с этим ранее нами проведено рекогносцировочное исследование кроссбредных полутонкорунных овец печорской популяции, при выведении которых материнской основой послужила ныне исчезнувшая аборигенная северная короткохвостая овца. В результате получили предварительные сведения об аллельной структуре STR-локусов и выявили приват-аллели, которые предположительно отнесли к утраченному аллелофонду [2]. В задачи настоящего исследования входило путем анализа более многочисленных выборок по аллелям STR-локусов определить генетический вклад северной короткохвостой грубошерстной овцы в аллелофонд печорской популяции.

С этой целью по 12 локусам микросателлитов генотипировали три репродуктивные группы животных. В первую включили полутонкорунных овец по родословным и внешним признакам, имевшим предположительное родство с исчезнувшей аборигенной северной овцой. Во вторую группу вошли помеси, полученные от скрещивания баранов куйбышевской породы с печорскими

овцематками в типе ромни-марш, по родословным и внешним признакам, не имевшим родства с аборигенной овцой. В третью группу включили чистопородных овец грубошерстной романовской породы исторически близкой по региону разведения и, возможно, имеющей с последней общее происхождение [3]. Исследование провели на базе экспериментального стада овец крестьянско-фермерского хозяйства Л.А. Каневой, изначально укомплектованного репродуктивным поголовьем овец, законтрактованным у местного населения поселений Усть-Цилемского р-на Республики Коми. Территория района (с географическими координатами 65°48'13" северной широты и 51°32'4" восточной долготы) относится к атлантико-арктической климатической зоне.

Анализ полиморфизма микросателлитов на коммерческих условиях выполнили лаборатории ДНК-технологий ВНИИплем и ООО "Гордиз" (gordiz.ru). Для генотипирования использовали набор реагентов COrDIS Sheep, с помощью которого можно анализировать аллельный полиморфизм следующих локусов: *McM042*, *INRA006*, *McM527*, *ETH152*, *CSR247*, *OarFCB20*, *INRA172*, *INRA063*, *MAF065*, *MAF214*, *INRA005*, *INRA023* и маркер пола *AMEL* [4]. ДНК для анализа выделяли из тканей ушных раковин, отсеченных во время мечения животных. Образцы консервировали 96%-ным этиловым спиртом-ректификатом.

По группам овец рассчитали следующие генетико-популяционные показатели: число животных в группе — n , частоты генов (q_{ijk} — частота i -го аллеля, j -го локуса, в k -ой (суб)популяции (группе); стандартные ошибки частот генов — $\pm sq_{ijk}$), разницу по частотам генов между группами овец (dq_{ijk}), среднее число аллелей (N_{jk}), число аллелей с частотой ≥ 0.05 ($N_{a_{jk}}$), число эффективных аллелей ($N_{e_{jk}}$) на locus, доля приват-аллелей к сумме аллелей по 12 STR-локусам ($N_{pl_{ijk}}$). Также по группам животных рассчитывали: ожидаемую (H_{e_k}) и наблюдаемую (H_{o_k}) гетерозиготности, F_{isj_k} — индексы фиксации, генетические дистанции при попарном сравнении групп по отдельным локусам — F_{stj} , и в среднем по 12 STR-локусам — F_{st} по Райту [5], а также коэффициенты вариации F_{stj} , вычисленные при попарном сравнении групп по каждому в отдельности локусу (C.V.). Статистическую обработку данных, построение диаграмм выполнили с использованием программ GenAlEx 6.503 [6] и Microsoft Excel.

В целом по 12 STR-локусам в трех группах животных выявлено 109 аллелей, из них в первой группе — 88, во второй — 91, в третьей — 77. Независимо от породности и породы аллели *INRA006*¹¹⁰, *INRA006*¹⁶⁴, *ETH152*¹⁸⁶, *CSRD247*²¹³ и *CSRD247*²²⁷, *OarFCB20*⁰¹ и *OarFCB20*¹⁰⁵, *INRA172*¹⁵⁴, *INRA063*¹⁶⁹ и *INRA063*¹⁷⁵, *MAF065*¹²⁷ и *MAF065*¹³⁵, *MAF214*¹⁸⁹ встречались во всех группах овец с частотами 0.150 и выше. Первая и вторая группы овец достоверно различались по частотам 28 аллелей, первая с третьей — по 57, вторая и третья — 61. Наиболее высокая частота достоверных различий между группами установлена по частотам аллелей трех высокополиморфных локусов: *CSRD247*, *INRA005*, *INRA023* (табл. 1). В первой группе выявлены два приват-аллеля: *CSRD247*²⁰⁹ и *INRA023*²¹⁸, во второй — 11 аллелей, которые не встречались в первой группе, 10 из них отсутствовали и в аллелфонде овец третьей группы.

В самой “бедной” по аллельному разнообразию третьей группе выявлено 16 специфических аллелей. Если в группах тонкорунных овец специфические аллели встречались с низкими частотами (максимальная частота — 0.049 ± 0.018 *INRA023*²⁰²), то у романовских овец частоты некоторых из них превышали 0.05 и доходили до 0.130.

Из данных, приведенных в табл. 2, видно, что по аллельному разнообразию, ожидаемой гетерозиготности первая группа достоверно превосходила чистопородных романовских овец и уступала кроссбредной второй группе. По значениям F_{is} она характеризовалась максимальным избытком гетерозигот, а по количеству и частоте выявленных приват-аллелей достоверно уступала второй и третьей группам соответственно при уровне значимости $p < 0.05$ и $p < 0.01$. Средняя по 12-ти

STR-локусам генетическая дистанция (F_{st}) между первой и второй группами составила 0.012 ± 0.002 . По парам 1*3 и 2*3 значения F_{st} соответственно были 0.052 ± 0.011 и 0.054 ± 0.010 . Коэффициенты вариации значений F_{st} , рассчитанных при попарном сравнении групп в пределах каждого локуса, колебались от 58.7 до 75.8%.

При сравнении пород (групп, популяций) некоторые из полиморфных маркеров теоретически могут коррелировать с дивергенцией популяций по полиморфным генам, контролирующим селективные признаки. Усреднение оценок генетической изменчивости по ряду маркерных локусов нивелирует такие ассоциации и мешает их выявлению [7–9]. Из данных, представленных на рис. 1 видно, что ни по одному локусу генетическая дистанция между первой и второй группами не превосходила генетические дистанции при попарном сравнении первой и второй групп с третьей группой. Лocus *CSRD247* являлся единственным, по которому значение F_{st} между первой и второй группами приближалось по величине к F_{st} между первой и третьей группами.

Анализ более многочисленных выборок, чем в ранее проведенном рекогносцировочном исследовании [10], показал, что поголовье овец сохранившее родственные связи с северными овцами и овцами печорской породной группы по абсолютному числу аллелей, числу информативных и эффективных аллелей на locus достоверно не отличались от помесей печорских маток с баранами куйбышевской породы и от чистопородных романовских овец. Генетические дистанции по Райту между полутонкорунными овцами 1-й и 2-й групп по отдельным локусам колебались в пределах от 0.004 до 0.024. По доле приват-аллелей от общего числа аллелей по 12 локусам овцы первой группы достоверно уступали второй ($p < 0.05$) и третьей группе ($p < 0.001$). Различия между первой и второй группами скорее всего обусловлены генетическим компонентом, привнесенным куйбышевской породой, поскольку именно во второй группе обнаружено 11 аллелей, которые в ней встречены.

При планировании исследования мы допускали, что генетическая дистанция между первой и третьей группами должна быть ниже, чем между второй и третьей, что косвенно указывало бы на наличие генного пула аборигенной северной короткохвостой овцы в генофонде полутонкорунных печорских овец первой группы. Такое допущение основывалось на различном генезисе печорских полутонкорунных овец и куйбышевской породы, поскольку при выведении последней материнскими породами служили аборигенные грубошерстные длинношестехвостые черкасские и вагасские полутонкорунные ярки, которые перекрывались баранами ромни-марш до получения второго поколения включительно (“кровность”

Таблица 1. Частоты аллелей STR-локусов и разница между группами овец по частотам аллелей

Локусы	Аллели	Группы и численность животных						Разница по частотам аллелей между группами (dq_{ijk}) ^x		
		1 (n = 68)		2 (n = 72)		3 (n = 50)		1–2	1–3	2–3
		q_{ijk}	$\pm sq_{ijk}$	q_{ijk}	$\pm sq_{ijk}$	q_{ijk}	$\pm sq_{ijk}$			
<i>McM042</i>	81	0.324	0.040	0.417	0.041	0.000	0.000	-0.093	0.324***	0.417***
	87	0.125	0.028	0.243	0.036	0.360	0.048	-0.118**	-0.235***	-0.117*
	89	0.176	0.033	0.076	0.022	0.060	0.024	0.100*	0.116**	0.016
	93	0.000	0.000	0.007	0.007	0.000	0.000	-0.007	0.000	0.007
	95	0.022	0.013	0.049	0.018	0.240	0.043	-0.027	-0.218***	-0.191***
	99	0.147	0.030	0.076	0.022	0.000	0.000	0.071	0.147***	0.076***
	103	0.206	0.035	0.132	0.028	0.340	0.047	0.074	-0.134*	-0.208***
<i>INRA006</i>	108	0.007	0.007	0.104	0.025	0.000	0.000	-0.097***	0.007	0.104***
	110	0.478	0.043	0.493	0.042	0.580	0.049	-0.015	-0.102	-0.087
	112	0.029	0.014	0.028	0.014	0.040	0.020	0.002	-0.011	-0.012
	116	0.103	0.026	0.097	0.025	0.230	0.042	0.006	-0.127**	-0.133**
	124	0.191	0.034	0.104	0.025	0.000	0.000	0.087*	0.191***	0.104***
	130	0.000	0.000	0.000	0.000	0.040	0.020	0.000	-0.040*	-0.040*
	132	0.162	0.032	0.125	0.028	0.100	0.030	0.037	0.062	0.025
	134	0.029	0.014	0.049	0.018	0.010	0.010	-0.019	0.019	0.039
<i>McM527</i>	158	0.000	0.000	0.014	0.010	0.000	0.000	-0.014	0.000	0.014
	164	0.404	0.042	0.375	0.040	0.210	0.041	0.029	0.194***	0.165**
	166	0.169	0.032	0.146	0.029	0.170	0.038	0.023	-0.001	-0.024
	168	0.162	0.032	0.236	0.035	0.120	0.032	-0.074	0.042	0.116*
	170	0.096	0.025	0.139	0.029	0.070	0.026	-0.043	0.026	0.069
	172	0.000	0.000	0.000	0.000	0.130	0.034	0.000	-0.130***	-0.130***
	174	0.044	0.018	0.014	0.010	0.080	0.027	0.030	-0.036	-0.066*
	176	0.125	0.028	0.076	0.022	0.120	0.032	0.049	0.005	-0.044
	178	0.000	0.000	0.000	0.000	0.100	0.030	0.000	-0.100***	-0.100***
<i>ETH152</i>	186	0.456	0.043	0.396	0.041	0.330	0.047	0.060	0.126*	0.066
	188	0.147	0.030	0.083	0.023	0.090	0.029	0.064	0.057	-0.007
	190	0.081	0.023	0.139	0.029	0.490	0.050	-0.058	-0.409***	-0.351***
	192	0.316	0.040	0.382	0.040	0.030	0.017	-0.066	0.286***	0.352***
	196	0.000	0.000	0.000	0.000	0.060	0.024	0.000	-0.060*	-0.060*
<i>CSRD247</i>	209	0.022	0.013	0.000	0.000	0.000	0.000	0.022	0.022	0.000
	213	0.375	0.042	0.194	0.033	0.620	0.049	0.181***	-0.245***	-0.426***
	223	0.044	0.018	0.049	0.018	0.000	0.000	-0.004	0.044*	0.049**
	227	0.250	0.037	0.410	0.041	0.240	0.043	-0.160**	0.010	0.170**
	228	0.000	0.000	0.007	0.007	0.000	0.000	-0.007	0.000	0.007
	229	0.125	0.028	0.125	0.028	0.020	0.014	0.000	0.105***	0.105***
	231	0.044	0.018	0.111	0.026	0.030	0.017	-0.067*	0.014	0.081**
	233	0.000	0.000	0.063	0.020	0.020	0.014	-0.063**	-0.020	0.043
	235	0.000	0.000	0.000	0.000	0.070	0.026	0.000	-0.070**	-0.070**
	237	0.140	0.030	0.028	0.014	0.000	0.000	0.112***	0.140***	0.028*
	239	0.000	0.000	0.014	0.010	0.000	0.000	-0.014	0.000	0.014

Таблица 1. Продолжение

Локусы	Алели	Группы и численность животных						Разница по частотам аллелей между группами (dq_{ijk}) ^x		
		1 (n = 68)		2 (n = 72)		3 (n = 50)		1–2	1–3	2–3
		q_{ijk}	$\pm sq_{ijk}$	q_{ijk}	$\pm sq_{ijk}$	q_{ijk}	$\pm sq_{ijk}$			
<i>OarFCB20</i>	87	0.015	0.010	0.056	0.019	0.000	0.000	–0.041	0.015	0.056**
	89	0.037	0.016	0.146	0.029	0.150	0.036	–0.109**	–0.113**	–0.004
	91	0.390	0.042	0.285	0.038	0.410	0.049	0.105	–0.020	–0.125*
	93	0.103	0.026	0.111	0.026	0.000	0.000	–0.008	0.103***	0.111***
	95	0.066	0.021	0.042	0.017	0.000	0.000	0.025	0.066**	0.042*
	99	0.096	0.025	0.028	0.014	0.010	0.010	0.068*	0.086**	0.018
	101	0.074	0.022	0.139	0.029	0.060	0.024	–0.065	0.014	0.079*
	102	0.000	0.000	0.007	0.007	0.000	0.000	–0.007	0.000	0.007
	105	0.221	0.036	0.188	0.033	0.370	0.048	0.033	–0.149*	–0.183**
<i>INRA172</i>	126	0.243	0.037	0.104	0.025	0.000	0.000	0.138**	0.243***	0.104***
	154	0.500	0.043	0.486	0.042	0.160	0.037	0.014	0.340***	0.326***
	156	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020	0.014	0.000	–0.020	–0.020
	158	0.051	0.019	0.104	0.025	0.000	0.000	–0.053	0.051**	0.104***
	160	0.074	0.022	0.132	0.028	0.540	0.050	–0.058	–0.466***	–0.408***
	162	0.088	0.024	0.097	0.025	0.190	0.039	–0.009	–0.102*	–0.093*
	164	0.044	0.018	0.069	0.021	0.090	0.029	–0.025	–0.046	–0.021
	170	0.000	0.000	0.007	0.007	0.000	0.000	–0.007	0.000	0.007
<i>INRA063</i>	167	0.000	0.000	0.000	0.000	0.060	0.024	0.000	–0.060*	–0.060*
	169	0.287	0.039	0.229	0.035	0.330	0.047	0.058	–0.043	–0.101
	173	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020	0.014	0.000	–0.020	–0.020
	175	0.375	0.042	0.278	0.037	0.290	0.045	0.097	0.085	–0.012
	177	0.081	0.023	0.125	0.028	0.180	0.038	–0.044	–0.099*	–0.055
	183	0.221	0.036	0.167	0.031	0.100	0.030	0.054	0.121**	0.067
	189	0.000	0.000	0.014	0.010	0.000	0.000	–0.014	0.000	0.014
	197	0.007	0.007	0.174	0.032	0.000	0.000	–0.166***	0.007	0.174***
	201	0.029	0.014	0.007	0.007	0.020	0.014	0.022	0.009	–0.013
	209	0.000	0.000	0.007	0.007	0.000	0.000	–0.007	0.000	0.007
<i>MAF065</i>	121	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.010	0.000	–0.010	–0.010
	125	0.191	0.034	0.097	0.025	0.000	0.000	0.094*	0.191***	0.097***
	127	0.265	0.038	0.410	0.041	0.150	0.036	–0.145**	0.115*	0.260***
	129	0.096	0.025	0.201	0.033	0.050	0.022	–0.105*	0.046	0.151***
	131	0.029	0.014	0.007	0.007	0.110	0.031	0.022	–0.081*	–0.103**
	133	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.010	0.000	–0.010	–0.010
	135	0.390	0.042	0.229	0.035	0.210	0.041	0.161**	0.180**	0.019
	137	0.029	0.014	0.056	0.019	0.450	0.050	–0.026	–0.421***	–0.394***
	139	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.010	0.000	–0.010	–0.010
<i>MAF214</i>	183	0.110	0.027	0.049	0.018	0.000	0.000	0.062	0.110***	0.049**
	187	0.007	0.007	0.063	0.020	0.000	0.000	–0.055**	0.007	0.063**
	189	0.507	0.043	0.479	0.042	0.630	0.048	0.028	–0.123	–0.151*
	191	0.250	0.037	0.306	0.038	0.160	0.037	–0.056	0.090	0.146**
	223	0.125	0.028	0.104	0.025	0.080	0.027	0.021	0.045	0.024
	263	0.000	0.000	0.000	0.000	0.130	0.034	0.000	–0.130***	–0.130***

Таблица 1. Окончание

Локусы	Алели	Группы и численность животных						Разница по частотам аллелей между группами (dq_{ijk}) ^x		
		1 (n = 68)		2 (n = 72)		3 (n = 50)		1–2	1–3	2–3
		q_{ijk}	$\pm sq_{ijk}$	q_{ijk}	$\pm sq_{ijk}$	q_{ijk}	$\pm sq_{ijk}$			
INRA005	119	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020	0.014	0.000	–0.020	–0.020
	125	0.000	0.000	0.000	0.000	0.070	0.026	0.000	–0.070**	–0.070**
	127	0.066	0.021	0.146	0.029	0.210	0.041	–0.080*	–0.144**	–0.064
	129	0.096	0.025	0.014	0.010	0.000	0.000	0.082**	0.096***	0.014
	133	0.022	0.013	0.021	0.012	0.000	0.000	0.001	0.022	0.021
	135	0.051	0.019	0.118	0.027	0.130	0.034	–0.067*	–0.079*	–0.012
	137	0.000	0.000	0.007	0.007	0.000	0.000	–0.007	0.000	0.007
	141	0.199	0.034	0.181	0.032	0.020	0.014	0.018	0.179***	0.161***
	143	0.066	0.021	0.181	0.032	0.040	0.020	–0.114**	0.026	0.141***
	145	0.250	0.037	0.188	0.033	0.130	0.034	0.063	0.120*	0.058
	147	0.029	0.014	0.042	0.017	0.370	0.048	–0.012	–0.341***	–0.328***
	151	0.169	0.032	0.097	0.025	0.010	0.010	0.072	0.159***	0.087***
	153	0.051	0.019	0.007	0.007	0.000	0.000	0.045*	0.051**	0.007
INRA023	194	0.169	0.032	0.215	0.034	0.060	0.024	–0.046	0.109**	0.155***
	196	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.010	0.000	–0.010	–0.010
	198	0.007	0.007	0.007	0.007	0.170	0.038	0.000	–0.163***	–0.163***
	200	0.213	0.035	0.292	0.038	0.140	0.035	–0.078	0.073	0.152**
	202	0.000	0.000	0.049	0.018	0.000	0.000	–0.049**	0.000	0.049**
	204	0.096	0.025	0.097	0.025	0.030	0.017	–0.002	0.066*	0.067*
	206	0.257	0.037	0.125	0.028	0.230	0.042	0.132**	0.027	–0.105*
	208	0.074	0.022	0.042	0.017	0.010	0.010	0.032	0.064**	0.032
	210	0.029	0.014	0.021	0.012	0.000	0.000	0.009	0.029*	0.021
	212	0.125	0.028	0.042	0.017	0.250	0.043	0.083*	–0.125*	–0.208***
	214	0.000	0.000	0.000	0.000	0.050	0.022	0.000	–0.050*	–0.050*
	216	0.015	0.010	0.035	0.015	0.050	0.022	–0.020	–0.035	–0.015
	218	0.007	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007	0.007	0.000
220	0.007	0.007	0.076	0.022	0.000	0.000	–0.069**	0.007	0.076***	

Примечание. Достоверность различий (dq_{ijk}) при уровнях значимости: * – $p \leq 0.05$, ** – $p \leq 0.01$, *** – $p \leq 0.001$.

по ромни-марш $\approx 75\%$) [11]. “Кровность” овец печорской породной группы по отцовской породе ромни-марш доходила до 87–93% [12]. Поэтому генетический компонент северной аборигенной овцы в синтетическом генофонде, по-видимому, не превышал 13%. Родство романовской породы с исчезнувшей северной короткохвостой овцой обосновывалось их бесспорным сходством по некоторым анатомическим особенностям скелета, шерстного покрова, скороспелости, плодовитости, полиэстричности и очагу первичного возникновения [3]. На этом основании генофонд романовской овцы рассматривался нами в качестве возможного образца генофонда северной аборигенной овцы [13]. Хотя, объективности ради, заметим, что о

происхождении романовской породы до настоящего времени единого мнения нет [3, 13, 14].

Таким образом, анализ дифференциации групп овец разного генезиса по частотам генов STR-локусов, генетических дистанций, приват-аллелей и результатов ранее проведенного кластерного анализа [10] при исследовании более многочисленных выборок не подтвердил полученную ранее предварительную информацию об обнаружении STR-маркеров аллелофонда исчезнувшей аборигенной северной короткохвостой овцы [10], ассимилированной породой ромни-марш в ходе выведения печорской полутонкорунной породной группы. Поглотительное скрещивание на улучшающую породу и селекция по целевым стандартам полутонкорунных мясошерстных пород в типе ромни-марш

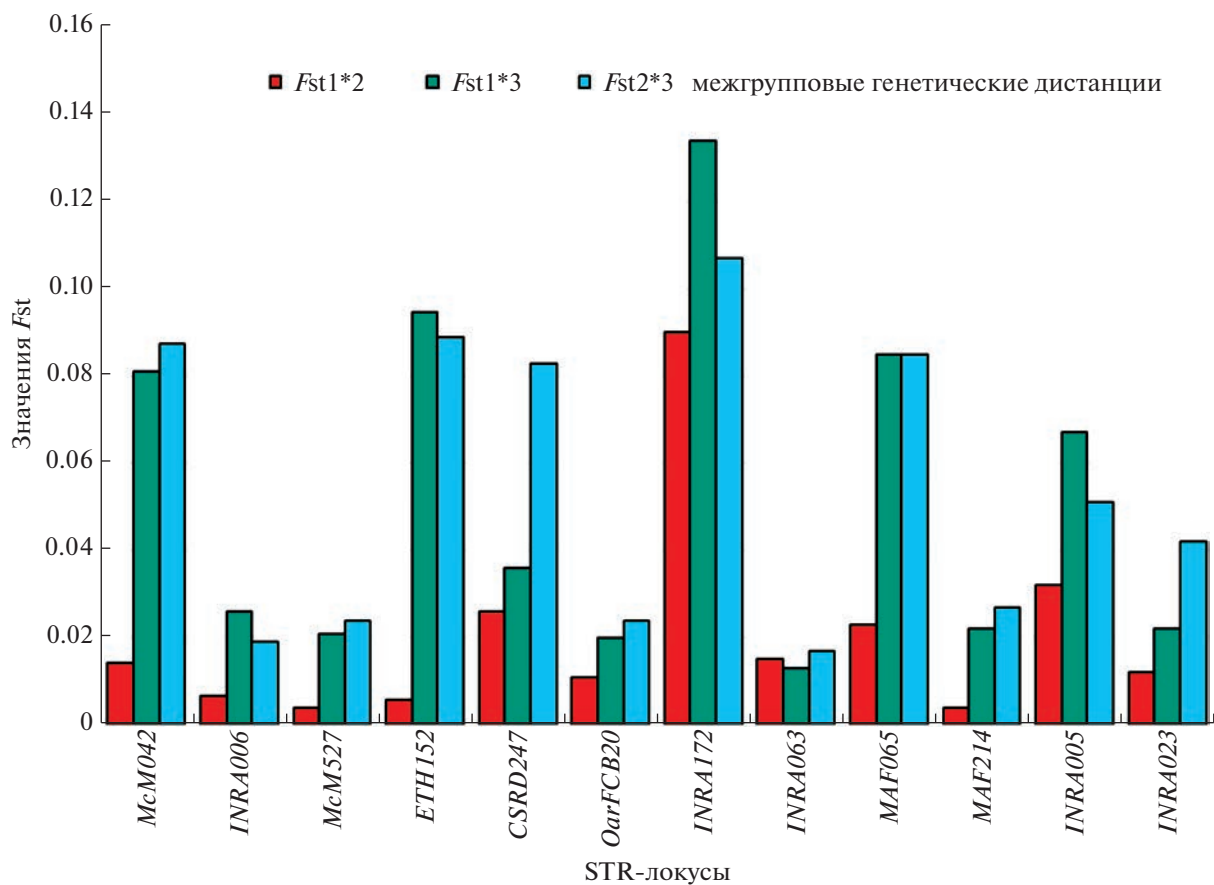
Таблица 2. Характеристика групп овец по генетико-популяционным показателям

Показатель	Средние по группам					
	X_1	$\pm Sx_1$	X_2	$\pm Sx_2$	X_3	$\pm Sx_3$
N	6.8	0.58	7.6	0.62	6.4	0.57
N_a	4.9	0.36	5.1	0.19	4.7	0.43
N_e	4.077	0.322	4.321	0.356	3.655	0.436
N_{PI}	0.027	0.017	0.110	0.033	0.208	0.046
I_{Sh}	1.553	0.073	1.624	0.075	1.419	0.096
H_e	0.740	0.018	0.753	0.018	0.690	0.029
F_{is}	-0.050	0.013	-0.033	0.020	-0.023	0.025
Между группами	1*2		1*3		2*3	
F_{st}	0.012	0.002	0.052	0.011	0.055	0.010
$C.V_{Fst}$	58.7		75.8		61.0	

Примечание. X_k – средние значения по 12-ти локусам STR в трех группах животных, $\pm Sx_k$ – стандартные ошибки средних по группам.

привели к тому, что печорские полутонкорунные овцы по STR-маркерам, видимо, утратили генный пул короткохвостой аборигенной овцы, ранее широко распространенной на территории Северной

Европы. По устным свидетельствам старожилів приполярных районов, исчезнувшая северная аборигенная овца обладала неприхотливостью, жизнеспособностью, скороспелостью, плодовитостью

**Рис. 1.** Генетические дистанции по Райту между группами овец по 12-ти STR-локусам (F_{st}).

и полиэстричностью – ценнейшими качествами, которых остро не достает современным культурным породам.

Работа выполнена при поддержке Министерства высшего образования и науки РФ в рамках Государственного задания 02106411598-8-4.4.4.

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. Ульянов А.Н., Куликова А.Я., Ерохин А.И. Состояние и резервы породного генофонда овцеводства России // Овцы, козы, шерстяное дело. 2012. № 1. С. 4–11.
2. Матюков В.С., Жариков Я.А., Канева Л.А. Генетическая структура печорской популяции полутонкорунных овец по аллелям STR-локусов // Достиж. науки и техники АПК. 2022. Т. 36. № 3. С. 91–96. https://doi.org/10.53859/02352451_2022_36_3_91
3. Чирвинский Н.П., Елагин В.Д. Разводимые в России породы грубошерстных овец // Избранные соч. Чирвинский Н.П. М.: Изд. сельхоз лит., 1951. Т. 2. С. 11–242.
4. COgDIS Sheep. Набор реагентов для мультиплексного анализа 12-ти микросателлитных маркеров и локуса амелогенина овец COgDIS Sheep. Инструкция пользователя. URL: <https://gordiz.ru/wp-content/uploads/2021/05/instrukczija-cordis-sheep-140521.pdf> (дата обращения: 20.01.2022).
5. Кузнецов В.М. F-статистики Райта: оценка и интерпретация // Пробл. биол. продуктивных животных. 2014. № 4. С. 80–104.
6. Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-anupdate // Bioinformatics. 2012. V. 28. P. 2537–2539.
7. Msalya G., Kim E.S., Laisser E.L. et al. Determination of genetic structure and signatures of selection in three strains of Tanzania shorthorn zebu, boran and friesian cattle by genome-wide SNP analyses. // PLoS One. 2017. V. 12. № 1. P. 88. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171088>
8. Upadhyay M.R., Chen W., Lenstra J.A. et al. Genetic origin, admixture and population history of aurochs (*Bos primigenius*) and primitive European cattle // Heredity (Edinb). 2017. V. 118. № 2. P. 169–176. <https://doi.org/10.1038/hdy.2016.79>
9. Te Pas M.F.W., Madsen J., Calus M.P.L. et al. The importance of endophenotypes to evaluate the relationship between genotype and external phenotype // Int. J. Mol. Sci. 2017. V. 18. № 2. P. 472. <https://doi.org/10.3390/ijms18020472>
10. Жариков Я.А., Матюков В.С., Канева Л.А. Биологические и продуктивные особенности овец разных генотипов в Арктической зоне разведения. Сыктывкар, 2022. 154 с.
11. Вениаминов А.А. Породы овец мира. М.: Колос, 1984. 207 с.
12. Епанешников Д.А. Разведение полутонкорунных овец на Крайнем севере Коми АССР. Дис. ... канд. с.-х. наук. М.: Всесоюзный НИИ животноводства, 1953. 105 с.
13. Лазовский А.А. К вопросу о происхождении романовских овец // Генетика. 1982. Т. 18. № 12. С. 2036–2043.
14. Марзанов Н.С., Девришов Д.А., Марзанова С.Н. и др. Оценка овец романовской породы по различным типам иммунологических и генетических маркеров. М.: МВА им. К.И. Скрябина, 2021. 154 с.

Analysis of the Allelofund of Semi-Fine-Wool Sheep of the Pechora Population Using STR Markers

V. S. Matyukov^a, *, Ya. A. Zharikov^a, and L. A. Kaneva^a

^aInstitute of Agrobiotechnologies of the Federal Research Center of the Komi, Science Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, 167023 Russia

*e-mail: nipti38@mail.ru

The polymorphism of microsatellites was studied in semi-fine-wool sheep in the Romney-Marsh type of the Pechora population, bred with the participation of the now extinct northern short-tailed aboriginal sheep. Evaluation of the differentiation of groups of sheep of different genesis by the frequencies of STR loci genes, identification of private alleles and cluster analysis did not allow to obtain information about the allelofund of the aboriginal sheep. Absorption crossing into an improved breed with the selection of a crossbred population according to the target standards of semi-fine-wool breeds, apparently, led to the loss of the gene pool characteristic of the northern aboriginal sheep by the Pechora sheep.

Keywords: frequency of alleles, heterozygosity, private alleles, subpopulation, allelofund, short-tailed, semi-fine-wool, sheep.

УДК 57.088;575

ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПО ВЫЯВЛЕНИЮ РЕПЕРТУАРОВ ГАММА-ЦЕПИ Т-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ У ПАЦИЕНТОВ С ЮВЕНИЛЬНОЙ ФОРМОЙ ШИЗОФРЕНИИ

© 2023 г. М. Ю. Плотникова^{1, 2, *}, А. Д. Патрикеев¹, А. Ю. Левченко⁴, О. Ю. Федоренко⁵,
Т. В. Андреева^{1, 2, 3}, Е. И. Рогаев^{1, 2, 3}

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

²Центр генетики и наук о жизни, Университет “Сириус”, Краснодарский край, пгт. Сириус, 354340 Россия

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

⁴Институт трансляционной биомедицины Санкт-Петербургского государственного университета,
Санкт-Петербург, 199034 Россия

⁵Научно-исследовательский институт психического здоровья Томского национального
исследовательского медицинского центра, Томск, 634014 Россия

*e-mail: plotnikova.m.u.1996@gmail.com

Поступила в редакцию 12.12.2022 г.

После доработки 09.03.2023 г.

Принята к публикации 10.03.2023 г.

Нарушение функции иммунной системы и нейровоспаление, предполагается, могут играть роль в патогенезе шизофрении. При этом роль адаптивного иммунитета на сегодняшний день мало изучена. Данная работа является пилотным исследованием в выявлении разнообразия репертуаров Т-клеточных рецепторов гамма-цепи при шизофрении. В рамках проведенного исследования была апробирована методология выявления иммунных репертуаров Т-клеточных рецепторов (ТКР) гамма-цепи с использованием глубокого секвенирования, на примере нескольких пациентов с ювенильной формой шизофрении. Были выявлены профили клонотипов, оценено их разнообразие и предполагаемые отличия в структуре CDR3-региона TRG (T Cell Receptor Gamma Locus) функциональных клонов у пациентов с ювенильной формой шизофрении по сравнению с контрольными индивидами. Данный подход представляется перспективным для дальнейшего изучения изменений в адаптивной иммунной системе на репрезентативных когортах больных с различными формами шизофрении.

Ключевые слова: шизофрения, NGS, Т-клеточные рецепторы, иммуногенетические факторы, CDR3 TRG, клонотипы.

DOI: 10.31857/S0016675823070081, **EDN:** QPJHMR

Шизофрения — эндогенное полиморфное психическое расстройство, частота встречаемости которого составляет около 1% во всем мире [1]. Данное заболевание характеризуется когнитивными, поведенческими и эмоциональными нарушениями [2]. Ранее проведенные исследования показывают, что воспаление в центральной нервной системе (ЦНС) и нарушения систем иммунного ответа могут играть важную роль в патогенезе шизофрении. Эта гипотеза подтверждается иммуногенетическими данными последних лет, а также повышенной частотой аутоиммунных заболеваний у пациентов с шизофренией [3–7]. Современные технологии NGS-секвенирования открывают новые возможности для изучения иммуногенетических факторов при развитии шизофрении и других нейропсихических патологий. Особый инте-

рес представляет собой изучение гамма-дельта Т-клеточных рецепторов (ТКР), которые представляют минорную фракцию Т-клеток (5–10%), и на данный момент являются малоизученными. При этом, гамма-дельта Т-клетки могут играть значительную регуляторную роль в адаптивном иммунитете у пациентов с ювенильной формой шизофрении.

В исследовании использовали 17 образцов ДНК, выделенной из периферической крови, включающих девять пациентов с ювенильной формой шизофрении и восемь здоровых индивидов контрольной группы до 20 лет (табл. 1). Исследование было одобрено локальным этическим комитетом Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН (№ 5 от 01.12.2016 г.) и локальным

Таблица 1. Список образцов ДНК, выделенных из периферической крови пациентов с шизофренией и здоровых индивидов контрольной группы

№	Диагноз	Возраст	Возраст манифестации заболевания	Пол	Кол-во прочтений	Разнообразие клонотипов
1	Здоровый	19	—	Ж	227007	7103
2	То же	20	—	М	145520	7380
3	«	20	—	Ж	103268	6615
4	«	18	—	Ж	501141	3902
5	«	18	—	М	220172	3721
6	«	18	—	Ж	247434	3920
7	«	20	—	М	319309	5027
8	«	20	—	М	379338	4358
9	Шизофрения	19	13	Ж	199163	4707
10	То же	19	17	Ж	214393	9287
11	«	17	12	М	205314	20204
12	«	20	17	М	231099	7891
13	«	19	15	М	263702	8061
14	«	18	17	М	179660	12040
15	«	18	15	М	345709	4712
16	«	19	18	Ж	155511	4380
17	«	20	14	Ж	256086	5919

этическим комитетом НИИ психического здоровья Томского НИМЦ (протокол № 63/7.2014).

Образцы ДНК были выделены из периферической крови набором QIAamp DNA Blood Midi Kit (Qiagen). Оценка качества и количества выделенной ДНК была проведена с использованием приборов: Nano Drop One C (Thermo Scientific) и Qubit 4.0 (Invitrogen). Мультиплексную ПЦР с олигонуклеотидами на CDR3-регионы TRG (T Cell Receptor Gamma Locus) проводили на готовом наборе реагентов PicoMaxx High Fidelity PCR System (Agilent). Синтез олигонуклеотидов TRG, опубликованных ранее в статьях [8, 9], был произведен компанией “Евроген”. Амплификацию проводили по протоколу, опубликованному ранее в статье [9]. Качественно ПЦР-продукты были проверены методом гель-электрофореза в 2%-ном агарозном геле. Далее была проведена дополнительная очистка ПЦР-продуктов с помощью набора QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Приготовление NGS-библиотек для глубокого секвенирования осуществлялось с помощью набора TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit (Illumina). Молярность NGS-библиотек T-клеточных рецепторов гамма-цепи оценивали методом ПЦР в реальном времени для каждой библиотеки с использованием набора KAPA Library Quantification Kit (KAPA Biosystems). Оценку качества приготовленных библиотек осуществляли с помощью наборов DNA High Sensitivity Chip (Agilent) и High Sensitivity D5000 (Agilent) на приборах Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent) и

TapeStation 4150 (Agilent) соответственно. NGS-библиотеки были просеквенированы на платформе MiSeq Illumina (2 × 250) и проанализированы с использованием программ MiXCR и VDJtools.

Из исходных прочтений в формате FASTQ для каждого образца были получены репертуары T-клеточных рецепторов. Первым шагом с помощью программы MiXCR [10] исходные данные в формате FASTQ были выровнены на референсные последовательности генов V, D, J и C-регионов T-клеточных рецепторов человека и получены репертуары CDR3 в табличном виде. Для дальнейшей предобработки и первичного анализа был использован пакет программ VDJtools [11].

Полученные репертуары были скорректированы с помощью программы VDJtools Correct для устранения ошибочных клонотипов: были объединены клонотипы, последовательности которых отличались двумя и менее нуклеотидами, и отношение частоты редкого варианта клонотипа к частоте было менее 0.05. Далее, с помощью программы VDJtools Decontaminate с параметрами по умолчанию, была проведена деконтаминация полученных на предыдущем шаге репертуаров. С помощью программы VDJtools FilterNonFunctional были отфильтрованы нефункциональные клонотипы (клонотипы, в последовательности которых встречаются стоп-кодона или сдвиги рамки считывания).

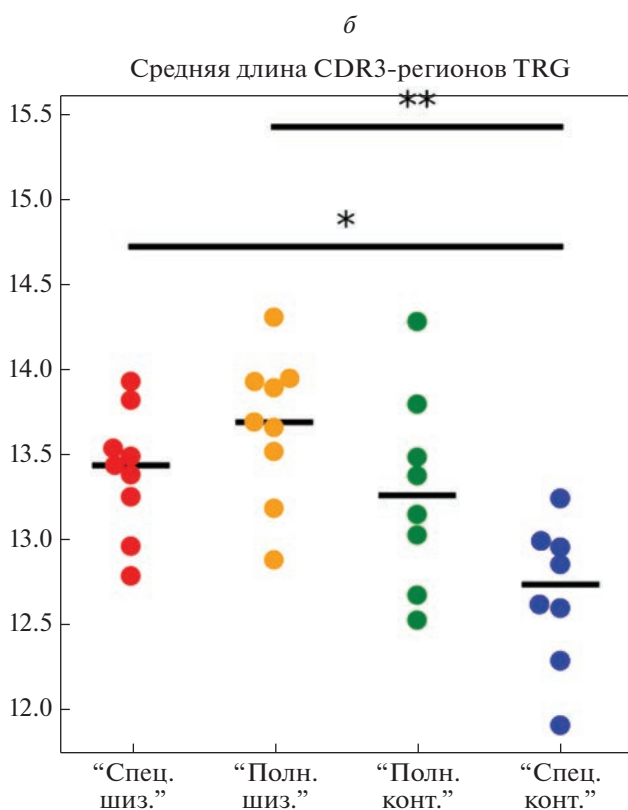
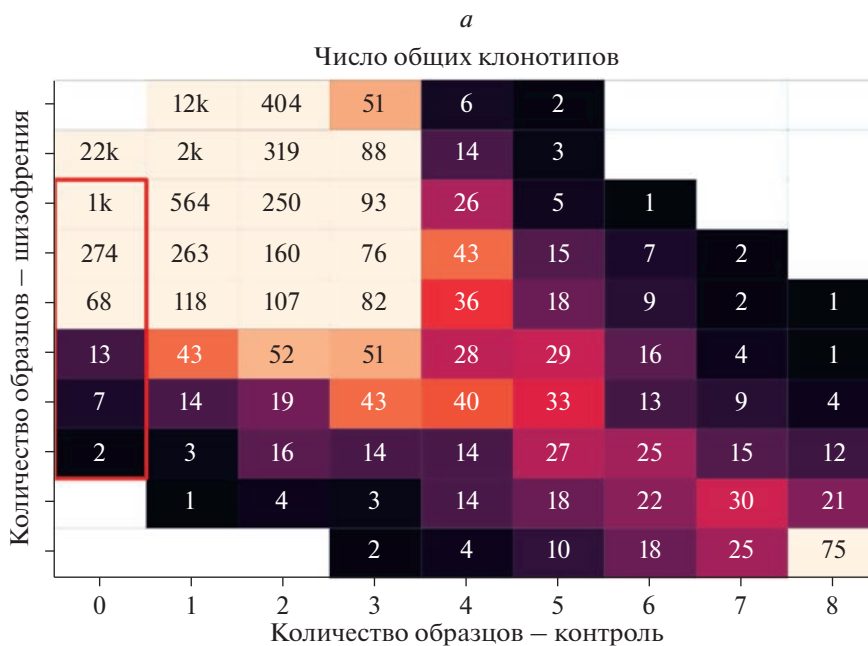


Рис. 1. Результаты сравнительного анализа TRG-репертуаров пациентов с ювенильной шизофренией и контрольной группы здоровых индивидов. *a* – значения в матрице соответствуют числу уникальных клонотипов, общих для образцов из группы больных шизофренией и из контрольной группы (количество образцов указано на соответствующей оси). Были отобраны клонотипы (в красной рамке, “Спец. шиз.”), которые встречаются как минимум у двоих пациентов с шизофренией, но не встречающихся в контрольной группе. *б* – сравнительный анализ значений взвешенной средней длины CDR3 (количество аминокислот)-регионов TRG у пациентов с шизофренией и контрольной группой. Для анализа был использован тест Крускала с поправкой Данна. Были отобраны клонотипы “Спец. шиз.”, которые встречаются как минимум у двоих пациентов с шизофренией, но не встречаются в контрольной группе. Аналогичным образом были отобраны клонотипы, специфичные для здоровых индивидов “Спец. конт.”. Свойства полных репертуаров обозначены как “Полн. шиз.”, “Полн. конт.”; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

При расчете базовых статистик (таких как средняя частота клонотипов, средняя длина последовательности CDR3 и других), а также метрик разнообразия репертуаров (индекс Шеннона–Винера, нормализованный на размер репертуара, D50 и других) из исходных репертуаров последовательно выбирались случайные подмножества из 103268 прочтений (это число было выбрано как наименьшее из числа прочтений среди всех репертуаров, а именно для образца № 3).

Последующее сравнение свойств репертуаров (включая анализ их физико-химических свойств) в группе больных и здоровых, а также регрессионный анализ свойств репертуаров относительно возраста и длительности заболевания был проведен с помощью разработанных нами скриптов Python 3. При сравнении свойств репертуаров между группами больных и здоровых использовался *U*-критерий Манна–Уитни.

Для анализа физико-химических свойств репертуаров и сравнения в группах больных и здоровых использовался подход аналогичный тому, что изложен в статье [9]. Так как сравнение полных репертуаров не показало значимых отличий между группами, то мы предположили, что отличия могут быть в субрепертуарах (подмножествах клонотипов), которые специфичны для группы больных или для группы здоровых. Для этого были отобраны только аминокислотные последовательности CDR3, которые встречаются хотя бы в двух образцах из группы больных шизофренией, но не встречаются в контрольной группе (рис. 1,а). Цель данного подхода – выявить наборы клонотипов, специфичных для одной из групп (группа больных шизофренией). В основе выбранного подхода реализованы следующие идеи: 1) клонотипы, сходные по ряду физико-химических свойств, могут определять их специфичность к сходным антигенам; 2) свойства таких “кластеров” клонотипов с общими физико-химическими свойствами будут наиболее выражены в субрепертуарах, характерных только для одной из групп в сравнении (“Спец.”): для этого из полных репертуаров образцов каждой группы были выделены только те клонотипы, которые не встречаются во второй группе и при этом общие хотя бы для двух образцов из первой группы. Таким образом, для свойств, значимо отличающихся между группами больных и здоровых, можно определить пороговое значение (например, среднее для группы “Спец. шиз.”), которое можно использовать как один из маркеров болезни.

Таким образом, получены репертуары CDR3-регионов Т-клеточных рецепторов гамма-цепи 17 индивидов, из которых девять являются больными шизофренией. Количество прочтений для функциональных клонотипов в полученных репертуарах составило $246\,696 \pm 96\,098$, при этом репертуары содержат 7013 ± 4081 клонотипов (среднее \pm стандартное отклонение). Данные по коли-

честву прочтений и клонотипов по каждому индивиду приведены в табл. 1. Всего полученные репертуары содержат 73355 уникальных клонотипов, из которых 9789 являются публичными (встречаются как минимум у двух образцов). Доминирующим сегментом во всех образцах для Топ-100 клонотипов в полученных репертуарах является сегмент TRGV9, доля которого составляет от 56 до 92%, что согласуется с литературными данными [12].

Статистически значимая разница наблюдается в увеличении средней длины CDR3-регионов функциональных TRG в группах шизофрения-специфичных клонотипов по сравнению с контрольной группой (рис. 1,б). Для валидации полученных результатов и поиска новых иммуногенетических изменений в репертуарах Т-клеточных рецепторов пациентов с шизофренией и другими нейropsychическими патологиями необходимо проведение дополнительных исследований на расширенных выборках. Дальнейшие исследования в этой области могут пролить свет на изменение адаптивного иммунитета у пациентов с шизофренией.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (номер гранта 19-75-30039). Авторы выражают благодарность Светлане Александровне Ивановой за предоставление коллекции образцов периферической крови пациентов с шизофренией и контрольной группы здоровых индивидов.

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. *Perälä J., Suvisaari J., Saarni S.I. et al.* Lifetime prevalence of psychotic and bipolar I disorders in a general population // Arch. Gen. Psychiatry. 2007. V. 64. № 1. P. 19–28.
<https://doi.org/10.1001/ARCHPSYC.64.1.19>
2. *Vallée A.* Neuroinflammation in Schizophrenia: The key role of the WNT/ β -catenin pathway // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. № 5.
<https://doi.org/10.3390/IJMS23052810>
3. *Ushakov V.L., Malashenkova I.K., Kostyuk G.P. et al.* The relationship between inflammation, cognitive disorders and neuroimaging data in schizophrenia // Zh. Nevrol. i Psih. im. S.S. Korsakova. 2020. V. 120. № 11. P. 70–78.
<https://doi.org/10.17116/JNEVRO202012011170>

4. Mikocziova I., Greiff V., Sollid L.M. Immunoglobulin germline gene variation and its impact on human disease // *Genes Immun.* 2021. V. 22. № 4. P. 205–217. <https://doi.org/10.1038/S41435-021-00145-5>
5. Uptegrove R., Manzanares-Teson N., Barnes N.M. Cytokine function in medication-naive first episode psychosis: A systematic review and meta-analysis // *Schizophr. Res. Elsevier.* 2014. V. 155. № 1–3. P. 101–108. <https://doi.org/10.1016/J.SCHRES.2014.03.005>
6. Fernandes B.S., Steiner J., Bernstein H.G. et al. C-reactive protein is increased in schizophrenia but is not altered by antipsychotics: Meta-analysis and implications // *Mol. Psychiatry.* 2015. V. 21. № 4. P. 554–564. <https://doi.org/10.1038/MP.2015.87>
7. Rodrigues-Amorim D., Rivera-Baltanás T., Spuch C. et al. Cytokines dysregulation in schizophrenia: A systematic review of psychoneuroimmune relationship // *Schizophr. Res. Elsevier.* 2018. V. 197. P. 19–33. <https://doi.org/10.1016/J.SCHRES.2017.11.023>
8. Langerak A.W., Groenen P.J.T.A., Brüggemann M. et al. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations // *Leukemia.* 2012. V. 26. № 10. P. 2159–2171. <https://doi.org/10.1038/LEU.2012.246>
9. Aliseychik M., Patrikeev A., Gusev F. et al. Dissection of the human T-cell receptor γ gene repertoire in the brain and peripheral blood identifies age- and Alzheimer's disease-associated clonotype profiles // *Front. Immunol.* 2020. V. 11. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.00012/PDF>
10. Bolotin D.A., Poslavsky S., Mitrophanov I. et al. MiXCR: Software for comprehensive adaptive immunity profiling // *Nat. Methods.* 2015. V. 12. № 5. P. 380–381. <https://doi.org/10.1038/NMETH.3364>
11. Shugay M., Bagaev D., Turchaninova M.A. et al. VDJtools: Unifying post-analysis of T-cell receptor repertoires // *PLoS Comput. Biol.* 2015. V. 11. № 11. P. e1004503. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1004503>
12. Ravens S., Schultze-Florey C., Raha S. et al. Human $\gamma\delta$ T cells are quickly reconstituted after stem-cell transplantation and show adaptive clonal expansion in response to viral infection // *Nat. Immunol.* 2017. V. 18. № 4. P. 393–401. <https://doi.org/10.1038/NI.3686>

Pilot Study to Detect the Repertoires of T-Cell Receptor Gamma Chains in Patients with Juvenile Schizophrenia

**M. Yu. Plotnikova^{a, b, *}, A. D. Patrikeev^a, A. Yu. Levchenko^d, O. Yu. Fedorenko^e,
T. V. Andreeva^{a, b, c}, and E. I. Rogaev^{a, b, c}**

^aVavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

^bCenter for Genetics and Life Sciences, “Sirius” University, Krasnodarskiy kray, p. Sirius, 354340 Russia

^cLomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

^dInstitute of Translational Biomedicine, Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, 199034 Russia

^eMental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634014 Russia

*e-mail: plotnikova.m.u.1996@gmail.com

Disfunction of immune system and neuroinflammation may play a role in pathogenesis of schizophrenia. The role of adaptive immune system has to be elucidated. We present a pilot study to test the methodology of profiling of immune repertoires of the TCR gamma chain by deep sequencing using several patients with juvenile schizophrenia and unaffected control subjects. The clonotype profiles were revealed and their diversity and presumable differences in structure of CDR3 TRG region of functional clones in juvenile schizophrenia and controls were estimated. This approach is perspective for further comprehensive study of changes in adaptive immune system in representative cohorts of patients with different forms of schizophrenia.

Keywords: schizophrenia, NGS, T-cell receptors, immunogenetic factors, CDR3 TRG, clonotypes.