

Том 60, Номер 3

ISSN 0016-6758

Март 2024



# ГЕНЕТИКА



НАУКА

— 1727 —

# СОДЕРЖАНИЕ

Том 60, номер 3, 2024

## Обзорные и теоретические статьи

Многолисточковость люцерны: ее причины и влияние

Н. М. Барсуков, Е. С. Леонова, И. С. Зайцев

3

## Генетика растений

Цитогеография полиплоидного комплекса *Bassia prostrata* s. l. (Chenopodiaceae) по данным анализа размера генома и PCR-RFLP хпДНК

Т. В. Панкова, М. Н. Ломоносова, О. В. Ваулин, А. Ю. Королюк, Е. А. Королюк,  
Д. Н. Шауло, Б. Осмонали

13

Изменчивость генетического разнообразия ярового ячменя по гордеинкодирующим локусам за 40-летний период научной селекции в Красноярском крае

Н. А. Сурин, Л. Н. Шевцова, Н. С. Козулина, Ю. М. Борисов

27

## Генетика животных

Структура гибридной зоны между близкими видами обыкновенных полевых *Microtus arvalis* и *M. obscurus*: влияние генетических факторов и ландшафтно-географических условий

Л. А. Лавренченко, А. Р. Громов, А. А. Мартынов, Д. С. Костин, В. А. Комарова, Д. М. Кривоногов,  
Е. В. Черепанова

35

Структура субпопуляций айрширского, голштинского и джерсейского скота южных регионов России по *CSN2* (rs43703011), *CSN3* (rs43703016) и микросателлитным локусам (*BM1818*, *BM1824*, *BM2113*, *ETH10*, *ETH225*, *ETH3*, *INRA023*, *SPS115*, *TGLA126*, *TGLA122*, *TGLA227*, *TGLA53*)

Н. В. Ковалюк, А. Е. Волченко, Е. В. Ширяева, Л. И. Якушева, Ю. Ю. Шахназарова

49

Полиморфизм микросателлитных локусов в популяциях кавказских скальных ящерич и его использование для оценки генетического разнообразия комплекса *Darevskia raddei*

Д. О. Одегов, А. А. Валяева, М. С. Аракелян, А. П. Рысков, В. И. Корчагин, И. А. Мартыросян

59

Сравнительный микросателлитный анализ зебувидного скота с породами *Bos taurus*

С. В. Бекетов, Г. Р. Свищева, В. П. Упелниек, С. А. Сенатор, С. Б. Кузнецов,  
Э. А. Николаева, Ю. А. Столповский

68

## Генетика человека

Исследование роли генов, участвующих в метаболизме гистамина, в развитии аллергических заболеваний дыхательных путей

О. Н. Савельева, А. С. Карунас, А. Р. Бикташева, А. О. Власова, И. М. Хидиятова,  
Э. И. Эткина, Э. К. Хуснутдинова

76

Поиски эпистатически взаимодействующих генетических вариантов, ассоциированных в составе биаллельных сочетаний с вазовагальными обмороками

Б. В. Титов, Н. А. Матвеева, Е. А. Базылева, А. В. Певзнер, О. О. Фаворова

85

Экзосомальные микроРНК-146а и микроРНК-424 как возможные предикторы ответа на терапию ингибиторами иммунных контрольных точек при светлоклеточной почечно-клеточной карциноме

Д. Д. Асадуллина, И. Р. Гилязова, Е. А. Иванова, С. М. Измайлова, Г. Р. Гилязова,  
В. Н. Павлов, Э. К. Хуснутдинова

94

## Краткие сообщения

Исследование связи между полиморфизмом гена окситоцинового рецептора, невзгодами детства и негативными симптомами шизофрении

Т. В. Лежсейко, В. А. Михайлова, М. В. Габаева, В. Е. Голимбет

104

Анализ генотипов гречиши, полученных на селективных средах с цинком *in vitro*, с помощью ISSR-маркеров

С. А. Боровая, А. Г. Клыков, Н. Г. Богинская

110



## МНОГОЛИСТОЧКОВость ЛЮЦЕРНЫ: ЕЕ ПРИЧИНЫ И ВЛИЯНИЕ

© 2024 г. Н. М. Барсуков<sup>1,2,\*</sup>, Е. С. Леонова<sup>1,2</sup>, И. С. Зайцев<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Федеральный научный центр кормопроизводства и агроэкологии им. В.Р. Вильямса, Московская область, Лобня, 141055 Россия

<sup>2</sup>Российский государственный аграрный университет — МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, 127434 Россия

\*e-mail: keeper@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.10.2023 г.

После доработки 31.10.2023 г.

Принята к публикации 02.11.2023 г.

Увеличение облиственности богатой белком люцерны (*Medicago*) возможно не только через селекцию на изменение размеров пластинки листа. Одни из первых сообщений об изучении явления формирования дополнительных листочков, названного впоследствии многолисточковостью, датируются тридцатыми годами XX в. В обзоре упомянуты основные статьи, связанные с изучением признака. Описано строение листа и собрана информация по корреляциям многолисточковости с высотой, междоузлиями, длиной дня, температурой. Указано влияние зародышевой плазмы и методик исследований на получение противоречивых данных. Рассмотрены изначально выдвинутые исследователями предположения об атавистическом характере проявления признака, а позднее и о наличии рецессивной мутации с двумя аддитивными генами, регулирующими экспрессию. Показаны методика нахождения индекса оценки экспрессии многолисточковости, предложенная Крейгом Шиффером, и подтверждения сильного характера наследования признака в классической селекции через рекуррентный отбор. В заключении собраны наиболее значимые гены и семейства генов, прямо или косвенно влияющие на проявление многолисточковости, среди которых *PALM1* и *KNOX*.

**Ключевые слова:** многолисточковость, *mf*, протеин, люцерна, облиственность, *PALM1*.

**DOI:** 10.31857/S0016675824030013 **EDN:** DQBTZC

Люцерна — один из лидеров по количеству продуцируемого недорогого протеина с отличным аминокислотным составом, превосходящим сорго-суданковые гибриды в 3 раза, а кукурузу в 2 [1, 2]. Она пригодна к возделыванию в высоких северных широтах с возможностью давать приемлемые урожаи и слабо поражаться болезнями [3]. Плохая приспособленность к влажным кислым почвам и краткосрочным затоплениям корректируется внедрением сортов, полученных благодаря сопряженной симбиотической растительно-микробной селекции с повышенной адаптивностью к абиотическим факторам [4–7]. Большие запасы азота, оставляемые культурой в почве, позволяют значительно сократить использование азотных удобрений для последующих культур и снизить затраты на производство [8].

Однако уровень белка люцерны подвержен сильной вариации [2, 9]. Агротехнические решения для его сохранения подразумевают уборку первого укоса на кормовые цели в фазу бутонизации — начало цветения, а также своевременную сушку [8–11]. Уровни многих аминокис-

лот, хлорофилла и флавоноидов, среди которых апигенин, лютеолин, кверцетин и мирицетин, в этот период в люцерне значительно выше, чем в фазу массового цветения культуры [9, 11, 12]. Поздняя заготовка приводит к сокращению листовой массы, содержащей большое количество белка, повышенному развитию стеблей, а также увеличению доли целлюлозы и лигнина [13–15]. Избыточная влажность в период сушки приводит к потерям хлорофилла, положительно коррелирующего с белком. Наибольшие его потери происходят в первые 12 ч физиологической сушки. Если в этот промежуток выпадают дожди, первый этап высушивания продлевается, и потери хлорофилла значительно увеличиваются [9, 11].

Одним из возможных селекционных решений по увеличению процентного соотношения показателя белка к уровню клетчатки, плохо сказывающейся на качестве корма, служит выявление и отбор растений с повышенной облиственностью для увеличения площади листовой поверхности [16]. Для этого надо отбирать растения с крупными листовыми пластинками или образцы с

дополнительными листочками на черешке, отличающиеся по количеству от дикого растения с тремя листочками [15, 17, 18].

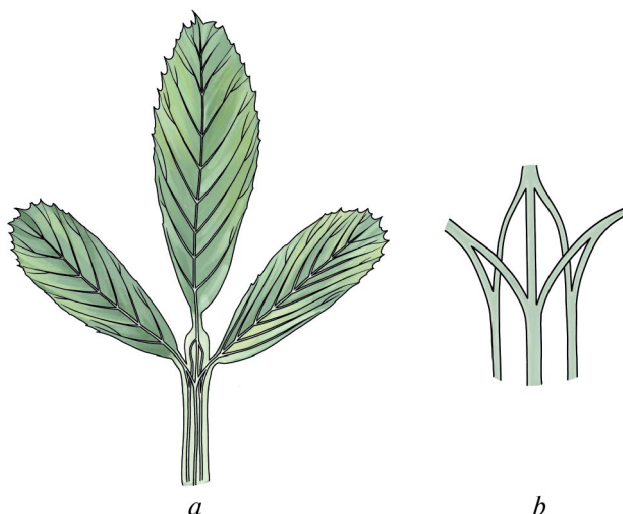
Цель исследования обзорной статьи заключается в изучении информации о причинах и последствиях появления многолисточковости у люцерны с точки зрения селекции и генетики с начала исследований признака, а также его результатов на момент публикации обзора.

## ИССЛЕДОВАНИЕ МНОГОЛИСТОЧКОВОСТИ

Наличие дополнительных листьев вызывается мутацией, проявляющейся путем увеличения количества листочков на черешке, по разным данным, от четырех—пяти, до десяти и более [19]; некоторые источники отмечают наиболее распространенными растения с пятью и семью листочками [20, 21]. Есть публикация, сообщающая о существовании образца, созданного в Болгарии, с рекордными 23—24 листочками на лист и приемлемой урожайностью [22]. Вероятность проявления признака многолисточковости, в случае если до этого его преобладание у образца не прослеживалось, может быть очень мала [23].

Одни из первых исследований этого признака за рубежом отсылают в университет Небраски, США. В 1938 г. исследователем Баудером (Bauder), в диссертационной работе, явление многолисточковости именовалось как “odd-leaf”. Выбрав из девяти генотипов, он, для изучения отобрал всего два, из-за низких показателей всхожести семян или низкого процента многолисточковых форм [24, 25]. Баудер предложил дисомный характер наследования для каждого из двух независимых доминантных факторов, при которых один замешан в роли ингибитора, а второй эпистатичен к другому [20, 24, 25]. Также Баудер изучал уровень облиственности среди 50 растений трехлисткового, а также 31 многолисточкового типа. Он установил, что в образцах, у которых многолисточковые листья представляли меньше половины всех листьев, сухое вещество практически не отличалось от растений с многолисточковостью более чем у 50% листьев [20, 24, 25].

Возможно, одним из первых упоминаний этого признака в СССР стала работа “Биолого-анатомическое исследование люцерны (*Medicago sativa* L.)” Е.А. Мокеевой от 1940 г. На рис. 1, созданном на основе иллюстрации из ее работы, изображен тройчатый лист с сосудами и жилками. Е.А. Мокеева указывала, что сосудистый



**Рис. 1.** Иллюстрация тройчатого листа, выполненная по рис. 12 из работы Е.А. Мокеевой [19, с. 26] *а* — общий план листа с сосудами и жилками; *б* — крупный план расхождения пучков боковых и верхнего листочков на второй и третьей ветвях соответственно.

пучок, выходящий из верхнего листочка, разделяется на три пучка, а именно центральный и боковые. Последние расходятся на два, где один из них сливается с центральным, а другой с боковым, формируя тем самым по всей длине общего черешка три сосудистых пучка [19].

Расхождение на три сосуда проводящего пучка в сочленении у верхнего листочка (рис. 1, *б*), как подметила автор, свидетельствует о допустимом формировании двух дополнительных листочков или лопастей, а у соединения боковых листьев возможно восстановление только одного листочка или лопасти. В подтверждение своих выводов исследователь привела наблюдения за многолисточковыми формами, часто обнаруживаемыми в периоды межсезонья при коротком световом дне, и предположила, что данный признак может быть проявлением атавизма. Мокеева утверждала, что проведенные опыты на сокращающемся световом дне на местной селекционной станции позволили получить растения как с увеличенными листовыми пластинками, так и с перистыми формами листьев, однако попытки отобрать из них образцы для исследований в местных условиях не дали результатов [19, с. 29, 113].

Американский исследователь Э. Бингхэм (E. Bingham) предположил, что многолисточковость в диплоидной люцерне находится под контролем как минимум трех генов: *multifoliata* (*mf*) — рецессивного, отвечающего за экспрес-

сию, и двух аддитивных, оказывающих влияние на характер проявления признака [20]. В другой своей работе он повторил опыты Моисеевой в климатической камере с низкими температурами и короткими периодами освещенности, где многолисточковых форм не обнаружил, однако отметил увеличение размера листовых пластинок [19, 20, 25, 27]. В статье Бингхэма 1966 г. появились данные, что черешки многолисточковых листьев имеют размер сосудистых пучков в 2 раза больше, чем обычные формы. Проявилось это за счет рассечения срединного пучка в шейке при появлении дополнительных листьев. Сосудистый рисунок листьев остался прежним и был сходен с другими бобовыми [28].

В 1969 г. появилось первое упоминание об обнаружении многолисточковости у гексаплоидной люцерны [29]. Сравнение обычных растений с мутантными по высоте в 1973 г. выявило противоречия. Длина междоузлий у обычных растений была меньше, чем у мутантных. Авторы посчитали, что данные признаки различаются из-за разной плотности посева [30]. В 1976 г. М. Брик (M. Brick) и соавт. сообщили, что полученные при скрещиваниях многолисточковые растения имели как длинные, так и короткие междоузлия, а корреляция между высотой растения и длиной междоузлий отсутствует [31].

В 1993 г. Н. Хуан (N. Juan) и соавт. подтвердили влияние короткого светового дня на увеличение среднего количества листочков и его значительное взаимодействие с уровнем экспрессии признака. Черешки многолисточковых листьев оказались тяжелее обычных, однако их размеры остались пропорциональными. У мутантных растений была выявлена связь с более длинными междоузлиями у образцов с низкой экспрессией признака. Повышенная экспрессия многолисточковости не сопровождалась снижением урожайности стеблевой массы [32].

В лаборатории селекции люцерны ФНЦ “ВИК им. В. Р. Вильямса” также изучают проявление многолисточковости у растений люцерны разных видов. На рис. 2 изображена вариация листьев, встречаемая на одном из опытных образцов, относящихся к люцерне изменчивой (*Medicago varia* Mart.), а на рис. 3 показаны листья с того же образца, но с представлением разной морфологии листа, проявляющейся на растении.

Группа исследователей из Белгорода утверждает, что растения с мутацией многоли-

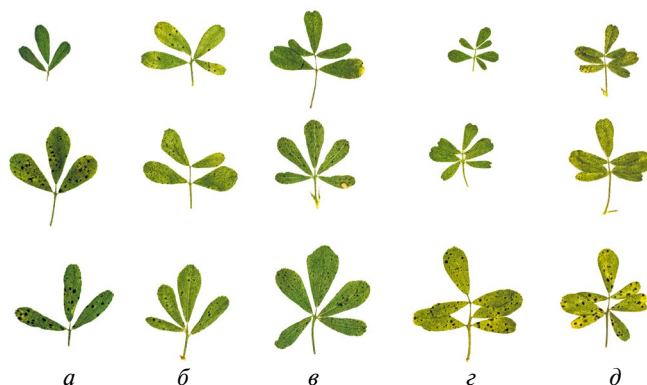


Рис. 2. Вариация листьев на одном из образцов лаборатории селекции люцерны: дикий тип — а (три листочка); многолисточковый — б, в, г, д (от четырех до семи листочков соответственно).

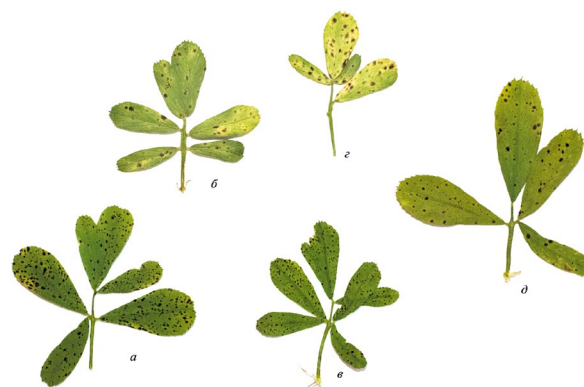


Рис. 3. Листья с разным строением: а, б — расщепление верхнего листочка; в — разнонаправленность боковых листочков; г — “потеря” бокового листа; д — расположение нескольких листочков на одном черешке. Вероятно, наличие бурой пятнистости на листьях обусловлено поздним их сбором, 31.08.2023 г.

сточковости имеют устойчивость к развитию листостебельных заболеваний, причем наиболее она выражена у образцов с антоциановой окраской и восковым налетом [33]. В другой своей работе они сообщают, что многолисточковые сортопопуляции показывают повышенный выход зеленой массы в условиях высокоплодородных почв и пониженный при возделывании на луговых экотопах [34].

В исследовании, изучающем использование маркеров для отбора растений, устойчивых к засухе, установили, что урожайность многолисточковых растений люцерны в среднем несколько выше, чем у обычных растений. Наиболее продуктивными оказались варианты с низкими побегами, продемонстрировавшие повышение продуктивной массы на 19–20% по сравнению с отобранной высокостебельной и начальной

популяцией. Наиболее низкая продуктивность была отмечена у растений с маркерами, отвечающими за отбор форм с поверхностным залеганием корневой системы и высокими стеблями [35].

По другим данным, есть риск, что многолисточковые формы растений будут менее устойчивы к условиям засушливых регионов в отсутствие искусственного орошения из-за повышенной потери воды ввиду большей площади листовой поверхности, подверженной транспирации [35]. Однако если засуха будет кратковременной и умеренной, уровень клетчатки, в результате ускоренного ферментативного осахаривания целлюлозы, может снизиться, а показатели пеквариваемости улучшиться [36].

Эффективность фотосинтеза у растений с признаками многолисточковости в порядке уменьшения листочков выглядит так:  $5 > 4 > 3 > 6 > 7 > 8 > 9$ . Лист с пятью листочками показывает значительное превосходство над трехлисточковым растением, демонстрируя максимальную общую эффективность фотосинтеза среди всех изученных образцов. В нем содержится наибольшее количество базальных тел, хлоропластов и крупных зерен крахмала [37].

## ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИЗНАКА

Люцерна с признаками многолисточковости может содержать в своей генетической базе внушительное разнообразие геномов из достаточно удаленных друг от друга источников [35]. В подтверждение сильного фактора наследования, предположения о котором выдвигались и ранее [25], научная группа из Аргентины отмечает, что при задействовании фенотипического рекуррентного отбора в течение четырех поколений, представленных 40 образцами, признак, отвечающий за многолисточковость, сохраняется в созданной популяции без существенного снижения генетического разнообразия, повышения уровня инбридинга и дрейфа генов, дополнительно с понижением части антипитательных веществ, а также увеличением общей питательной ценности биомассы [38]. Схожие данные получила и российская исследовательская группа, применив три цикла рекуррентного отбора [33].

Увеличение количества листьев из-за мутации многолисточковости может повышать уровень белка и облиственности [23]. Если 60% растений и более в популяции люцерны будут содержать хотя бы один лист с признаком многолисточково-

сти, то их можно отнести к группе с высокой экспрессией признака с коммерческой точки зрения, указывает А. Одорицци (A. Odorizzi). Также он считает, ссылаясь на других авторов, что разные варианты оценки выраженности многолисточковости могут быть результатом противоречивых данных, публикуемых по этой тематике [39]. Нами была обнаружена только одна методика учета экспрессии признака, предложенная К. Шиффером (C. Sheaffer) с соавт. в 1995 г. Согласно ей каждому стеблю растения/растению присваивается оценка от 0 до 5 в зависимости от количества листьев с признаками многолисточковости, и подсчитывается индекс экспрессии признака MultiFoliate Index (MFI) – сумма произведений количества ( $N^*$ ) растений, относящихся к каждой оценке многолисточковости, разделенная на общее количество растений в популяции. Высокая экспрессия признака подразумевает нахождение в диапазоне от 2.8 и 3 до 3.8, умеренная – от 2 до 3, низкая – 1.4–2.4 [21].

Из-за тетраплоидности генома аллогамной люцерны со сложным морфогенезом листьев, его основу не могли получить длительное время [23, 40]. В мае 2020 г. китайскими учеными была опубликована работа, в которой описывается сборка эталонного генома на уровне хромосом и одновременно протокол его редактирования с помощью системы Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein 9 (CRISPR/Cas9), позволяющей удалять конкретные участки заданных генов, что, в свою очередь, дает возможность создавать мутанты, способные к аллогамному скрещиванию без передачи потомству трансгенов [40, 41].

Китайские исследователи описывают один из значимых для формирования структуры листьев ген, именуемый *Palmate-like Pentafoliata1* (*PALMI*). Его мутация приводит к образованию пятилисточковых листьев, тогда как наиболее распространенные формы являются трехлисточковыми [15]. Ген *PALMI* отвечает за один из факторов транскрипции цинкового пальца – Cys(2) His(2) [15, 42, 43]. Факторы транскрипции являются крупной группой молекул, контролирующей большое количество генов-мишеней и вызывающей их подавление или активизацию [43, 44].

Детализированный анализ показал, что пара дополнительных примордиев листочков закладывается на ранней стадии формирования зачатка, тем самым свидетельствуя о том, что *PALMI* угнетает в проксимальной области листа дея-

тельность морфогенеза и требуется для поддержки развития трехлисточкового листа. Несмотря на то, что у мутантного растения *palm1* наблюдается увеличенное количество, почти в 3 раза, транскрипта *Single Leaflet 1 (SGL1)*, потеря которого приведет к формированию одиночной пластинки вместо тройчатой, на фоне дикого образца сдвоенный мутант *palm1sgl1* формирует не сложные, а простые листья. По данным исследователей это свидетельствует о том, что *SGL1* подвержен эпистатическому взаимодействию по отношению к *PALM1*, а дополнительные листочки, сформированные под воздействием *palm1*, образованы увеличением деятельности морфогенеза боковых створок примордия [42, 45].

Мутирование хотя бы одного из четырех идентифицированных аллелей *MsPALM1* (*Ms* – приставка к генам из *Medicago sativa*), которые имеют одинаковый экзон, может привести к формированию листа с пятью листочками. У растений *palm1* все четыре аллеля были мутированы. Несколько исследуемых мутантов *palm1* были идентифицированы как химерные [40]. В публикации 2023 г. говорится об обнаружении мутации, приводящей к образованию семилисточковых листьев. Она превращает глутамин 15 транскрипционного фактора *PALM1* в аргинин. В полевых условиях эта доминантная мутация в *PALM1* приводит к значительному повышению уровней облиственности и белка, а также снижению нейтрально-детергентной клетчатки [46].

Сделано предположение, что многолисточковость имеет связь с выраженностью работы генов *Knotted-like Homeobox (KNOX)*, отвечающих за развитие морфогенеза и меристем сложных листьев растений, ввиду их повышенной экспрессии у многолисточковых образцов. Возможно, данные наблюдения можно использовать как маркер многолисточковости [23, 47–50]. *Homeobox* – семейство генов, имеющее общий элемент последовательности ДНК, открытое в 1983 г. [51]. Нарушение работы этих генов в клетках зародыша листа приводит к формированию листьев с выраженными лопастями или зубинами [52]. У люцерны посевной (*Medicago sativa* L.), как и других бобовых, относящихся к Inverted Repeat Lacking Clade (IRLC), в зоне зарождения листьев *KNOX* находятся в состоянии подавленности, считается что их роль заменяет *SGL1*, *Floricaula (FLO)*, *Lfy (LFY)* и другие ортологи [45, 53–55]. *SGL1*, возможно, оказывает влияние на регуляцию параллельных путей с

*KNOX* в комплексном развитии, так как постоянная его экспрессия функционально не равнозначна *KNOX* [45]. Данные о том, экспрессируется ли *KNOX* у растений из IRLC, противоречивы [2, 53, 56]. Высказывается предположение также и о влиянии *PALM1* на морфогенетические процессы, чувствительные к работе *KNOX* [42].

Была опубликована научная работа, посвященная изучению генов *SQUAMOSA promoter-binding Protein-Like (SPL)* на уровне всего генома, отвечающих за регуляцию признаков в растениях и их адаптацию к абиотическому стрессу, а также микроРНК 156 (*miR 156*), ответственной за посттранскрипционную регуляцию некоторых *SPL*. Исследователи пришли к выводам, что транскрипты *MsSPL08*, улучшающие адаптационные условия люцерны в условиях засухи и засоления, были значительно подавлены в многолисточковой люцерне, а *MsSPL08*, нацеленный на *miR156*, играет роль в формировании растений с дополнительными листочками и способствует образованию ветвей [43]. В публикации 2023 г. установили, что *MsSPL* отвечают на стрессы, связанные с засухой, засолением и уровнем метилжасмоната, а также что их белки локализованы в ядре [57].

Группа исследователей из Аргентины и Франции во время поиска доминантных мутаций с просматриваемым фенотипом у растений, полученных при помощи *Transposable element of tobacco (Nicotiana tabacum) cell type 1 (Tnt1)*, обнаружила мутантную форму растения люцерны с многолисточковыми листьями разной морфологии [43, 58]. Количество листочков в образце варьировало от трех до семи. Сравнение нового растения с родительской формой показало преимущество первого над вторым по соотношению листьев к стеблям. Особое внимание привлек тот факт, что у половины цветков многолисточкового образца с мутацией обнаружено увеличенное количество лепестков. По заявлению исследователей на 2021 г., это является первым упоминанием доминантной мутации, отвечающей за развитие многолисточковости, и новых возможностей для задействования ретротранспозона *Tnt1* в поисках подобных типов мутаций у полиплоидных видов [58]. Анализ фланкирующих последовательностей *Tnt1* в растении с мутацией, а также его потомстве, свидетельствовал о том, что мутация многолисточковости локализована в хромосоме 3.4 с геном *Nitrogen Assimilation Control protein 39 (MsNAC39)*, который может быть ответственным за контроль онтогенеза ви-



ду родственности с NAC-подобными белками и генами *Cup-Shaped Cotyledon 1 (CUC1)*, *CUC2* у *Arabidopsis thaliana*, участвующих в формировании листьев и цветков [58–60]. Ген *CUC2*, при развитии листового края, содействует формированию точек сближения транспортера оттока ауксина Pin-Formed (PIN1), что приводит к максимальным концентрациям ауксина на зубчатых кончиках листа, который сильно угнетает *CUC2* на кончиках зубцов и способствует их росту [45].

Многие мутации люцерны, полученные как индуцированием мутагенов, так и естественным путем, являются рецессивными, их обнаружению способствовало изучение вида *Medicago truncatula* [40, 46, 58]. Гены *Revoluta (REV)* из семейства *class III HomeoDomain-leucine ZIPper (HD-ZIPIII)*, отвечающие за адаксиальное развитие клеток в листе, при неправильной экспрессии в *Medicago truncatula* формируют новую полярность и структуру сложных листьев вдоль дорсовентральной оси, а также, предположительно, участвуют в изменении уровня гомеостаза ауксина, изменяют сложный рисунок листьев [61].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования причин появления дополнительных листьев были начаты уже довольно давно. Начиная с изучения строения черешка сложного листа, наука дошла до анализа генома и выявления все новых, вероятно взаимосвязанных в работе аллелей. Активное исследование многолисточковости начато с 60-х гг. прошлого века. С 2000-х гг. активно изучается работа генов, дающих начало появлению таких растений.

При изучении строения листьев в 40-х гг. прошлого века было выдвинуто предположение о том, что дополнительные листочки являются проявлением атавизма. Обычно многолисточковость сопровождается наличием от 4 до 10–11 листочков, однако существует публикация о люцерне из Болгарии с впечатляющими 23–24 листочками. Исследование признака часто связано с подсчетом индекса многолисточковости MFI, предложенного К. Шиффером в 1995 г. Однако при работе с ним возникает проблема как интерпретировать значения, попадающие в межинтервальный промежуток категорий экспрессии.

Интерес представляет изучение и сравнение внутреннего строения различных по количеству листочков листьев. Несмотря на их разнообраз-

ное количество у люцерны, отдавать предпочтение в отборе образцам исключительно с самым большим количеством листочков из-за вероятных проблем с эффективностью фотосинтеза не всегда идеальное решение. Оптимальное количество листочков в качестве цели для классического отбора будет четыре–пять.

Особое внимание следует обратить на изучение влияния длины дня ввиду большого количества световых зон в нашей стране. Короткий световой день повышает экспрессию многолисточковости у растений с высоким индексом MFI. Связь высоты с мутантным признаком найдена у растений с длинными междоузлиями и низкой экспрессией многолисточковости. Противоречивые данные, рассмотренные в предыдущих статьях [14, 30, 31], по мнению Н. Хуана и К. Шиффера, связаны с изучением влияния конкретных зародышевых плазм, а не самого признака [30, 32]. Несмотря на это заключение, исследований о связи с высотой по-прежнему недостаточно, как и не хватает данных о влиянии мутантного признака на засухо- и морозоустойчивость, зимостойкость, устойчивость к заболеваниям, изменения площади листовых пластинок, параметры цветения, изменения подземной части. По многим из этих тем публикаций нет вовсе. Большинство исследований корреляций было выполнено более 20 лет назад. Необходимы дополнительные научные работы для подтверждения старых и обнаружения новых связей между признаками.

Во многих работах, затрагивающих проявление и изучение многолисточковости, долгое время сообщали только про *mf*-мутацию, предположение о которой выдвинул Э. Бингхэм в 1965 г. Она представлена как рецессивная и подверженная сильному фактору наследования, что позволяет выделить ее через использование классической селекции. Однако с развитием генетики и возможностей оборудования геном люцерны, сложность которого связана с тетраплоидной природой, удалось представить в сборке на уровне хромосом с учетом аллелей. Смогли обнаружить часть новых генов, прямо или косвенно принимающих участие в развитии признака многолисточковости. Изучением их работы и взаимодействия в роли проявления признака предстоит заниматься еще длительное время. Выделение потенциальных доноров многолисточковости можно осуществлять как многократным рекуррентным отбором и длительным инбридингом, так и через задействование

Таблица 1. Гены, участвующие в проявлении многолисточковости

| Гены, семейства генов                                                                     |                                 | Роль в растениях                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| полное название                                                                           | аббревиатура                    |                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| <i>Palmate-like Pentafoliata 1</i> или <i>PALM1 from Medicago sativa</i>                  | <i>PALM1</i> или <i>MsPALM1</i> | Отвечает за образование пятилисточковых и, по последним данным, семилисточковых листьев. Участвует в транскрипции цинкового пальца. Некоторые его рецессивные мутанты являлись химерными. Доминантная мутация повышает облиственность и уровень белка              |
| Knotted-like Homeobox                                                                     | KNOX                            | Отвечают за развитие сложных листьев у растений, не относящихся к IRLC. Данные о том, синтезируется ли <i>KNOX</i> у IRLC противоречивы, однако у многолисточковых растений их экспрессия повышена. Есть предложения использовать их как маркер многолисточковости |
| <i>SQUAMOSA promoter-binding Protein-Like</i> или <i>SPL from Medicago sativa type 08</i> | <i>SPL</i> или <i>MsSPL08</i>   | Регулируют адаптацию растений к абиотическим стрессам в условиях засухи и засоления. В многолисточковых растениях подавлены и оказывают влияние на образование листьев и ветвей                                                                                    |
| Nitrogen Assimilation Control protein 39 from <i>Medicago sativa</i>                      | MsNAC39                         | С этим геном локализована доминантная мутация многолисточковости в хромосоме 3.4, полученная с помощью ретротранспозона <i>Tnt1</i> . Вероятно, отвечает за контроль онтогенеза, включая вегетативный рост                                                         |
| Revoluta                                                                                  | REV                             | В результате неправильной экспрессии образуют новую структуру и полярность сложных листьев. Могут быть связаны с проявлением многолисточковости                                                                                                                    |

системы CRISPR/Cas9, а также ретротранспозона *Tnt1*. Гены, описанные в настоящей статье и имеющие связь с многолисточковостью, собраны в табл. 1 и сопровождаются краткой характеристикой их роли в растениях.

В настоящей работе мы хотели собрать некоторое представление о разных причинах, связанных с появлением дополнительных листочков и их влиянием на растения. По данной тематике написано не так много публикаций, большая часть из них относится к зарубежным авторам. Исследователей этого признака в России крайне мало, однако опыты в полевых условиях разных экотопов уже ведутся на юге страны [62, 63]. Мы надеемся, что научные работы по изучению многолисточковости найдут продолжение у исследователей нашей страны.

Авторы выражают благодарность Ю.Г. Шаповой за помощь в подготовке иллюстраций и Г.В. Степановой за консультации во время написания статьи.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № FGFW-2023-0002. Разработать биотехнологию управления процессом сопряженной селекции люцерно-ризобиальных симбиотических систем для создания сортов люцерны с высокой эффективностью симбиоза, обеспечивающей устойчи-

во высокую урожайность в различных условиях возделывания).

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. Пикун, П.Т. Люцерна и ее возможности. Минск: Беларус. навука, 2012. 310 с.
2. Di Giacomo E., Sestili F., Iannelli M. et al. Characterization of *KNOX* genes in *Medicago truncatula* // Plant Mol. Biol. 2008. V. 67. P. 135–150. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9307-7>
3. Донских Н.А. Устойчивость сортов люцерны изменчивой к болезням и вредителям при возделывании их в одновидовых и смешанных посевах // Вест. студ. науч. общества. 2017. Т. 8. № 1. С. 74–76.
4. Sheaffer C.C., Evers G.W., Jungers J.M. Cool-season legumes for humid areas // Forages: The Sci. of Grassland Agriculture. 2020. V. 2. P. 263–275. <https://doi.org/10.1002/9781119436669.ch14>
5. Степанова Г.В. Сорт люцерны изменчивой Таисия // Адаптивное кормопроизводство. 2020. № 2. С. 21–32.

- <https://doi.org/10.33814/AFP-2222-5366-2020-2-21-32>
6. Степанова Г.В. Методы и результаты сопряженной симбиотической селекции люцерны // Методы и технологии в селекции растений и растениеводстве. 2015. С. 230–234.
  7. Степанова Г.В. Урожайность сортов люцерны изменчивой в стрессовых погодных условиях // Многофункциональное адаптивное кормопроизводство. 2022. С. 70–79.  
<https://doi.org/10.33814/МАК-2022-28-76-70-79>
  8. Radović J., Sokolović D., Marković J. Alfalfa-most important perennial forage legume in animal husbandry // Biotechnol. in Animal Husbandry. 2009. V. 25. № 5-6-1. P. 465–475.  
<https://doi.org/10.2298/BAH0906465R>
  9. Степанова, Г.В. Влияние погодных условий на химический состав сухого вещества люцерны (*Medicago varia* Mart.) в фазу цветения // Адаптивное кормопроизводство. 2019. № 2. С. 26–39.  
<https://doi.org/10.33814/AFP-2222-5366-2019-2-26-39>
  10. Liu L.Y., Jia Y.S., Fan W.Q. et al. An investigation of the main environmental factors affecting the natural drying of alfalfa for hay, and hay quality // Acta Prataculturae Sinica. 2022. V. 31. № 2. P. 121.  
<https://doi.org/10.11686/cyxb2020529>
  11. Liu L.Y., Fa W.Q., Cheng Q.M. et al. Multi-omics analyses reveal new insights into nutritional quality changes of alfalfa leaves during the flowering period // Front. in Plant Sci. 2022. V. 13.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.995031>
  12. Lui A.C., Lam P.Y., Chan K.H. et al. Convergent recruitment of 5'-hydroxylase activities by CYP75B flavonoid B-ring hydroxylases for tricin biosynthesis in *Medicago legumes* // New Phytologist. 2020. V. 228. № 1. P. 269–284.  
<https://doi.org/10.1111/nph.16498>
  13. Grev A.M., Wells M.S., Catalano D.N. et al. Stem and leaf forage nutritive value and morphology of reduced lignin alfalfa // Agronomy J. 2020. V. 112. № 1. P. 406–417.  
<https://doi.org/10.1002/agj2.20011>
  14. Putnam D.H. Factors influencing yield and quality in alfalfa // The Alfalfa Genome. Cham: Springer, 2021. P. 13–27.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-030-74466-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-74466-3_2)
  15. Wang T., Zhang W.H. Priorities for the development of alfalfa pasture in northern China // Fund. Research. 2023. V. 3. № 2. P. 225–228.  
<https://doi.org/10.1016/j.fmre.2022.04.017>
  16. Косолапова В.Г., Муссие С.А. Питательная ценность люцерны различных сортов в процессе роста и развития // Кормопроизводство. 2020. № 10. С. 17–24.
  17. Шамсутдинов З.Ш., Писковацкий Ю.М., Новоселов М.Ю. и др. Селекция и семеноводство кормовых культур в России: результаты и стратегические направления // Адаптивное кормопроизводство. 2014. № 2. С. 12–23.
  18. Чернявских В.И., Думачева Е.В., Бородаева Ж.А. Основные направления селекции и семеноводства люцерны в Европейской России // Plant Gen. 2019. С. 247.  
<https://doi.org/10.18699/PlantGen2019-229>
  19. Мокеева Е.А. Биолого-анатомическое исследование люцерны (*Medicago sativa* L.). Ташкент: Гос. с.-х. изд-во УзССР, 1940. 122 с.
  20. Bingham E.T., Murphy R.P. Breeding and morphological studies on multifoliolate selections of alfalfa, *Medicago sativa* L. // Crop Sci. 1965. V. 5. № 3. P. 233–235.  
<https://doi.org/10.2135/cropsci1965.0011183X000500030010x>
  21. Sheaffer C.C., McCaslin M., Volenec J.J. et al. Multifoliolate leaf expression (leaves with greater than 3 leaflets leaf) // Standard Tests Bull. N. Am. Alfalfa Improvement Conf. 1995.
  22. Stefanov D., Petkova D., Marinova D. et al. Photosynthetic characteristics of multifoliolate alfalfa leaves // Comptes Rendus de l'Académie Bulgare des Sciences. 2013. V. 66. № 7.  
<https://doi.org/10.7546/CR-2013-66-7-13101331-12>
  23. Popescu S., Boldura O., Ciulca S. Evaluation of the genetic variability correlated with multileaflet trait in alfalfa // AgroLife Sci. J. 2016. V. 5. № 2. P. 125–130.
  24. Bauder W.W. The Inheritance of the Odd-leaf Character in *Medicago* sp. Lincoln: Univ. Nebraska, 1938.
  25. Brick M.A. A Genetic Study of the Multifoliolate Characteristic in Alfalfa (*Medicago sativa* L.) // Tucson: Univ. Arizona, 1975.
  26. Bingham E.T. A Genetical and Morphological Investigation of Multifoliolate Leaves of Alfalfa, *Medicago sativa* L. Ithaca: Cornell Univ., 1964.
  27. Azizi M.R. Inheritance of the Multifoliolate Trait in Tetraploid Alfalfa, *Medicago sativa* L. Tucson: Univ. Arizona, 1980.
  28. Bingham E. T. Morphology and petiole vasculature of five heritable leaf forms in *Medicago sativa* L. // Bot. Gazette. 1966. V. 127. №. 4. P. 221–225.
  29. Bingham E. T., Binek A. Hexaploid alfalfa, *Medicago sativa* L.: origin, fertility and cytology // Canad. J. Genet. and Cytol. 1969. V. 11. № 2. P. 359–366.
  30. Ferguson J.E., Murphy R.P. Comparison of trifoliolate and multifoliolate phenotypes of alfalfa (*Medicago sativa* L.) // Crop Sci. 1973. V. 13. № 4. P. 463–465.
  31. Brick M.A., Dobrenz A.K., Schonhorst M.H. Transmittance of the multifoliolate leaf characteristic into non-dormant alfalfa 1 // Agronomy J. 1976. V. 68. № 1. P. 134–136.  
<https://doi.org/10.2134/agronj1976.00021962006800010037x>
  32. Juan N.A., Sheaffer C.C., Barnes D.K. Temperature and photoperiod effects on multifoliolate expression and morphology of alfalfa // Crop Sci. 1993. V. 33. № 3. P. 573–578.  
<https://doi.org/10.2135/cropsci1993.0011183X003300030030x>
  33. Cherniavskih V.I., Dumacheva E.V., Borodaeva Z.A., Markova E.I. Leaf-spotting diseases as a matter of damage

- of alfalfa breeding populations in an evident multifoliate phase in different cycles of phenotypic recurrent selection // J. Physics: Conference Series. 2021. V. 1942. № 1. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1942/1/012081>
34. Чернявских В.И., Бородаева Ж.А., Думачева Е.В. Устойчивость сортопопуляций *Medicago varia* Mart. к листовым пятнистостям в экотопах юга среднерусской возвышенности // Аграрная наука. 2019. Т. 1. С. 109–112. <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2019-326-1-109-112>
  35. Singh L., Pierce C., Santantonio N. et al. Validation of DNA marker-assisted selection for forage biomass productivity under deficit irrigation in alfalfa // The Plant Genome. 2022. V. 15. № 1. <https://doi.org/10.1002/tpg2.20195>
  36. Lin S., Medina C.A., Boge B. et al. Identification of genetic loci associated with forage quality in response to water deficit in autotetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.) // BMC Plant Biology. 2020. V. 20. № 1. P. 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02520-2>
  37. Wu Z.N., Wei Z.W., Hou X.Y. et al. Study on photosynthetic characteristics and compound leaf ultrastructure of multifoliate alfalfa // Acta Agrestia Sinica. 2015. V. 23. № 2. P. 223. <https://doi.org/10.11733/j.issn.1007-0435.2015.02.001>
  38. Odorizzi A., Mamani E.M.C., Sipowicz P. et al. Effect of phenotypic recurrent selection on genetic diversity of non-dormant multifoliate lucerne (*Medicago sativa* L.) populations // Crop and Pasture Sci. 2015. V. 66. № 11. P. 1190–1196. <https://doi.org/10.1071/CP14280>
  39. Odorizzi A., Arolfo V., Basigalup D.H. A very non-dormant alfalfa (*Medicago sativa* L.) with high multifoliate expression // Second World Alfalfa Congress. Argentina: Cordoba. 2018. P. 120–124.
  40. Chen H., Zeng Y., Yang Y. et al. Allele-aware chromosome-level genome assembly and efficient transgene-free genome editing for the autotetraploid cultivated alfalfa // Nat. Communications. 2020. V. 11. № 1. P. 2449. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16338-x>
  41. Bao A., Burrit D.J., Chen H. et al. The CRISPR/Cas9 system and its applications in crop genome editing // Critical Rev. in Biotechnology. 2019. V. 39. № 3. P. 321–336. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1554621>
  42. Chen J., Yu J., Ge L. et al. Control of dissected leaf morphology by a Cys (2) His (2) zinc finger transcription factor in the model legume *Medicago truncatula* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. № 23. P. 10754–10759. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003954107>
  43. Min X., Luo K., Liu W. et al. Molecular characterization of the miR156/MsSPL model in regulating the compound leaf development and abiotic stress response in alfalfa // Genes. 2022. V. 13. № 2. <https://doi.org/10.3390/genes13020331>
  44. Hobert O. Gene regulation by transcription factors and microRNAs // Science. 2008. V. 319. № 5871. P. 1785–1786. <https://doi.org/10.1126/science.1151651>
  45. Wang H., Kong F., Zhou C. From genes to networks: The genetic control of leaf development // J. Integrative Plant Biol. 2021. V. 63. № 7. P. 1181–1196. <https://doi.org/10.1111/jipb.13084>
  46. Gómez C., Jozefkiewicz C., Mozzicafreddo M. et al. The Gln15Arg mutation in the transcriptional factor PALM1 produces multifoliate alfalfa // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 2023. V. 152. № 3. P. 677–681. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02429-8>
  47. Bar M., Ori N. Leaf development and morphogenesis // Development. 2014. V. 141. № 22. P. 4219–4230. <https://doi.org/10.1242/dev.106195>
  48. Boldura O.M., Popescu S. KNOX genes expression as a marker of the multileaflet trait in alfalfa // Curr. Op. in Biotechnology. 2013. № 24. P. S124. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.05.394>
  49. Popescu S., Boldura O. M., Botau D. The KNOX genes involvement in the development of multileaflet trait on tetraploid *Medicago sativa* // 14th Int. Multidisciplinary Sci. Geoconf. SGEM 2014. Sofia: STEF92 Technology, 2014. V. 1. P. 551–558. <https://doi.org/10.5593/SGEM2014/B61/S25.075>
  50. Sorina P., Oana-Maria I.B. The six KNOX genes identification on tetraploid *Medicago sativa*, based on the model plant resources // Romanian Biotechnol. Letters. 2010. V. 15. № 2. P. 33.
  51. Gehring W.J., Hiromi Y. Homeotic genes and the homeobox // Annual Review Genet. 1986. V. 20. № 1. P. 147–173. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.20.120186.001051>
  52. Ori N., Eshed Y., Chuck G. et al. Mechanisms that control KNOX gene expression in the *Arabidopsis shoot* // Development. 2000. V. 127. № 24. P. 5523–5532. <https://doi.org/10.1242/dev.127.24.5523>
  53. Champagne C.E., Goliber T.E., Wojciechowski M.F. et al. Compound leaf development and evolution in the legumes // The Plant Cell. 2007. V. 19. № 11. P. 3369–3378. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.052886>
  54. Moghaddam M., Kazempour-Osaloo S. Extensive survey of the ycf 4 plastid gene throughout the IRLC legumes: Robust evidence of its locus and lineage specific accelerated rate of evolution, pseudogenization and gene loss in the tribe Fabeae // PLoS One. 2020. V. 15. № 3. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229846>
  55. Di Giacomo E., Sestili F., Iannelli M.A. et al. Characterization of KNOX genes in *Medicago truncatula* // Plant Mol. Biol. 2008. V. 67. P. 135–150. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9307-7>
  56. Hofer J., Gourlay C., Michael A., Ellis T.N. Expression of a class 1 knotted1-like homeobox gene is down-regulated in pea compound leaf primordia // Plant Mol. Biol. 2001. V. 45. P. 387–398. <https://doi.org/10.1023/A:1010739812836>
  57. Wang Y., Ruan Q., Zhu X. et al. Identification of alfalfa SPL gene family and expression analysis under biotic and abiotic stresses // Sci. Reports. 2023. V. 13. № 1. P. 84.

- <https://doi.org/10.1038/s41598-022-26911-7>
58. Jozefkiewicz C., Gómez C., Odorizzi A. et al. Expanding the benefits of Tnt1 for the identification of dominant mutations in polyploid crops: A single allelic mutation in the MsNAC39 gene produces multifoliate alfalfa // *Front. in Plant Sci.* 2021. V. 12. P. 3074.
  59. Mallory A. C., Dugas D. V., Bartel D. P., Bartel B. MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs // *Curr. Biol.* 2004. V. 14. № 12. P. 1035–1046.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.06.022>
  60. Rubio-Somoza I., Zhou C. M., Confraria A. et al. Temporal control of leaf complexity by miRNA-regulated licensing of protein complexes // *Curr. Biol.* 2014. V. 24. № 22. P. 2714–2719.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2014.09.058>
  61. Zhou C., Han L., Zhao Y. et al. Transforming compound leaf patterning by manipulating REVOLUTA in *Medicago truncatula* // *Plant J.* 2019. V. 100. № 3. P. 562–571.  
<https://doi.org/10.1111/tpj.14469>
  62. Бородаева Ж. А. Анализ исходного материала люцерны изменчивой в различных экотопах центрально-черноземного региона // *Многофункциональное адаптивное кормопроизводство*. 2022. С. 80–86.
  63. Cherniavskih V. I., Dumacheva E. V., Borodaeva Z. A. et al. Features of intra population variability of *Medicago varia* Mart. with the expressed mf-mutation on a complex qualitative characteristics // *EurAsian J. BioSciences*. 2019. V. 13. № 2. P. 733–737.

## MULTIFOLIATE ALFALFA: ITS CAUSES AND INFLUENCE

N. M. Barsukov<sup>a, b, \*</sup>, E. S. Leonova<sup>a, b</sup>, I. S. Zaitsev<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup>Federal Williams Research Center of Forage Production and Agroecology, Moscow oblast, Lobnya, 141055 Russia

<sup>b</sup>Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, 127434 Russia

\*e-mail: keeper@yandex.ru

An increase in the leafiness of protein-rich alfalfa (*Medicago*) is possible not only through selection to change the size of the leaf blade. Some of the first reports on the study of the phenomenon of the formation of additional leaves, afterwards called multifoliate, date back to the 30 years of the XX century. This review article mentions the main articles related to the study of the trait. The structure of the leaf is described and information is collected on the correlations of multifoliate with height, internodes, day length and temperature. The influence of germplasm and research methods on obtaining contradictory data is indicated. The assumptions initially put forward by researchers about the atavistic nature of the manifestation of the trait, and later about the presence of a recessive mutation with 2 additive genes regulating expression, are considered. The method of finding the index of evaluation of the expression of multifoliate proposed by Craig Sheaffer and confirming the strong character of inheritance of the trait in classical selection through recurrent selection is shown. In conclusion, the most significant genes and gene families that directly or indirectly affect the manifestation of multifoliate, including *PALM1* and *KNOX*, are collected.

**Keywords:** multifoliate, *mf*, protein, alfalfa, leafiness, *PALM1*.

УДК 582.3.99:575.1

## ЦИТОГЕОГРАФИЯ ПОЛИПЛОИДНОГО КОМПЛЕКСА *BASSIA PROSTRATA* S. L. (CHENOPODIACEAE) ПО ДАННЫМ АНАЛИЗА РАЗМЕРА ГЕНОМА И PCR-RFLP хпДНК

© 2024 г. Т. В. Панкова<sup>1, \*</sup>, М. Н. Ломоносова<sup>1</sup>, О. В. Ваулин<sup>2</sup>, А. Ю. Королюк<sup>1</sup>,  
Е. А. Королюк<sup>1</sup>, Д. Н. Шауло<sup>1</sup>, Б. Осмонали<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

<sup>2</sup>Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

<sup>3</sup>Институт ботаники и фитоинтродукции, Алматы, 050040 Республика Казахстан

\*e-mail: ankova\_tv@mail.ru

Поступила в редакцию 14.09.2023 г.

После доработки 02.11.2023 г.

Принята к публикации 07.11.2023 г.

Методом проточной цитометрии (FCM) исследована цитогеография полиплоидного комплекса *Bassia prostrata* s. l. на материале из 39 природных популяций в Армении, Казахстане и России. На основе определения содержания ДНК в ядрах (2C-value) выявлено три цитотипа: диплоидный ( $2n = 18$ ), тетраплоидный ( $2n = 36$ ) и гексаплоидный ( $2n = 54$ ). Верификация уровня плоидности, установленной по содержанию ДНК, проведена параллельным прямым подсчетом числа хромосом. Большинство изученных популяций представлены единственным цитотипом, в трех популяциях отмечена смешанная плоидность, когда наряду с диплоидами встречаются тетраплоиды или гексаплоиды. Выявлена генетическая обособленность хлоропластной ДНК диплоидного и полиплоидных цитотипов. Показаны предположительные варианты эволюционной связи цитотипов по спектрам рестрикции хпДНК.

**Ключевые слова:** цитотип, экология цитотипов, полиплоидия, проточная цитометрия, число хромосом, ДНК-уровень плоидности, PCR-RFLP.

DOI: 10.31857/S0016675824030025 EDN: DPXHPA

Полиплоидия широко распространена среди покрытосеменных растений, является важным фактором видообразования [1–3]. Во многих группах растений существуют полиплоидные комплексы, состоящие из форм, чей статус может рассматриваться как видовой или подвидовой, отдельные цитотипы могут признаваться (или не признаваться) в качестве самостоятельных обособленных таксонов — эти вопросы являются предметом дискуссии на протяжении всего периода изучения полиплоидии [2, 4–6]. Объединение морфологически сходных цитотипов в один вид, без детального исследования, приводит в ряде случаев к искажениям в описании биоразнообразия, так как нередко не учитываются самостоятельные таксоны, которые реально существуют в природе. С другой стороны, наиболее критическим является предложение признавать в ранге вида каждый цитотип [2, 7]. Изучение изменчивости цитотипов и их распространения в природе является одной из важней-

ших задач при исследовании процессов полиплоидизации.

*Bassia prostrata* (L.) A.J. Scott (= *Kochia prostrata* (L.) Schrad.) — широко распространенный евразийский вид, основной ареал которого простирается от северного Причерноморья, Кавказа, Малой, Средней и Центральной Азии. Изолированные участки имеются в Испании, Австрии, Чехии и Румынии [8]. В России этот вид распространен в степной зоне и на юге лесостепной зоны. Восточная граница ареала проходит через Восточную Сибирь (Забайкальский край) и Восточную Монголию. Обитает в различных экологических условиях на щебнистых, каменистых и глинистых почвах, на песках, солонцах, меллах, от низкогорий до высокогорий в степной, полупустынной и пустынной зонах с умеренным, континентальным или резко континентальным климатом.

*B. prostrata* морфологически очень полиморфный вид, в пределах которого были установлены многочисленные таксоны различного ранга, различающиеся по степени и характеру опушения побегов и листьев. Все внутривидовые таксоны были выделены в составе *K. prostrata*. Первые две разновидности установил С. Moquin-Tandon [9], а именно var. *canescens* Moq. с войлочно опушенными стеблями и сероватыми листьями и var. *rubella* Moq. с почти голыми стеблями, красноватыми ветвями и зеленоватыми листьями. Впоследствии авторы по степени опушения выделяли в пределах этого вида три основные морфологические группы, которые приводились как разновидности [10–12] или подвиды [13, 14]. Растения со слабым опушением указывались как var. *virescens* Fenzl, var. *rubella* Moq. или var. *prostrata*; растения с прижатым густым опушением относились к var. *canescens* Moq. или var. *villoscana* Bong. et C.A. Mey.; и растения с бело-мохнатым густым опушением указывались как var. *villosissima* Bong. et C.A. Mey. Л.П. Сергиевская [15] возвела наиболее опушенную разновидность в ранг вида *K. villosissima* (Bong. et C.A. Mey.) Serg. Позднее G. Kadereit и Н. Freitag [16] выполнили комплексный молекулярно-филогенетический анализ биогеографии и филогении подсемейства *Camphorosmeae*, в том числе была сделана таксономическая ревизия рода *Kochia* s. l., большинство видов которого были отнесены к роду *Bassia*. Авторы использовали в анализе некоторые образцы *B. prostrata* s. l., в том числе материал по *K. prostrata* var. *villosissima* Bong. et C.A. Mey. и подтвердили мнение Сергиевской, что войлочно опушенные образцы следует относить к самостоятельному таксономическому виду, ими предложена новая комбинация — *B. villosissima* (Bong. et C.A. Mey.) Freitag et G. Kadereit.

Помимо значительной морфологической вариабельности по характеру опушения, *B. prostrata* s. l. характеризуется наличием нескольких цитотипов. Различные уровни пloidности у этого вида неоднократно отмечались в литературе. Так, диплоиды ( $2n = 2x = 18$ ) были указаны из России (Республики Тыва [17, 18], Республики Алтай [19], Красноярского края [20], Волгоградской области [18]), а также из Монголии [21], Казахстана, Узбекистана [22] и Ирана [23]. Тетраплоиды ( $2n = 4x = 36$ ) известны из Казахстана [22] и Китая [24]. Значительно реже были отмечены гексаплоиды ( $2n = 6x = 54$ ), обнаруженные в Узбекистане [22], Пакистане [25] и Иране [23]. Эти данные были получены на исследовании единичных растений. В литерату-

ре имеются немногочисленные данные по определению уровня пloidности при измерении размера генома методом проточной цитометрии этого вида, полученные на материале из Чехии [26], Республики Алтай и Новосибирской области [19]. Изучение детального географического распространения отдельных цитотипов, оценка их таксономического статуса и выявление возможных механизмов возникновения ранее не проводились.

Цитологическое изучение уровня пloidности методом прямого подсчета хромосом в стадии митоза — достаточно трудоемкий процесс, требует большой затраты времени и соблюдения ряда условий: наличие растительного материала в стадии плодоношения со всхожими семенами, фиксация корешков в природе, подбор условий для прорастивания семян, учет особенностей предфиксационной обработки проростков, процесса подсчета. Определение размера генома методом проточной цитометрии (FCM) позволяет в короткий срок установить уровень пloidности у большого количества образцов в любой стадии вегетации, в том числе и на гербарном материале. Это позволяет выявить географическое и экологическое распространение цитотипов.

Цель исследования — установить экологические и биогеографические закономерности распространения отдельных цитотипов полиплоидного комплекса *Bassia prostrata* s. l.

Были поставлены задачи: 1) собрать репрезентативный материал в 39 популяциях в различных участках ареала *B. prostrata* s. l.; 2) определить содержание ДНК в ядрах (размер генома) в выборках из всех популяций; 3) выявить корреляцию между размером генома и уровнем пloidности, меж- и внутривидовую изменчивость уровня пloidности; 4) подобрать фрагменты участков хлоропластной ДНК для метода рестрикционного анализа ПЦР-продукта у образцов разного уровня пloidности из разных популяций; 5) выявить гаплотипы, различающиеся по спектрам рестрикции, наличие внутривидового разнообразия; 6) установить паттерны рестрикции, соответствующие пloidности; 7) выявить закономерности экологического и географического распространения отдельных цитотипов, их морфологическую и генетическую обособленность; 8) дать таксономическую интерпретацию цитотипов в полиплоидном комплексе *B. prostrata* s. l. на основании анализа всех полученных результатов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Происхождение растительного материала*

Материал для исследования был собран в природе в 39 популяциях из Армении, Казахстана и России в период с 2019 по 2021 гг. Местонахождение популяций и их номера, указанные в табл. 1, соответствуют использованным в тексте и на рисунках. Собранные растения были высушены по стандартной методике сушки гербарных образцов, ваучеры хранятся в Гербарии ЦСБС СО РАН (NS).

*Определение числа хромосом*

Числа хромосом определяли методом прямого подсчета в корневой меристеме в стадии метафазы митоза. В чашках Петри со стерильным песком были пророщены семена растений из популяций: 9, 17, 28 и 36. Проростки длиной 1–2 см выдерживали в 0.2%-ном водном растворе колхицина в течение 2 ч при комнатной температуре и фиксировали в уксусно-кислом спирте (3 : 1). Корешки перед окрашиванием протравливали в течение 15 мин в 4%-ном водном растворе железоаммонийных квасцов, затем окрашивали ацетогематоксилином по Ю.А. Смирнову [27]. Давленные временные препараты просматривали на световом микроскопе Axioskop 40 и Axioscope A1 ( $\times 100$ ) с использованием программного обеспечения AxioVision 4.8 и ZEN2012 (blue edition).

*Анализ размера генома (цитогенетический анализ)*

Содержание ядерной ДНК, или голоплоидный размер генома (2C) определяли методом проточной цитометрии у 309 образцов из 38 популяций, в каждой из которых анализировали от трех до 18 растений (табл. 1). Для исследования брали листовые пластинки из средней части побега. Анализ образцов из 35 популяций проводили на приборе Cy Flow Space (Sysmex Partec, Gorlitz, Германия) со штатным ПО CyFlow® Space с лазерным источником излучения 532 нм. Материал из четырех популяций (29, 30, 32, 36) был исследован на цитометре Partec CyFlow (Partec, GmbH) со штатным ПО CyView с лазерным источником излучения с длиной волны 532 нм.

Анализ каждого образца проводили в два этапа. На первом этапе подбирали параметры детекции флуоресценции и выявления положения пика образца на графике и отмечали канал флуоресценции образца. На втором этапе ядра стандарта и образца выделяли и окрашивали одновременно: листья образца и стандарта ( $0.5 \times 0.5$  см)

измельчали с использованием острого лезвия в пластиковых чашках Петри в 500 мкл охлажденного буфера (0.1 М лимонной кислоты, 0.5% Triton), затем фильтровали через одноразовый фильтр CellTrics Partec 30 мкм (Sysmex Partec, Германия), и смешивали с 1500 мкл раствора для окрашивания, состоящего из Tris-MgCl<sub>2</sub> буфера (0.4 М Tris-основание, 4 мМ MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O) с PI (50 мкг/мл), РНКазой (50 мкг/мл) и  $\beta$ -меркаптоэтанолом (1 мкл/мл) [28, 29]. Для дальнейшей интерпретации данных использовали пики с не менее чем 1000 детектируемых частиц, при детекции 10000–15000 событий. Не менее трех образцов из каждой популяции анализировали три дня подряд, чтобы исключить погрешность прибора [30].

В качестве стандартов использовали свежие листья растений с известным содержанием ДНК: *Solanum lycopersicum* “Stupicke polnirane” 2C = 1.96 пг [31]; *Pisum sativum* “Ctirad” 2C = 9.09 пг [29] и *Petroselinum crispum* “Champion Moss Curled” 2C = 4.50 пг [32].

Голоплоидный размер генома (2C, в понимании J. Greilhuber) [33] рассчитывали по формуле:

2C образца = 2C стандарта  $\times$  (средняя флуоресценция пика образца/средняя флуоресценция пика стандарта).

Полученные результаты обрабатывали при помощи ПО FloMax 2.9, Flowing Software 2.5.1 (создатель Perttu Terho) и Statistica 12 (StatSoft Inc.).

Примеры гистограмм интенсивности флуоресценции некоторых образцов *B. prostrata* из различных популяций показаны на рис. 1.

*Молекулярно-генетический анализ*

Молекулярно-генетическая изменчивость отдельных цитотипов *B. prostrata* s. l. была исследована методом рестрикционного анализа ПЦР-продукта (PCR-RFLP). Исследование популяций на распространение различных рестрикционных паттернов было проведено для 13 популяций заведомо удаленных друг от друга: из России (республик Калмыкия, Тыва и Бурятия, Новосибирской области, Алтайского и Забайкальского краев), Армении и Казахстана (табл. 1). Для всех образцов, кроме Забайкальского края, предварительно был определен уровень ploидности методом проточной цитометрии. Среди отобранных образцов были представлены шесть диплоидных популяций (1, 4, 7,



Таблица 1. Местонахождения, размер генома (GS) и уровень плоидности образцов *Bassia prostrata* s. l.

| Номер популяции | Локалитет                                                                                                        | Размер генома (2C, пг)       |                    |                 |           |       |          |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|--------------------|-----------------|-----------|-------|----------|
|                 |                                                                                                                  | число исследованных образцов | уровень алоидности | mean $\pm$ SD   | min–max   | CV, % | стандарт |
| 1*              | Russia, Republic of Buryatia, 52.11796°N, 109.1491°E, 30.07.2019, typical steppe, <i>A. Korolyuk 531</i>         | 3                            | ~ 2x               | 2.83 $\pm$ 0.05 | 2.79–2.88 | 1.67  | Pt       |
| 2               | Russia, Republic of Buryatia, 50.64362°N, 106.0111°E, 26.07.2019, <i>A. Korolyuk 509</i>                         | 6                            | ~ 2x               | 2.79 $\pm$ 0.07 | 2.70–2.89 | 2.47  | Pt       |
| 3               | Russia, Republic of Buryatia, 51.5362°N, 107.3451°E, 6.08.2019, typical steppe, <i>E. &amp; A. Korolyuk s.n.</i> | 5                            | ~ 2x               | 2.46 $\pm$ 0.05 | 2.41–2.52 | 1.89  | Ps       |
| 4*              | Russia, Republic of Buryatia, 51.7288°N, 107.4513°E, 6.08.2019, typical steppe, <i>E. &amp; A. Korolyuk s.n.</i> | 5                            | ~ 2x               | 2.60 $\pm$ 0.02 | 2.58–2.62 | 0.61  | Ps       |
| 5               | Russia, Irkutsk Region, 53.015617°N, 106.905641°E, 9.09.2020, stony steppe, <i>V. Chepinoga 20-84</i>            | 9                            | ~ 2x               | 2.44 $\pm$ 0.08 | 2.34–2.57 | 3.33  | Ps       |
| 6               | Russia, Republic of Khakassia, 53.696667°N, 91.555833°E, 25.08.2020, sandy steppe, <i>M. Lomonosova 1427</i>     | 11                           | ~ 4x               | 4.56 $\pm$ 0.05 | 4.49–4.64 | 1.18  | Ps       |
| 7*              | Russia, Republic of Tuva, 51.627583°N, 94.435472°E, 22.08.2019, desert steppe, <i>D. Shaulo 82</i>               | 7                            | ~ 2x               | 2.82 $\pm$ 0.11 | 2.60–2.93 | 3.88  | Pt       |
| 8               | Russia, Republic of Tuva, 52.041°N, 94.199361°E, 24.08.2019, typical steppe, <i>D. Shaulo 97</i>                 | 7                            | ~ 2x               | 2.68 $\pm$ 0.06 | 2.56–2.75 | 2.33  | Pt       |
| 9               | Russia, Republic of Altai, 50.00403°N, 88.23078°E, 8.09.2018, stony steppe, <i>E. &amp; A. Korolyuk 2</i>        | 3                            | 2x                 | 2.30 $\pm$ 0.08 | 2.21–2.35 | 3.40  | Pt       |
| 10              | Russia, Krasnoyarsk Territory, 51.851361°N, 91.851611°E, 18.07.2020, stony steppe, <i>D. Shaulo 37a</i>          | 7                            | ~ 2x               | 2.49 $\pm$ 0.09 | 2.42–2.65 | 3, 75 | Ps       |
| 11              | Russia, Altai Territory, 55.555833°N, 81.375278°E, 2.08.2020, salted steppe <i>T. An'kova s.n.</i>               | 10                           | ~ 4x               | 4.43 $\pm$ 0.12 | 4.19–4.58 | 2.65  | Ps       |
| 12*             | Russia, Altai Territory, 52.733611°N, 79.873889°E, 10.09.2020, salted steppe, <i>A. Grebenyuk 1530</i>           | 10                           | ~ 4x               | 4.42 $\pm$ 0.12 | 4.24–4.63 | 2.81  | Ps       |
| 13              | Russia, Novosibirsk Region, 53.62795°N, 77.93332°E, 26.09.2020, salted steppe, <i>E. Korolyuk 15-20</i>          | 4                            | ~ 4x               | 4.70 $\pm$ 0.06 | 4.64–4.78 | 1.35  | Ps       |
| 14*             | Russia, Novosibirsk Region, 54.26674°N, 82.45371°E, 2.09.2019, typical steppe, <i>A. Korolyuk 19-567</i>         | 4                            | ~ 2x               | 2.59 $\pm$ 0.05 | 2.55–2.64 | 1.81  | Ps       |
| 15              | Russia, Novosibirsk Region, 54.091458°N, 81.370428°E, 7.08.2019, stony slope, <i>T. An'kova s.n.</i>             | 11                           | ~ 4x               | 5.28 $\pm$ 0.19 | 4.87–5.61 | 4.46  | Sl       |
| 16*             | Kazakhstan, Almaty Region, 43.879917°N, 77.060389°E, 2.11.2019, sandy dunes, <i>T. An'kova 208</i>               | 9                            | ~ 4x               | 5.01 $\pm$ 0.04 | 4.93–5.06 | 0.75  | Ps       |

Таблица 1. Продолжение

|         |                                                                                                                     |    |           |                 |           |      |    |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|-----------|-----------------|-----------|------|----|
| 17*     | Kazakhstan, Almaty Region,<br>43.718389°N, 77.037667°E, 2.11.2019,<br>sandy dunes, <i>T. An'kova 205</i>            | 18 | <b>4x</b> | $4.90 \pm 0.14$ | 4.60–5.10 | 2.80 | Ps |
| 18*     | Kazakhstan, Almaty Region,<br>43.334667°N, 75.880556°E, 3.11.2019,<br>stony steppe, <i>T. An'kova 213</i>           | 5  | ~ 2x      | $2.66 \pm 0.12$ | 2.52–2.75 | 4.38 | Ps |
| 19*     | Kazakhstan, Almaty Region,<br>43.297083°N, 76.230194°E, 3.11.2019,<br>salted steppe, <i>T. An'kova 210</i>          | 9  | ~ 2x      | $2.49 \pm 0.08$ | 2.39–2.65 | 3.27 | Ps |
| 20      | Kazakhstan, Kyzylorda Region,<br>46.008333°N, 62.049444°E, 3.09.2019,<br>sandy dunes, <i>B. Osmonali et al. 932</i> | 6  | ~ 4x      | $5.01 \pm 0.05$ | 4.94–5.08 | 1.04 | Ps |
| 21      | Kazakhstan, Kyzylorda Region,<br>46.035833°N, 62.226111°E, 6.09.2019,<br>sandy dunes, <i>B. Osmonali et al. 931</i> | 4  | ~ 4x      | $5.16 \pm 0.10$ | 5.07–5.27 | 1.88 | Ps |
| 22      | Russia, Chelyabinsk Region,<br>52.100389°N, 60.000000°E,<br>26.09.2020, typical steppe,<br><i>O. Kalmykova 366</i>  | 10 | ~ 2x      | $2.34 \pm 0.06$ | 2.27–2.46 | 2.56 | Ps |
| 23      | Russia, Orenburg Region,<br>51.280083°N, 60.011583°E, 26.09.2020,<br>typical steppe,<br><i>O. Kalmykova 360</i>     | 7  | ~ 2x      | $2.30 \pm 0.03$ | 2.27–2.34 | 1.14 | Ps |
| 24      | Russia, Orenburg Region,<br>50.813972°N, 60.922472°E, 23.09.2020,<br>typical steppe,<br><i>O. Kalmykova 356</i>     | 9  | ~ 2x      | $2.27 \pm 0.06$ | 2.17–2.37 | 2.84 | Ps |
| 25      | Russia, Orenburg Region, 51.081111°N,<br>57.787222°E, 8.10.2020, stony slope,<br><i>T. An'kova 221</i>              | 15 | ~ 6x      | $6.70 \pm 0.10$ | 6.57–6.85 | 1.54 | Ps |
| 26 mix  | Russia, Orenburg Region, 51.4175°N,<br>57.14348°E, 7.10.2020, typical steppe,<br><i>T. An'kova 219</i>              | 3  | ~ 6x      | $6.98 \pm 0.46$ | 6.71–7.52 | 6.66 | Ps |
|         | the same population                                                                                                 | 9  | ~ 2x      | $2.30 \pm 0.03$ | 2.25–2.33 | 1.12 | Ps |
| 27      | Russia, Orenburg Region, 51.251389°N,<br>55.063333°E, 5.10.2020, sandy steppe,<br><i>T. An'kova 218</i>             | 9  | ~ 6x      | $6.73 \pm 0.20$ | 6.37–6.99 | 2.76 | Ps |
| 28      | Russia, Orenburg Region,<br>51.534444°N, 55.106944°E, 5.10.2020,<br>typical steppe, <i>T. An'kova 216</i>           | 15 | <b>2x</b> | $2.27 \pm 0.04$ | 2.20–2.34 | 1.69 | Ps |
| 29      | Russia, Republic of Dagestan,<br>41.50462°N, 48.08520°E, 18.05.2021,<br><i>A. Korolyuk s.n.</i>                     | 6  | ~ 6x      | $7.69 \pm 0.26$ | 7.19–7.87 | 3.33 | Pt |
| 30      | Russia, Republic of Dagestan, 42.27°N,<br>47.52°E, 10.10.2021,<br><i>A.&amp;E. Korolyuk 119EK</i>                   | 4  | ~ 6x      | $7.03 \pm 0.18$ | 6.94–7.29 | 2.55 | Pt |
| 31      | Russia, Republic of Kalmykia,<br>46.95568°N, 44.47173°E, 29.05.2020,<br>dry steppe, <i>A. Korolyuk 20-098</i>       | 5  | ~ 6x      | $7.85 \pm 0.02$ | 7.83–7.88 | 0.24 | Pt |
| 32      | Russia, Republic of Kalmykia,<br>51.61786°N, 58.62958°E, 22.05.2021,<br><i>A. Korolyuk 21-088</i>                   | 5  | ~ 4x      | $4.49 \pm 0.12$ | 4.37–4.62 | 2.64 | Ps |
| 33      | Russia, Republic of Kalmykia,<br>46.39939°N, 44.01906°E, 27.05.2020,<br>dry steppe, <i>A. Korolyuk 20-075</i>       | 5  | ~ 4x      | $4.57 \pm 0.09$ | 4.43–4.67 | 1.90 | Ps |
| 34* mix | Russia, Republic of Kalmykia,<br>47.24055°N, 44.33986°E, 31.05.2020,<br>dry steppe, <i>A. Korolyuk 20-132</i>       | 6  | ~ 4x      | $4.68 \pm 0.20$ | 4.47–5.03 | 4.36 | Ps |
|         | the same population                                                                                                 | 4  | ~ 2x      | $2.34 \pm 0.11$ | 2.22–2.49 | 4.81 | Ps |

Таблица 1. Окончание

|         |                                                                                                                                 |    |           |             |           |      |    |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|-----------|-------------|-----------|------|----|
| 35* mix | Russia, Republic of Kalmykia, 46.15366°N, 44.30138°E, 25.05.2020, dry steppe, <i>A. Korolyuk 20-44</i>                          | 8  | ~ 6x      | 6.54 ± 0.22 | 6.06–6.73 | 3.33 | Ps |
|         | the same population                                                                                                             | 4  | ~ 2x      | 2.33 ± 0.09 | 2.20–2.41 | 3.86 | Ps |
| 36*     | Russia, Republic of Crymea, 44.502611°N, 33.596389°E, 26.10.2021, stony slope, <i>T. Pankova 231</i>                            | 12 | <b>6x</b> | 7.16 ± 0.14 | 6.85–7.32 | 1.96 | Pt |
| 37*     | Armenia, Kotayk Province, 41.506111°N, 44.798889°E, 23.09.2019, stony slope, <i>E. Korolyuk-10-19</i>                           | 5  | ~ 6x      | 7.42 ± 0.26 | 6.97–7.52 | 3.46 | Ps |
| 38      | Armenia, Kotayk Province, 40.079167°N, 44.7302278°E, 21.09.2019, stony slope, <i>E. Korolyuk 6-19</i>                           | 15 | ~ 6x      | 7.04 ± 0.15 | 6.68–7.31 | 2.17 | Ps |
| 39*     | Russia, Trans-Baikal Territory, State Nature Biosphere Reserve Dauriskiy, 50.055833°N, 115.34°E, steppe, <i>L. Saraeva s.n.</i> | 10 | —         | —           | —         | —    | —  |

Примечание. В первом столбце звездочкой отмечены популяции, исследованные методом рестрикционного анализа хлДНК, “mix” — популяции смешанной плоидности; в столбце “Локалитет” приведена сокращенная этикетка, курсивом выделены коллекторы и их гербарные номера при наличии. Знаком “~” — обозначен уровень плоидности, определенный только по размеру генома, жирным шрифтом обозначена плоидность, подтвержденная прямым подсчетом хромосом. CV — коэффициент вариации. Стандарты: Ps — *Pisum sativum*, Pt — *Petroselinum crispum*, Sl — *Solanum lycopersicum*.

14, 18, 19), три тетраплоидные (12, 16, 17), две гексаплоидные (36, 37) и две популяции смешанной плоидности (34, 35).

Для анализа, по результатам предварительно секвенирования были отобраны относящиеся к хлоропластной ДНК фрагмент гена *rbcL* и межгенные спейсеры *pbsK-pbsL* и *trnD-trnT*, имеющие полиморфные сайты рестрикции; состав и температуры отжига используемых праймеров приведены в табл. 2.

Выделение ДНК выполняли по методике [34]. ПЦР проводили в смеси объемом 25 мкл, имеющей состав: 1×PCR-buffer (16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 mM Tris-HCl (pH 8.8 при 25°C), 0.1% Tween-20); 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.4 mM каждого dNTP; 0.5 мкМ каждого праймера и 1 ед. Taq-полимеразы производства ИМКБ СО РАН.

Секвенирование проводили с использованием ресурсов ЦКП “Геномика” СО РАН (<http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/sequest>). Подбор ферментов рестрикции, различающих полиморфные варианты, осуществляли с помощью пакета программ *in silico* [35].

Рестрикцию проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, с рекомендованным производителем (Сибэнзим) буфером, 1 ед. фермента, и 2 мкл ПЦР-продукта на реакцию. Время реакции — не менее 3 ч. После чего продукты рестрик-

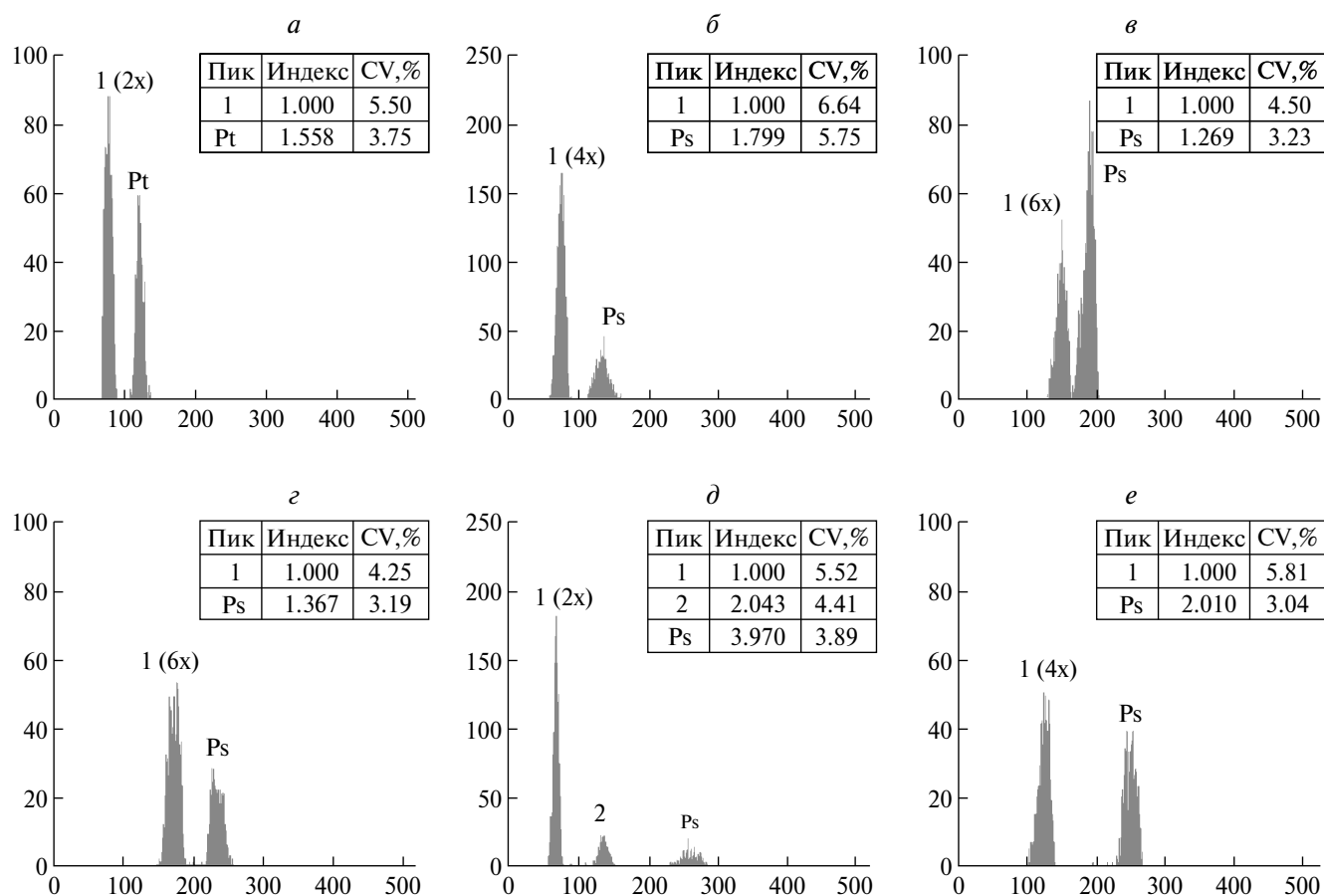
ции отмывались спиртом от компонентов смеси и наносили на электрофорез в 1–2%-ном геле.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кариологический и цитогенетический анализ

Соотношение размера генома с уровнем плоидности установлено (откалибровано) параллельным подсчетом хромосом и измерением размера генома у образцов из четырех популяций. В популяции 28 отмечены диплоиды (2n = 2x = 18; 2C = 2.27 пг), в популяциях 9 и 17 диплоиды (2n = 2x = 18; 2C = 2.30 пг) и тетраплоиды (2n = 4x = 36; 2C = 4.90 пг) соответственно. В популяции 36 выявлены гексаплоиды (2n = 6x = 54; 2C = 7.16 пг). Размер генома (2C, пг) был определен у 309 растений из 38 популяций (табл. 1). Для оценки различий по содержанию ДНК в ядрах был использован статистический анализ ANOVA. Все значения распределились в три группы, в каждую из которых попали, в том числе, образцы, изученные кариологически (рис. 2, 3), что свидетельствует о том, что образцы каждой группы являются различными цитотипами.

Так, образцы 19 популяций с содержанием ДНК от 2.17 до 2.93 пг являются диплоидами, от 4.19 до 5.61 пг — тетраплоидами и от 6.06 до 7.88 пг — гексаплоидами. Минимальное среднее значение размера генома (2C = 2.27 пг) было выявлено в листьях диплоидных образцов из Орен-



**Рис. 1.** Гистограммы интенсивности флуоресценции образцов *B. prostrata* разной ploидности. По оси абсцисс – значения относительной флуоресценции; по оси ординат – число ядер. 1, 2, – пики флуоресценции *Bassia prostrata*, Pt – пик флуоресценции стандарта *Petroselinum crispum* (2C = 4.50 пг), PS – пик флуоресценции стандарта *Pisum sativum* (2C = 9.09 пг); а – популяция № 7 (2х); б – популяция № 17 (4х); в – популяция № 38 (6х); г – популяция № 26-смешанная (6х); д – популяция № 26-смешанная (2х); е – популяция № 34-смешанная (4х). Индекс – соотношение значений размера генома (2C) образца и стандарта.

бургской области (28), максимальное среднее (2C = 7.42 пг) – у гексаплоидных образцов из Армении (37). Среднее содержание ДНК у всех диплоидов составляло 2.47 пг, у тетраплоидов 4.78 пг и у гексаплоидов 7.03 пг (табл. 3).

Большинство исследованных популяций представлены одним цитотипом. Среди них

диплоидный цитотип выявлен в 19 популяциях, тетраплоидный в 12 и гексаплоидный в 10 (табл. 1, рис. 2). Три популяции имели смешанный уровень ploидности: в популяции 35 из Республики Калмыкии совместно обитают диплоиды и гексаплоиды, в популяции 34 отмечены диплоиды и тетраплоиды (рис.1,е). В популяции 26 из Оренбургской области встре-

**Таблица 2.** Праймеры для рестрикционного анализа фрагментов хпДНК

| Участок ДНК                        | Прямой праймер                   | Обратный праймер               | Температура отжига |
|------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|--------------------|
| Фрагмент гена <i>rbcL</i>          | 5'-ATGTC-ACCAC-AAACA-GAAAC- 3'   | 5'-TCGCA-TGTAC-CTGCA-GTAGC- 3' | 55°C               |
| Межгенный участок <i>pbsK-pbsL</i> | 5'-ACATC-KARTA-CKGGA-CCAAT-AA-3' | 5'-AACAC-CAGCT-TTRAA-TCCAA-3'  | 49°C               |
| Межгенный участок <i>trnD-trnT</i> | ACCAA-TTGAA-CTACA-ATCCC          | CTACC-ACTGA-GTTAA-AAGGG        | 53°C               |

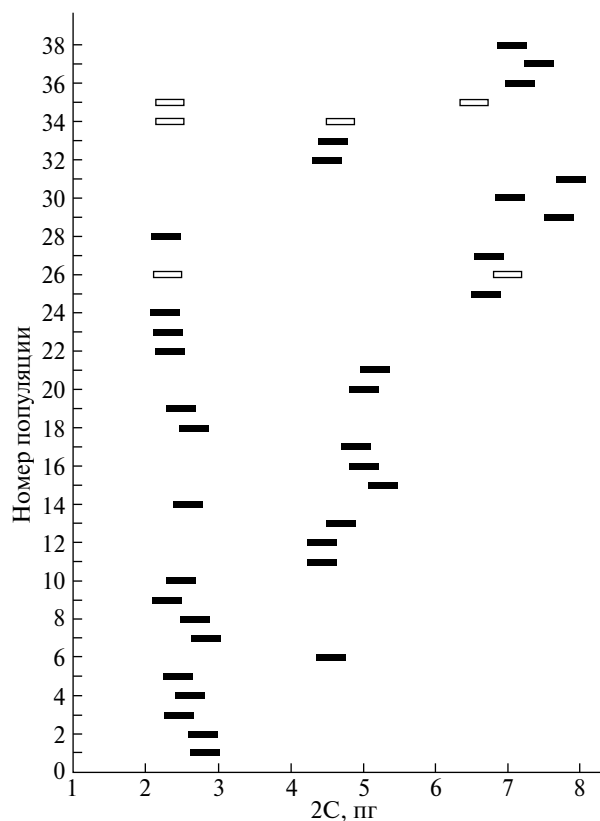


Рис. 2. Средние значения размера генома (GS, 2C) для изученных популяций *B. prostrata*. Неокрашенные отрезки соответствуют смешанным популяциям, номера популяций соответствуют табл. 1.

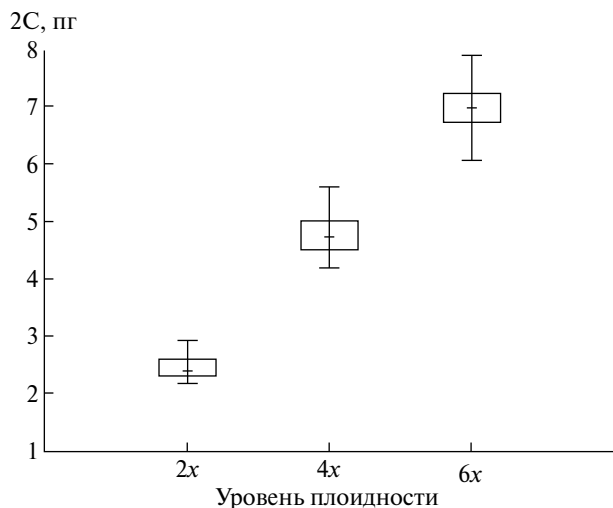


Рис. 3. Box-plot размера генома трех цитотипов *B. prostrata* (по Kruskal–Wallis). Границы прямоугольника определяют 1 и 3 квартили (25-й и 75-й процентиля), горизонтальный отрезок внутри прямоугольника — медиана, вертикальный отрезок соответствует минимальному и максимальному значению.

чаются диплоиды (рис.1,д) и гексаплоиды (рис.1,з). Примечательно, что в обеих смешанных популяциях из Калмыкии преобладают образцы с полиплоидными цитотипами, тогда как в миксоплоидной популяции из Оренбургской области — большинство исследованных образцов являются диплоидами. Несколько цитотипов, обитающих симпатрически в одной популяции, могут быть фенологически разобшенными. Так, по данным М.И. Рубцова и соавт. [36] диплоидные образцы *B. prostrata* в условиях эксперимента зацветают через 77–92 дня со дня вегетации, тетраплоиды — через 94–102 дня и гексаплоиды вступают в фазу цветения через 113–119 дней. По нашим наблюдениям, растения изученных миксоплоидных популяций также находились в разной стадии вегетации. При этом полиплоиды опережали в развитии диплоидов.

#### Морфология цитотипов

Как было указано выше, *Bassia prostrata* s. l. отличается высокой морфологической изменчивостью. Для оценки различий между тремя цитотипами был проведен анализ десяти морфологических признаков (табл. 4). Было показано, что все диплоиды характеризуются меньшими размерами растений, слабым опушением стеблей и листьев, вальковатой формой листа и серовато-зеленой окраской. Такие растения при классификации данного таксона в составе рода *Kochia* относились к разновидностям var. *rubella* Moq., var. *virescens* Fenzl. или выделены в ранге подвида *K. prostrata* var. *virescens* Prat. Тетраплоиды представлены двумя морфотипами. Наиболее широко распространен морфотип I, характеризующийся более крупными размерами растений с сероватым или беловатым полуприжатым опушением листьев и стеблей. Этот морфотип обычно относился к *K. prostrata* var. *canescens* Moq. Тетраплоидный морфотип II хорошо отличается прежде всего густым бело-мохнато-волосистым опушением листьев и стеблей, более широкими листовыми пластинками и другими признаками. Такие растения были описаны как *K. prostrata* var. *villosissima* Bong. et C.A. Mey. *B. villosissima* (Bong. et C.A. Mey.) Freitag et G. Kadereit). Изученные нами гексаплоидные растения сходны по характеру опушения с тетраплоидными, относящимися к морфотипу I. Они отличаются главным образом более крупными размерами стеблей и листьев, что в целом соответствует общей закономерности, наблюдаемой у полиплоидов по сравнению с родственными диплоидами.

**Таблица 3.** Статистические показатели значений размера генома (2C, пг) для всех изученных образцов *B. prostrata* по уровню пloidности

| Пloidность | N   | Среднее | Медиана | Мин  | Макс | Станд. откл. | CV, % |
|------------|-----|---------|---------|------|------|--------------|-------|
| 2x         | 128 | 2.47    | 2.40    | 2.17 | 2.93 | 0.20         | 7.93  |
| 4x         | 99  | 4.78    | 4.72    | 4.19 | 5.61 | 0.31         | 6.59  |
| 6x         | 82  | 7.03    | 6.97    | 6.06 | 7.88 | 0.41         | 5.86  |

Примечание. N – число исследованных образцов.

**Таблица 4.** Морфология исследованных цитотипов *B. prostrata*

| Признаки                         | Диплоиды                           | Тетраплоиды (I)             | Тетраплоиды (II)                | Гексаплоиды                 |
|----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
|                                  | var. <i>prostrata</i>              | var. <i>canescens</i>       | var. <i>villosissima</i>        | var. <i>canescens</i>       |
| Окраска растения                 | серовато-зеленая                   | сероватая                   | серая                           | сероватая                   |
| Розетка прикорневых побегов      | +                                  | +, –                        | –                               | –                           |
| Высота растения (см)             | 30–35 (50)                         | (30) 35–70                  | 50–70                           | 60–90                       |
| Стебель, диаметр у основания, см | 1–1.2 (2)                          | 2–4                         | 3–4                             | 2–4                         |
| Стебель, опушение                | слабое, коротко-курчаво-волосистое | плотно-курчаво-волосистое   | густое, бело-мохнато-волосистое | коротко-прижатое-волосистое |
| Лист, форма                      | линейные, вальковатые              | линейные, линейно-ланцетные | линейно-ланцетные, ланцетные    | линейные, линейно-ланцетные |
| Лист, длина (мм)                 | 10–13 (17)                         | 12–15 (20)                  | 11–15                           | 25–30                       |
| Лист, ширина (мм)                | 0.5–1                              | (0.5) 1–1.5                 | 1–1.75 (2)                      | 1.1–1.75                    |
| Лист, опушение                   | прижатое                           | полуприжатое, густое        | бело-мохнато-волосистое         | полуприжатое                |
| Лист, цвет                       | серовато-зеленые                   | серовато-беловатые          | серовато-белые                  | сероватые                   |

**Таблица 5.** Спектры рестрикции некоторых фрагментов хпДНК *B. prostrata*

| Пара участок ДНК + фермент   | Выявляемые фракции ДНК, пн |                         |                         |
|------------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                              | генотип 1 (диплоиды)       | генотип 2 (гексаплоиды) | генотип 3 (тетраплоиды) |
| <i>rbcL</i> + <i>Erh</i> I   | 750                        | 750                     | 300+450                 |
| <i>pbsK</i> + <i>BstAC</i> I | 300+250                    | 550                     | 550                     |
| <i>DT</i> + <i>Bpu</i> 14 I  | 800+200                    | 800+200                 | 1000                    |
| <i>DT</i> + <i>Bsp</i> 4C I  | 650+450                    | 470+380+250             | 470+420+250             |

Примечание. Размер фрагментов ДНК приведен условно, в соответствии с возможностями электрофоретического разделения.

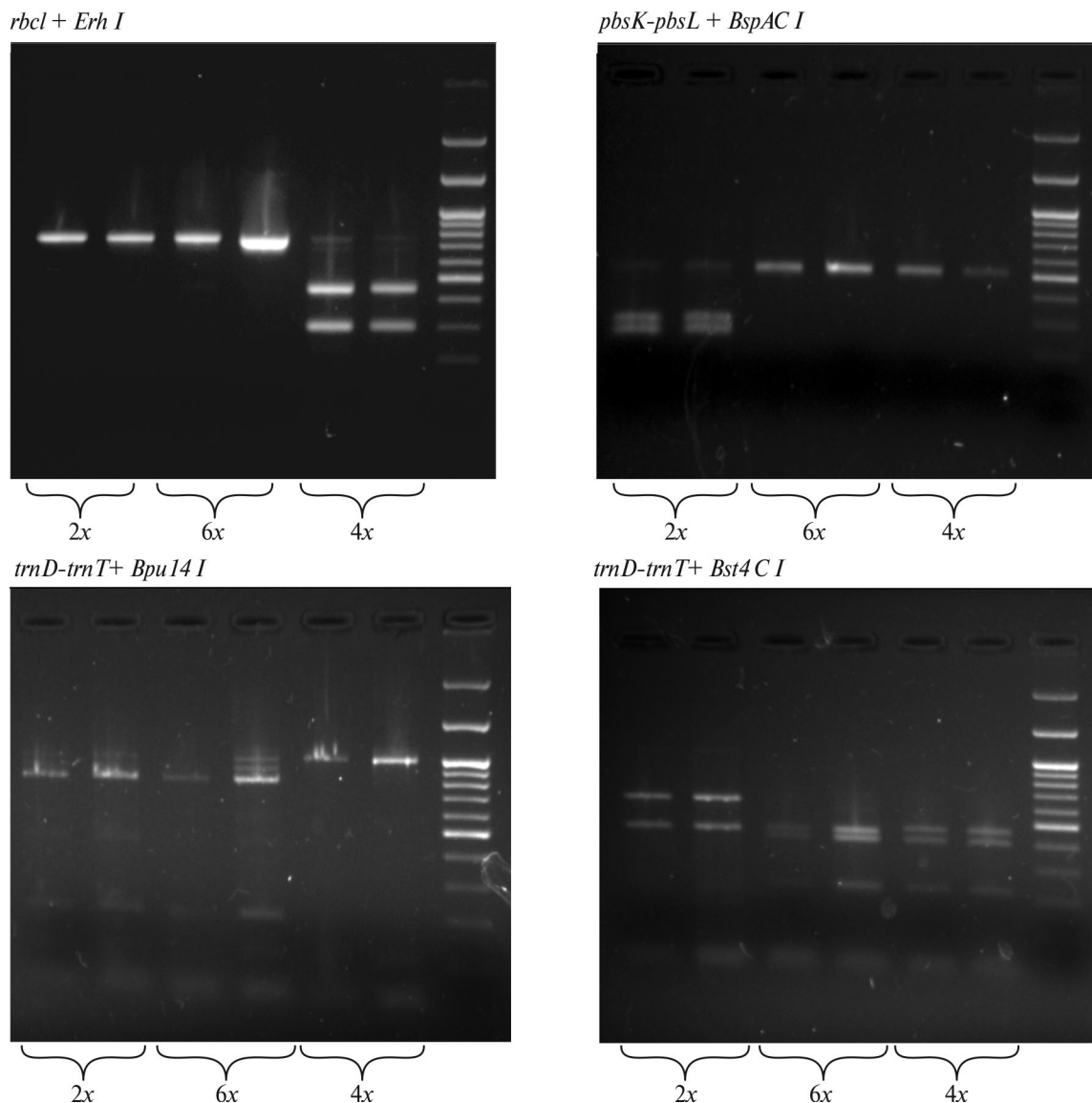
По данным А.А. Бутник [37] шерстистоопушенные формы *Bassia prostrata* характеризуются крупноклеточным эпидермисом с утолщенной наружной стенкой и мощной склеренхимной обкладкой вокруг проводящих пучков по сравнению с этими признаками у слабоопушенных растений, что, по мнению автора, повышает способность выживания в засушливых условиях. Однако большинство доказательств, что полиплоидия повышает адаптивность, являются косвенными, так как прямые тесты трудно провести и они редки.

#### Молекулярно-генетическая изменчивость

На основе анализа 130 образцов из 13 популяций (табл. 1) было выявлено три гаплотипа, различающихся по спектрам рестрикции (табл. 5).

В большинстве случаев внутривидовое разнообразие отсутствовало, а паттерны рестрикции соответствовали пloidности (рис. 4). В миксопloidных популяциях из Калмыкии часть образцов имела паттерны рестрикции, характерные для диплоидов, а другие образцы – паттерны рестрикции, характерные для тетраплоидов.

В целом проведенный нами молекулярно-генетический анализ отдельных цитотипов показал генетическую обособленность диплоидов, тетраплоидов и гексаплоидов. При этом гексаплоиды, представленные в двух популяциях из Армении (37 и 38), по спектрам рестрикции хпДНК занимают промежуточное положение



**Рис. 4.** Электрофореграммы рестрикции участков хлоропластной ДНК для образцов *Bassia prostrata* s. l. различной плоидности. 2х — диплоиды (популяция 14), 4х — тетраплоиды (популяция 18), 6х — гексаплоиды (популяция 38). Дорожка справа — маркер молекулярных масс 100 пн + 1.5 + 3 тпн.

между ди- и тетраплоидами. Возникновение гексаплоидов у *B. prostrata* в результате слияния нередуцированных гамет диплоидов и тетраплоидов было отмечено Е.Ш. Шахановым [38] при изучении мейоза, в процессе которого образовывались 27 закрытых бивалентов. Однако в связи с ограничениями на рекомбинацию хпДНК, связанную с ее наследованием от одного из родительских растений, промежуточные спектры рестрикции не являются свидетельством многократного гибридогенного происхождения гексаплоидов *B. prostrata*. Полученным спектрам рестрикции соответствует формирование предковой формой нескольких

гаплотипов, три из которых дали начало ныне живущим вариантам с различной плоидностью. Если же гексаплоиды являются гибридами, то такая гибридизация была по-видимому единичной, при этом формой, давшей начало хлоропластной ДНК, была форма, дающая нынешние спектры рестрикции гексаплоидов, вне зависимости от ее исходной плоидности. Предлагаемые эволюционные варианты связи плоидности и спектров рестрикции хпДНК представлены на рис. 5.

Однако для выявления конкретных путей становления данного полиплоидного комплекса

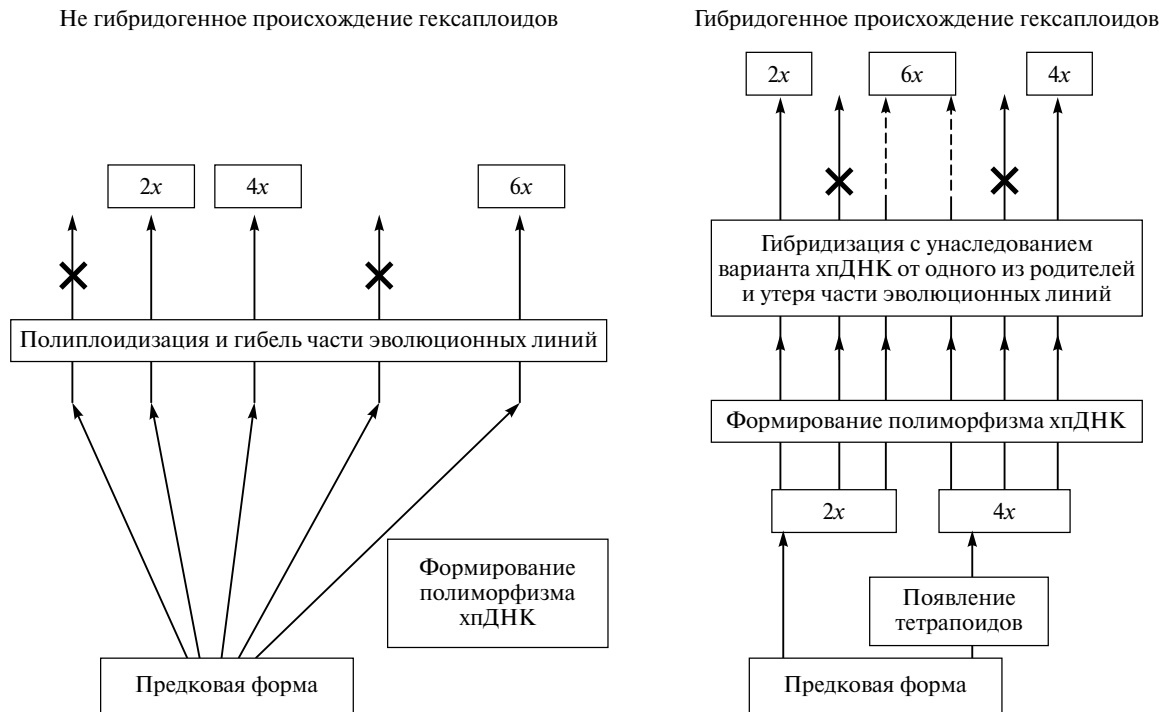


Рис. 5. Варианты эволюционной связи плоидности и спектров рестрикции участков хпДНК.

необходимы более детальные генетические исследования.

#### Эколого-географическое распространение цитотипов

*B. prostrata* s. l. характеризуется широкой экологической амплитудой, произрастая как в условиях холодных высокогорий, так и в жарких пустынях на высотах от 200–300 до 3000 м над ур. моря. Диплоидные популяции встречаются в степных сообществах, часто каменистых, и приурочены преимущественно к равнинным и низкорослым местообитаниям. В среднем горном поясе отмечены на высотах от 750 до 2000 м. Тетраплоиды распространены в более засушливых условиях по сравнению с диплоидами и обитают на песках или в степных сообществах. Гексаплоиды приурочены к каменистым склонам, часто обитают на нарушенных местообитаниях. Изредка отмечены также в составе смешанных степных популяций совместно с диплоидами.

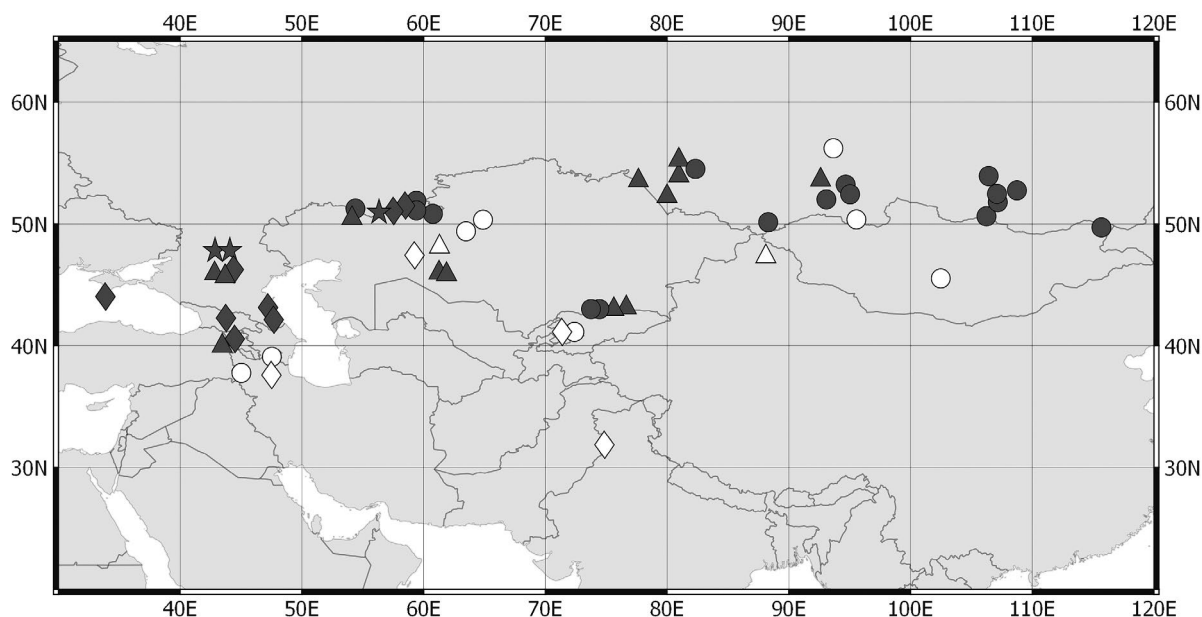
Согласно географическому распространению (рис. 6) в восточной, преимущественно горной части ареала *B. prostrata* от Алтая до Забайкальского края встречается только диплоидный цитотип. Западнее, на равнинах в степной и полупустынной зонах с более засушливым климатом, наряду с диплоидами часто встречаются тетраплоиды. Гексаплоидный цитотип, изредка отме-

ченный в центральной части ареала, преобладает в западной части изученного ареала в Армении и Дагестане. Высота над уровнем моря не влияет на распространение цитотипов.

Проведен анализ распространения цитотипов бассейна по основным климатическим факторам: среднегодовая температура, средняя температура января, средняя температура июля, сумма годовых осадков. Использованы данные сайта Climate-Data.org (<https://ru.climate-data.org>) для населенных пунктов наиболее близких к местонахождениям изученных 39, популяций и для 14 популяций с известным цитотипом по литературе [17–26]. Диплоиды распространены в районах со среднегодовой температурой от  $-5^{\circ}\text{C}$  (Алтай) до  $11.9^{\circ}\text{C}$  (Иран), тетраплоиды встречаются в районах с диапазоном только положительных среднегодовых температур  $2.6\text{--}11.6^{\circ}\text{C}$ , а гексаплоиды ограничены в распространении среднегодовой температурой не ниже  $4^{\circ}\text{C}$ . Влияние других указанных выше климатических факторов на закономерности в распространении цитотипов *B. prostrata* не выявлено.

В целом наши данные согласуются с гипотезой, что для полиплоидов характерна лучшая приспособленность к аридным условиям по сравнению с родственными диплоидами [39–41].





**Рис. 6.** Географическое распространение цитотипов *B. prostrata* по данным размера генома. Серые значки — наши данные, белые — по литературным источникам; уровень плоидности: круг — 2х, треугольник — 4х, ромб — 6х, звезда — миксоплоидная популяция.

По характеру субстрата для *B. prostrata* s. l. выделяют глинистый, песчаный и каменистый экотипы [42]. По нашим данным, диплоиды занимают более плотные глинистые субстраты, часто солонцовые, в степных сообществах; тетраплоиды обитают, как правило, на песчаных субстратах (пески, барханы); гексаплоиды встречаются на каменистых склонах часто антропогенно нарушенных.

#### Таксономическая интерпретация

Ранее было отмечено [43], что три разновидности *Bassia prostrata* характеризуются различным уровнем плоидности. Авторы приводят диплоидный цитотип как *B. prostrata* var. *virescens* (соответствует по нашим данным var. *prostrata*) тетраплоидный цитотип *B. prostrata* var. *villoscana* (соответствует var. *canescens* по нашим данным) и гексаплоидный цитотип *B. prostrata* var. *villosissima* (табл. 4). В статье было указано, что выделенные разнотетраплоидные формы могут являться отдельными видами, поскольку взаимного переопыления растений с разным уровнем плоидности не обнаружено.

Проведенный нами анализ показал, что три группы, выделенные по морфологическим признакам, не коррелируют с тремя группами, обозначенными генетически. Соответствие отмечено только для диплоидов (var. *prostrata*), тогда как тетраплоиды по морфологическим признакам могут относиться как к var. *canescens*, так и var.

*villosissima*. Гексаплоиды по морфологии сходны с var. *canescens*, а генетически совмещают признаки как диплоидов, так и тетраплоидов, что свидетельствует об их гибридогенном характере. Однако для более детальных выводов необходимо включить в молекулярно-генетический анализ большее число гексаплоидных образцов.

Таким образом, на основании полученных данных в пределах полиплоидного комплекса *Bassia prostrata* мы считаем целесообразным выделение внутри видовых таксонов в ранге разновидностей *B. prostrata* var. *prostrata*, *B. prostrata* var. *canescens* Moq. и *B. prostrata* var. *villosissima* Bong. et C.A. Mey.

Исследование выполнено при поддержке РФФИ (проект № 19-04-00546-а) и научной программы № AAAA-A21-121011290024-5 Центрального сибирского ботанического сада СО РАН и научной программы № FWNR-2022-0015 ФИЦ Института цитологии и генетики СО РАН. Финансирование в части реактивов для проточной цитометрии некоторых образцов проведено при поддержке Минобрнауки России по договору № 075-15-2021-1056 от 28 сентября 2021 г. между БИН РАН и Минобрнауки РФ, также в рамках Соглашения № ЕП/29-10-21-4 от 29 октября 2021 г. между БИН РАН и ЦСБС СО РАН. При подготовке публикации использованы материалы биоресурсных научных коллекций ЦСБС СО

РАН УНУ № 440537 (NS) и оборудование для микроскопического анализа ЦСБС СО РАН.

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. Otto S.P. The evolutionary consequences of polyploidy // Cell. 2007. V. 131. I. 3. P. 452–462. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.022>
2. Soltis D.E., Soltis P.S., Schenck D.W. et al. Autopolyploidy in angiosperms: Have we grossly underestimated the number of species? // Taxon. 2007. V. 56. I. 1. P. 13–30.
3. Jiao Y., Wickett N.J., Ayyampalayam S. et al. Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms // Nature. 2011. V. 473. P. 97–100. <https://doi.org/10.1038/nature09916>
4. Löve A. Taxonomical evaluation of polyploids // Caryologia. 1951. V. 3. I.3. P. 263–284. <https://doi.org/10.1080/00087114.1951.10797163>
5. Lewis W.H. Cytocatalytic evolution in plants // Bot. Rev. 1967. V. 33 I. 2. P. 105–115.
6. Grant V. Plant Speciation. N. Y.: Columbia Univ. Press, 1971. 432 p.
7. Шнеер В.С., Пунина Е.О., Родионов А.В. Внутривидовые различия в плоидности у покрытосеменных и их таксономическая интерпретация // Бот. жур. 2018. № 5. С. 555–585. <https://doi.org/10.1134/S0006813618050010>
8. Бегучев П.П. Материалы к изучению ареала *Kochia prostrata* (L.) Schrad // Изень – *Kochia prostrata* (L.) Schrad. Ташкент: Фан, 1971. С. 10–16.
9. Moquin-Tandon C.H.B.A. *Chenopodearum* monographica enumeratio. Parisiis: P.-J. Loss., 1840. P. 182. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.15484>
10. Bongard C., Meyer A. *K. prostrata* var. *villosissima* Bong. et C.A. Mey // Verz. Saisang-nor Pfl. St. Petersburg: Mem. Acad. Sci., 1841. 67 p.
11. Ильин М. *Camphorosmeae* Moq. // Флора СССР. Т. 6. М.:Л.: Изд-во Акад. наук, 1936. С. 116–134.
12. Zhu G., Mosyakin S.L., Clemants S.E. *Chenopodiaceae* Vent. // Flora of China. V. 5. Beijing-St. Louis: Sci. Press, Missouri Botan. Garden Press, 2003. P. 351–414.
13. Пратов У. Вопросы внутривидовой систематики *Kochia prostrata* (L.) Schrad. // Изень. Ташкент: Фан, 1971. С. 3–5.
14. Черепанов С.К. Сосудистые растения России и сопредельных государств (в пределах бывшего СССР). СПб.: Мир и семья, 1995. 990 с.
15. Сергеевская Л.П. *Kochia* Roth Кохия // Флора Западной Сибири. 1964. Т. 12. Ч. 2. Томск: Изд-во Томского у-та, С. 3260–3261.
16. Kadereit G., Freitag H. Molecular phylogeny of *Camphorosmeae* (*Camphorosmoideae*, *Chenopodiaceae*): Implications for biogeography, evolution of C4-photosynthesis and taxonomy // Taxon. 2011. V. 60. I. 1. P. 51–78. [https://doi.org/10.1002/tax.601006open\\_in\\_new](https://doi.org/10.1002/tax.601006open_in_new)
17. Ломоносова М.Н., Красников А.А. Числа хромосом некоторых представителей семейства *Chenopodiaceae* // Бот. жур. 1993. Т. 78. № 3. С. 158–159.
18. Lomonosova M.N. Contribution to chromosome study in some vascular plants from Russia: *Chenopodiaceae*, *Amaranthaceae*, *Brassicaceae* // Bot. Pacifica. 2018. V. 7. № 2. P. 151–156. <https://doi.org/10.17581/bp.2018.07201>
19. Lomonosova M.N., An'kova T.V., Voronkova M.S. et al. Ploidy level in the representatives of *Chenopodiaceae* from North Asia as revealed by genome size and chromosome numbers // Turczaninowia. 2020. V. 23. № 1. P. 24–31. <https://doi.org/10.258/turczaninowia23.1.3>
20. Степанов Н.В. Хромосомные числа некоторых таксонов высших растений флоры Красноярского края // Бот. жур. 1994. Т. 79. № 2. С. 135–139.
21. Hanelt P. IOPB chromosome number reports XLII // Taxon. 1973. V. 22. I. 5–6. P. 647–654.
22. Захарьева О.И., Сосков Ю.В. Хромосомные числа некоторых пустынных кормовых растений // Бюлл. ВИР. 1981. Вып. 108. С. 57–60.
23. Ghaffari S.M., Balaei Z., Chatrehoor T., Akhiani H. Cytology of SW Asian *Chenopodiaceae*: New data from Iran and a review of previous records and correlations with life forms and C4 photosynthesis // Plant Syst. Evol. 2015. V. 301. P. 501–521. <https://doi.org/10.1007/s00606-014-1109-6>
24. Lomonosova M.N., Shauro D.N., An'kova T.V. et al. IAPT/IOPB chromosome data // Taxon. 2014. V. 63. I. 6. P. E.16–E18. <https://doi.org/10.12705/636.37>
25. Khatoon S. Polyploidy in the flora of Pakistan: An analytical study. PhD. Thesis. Karachi: Univ. Karachi, 1991.
26. Šmarda P., Knápek O., Březinová A. et al. Genome sizes and genomic guanine+cytosine (GC) contents of the Czech vascular flora with new estimates for 1700 species // Preslia. 2019. V. 91. P. 117–142. <https://doi.org/10.23855/preslia.2019.117>
27. Смирнов Ю.А. Ускоренный метод исследования соматических хромосом плодовых // Цитология. 1968. Т. 10. № 12. С. 1601–1602.
28. Pfosser M., Amon A., Lelley T., Heberle-Bors E. Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines // Cytometry. 1995. V. 21. I. 4. P. 387–393.

- <https://doi.org/10.1002/cyto.990210412>
29. Doležel J., Greilhuber J., Lucretti S. et al. Plant genome size estimation by flow cytometry: Inter-laboratory comparison // Ann. Botany. 1998. V. 82. Supp. A. P. 17–26. <https://doi.org/10.1006/anbo.1998.0730>
  30. Doležel J., Bartoš J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size // Ann. of Botany. 2005. V. 95. I. 1. P. 99–110. <https://doi.org/10.1093/aob/mci005>
  31. Doležel J., Sgorbati S., Lucretti S. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants // Physiol. Plantarum. 1992. V. 85. P. 625–631.
  32. Obermayer R., Leitch I.J., Hanson L., Bennett M.D. Nuclear DNA C-values in 30 species double the familial representation in pteridophytes // Ann. Botany. 2002. V. 90. P. 209–217. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf167>
  33. Greilhuber J., Doležel J., Lysák M., Bennett M.D. The origin, evolution, and proposed stabilisation of the terms “genome size” and, C-value’ to describe nuclear DNA contents // Ann. Botany. 2005. V. 95. P. 255–260. <https://doi.org/10.1093/aob/mci019>
  34. Kosterin O.E., Bogdanova V.S. Relationship of wild and cultivated forms of *Pisum* L. as inferred from an analysis of three markers, of plastid, mitochondrial and nuclear genomes // Genet. Res. Crop Evol. 2008. V. 55. P. 735–755. <https://doi.org/10.1007/s10722-007-9281-y>
  35. San Millán R.M., Martínez-Ballesteros I., Rementeria A. et al. Online exercise for the design and simulation of PCR and PCR-RFLP experiments // BMC Res. Notes. 2013. V. 6. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-513>
  36. Рубцов М.И., Сагымбаев Р.Р., Шаханов Е.Ш. и др. Естественные полиплоиды изения и терескена серого как исходный материал для селекции // Докл. ВАСХНИЛ. 1989. № 4. С. 15–17.
  37. Бутник А.А. Анатомические особенности строения листа различноопушенных форм *Kochia prostrata* (L.) Schrad. // Материалы по физиологии и экологии растений Средней Азии. Ташкент, 1966. С. 59–69.
  38. Шаханов Е.Ш. Полиплоидия и отдаленная гибридизация аридных кормовых культур: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М: МСХА им. Тимирязева, 1991. 32 с.
  39. Hao G.Y., Lucero M.E., Sanderson S.C. et al. Polyploidy enhances the occupation of heterogeneous environments through hydraulic related trade-offs in *Atriplex canescens* (Chenopodiaceae) // New Phytol. 2013. V. 197. I. 3. P. 970–978. <https://doi.org/10.1111/nph.12051>
  40. Levin D.A. The timetable for allopolyploidy in flowering plants // Ann. Botany. 2013. V. 112. P. 1201–1208. <https://doi.org/10.1093/aob/mct194>
  41. Čentner M., Kúr P., Kolár F., Suda J. Climatic conditions and human activities shape diploid-tetraploid coexistence of different spatial scales in the common weed *Tripleurospermum inodorum* (Asteraceae) // J. Biogeography. 2019. V. 46. P. 1355–1366. <https://doi.org/10.1111/jbi.13629>
  42. Дзюбенко Н.И., Сосков Ю.Д. Генетические ресурсы кохии простертой – *Kochia prostrata* (L.) Schrad. СПб: ВИР, 2014. 336 с.
  43. Лиджиева Н.Ц., Джалсанова С.С. Цитогенетическое изучение *Kochia prostrata* (L.) Schrad. // XI съезд Русс. бот. общества. 2003. Т. 1. С. 306–307.

## CYTOGEOGRAPHY OF THE POLYPLOID COMPLEX *BASSIA PROSTRATA* S. L. (CHENOPODIACEAE) BASED ON GENOME SIZE ANALYSIS AND PCR-RFLP CPDNA

T. V. Pankova<sup>1</sup>\*, M. N. Lomonosova<sup>1</sup>, O. V. Vaulin<sup>2</sup>, A. Yu. Korolyuk<sup>1</sup>, E. A. Korolyuk<sup>1</sup>,  
D. N. Shaulo<sup>1</sup>, B. Osmonali<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

<sup>2</sup>Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

<sup>3</sup>Institute of Botany and Phytointroduction, Almaty, 050040 Republic of Kazakhstan

\*e-mail: [ankova\\_tv@mail.ru](mailto:ankova_tv@mail.ru)

The cytogeography of the polyploid complex *Bassia prostrata* s. l. was studied by flow cytometry (FCM) on material from 39 populations in Armenia, Kazakhstan and Russia. Based on the determination of the DNA content in the nuclei (2C-value), three cytotypes were identified: diploid ( $2n = 18$ ), tetraploid ( $2n = 36$ ) and hexaploid ( $2n = 54$ ). Verification of the ploidy level determined by DNA content was carried out by parallel direct counting of the chromosome number. Most of the studied populations are represented by a single cytotype; in three populations mixed ploidy is noted, when tetraploids or hexaploids are found along with diploids. The genetic isolation of chloroplast DNA of diploid and polyploid cytotypes was revealed. Presumable variants of the evolutionary relationship of cytotypes are shown based on cpDNA restriction spectra.

**Keywords:** cytotype, ecology of cytotypes, polyploidy, flow cytometry, chromosome number, DNA ploidy level, PCR-RFLP.

УДК 575.174.015.3:631.527:633.11:633.16

## ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ЯРОВОГО ЯЧМЕНЯ ПО ГОРДЕИН-КОДИРУЮЩИМ ЛОКУСАМ ЗА 40-ЛЕТНИЙ ПЕРИОД НАУЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ В КРАСНОЯРСКОМ КРАЕ

© 2024 г. Н. А. Сурин<sup>1</sup>, Л. Н. Шевцова<sup>2, \*</sup>, Н. С. Козулина<sup>1</sup>, Ю. М. Борисов<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Красноярский научно-исследовательский институт сельского хозяйства Федерального исследовательского центра “Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук”, Красноярск, 660041 Россия

<sup>2</sup>Красноярский государственный аграрный университет, Красноярск, 660049 Россия

<sup>3</sup>Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

\*e-mail: shevtsovaln48@rambler.ru

Поступила в редакцию 14.09.2023 г.

После доработки 25.09.2023 г.

Принята к публикации 06.10.2023 г.

В статье рассмотрены и обобщены результаты исследований полиморфизма гордеинов (HRD) ярового ячменя методом электрофореза в Красноярском НИИ сельского хозяйства (КНИИСХ) за период с 1988 по 2021 г. Проведенный анализ динамики генетического разнообразия сортообразцов ячменя экологического и селекционных питомников КНИИСХ, районированных и допущенных к использованию сортов в Красноярском крае показал существенное сужение частоты встречаемости и утрату ряда аллелей, характерных для условий Приенисейской Сибири, и появление редких вариантов для Сибирского региона. На основе многолетних наблюдений состава гордеинов селекционных образцов (перспективные и браковки), созданных по разным направлениям селекции, выявлена сопряженность ряда аллелей с хозяйственно ценными признаками.

**Ключевые слова:** ячмень, селекция, идентификация, электрофоретические спектры, запасные белки ячменя, гордеины, аллели гордеинов, разнообразие, частоты встречаемости.

DOI: 10.31857/S0016675824030037 EDN: DPHBMH

В настоящее время установлены значительный генетический полиморфизм для ячменя по локусам запасного белка — гордеина (Hrd), а также различия частот встречаемости аллелей гордеина у популяций и сортов в зависимости от географического происхождения [1–3]. Расширились возможности оценить адаптивную и селекционную важность аллелей гордеина и их целенаправленного использования в качестве генетических маркеров для ускорения селекционного процесса и повышения результативности отбора генотипов, наиболее приспособленных к определенным агроэкологическим зонам [4, 5].

Цель работы — сравнительный анализ во времени аллельного состава гордеинов сортов ярового ячменя, возделываемых в Красноярском крае, сортообразцов селекционных питомников КНИИСХ и сортов инорайонной селекции, выделенных в качестве источников ценных признаков в агроэкологических условиях края.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материала для исследования служили 33 сорта ярового ячменя, допущенных к использованию (районированных) на территории Красноярского края (начиная с 1940 г.), 40 местных сибирских форм ярового ячменя, не менее 500 образцов селекционных питомников Красноярского НИИСХ, а также 400 сортообразцов инорайонной селекции, выделенных по комплексу хозяйственных признаков в агроэкологических условиях края.

Полевая оценка образцов коллекции ВНИИР выполнена в КНИИСХ в лесостепной зоне Красноярского края. Почва участка чернозем обыкновенный маломощный с содержанием гумуса (по Тюрину) 6.00%, N-NO<sub>3</sub> 31.3 мг/кг почвы, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (по Мачигину) 5.0 мг/100 г почвы, K<sub>2</sub>O (по Мачигину) 21.9 мг/100 г почвы, pH 6.2. Предшественник чистый пар.

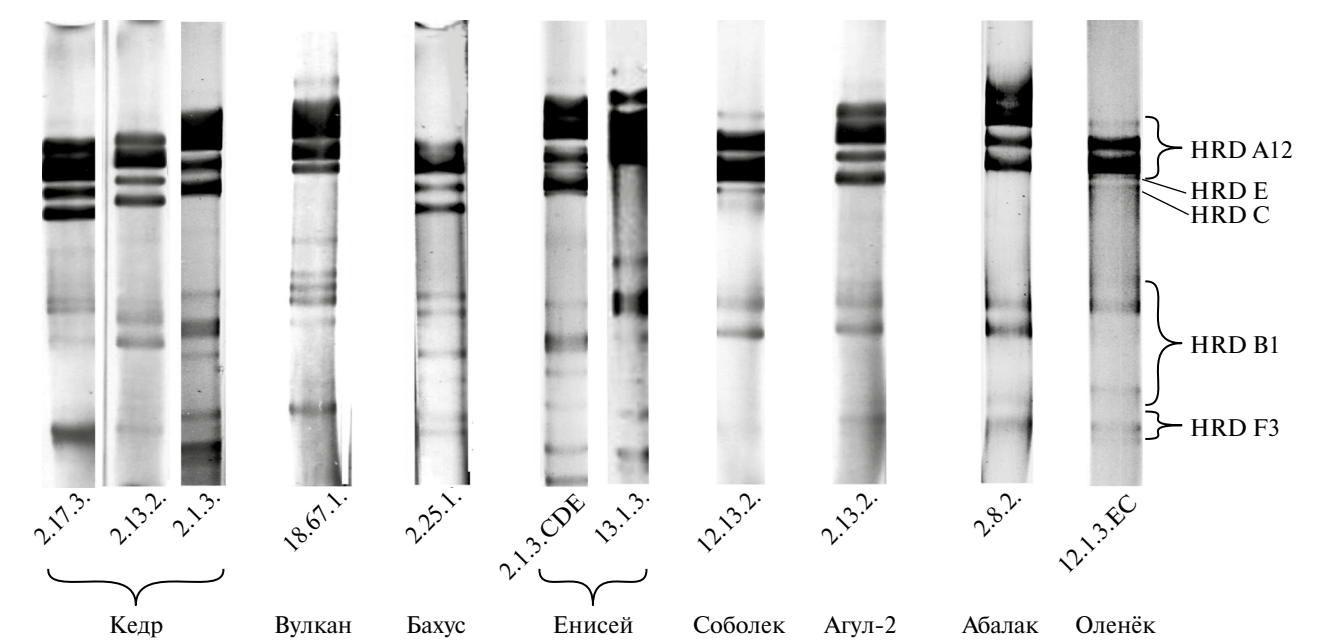


Рис.1. Электрофоретические спектры гордеинов ряда сортов селекции Красноярского НИИСХ.

| № п/п | Название сорта      | Учреждение-оригинатор | Год районирования | Гордеины А.В.Ф.         |
|-------|---------------------|-----------------------|-------------------|-------------------------|
| 1     | Червонец            | Тулунская ГСС         | 1940              | 2.39.2.                 |
| 2     | Винер 11.63         | Фаленская ГСС         | 1941              | 12.19.1.+2.19.1.        |
| 3     | Красноярский -1     | КНИИСХ                | 1967              | 12.19.1.+2.39.2.        |
| 4     | Айхал               | Якутский НИИСХ        | 1974              | 12.8.2.+2.8.2.          |
| 5     | Рассвет             | КНИИСХ                | 1977              | 12.13.2.                |
| 6     | Агул                | КНИИСХ                | 1978              | 2.13.2.+2.39.2.         |
| 7     | Баджей              | КНИИСХ                | 1980 ГСИ          | 12.13.2.                |
| 8     | Енисей              | КНИИСХ                | 1981              | 13.1.3.+2.1.3.CDE       |
| 9     | Красноярский-80     | КНИИСХ                | 1986              | 2.17.3.                 |
| 10    | Новосибирский-80    | СибНИИРС              | 1986              | 2.8.2.+24.8.2.          |
| 11    | Агул-2              | КИИСХ                 | 1988              | 2.13.2.                 |
| 12    | Кедр                | КНИИСХ                | 1988              | 2.17.3.+2.1.3.+2.13.2.  |
| 13    | Лазурит             | КНИИСХ                | 1989 ГСИ          | 2.17.3.                 |
| 14    | Маяк                | КНИИСХ                | 1989 ГСИ          | 18.н.н.                 |
| 15    | ТАН1                | Донской НИИСХ         | 1990              | 23.29.3.                |
| 16    | Одесский 115        | ВСГИ                  | 1990              | 12.13.2.                |
| 17    | Соболек             | КНИИСХ                | 1996              | 12.13.2.                |
| 18    | Ача                 | СибНИИРС              | 1997              | 12.1.3.                 |
| 19    | Андрей              | НИИСХ Северо-Востока  | 1999              | 2.95.1.                 |
| 20    | Вулкан              | КНИИСХ                | 2002              | 18.67.1.                |
| 21    | Бахус               | КНИИСХ                | 2003              | 2.25.1.                 |
| 22    | Оскар               | КНИИСХ                | 2007              | 12.1.3.C                |
| 23    | Биом                | СибНИИРС              | 2008              | 24.8.2.CD               |
| 24    | Буян                | КНИИСХ                | 2012              | 2.17.3.                 |
| 25    | Абалак              | КНИИСХ                | 2013              | 2.8.2.                  |
| 26    | Омский голозерный 1 | СибНИИСХ              | 2013              | 18.35.1.+2.1.3.+2.17.3. |
| 27    | Омский голозерный 2 | СибНИИСХ              | 2013              | 18.35.1.                |

| № п/п | Название сорта  | Учреждение-оригинатор          | Год районирования | Гордеины А.В.Ф. |
|-------|-----------------|--------------------------------|-------------------|-----------------|
| 28    | Оленек          | КНИИСХ                         | 2014              | 12.1.3.ЕС       |
| 29    | Танай           | СибНИИРС                       | 2014              | 12.1.3.         |
| 30    | Красноярский 91 | КНИИСХ                         | 2017              | 12.1.3.         |
| 31    | Емеля           | КНИИСХ                         | 2018              | 2.81.3.         |
| 32    | Уватский        | КНИИСХ, ГАУ Северного Зауралья | 2018 ГСИ          | 12.8.2.         |
| 33    | Такмак          | КНИИСХ                         | 2019              | 12.1.3.         |

Примечание. н.н. — неизвестные аллели.

Электрофорез гордеинов проводили в 13%-ном крахмальном геле в присутствии 3 М мочевины [6, 7]. Электрофоретические спектры записывали в виде генетических формул (HRD A.V.F.) согласно каталогу блоков компонентов гордеинов [5, 7].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования полиморфизма гордеинов районированных в Красноярском крае сортов ярового ячменя, включая паспортизацию сортов селекции КНИИСХ (проводилась с 1988 г. [8, 9], рис. 1), выявили наиболее часто встречаемые (характерные) аллели для обширной территории края, а также динамику изменчивости аллельного состава гордеинов сортов на протяжении периода районирования с 1940 г. до настоящего времени.

В табл. 1 представлены районированные и допущенные к использованию в Красноярском крае сорта ярового ячменя (начиная с 1940 г.), где прослеживаются уровни межсортового (20 разных гордеиновых формул для 33 сортов) и внутрисортового полиморфизма.

Рассматривая полиморфизм этих сортов во времени, можно отметить устойчивую встречаемость аллелей *A2*, *A12*, *B1*, *B8*, *B17*, но также утрату аллеля *B13* в формулах районированных сортов, начиная с 2000 г. При этом в предыдущих исследованиях и публикациях [8–10] выделено, что именно аллель *B13* являлся самым распространенным среди сортов красноярской селекции (входит в биотипный состав сортов Рассвет, Агул, Агул-2, Баджей, Кедр, Соболек) и районированных в крае. В работах [11, 12] авторы отмечают, что гладкоостые красноярские сорта шестирядного ячменя, ранее возделывавшиеся на территории Красноярского края, Агул (2.13.2. и 2.39.2.), Агул-2 (2.13.2.) и Соболек (12.13.2.) с аллелем *B13* локуса *Hrd B*

занимали в разные годы лидирующее положение в регионе, что подчеркивает адаптивную роль формул гордеинов 12.13.2. и 2.13.2., а особенно аллеля *B13* к условиям Красноярского края. Начиная с 2002 г. изменилось не только соотношение частот аллелей в группе районированных в крае сортов, но и отмечается появление редких аллелей *B81* и *B67* в формулах гордеина сортов красноярской селекции. На рис. 2 представлена диаграмма генетического разнообразия районированных в крае сортов (из табл.1) по локусу *Hrd B*, разделенных на две группы по периодам селекции: первая группа — до 2000 г., вторая группа — от 2001 г. и отдельно выделена группа сортов селекции КНИИСХ. Частота встречаемости гордеина В рассчитана по количеству генотипов с конкретным аллелем.

Известно, что успех в селекционной работе определяется в значительной мере ценностью исходного материала. В Красноярском НИИСХ в процессе многолетнего изучения коллекционного материала ВНИИР им. Н.И. Вавилова в жестких условиях Восточной Сибири выделены ценные источники по важнейшим селекционным признакам [13–15].

За период с 1989 по 2007 г. методом электрофореза были исследованы 225 сортообразцов ярового ячменя различного эколого-географического происхождения (в том числе 40 местных стародавних образцов), привлекаемых в разные годы в качестве родительских форм в селекционные программы института [10, 15]. Сравнительный анализ выборок сортообразцов за период по 2007 г. показал, что, несмотря на широкое вовлечение в гибридизацию (Красноярский НИИСХ) исходных форм с аллелями *A1*, *A23*, *B3*, *B21*, *B29*, в сортах и перспективных селекционных образцах института эти аллели отсутствовали. С другой стороны, отмечен преобладающий вклад родительских форм с аллелями *A2*, *A12*, *B1*, *B8*,

*B13*, *B17* в сорта института и в целом в сибирские селекционные сорта [10].

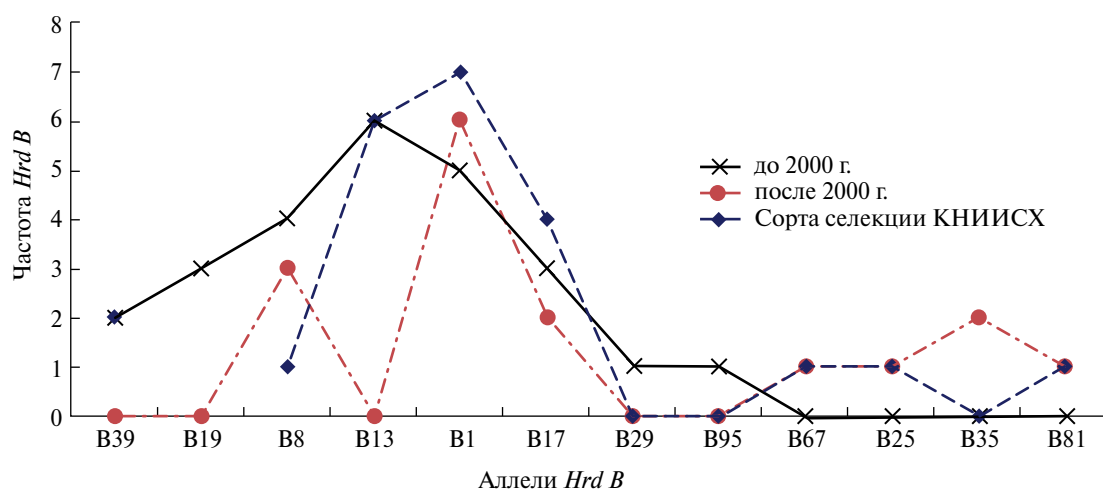
Сравнение выборок сибирских стародавних и сибирских селекционных сортообразцов выявило высокую частоту встречаемости аллелей *A2*, *B1*, *B8*, *B13*, *B17*, *B39* во всех сибирских сортообразцах. Но обнаружено, что аллель *A44* (частота встречаемости среди стародавних форм равна 26%) полностью утрачен и не встречается в современных сортах (табл. 2). Указанный аллель был впервые определен у образца Лыковский (44.1.3.+2.13.2.), возделываемого семьей Лыковых, живших в изоляции в горах юга Красноярского края более 70 лет. Образец был подробно исследован в Красноярском НИИСХ, позже этот аллельный вариант был зарегистрирован А.А. Поморцевым в Институте общей генетики (ИОГен АН СССР) под номером *A44*.

По предварительной полевой оценке коллекционного материала ячменя (238 образцов) за период 2014–2017 гг. были определены генетические формулы выделенных селекционерами 10 образцов с положительным сочетанием комплекса ценных селекционных признаков – Тарский-3<sub>Омск</sub> (12.1.3.+12.13.2.), Казьминский<sub>Хабаровск</sub> (12.1.3.2.), AC Albright<sub>Канада</sub> (12.1.3.2.), AC Stacey<sub>Канада</sub> (12.1.3.2.), Jackson<sub>Канада</sub> (2.1.3.2.), VVP-2D-1<sub>Канада</sub> (2.1.3.2.), Багрец<sub>Свердловск</sub> (2.8.2.), Калита<sub>Свердловск</sub> (2.8.2.), Степан<sub>Челябинск</sub> (2.8.2.), Талан<sub>Новосибирск</sub> (2.8.2.) [11]. В этой группе сортообразцов лидирующая позиция по частоте встречаемости принадлежит аллелю *B13* (50%),

четыре образца имеют генетическую формулу 2.8.2. (распространенная формула в культуре ярового ячменя, в том числе характерна для новосибирских сортов) и один генотип с формулой 12.1.3.

Последующее изучение образцов (2016–2021 гг.) коллекции ВНИИР по комплексу селекционных показателей позволило выделить 45 перспективных образцов для Восточной Сибири, которые могут быть использованы в качестве источников ценных признаков [16]. Определение генетических формул по гординам этих сортов сопровождалось изучением следующих селекционных показателей: урожайность, низкое варьирование урожайности (*Cv*, %), экологическая стабильность (*St*<sup>2</sup>), стрессоустойчивость, стабильность генотипа (*Sg*<sub>i</sub>), высокая экологическая пластичность (*b*<sub>i</sub> > 1.0), селекционная ценность генотипов по массе зерна с м<sup>2</sup>, коэффициент адаптации (*KA* > 1.0) [16]. В этой группе выделившихся перспективных образцов у четырех сортов отмечены лучшие (многолетние) показатели по пяти (и более) селекционным признакам: AC Albright<sub>Канада</sub> (12.1.3.2.), Cirstin<sub>Германия</sub> (2.1.3.+2.17.3.), Тарский-3<sub>Омск</sub> (12.1.3.+12.13.2.), Абалак<sub>Красноярск–Тюмень</sub> (2.8.2.) [16].

В табл. 2 представлен сравнительный анализ аллельного состава горделинов в рассмотренных выборках ярового ячменя (экологический питомник, коллекция ВНИИР им. Н.И. Вавилова, районированные сорта) по периодам изучения в Красноярском НИИСХ.



**Рис. 2.** Распределение частот встречаемости аллелей локуса *Hrd B* в группах сортов, районированных и допущенных к использованию в Красноярском крае.

**Таблица 2.** Частота встречаемости (%) выделившихся в Сибири аллелей локусов *Hrd A* и *Hrd B* у сортообразцов ярового ячменя

| Аллели<br><i>Hrd A</i> и<br><i>Hrd B</i> | Районированные и допущенные к использованию<br>сорта ячменя в Красноярском крае |                                           |                                             | Экологический питомник,<br>коллекция ВНИИР им. Н.И. Вавилова |                                                                   |                                                                                   |
|------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
|                                          | год райони-<br>рования — до<br>2000 г.                                          | год райониро-<br>вания — после<br>2000 г. | сорта селекции<br>КНИИСХ<br>(1967–2020 гг.) | местные<br>формы                                             | сорта<br>сибирской<br>селекции (годы<br>изучения —<br>до 2007 г.) | выделившиеся в крае<br>сорта инорайонной<br>селекции (годы<br>изучения 2016–2021) |
| <i>A2</i>                                | 60.0                                                                            | 37.5                                      | 56.5                                        | 54.0                                                         | 57.1                                                              | 49.0                                                                              |
| <i>A3</i>                                | 0                                                                               | 0                                         | 0                                           | 3.2                                                          | 1.4                                                               | 0                                                                                 |
| <i>A4</i>                                | 0                                                                               | 0                                         | 0                                           | 1.6                                                          | 1.4                                                               | 0                                                                                 |
| <i>A12</i>                               | 32.0                                                                            | 35.2                                      | 34.7                                        | 1.6                                                          | 21.4                                                              | 26.4                                                                              |
| <i>A13</i>                               | 4.0                                                                             | 0.0                                       | 4.3                                         | 0                                                            | 1.4                                                               | 1.9                                                                               |
| <i>A18</i>                               | 4.0                                                                             | 18.8                                      | 8.6                                         | 3.2                                                          | 4.2                                                               | 0                                                                                 |
| <i>A21</i>                               | 0.0                                                                             | 0                                         | 4.3                                         | 0                                                            | 1.4                                                               | 3.8                                                                               |
| <i>A23</i>                               | 4.0                                                                             | 0                                         | 0                                           | 0                                                            | 0                                                                 | 13.2                                                                              |
| <i>A24</i>                               | 0                                                                               | 6.2                                       | 0                                           | 9.8                                                          | 9.2                                                               | 1.9                                                                               |
| <i>A28</i>                               | 0                                                                               | 0                                         | 0                                           | 0                                                            | 0                                                                 | 3.8                                                                               |
| <i>A44</i>                               | 0                                                                               | 0                                         | 0                                           | 26.0                                                         | 0                                                                 | 0                                                                                 |
| <i>A46</i>                               | 0                                                                               | 0                                         | 0                                           | 1.6                                                          | 0                                                                 | 0                                                                                 |
| <i>A49</i>                               | 0                                                                               | 0                                         | 0                                           | 1.6                                                          | 0                                                                 | 0.0                                                                               |
| <i>B1</i>                                | 20.0                                                                            | 37.5                                      | 30.3                                        | 32.7                                                         | 24.0                                                              | 24.5                                                                              |
| <i>B3</i>                                | 0                                                                               | 0                                         | 0                                           | 6.5                                                          | 8.6                                                               | 0.0                                                                               |
| <i>B8</i>                                | 16.0                                                                            | 18.8                                      | 4.2                                         | 9.8                                                          | 24.3                                                              | 26.4                                                                              |
| <i>B13</i>                               | 24.0                                                                            | 0                                         | 26.1                                        | 1.6                                                          | 14.2                                                              | 9.4                                                                               |
| <i>B17</i>                               | 12.0                                                                            | 12.5                                      | 17.9                                        | 3.2                                                          | 14.2                                                              | 13.2                                                                              |
| <i>B19</i>                               | 12.0                                                                            | 0                                         | 0                                           | 8.2                                                          | 9.5                                                               | 1.9                                                                               |
| <i>B21</i>                               | 0                                                                               | 0                                         | 0                                           | 1.6                                                          | 0                                                                 | 5.8                                                                               |
| <i>B25</i>                               | 0.0                                                                             | 6.3                                       | 4.3                                         | 0                                                            | 2.7                                                               | 3.8                                                                               |
| <i>B29</i>                               | 4.0                                                                             | 0                                         | 0                                           | 0                                                            | 0                                                                 | 11.3                                                                              |
| <i>B35</i>                               | 0.0                                                                             | 12.5                                      | 0                                           | 0                                                            | 1.5                                                               | 0                                                                                 |
| <i>B37</i>                               | 0                                                                               | 0                                         | 0                                           | 0                                                            | 0                                                                 | 1.9                                                                               |
| <i>B39</i>                               | 8.0                                                                             | 0                                         | 8.7                                         | 8.2                                                          | 5.7                                                               | 0                                                                                 |
| <i>B64</i>                               | 0                                                                               | 0                                         | 0                                           | 0                                                            | 0                                                                 | 1.9                                                                               |
| <i>B67</i>                               | 0                                                                               | 6.3                                       | 4.3                                         | 1.6                                                          | 1.5                                                               | 0                                                                                 |
| <i>B81</i>                               | 0                                                                               | 6.3                                       | 4.3                                         | 0                                                            | 0                                                                 | 0                                                                                 |
| <i>B84</i>                               | 0                                                                               | 0                                         | 0                                           | 0                                                            | 3.0                                                               | 0                                                                                 |
| <i>B95</i>                               | 4.0                                                                             | 0                                         | 0                                           | 0                                                            |                                                                   | 0                                                                                 |
| Всего<br>образцов                        | <b>19</b>                                                                       | <b>14</b>                                 | <b>20</b>                                   | <b>40</b>                                                    | <b>42</b>                                                         | <b>45</b>                                                                         |
| Всего<br>генотипов                       | <b>25</b>                                                                       | <b>16</b>                                 | <b>23</b>                                   | <b>61</b>                                                    | <b>73</b>                                                         | <b>53</b>                                                                         |

Более 30 лет проводились электрофоретические исследования селекционных образцов из контрольного питомника и конкурсного сортоиспытания Красноярского НИИСХ,

которые включали наиболее перспективные образцы, а также браковки [10, 16]. Обнаружена значительная неравномерность частот встречаемости аллелей гордеинов в выборках



**Таблица 3.** Распределение формул гордеинов (HRD A.B.F.) образцов ячменя, имеющих высокий уровень проявления хозяйственно ценных признаков в условиях Красноярского края

| Экстрак-<br>тивность | Белок                                      | Устойчивость                     |                                                         |                                             |                                           |                                              | Адаптив-<br>ность                           |
|----------------------|--------------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------|
|                      |                                            | к полега-<br>нию                 | к пыльной<br>головне //твер-<br>дой головне             | к поражению<br>темнобурой пят-<br>нистостью | к засоле-<br>нию почв                     | к закислению почв<br>ионами водорода         |                                             |
| 2.17.3.              | 2.8.2.;<br>12.13.2.;<br>12.1.3.;<br>2.1.3. | 12.21.1.;<br>12.1.3.;<br>2.25.1. | 2.1.3.; 23.29.3.;<br>2.17.3. //<br>10.37.1.;<br>2.84.3. | 2.8.2.;<br>2.17.3.                          | 2.1.3.;<br>2.25.2.;<br>2.8.2.;<br>2.95.1. | 2.1.3.; 2.25.1.; 2.8.2.;<br>2.17.3.; 2.95.1. | 12.13.2.;<br>2.8.2.;<br>2.25.1.;<br>2.17.3. |

перспективных и браковочных форм. Наибольшей браковке на протяжении многих лет наблюдений подвергались аллели *A3*, *A10*, *A49*, *A19*, *A23* и все образцы с аллелем *B29* (сочетание *A23B29*). Обнаружено, что выбракованные образцы отличаются большей гетерогенностью (70%) по сравнению с перспективными формами.

Анализ электрофоретических спектров сортообразцов селекционных питомников позволил выделить формулы гордеинов, характерные для образцов, созданных по определенным направлениям селекции. В табл. 3 представлены многолетние итоговые данные распределения часто встречающихся биотипов гордеинов у селекционного материала, созданного по разным направлениям селекции.

Генетическая формула 2.25.1. с редким для Сибири аллелем *B25* впервые была определена при изучении аллельного состава гордеинов 148 адаптивных линий ячменя из контрольного питомника и конкурсного сортоиспытания КНИИСХ. Указанные линии получены в результате реализации селекционной программы под руководством Н.А. Сурина, направленной на повышение адаптивности сортов ячменя. Используя конвергентные скрещивания с привлечением таких сортов как Винер (материнская форма), Донецкий 650, Целинный 5, Омский 13709, Красноуфимский 95, были выделены перспективные линии, положительно сочетающие в себе устойчивость к неблагоприятным факторам и урожайность [10, 13, 15]. Лучшие из них послужили основой для сортов Арат и Бахус, внесенных в Госреестр РФ по 11-му региону. К сожалению, районированы они были в регионе непродолжительный период и занимали небольшие площади, как и большинство других сортов с редкими для Приенисейской Сибири аллелями — *A18* (Маяк), *B25* (Бахус), *B95* (Андрей).

Таким образом, отбор аллелей носит не случайный, а закономерный характер, что свидетельствует об экологической значимости белковых маркеров и важности учета вариантов спектров гордеинов при определении как общей перспективности создаваемого материала, так и по отдельным направлениям селекции.

В результате изучения аллельного состава гордеинов сортообразцов ярового ячменя коллекции ВНИИР им. Н.И. Вавилова (вовлеченных в селекционную работу в крае), экологического и селекционных питомников КНИИСХ, районированных и допущенных к использованию сортов в Красноярском крае отмечена изменчивость состава гордеинов сортовых популяций ячменя в пространстве (разные регионы Сибири) и во времени (стародавние и современные разных лет селекции и районирования), связанная с условиями возделывания и искусственным отбором в определенных географических условиях.

Определены наиболее характерные аллели гордеина для условий Приенисейской Сибири — *A2*, *A12*, *B1*, *B8*, *B13*, *B17*, *B37*. Отмечено, что у районированных и допущенных к использованию сортов в крае после 2000 г. ранее часто встречаемый аллель *B13* не обнаружен. Однако сортообразцы инорайонной селекции, отобранные селекционерами для использования в качестве ценных генетических источников, преимущественно имеют гордеиновые формулы с аллелем *B13*. У сортов КНИИСХ более поздней селекции (после 2000 г.) зафиксированы редкие для сибирского региона аллели гордеинов *B25*, *B67*, *B81*. При этом отмечено, что районированные в крае сорта с часто встречаемыми «красноярскими» аллелями (*A2*, *A12*, *B1*, *B13*, *B17*, *B39*) характерны для сортов-долгожителей ячменя в Сибирском регионе (Червонец, Кедр, Красноярский-80, Соболек).

Анализ образцов селекционных питомников КНИИСХ выявил преимущественную браковку генотипов с аллелями *A3*, *A10*, *A49*, *A19*, *A23* и *B29* (сочетание *A23B29*). Отмеченная сопряженность ряда аллельных вариантов с хозяйственно ценными признаками может помочь при отборе селекционного материала на соответствующие признаки.

Настоящая работа выполнена при поддержке СО РАСХН по направлению Программы 04 “Разработать адаптивные технологии возделывания сельскохозяйственных культур в Сибири на основе мобилизации генетических ресурсов растений, создания новых сортов и гибридов, конструирования высокопродуктивных агроэкосистем и агроландшафтов с целью обеспечения устойчивого роста величины и качества урожая, ресурсоэнергоэкономичности, природоохранности, экологической надежности и рентабельности”.

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.

Авторы выражают глубокую признательность докт. с-х. наук Н.В. Зобовой за административную поддержку генетических исследований в Красноярском НИИСХ. Авторы благодарны за многолетнее сотрудничество, а также за методическую помощь и обсуждение ряда результатов исследований ведущему сотруднику ИОГен РАН (г. Москва) докт. биол. наук А.А. Поморцеву.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жученко А.А. Адаптивный потенциал культурных растений (экологические основы). Кишинев: Штиинца, 1988. 766 с.
2. Конарев В.Г. Белки растений как генетические маркеры. М.: Колос, 1983. 320 с.
3. Созинов А.А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. М.: Наука, 1985. 270 с.
4. Конарев А.В., Конарев В.Г., Губарева Н.К., Пенева Т.И. Белки семян как маркеры в решении проблем генетических ресурсов растений, селекции и чеченоводства // Цитология и генетика. 2000. Т. 34. № 2. С. 91–103.
5. Поморцев А.А., Рубанович А.В., Лялина Е.В. Структура и пути формирования полиморфизма гордеинов, контролируемых аллелями гордеин-кодирующих локусов в культурном ячмене (*Hordeum vulgare* L.) // Генетика. 2021. Т.57. № 5. С. 544 – 556.
6. Методика проведения лабораторного сортового контроля по группам сельскохозяйственных растений. М.: ФНГУ Росинформагротех, 2004. 96 с.
7. Поморцев А.А., Лялина Е.В. Идентификация и оценка сортовой чистоты семян ячменя методом электрофоретического анализа запасных белков зерна. М.: Изд-во МСХА, 2003. 85 с.
8. Борисов Ю.М., Шевцова Л.Н., Зобова Н.В., Сурин Н.А. Характеристика компонентного состава гордеинов сортов ярового ячменя в Восточно-Сибирском регионе // Докл. ВАСХНИ, 1989. № 12. С. 2–4.
9. Борисов Ю.М., Сурин Н.А., Шевцова Л.Н., Зобова Н.В. Исследование гордеинов сибирских сортов ячменя стародавней и современной селекции // Докл. Росс. акад. с.-х. наук. 1998. № 2. С. 3–4.
10. Шевцова Л.Н., Зобова Н.В. Агроэкологическая детерминация ярового ячменя Восточной Сибири по гордеин-кодирующим локусам / Под. ред. Н.А. Сурина. Красноярск: Краснояр. гос. аграр. ун-т, 2008. 146 с.
11. Зобова Н.В., Сурин Н.А., Герасимов С.А. и др. Спектры проламинов в агроэкологической оценке коллекционного материала ячменя // Достижения науки и техники АПК. 2018. № 5. С. 45–47.
12. Зобова Н.В., Онуфриенко Т.В., Чуслин А.А. Особенности полиморфизма проламинов сортов ячменя, возделываемых в Красноярском крае // Достижения науки и техники АПК. 2014. № 6. С. 7–10.
13. Сурин Н.А., Зобова Н.В., Ляхова Н.Е. и др. Источники ценных признаков в селекции ячменя на адаптивность // Достижения науки и техники АПК. 2016. № 6. С. 36–40.
14. Сурин Н.А., Ляхова Н.Е., Герасимов С.А. и др. Оценка коллекционных образцов ярового ячменя в селекции на продуктивность и качество зерна в условиях Восточной Сибири // Достижения науки и техники АПК. 2018. Т. 32. № 5. С. 41–44.
15. Сурин Н.А., Ляхова Н.Е., Герасимов С.А., Липшин А.Г. Экологическая селекция ячменя в Средней Сибири. Красноярск: ФИЦ КНЦ СО РАН, 2023. 333 с.
16. Оценка аллельного состава исходного и селекционного материала пшеницы и ячменя на основе метода электрофореза: методические рекомендации Красноярский НИИСХ. Красноярск: ИФ ФИЦ КНЦ СО РАН, 2021. 40 с.

## VARIABILITY OF GENETIC DIVERSITY OF SPRING BARLEY BY HORDEINCODING LOCUS OVER A 40-YEAR PERIOD OF SCIENTIFIC BREEDING IN THE KRASNOYARSK TERRITORY

N. A. Surin<sup>1</sup>, L. N. Shevtsova<sup>2, \*</sup>, N. S. Kozulina<sup>1</sup>, Yu. M. Borisov<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Krasnoyarsk Scientific Research Institute of Agriculture, Federal Research Center "Krasnoyarsk Scientific Center Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences", Krasnoyarsk, 660041 Russia*

<sup>2</sup>*Krasnoyarsk State Agrarian University, Krasnoyarsk, 660049, Russia*

<sup>3</sup>*Severtsov Institute of Problems of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

*\*e-mail: shevtsovaln48@rambler.ru*

The article discusses and summarizes the results of studies of polymorphism of hordeins (HRD) of spring barley by electrophoresis at the Krasnoyarsk Research Institute of Agriculture (KNIISH) for the period from 1988 to 2021. The analysis of the dynamics of the genetic diversity of barley varieties from the ecological and breeding nurseries of the KNIISKh, released and approved for use in the Krasnoyarsk Territory, showed a significant narrowing of the frequency of occurrence and the loss of a number of alleles characteristic of the conditions of the Yenisei Siberia, and the appearance of rare variants for the Siberian region. Based on long-term observations of the composition of hordeins of breeding samples (promising and rejection) created in different areas of breeding, a number of alleles were found to be associated with economically valuable traits.

**Keywords:** barley, breeding, identification, electrophoretic spectra, barley storage proteins, hordeins, hordein alleles, diversity, frequency of occurrence.

УДК 575.82:599.323.4

## СТРУКТУРА ГИБРИДНОЙ ЗОНЫ МЕЖДУ БЛИЗКИМИ ВИДАМИ ОБЫКНОВЕННЫХ ПОЛЕВОК *Microtus arvalis* И *M. obscurus*: ВЛИЯНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ И ЛАНДШАФТНО-ГЕОГРАФИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ<sup>§</sup>

© 2024 г. Л. А. Лавренченко<sup>1, \*</sup>, А. Р. Громов<sup>1</sup>, А. А. Мартынов<sup>1</sup>, Д. С. Костин<sup>1</sup>,  
В. А. Комарова<sup>1</sup>, Д. М. Кривоногов<sup>2</sup>, Е. В. Черепанова<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского  
(Арзамасский филиал), Арзамас, 607220 Россия

\*e-mail: llavrenchenko@gmail.com

Поступила в редакцию 17.07.2023 г.

После доработки 03.10.2023 г.

Принята к публикации 06.10.2023 г.

Исследованы особенности интрогрессии отдельных генетических маркеров через зону гибридизации между двумя видами обыкновенных полевков *Microtus arvalis* s. str. и *M. obscurus* на четырех участках этой зоны: на северо-западе Нижегородской области, на востоке Владимирской и юго-западе Нижегородской области, на юге Липецкой области, и на северо-западе Воронежской обл. Анализ клинальной изменчивости по трем молекулярно-генетическим маркерам (*cytb*, *tp53*, *SMCY11*) и кариотипу выявил сходство в структуре “владимирско-нижегородского”, “нижегородского” и “воронежского” участков гибридной зоны. Наибольшая ширина клины показана для гена *cytb*, наименьшая — для *SMCY11*; клины по гену *tp53* и хромосомная клина занимают промежуточное положение по этому параметру. Кроме того, на этих трансектах обнаружено смещение на юг или на восток (в пределы ареала *M. obscurus*) центра клины *cytb* относительно центров трех остальных клин. Обнаруженная асимметричная интрогрессия митохондриального генома от *M. arvalis* к *M. obscurus* может быть объяснена формированием гибридной зоны в результате вселения *M. obscurus* в ареал *M. arvalis*. “Липецкая” трансекта отличается от трех вышеперечисленных трансект очень узкими клинами с практически совпадающими центрами, что связано с локализацией гибридной зоны на этом участке вдоль р. Воронеж. Полученные результаты позволяют предполагать, что структура изученной зоны гибридизации определяется преимущественно пространственным совпадением (или несовпадением) ее центра с локальными физико-географическими преградами.

**Ключевые слова:** интрогрессивная гибридизация, митохондриальная ДНК, ядерные гены, хромосомные перестройки, грызуны, млекопитающие.

DOI: 10.31857/S0016675824030046 EDN: DPGSZI

Гибридные зоны традиционно рассматриваются как “природные лаборатории эволюционных исследований” и своеобразные “окна в эволюционный процесс” [1]. На структуру гибридной зоны, которая формируется при вторичном контакте ранее изолированных видов (или внутривидовых форм), оказывают влияние множество факторов: генетические различия между контактирующими видами (или формами), экологические особенности (зависящие от генети-

ческих различий), а также абиотические факторы (рельеф местности и климат). Для того, чтобы определить какие из вышеназванных факторов преимущественно влияют на формирование какой-либо гибридной зоны, необходимо исследовать выборки на трансектах через несколько участков этой зоны, различающихся по природным условиям.

Настоящая статья посвящена особенностям интрогрессии отдельных генетических маркеров через зону гибридизации между двумя близкими видами обыкновенных полевков *Microtus arvalis* sensu stricto (s. str.) и *M. obscurus*. Зона контакта

<sup>§</sup> Дополнительные материалы для этой статьи доступны по ссылке: doi 10.31857/S0016675824030046 для авторизованных пользователей

между *M. arvalis* и *M. obscurus* локализована на Европейской территории России: от Нижегородской и Ивановской областей на севере до Воронежской и Курской областей на юге [2–4] (рис. 1).

Данная зона контакта и гибридизации сформировалась в послеледниковье: полевки *M. arvalis* восточной (Eastern) филогенетической линии предположительно расселялись из рефугиума в Карпатах [5], а *M. obscurus* Евразийской (Eurasian) сублинии китайско-русской (Sino-Russian) линии – из рефугиума на Алтае [6, 7]. В настоящий момент гибридная зона (ГЗ) между этими двумя формами обнаружена во Владимирской области [8–10], Нижегородской, Курской и Липецкой областях [3, 4].

При одинаковом диплоидном числе хромосом,  $2n = 46$ , *M. arvalis* и *M. obscurus* различаются по числу двуплечих и одноплечих аутосом: шесть пар мелких аутосом в кариотипе *M. arvalis* ( $NF = 84$ ) представлены метацентриками, а в кариотипе *M. obscurus* ( $NF = 72$ ) – акроцентриками [11–13]. Выявлены различия между ними и по морфологии Y-хромосомы, представленной в кариотипе *M. arvalis* самым мелким акроцентриком, а в кариотипе *M. obscurus* – средним акроцентриком [14]. Наконец, в популяциях *M. obscurus* встречается акроцентрическая аутосома № 5, сформированная в результате инверсии [14–16]. В популяциях *M. arvalis* пара аутосом № 5 всегда представлена субтелоцентриками.

*M. arvalis* и *M. obscurus* различаются по митохондриальному геному (3.1–4.6% нуклеотидных замен для гена цитохрома *b* (*cytb*)) [9, 17]. Различия между *M. arvalis* и *M. obscurus* также были выявлены по ядерному гену *tp53* [9, 18]. Еще одним диагностическим признаком этих видов является единичная замена нуклеотида (SNP) в интроне 11 Y-сцепленного гена *SMCY* [10].

Для исследования структуры гибридной зоны между *M. arvalis* и *M. obscurus* на четырех ее участках был проведен анализ клинальной генетической изменчивости по четырем маркерам: мтДНК, наследуемой по материнской линии (ген *cytb*); ядерной ДНК, не сцепленной с половыми хромосомами (ген *tp53*); ядерной ДНК, сцепленной с Y-хромосомой (ген *SMCY*) и наследуемой по отцовской линии; и кариотипам. Полевки были отловлены на четырех участках ГЗ: “нижегородском” (на северо-западе Нижегородской обл.), “владимирско-нижегородском” (на востоке Владимирской и юго-западе Нижегородской

обл.), “липецком” (на юге Липецкой обл.) и “воронежском” (на северо-западе Воронежской обл.). Данные по “владимирско-нижегородскому” участку ГЗ ранее были частично опубликованы [10].

Ранее при изучении гибридных популяций во Владимирской области был выявлен дефицит гетерозигот по гену *tp53* [9], что позволяет предположить сниженную приспособленность гетерозигот по сравнению с гомозиготами. В настоящем исследовании определена частота гетерозигот по гену *tp53* на четырех участках гибридной зоны, чтобы выяснить: отличается ли она от ожидаемой согласно уравнению Харди–Вайнберга. Также исследовались распространение и частота инверсии аутосомы № 5, специфичной для *M. obscurus*, которая ранее не была выявлена в зоне гибридизации этих видов [4].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материала были использованы образцы тканей полевок, отловленных на четырех участках ГЗ: на северо-западе Нижегородской области (13 пунктов, 474 экз.), на востоке Владимирской области и юго-западе Нижегородской области (29 пунктов, 736 экз.), на юге Липецкой области (7 пунктов, 180 экз.) и на северо-западе Воронежской области (11 пунктов, 314 экз.) (рис. 2, а–г). В Нижегородской и Владимирской областях полевок отлавливали на лугах и кластерах полей, разделенных лесными массивами, в Липецкой и Воронежской областях – в оврагах и на окраинах полей. “Владимирско-нижегородская” трансекта пересекается р. Окой, а “липецкая” – р. Воронеж (рис. 2, б, в).

Препараты митотических хромосом готовили из клеток костного мозга по стандартной методике [19]. Препараты окрашивали раствором Гимза (5%) в течение 12–14 мин. Митотические метафазы просматривали под микроскопом Leica CTR 5000 и анализировали с помощью программы Leica Application Suite version 3.3.1.

С помощью ПЦР-типирования фрагментов генов *cytb* и *tp53* (без секвенирования) [9, 10, 18] определяли видовую принадлежность зверьков, а также выявляли гетерозиготы по гену *tp53* и особей с различными сочетаниями гаплотипов *cytb* и аллелей *tp53*. Для амплификации фрагмента гена *cytb* использовалась смесь трех прямых праймеров – cbMA842F (5'-GGGGTTTACTATGGCTCA-3'), cbMO604F

(5'-CCTTCCACTTTATTCTACCT-3'), cbMR469F (5'-CAGTCAAAGACTTCTTAGGG-3') и одного обратного праймера H15915-SP (5'-TTCATTACTGGTTTACAAGAC-3') [10, 17, 18]. Длины получаемых фрагментов гена *cytb* составляли: 842 пн для *M. arvalis*, 604 пн для *M. obscurus* и 469 пн для вида-двойника *M. rossiaemeridionalis* [10, 18]. Для амплификации фрагмента гена *tp53* использовалась смесь двух прямых праймеров – tp53MAF (5'-CTCCGATGGTGATGGTGAGTACCCA-3') и tp53MOF (5'-CGACGGTGATGGTGAGTTCCCG-3') и одного обратного праймера tp53D (5'-CGGTTTCATGCCCCCATGC-3') [10, 18]. Длины получаемых фрагментов гена *tp53* составляли 788 пн для *M. arvalis* и 1003 пн для *M. obscurus* [10, 18]. Для проведения ПЦР использовалась реакционная смесь, которая включала 2 мкл dNTP (2.5 мМ), 2 мкл реакционного 10× буфера, 0.8 мкл MgCl<sub>2</sub> (50 мМ), 0.3 мкл (5 пМ) каждого праймера, 0.2 мкл (5 U/мкл) *Taq*-полимеразы, 12.4 мкл H<sub>2</sub>O и 2 мкл (30 нг/мкл) ДНК-матрицы. Были применены следующие параметры амплификации: 94°C – 3 мин, 35 циклов (94°C – 30 с, 50°C для фрагмента *cytb* и 65°C для фрагмента *tp53* – 30 с, 72°C – 1 мин), 72°C – 10 мин.

Секвенирование интрона 11 гена *SMCY* проводилось в центре коллективного пользования “Геном” с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer. Для секвенирования использованы праймеры SMCY11m-F (5'-GGAATTGTAAGAACCTGATT-3') и SMCY11m-R (5'-GGATTACTTAATACATACTT-3'). *M. arvalis* имеет в позиции 295 этого интрона цитозин (C), а *M. obscurus* – тимин (T) [10]. Все вновь полученные последовательности депонированы в GenBank с номерами доступа OR451804–OR451930 (дополн. табл.).

Положение пересекающих гибридную зону трансект определялось аппроксимирующей прямой, рассчитанной с помощью линейной регрессии методом наименьших квадратов, в среде программирования R [20]. За относительные позиции отдельных мест отлова принимались их проекции на трансекту. Был проведен анализ географической изменчивости на трансектах по генам *cytb*, *tp53*, *SMCY* и кариотипу. Для каждого из четырех данных признаков рассчитывалась его частота в каждой из точек отлова. Частоты колебались от 0 до 1, где 0 это “чистые” *M. obscurus*,

а 1 – “чистые” *M. arvalis*. Для гена *tp53*, по которому были обнаружены гетерозиготные особи, суммировали количество родительских аллелей и полученную сумму делили на общее удвоенное число особей в выборке (2*N*). Для хромосом применяли иные вычисления, так как количество их вариантов гораздо больше, чем для молекулярных маркеров. *M. arvalis* и *M. obscurus* имеют одинаковое диплоидное число хромосом 2*n* = 46, но различаются числом мелких акроцентрических хромосом: у *M. arvalis* их 8, а у *M. obscurus* – 20. Особи гибридного происхождения имеют промежуточное количество акроцентриков, т.е. от 9 до 19. Исходя из того, что общее количество промежуточных вариантов составляет 11, мы рассчитали “гибридный коэффициент” равный 1/11 (0.091). Учитывая то, что ранее мы приняли “чистых” *M. arvalis* за 1, а *M. obscurus* за 0, гибридные особи будут иметь промежуточные частоты: 9 акроцентриков – 0.916; 10 – 0.833; 11 – 0.75, 19 – 0.083.

Для построения клин использован пакет HZAR [21], разработанный для среды R. Для каждого из анализируемых признаков при помощи информационного критерия Акайка (AIC) определялась оптимальная модель (из 15 возможных) с оценкой параметров ширины клины и положения ее центра; совпадение центров и соответствие ширины различных клин на отдельных трансектах оценивались с использованием теста отношения правдоподобий; доверительные 95%-ные интервалы (2LL low-high) определялись для оптимальной модели каждого признака (*cytb*, *tp53*, *SMCY11* и кариотипа).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

На всех четырех участках ГЗ обнаружены особи с гаплотипами *cytb* и *SMCY11*, присущими *M. arvalis* и *M. obscurus*, и с аллелями гена *tp53* обоих видов (гомо- и гетерозиготы на трех участках и только гомозиготы на “воронежском” участке). Детальная информация по молекулярно-генетическим и хромосомным маркерам исследованных полевых представлена в дополнительных материалах (дополн. табл.).

На “нижегородском” участке гетерозиготы по гену *tp53* наблюдались в пункте № 11 (частота составила 14.5%), на “владимирско-нижегородском” участке – в пунктах № 12–18 и 20–23 (частота гетерозигот варьировала от 6.3 до 38.1%); на “липецком” – в пункте № 5 (частота 8.0%) (рис. 2, а–в; табл. 1). Если суммировать результа-

ты по трем участкам ГЗ, учитывая ранее опубликованные данные по участку ГЗ в окр. г. Ковров (Владимирская обл.) [9], то в шести из 14 выборок численность гетерозигот по гену *tp53* была ниже ожидаемой согласно уравнению Харди–Вайнберга (Hardy–Weinberg equilibrium, HWE), а в восьми не отличалась от ожидаемой согласно HWE (табл. 1).

Совместное обитание полевых с гаплотипами *SMCY11 M. arvalis* и *M. obscurus* было обнаружено: на “нижегородском” участке в пунктах № 6 и 7, на “владимирско-нижегородском” в пункте № 13 и на “липецком” участке в пункте № 4 (рис. 2, а–в; дополн. табл.). На “воронежском” участке совместного обитания особей с гаплотипами *SMCY11 M. arvalis* и *M. obscurus* не было выявлено ни в одном пункте.

На всех участках ГЗ присутствовали особи с кариотипами, идентичными кариотипам исходных видов: с 26 мелкими метацентриками и 8 акроцентриками (“8А”) и 14 мелкими метацентриками и 20 акроцентриками (“20А”), а также с рекомбинантными кариотипами (дополн. табл.). На “нижегородском” участке встречались рекомбинанты “9А”–“13А” (с преобладанием хромосом *arvalis*) и “16А”, “18А” и “19А” (с преобладанием хромосом *obscurus*). Три особи с кариотипом “14А”, идентичным кариотипу гибридов F1, были отмечены в пункте № 6 и одна особь – в пункте № 7 (рис. 2, а; дополн. табл.). На “владимирско-нижегородском” участке присутствовали рекомбинанты “9А”–“11А”, “15А”, “17А”–“19А”; кариотип “14А” был отмечен в пункте № 12 (рис. 2, б). На “липецком” участке был зарегистрирован один вариант рекомбинантного кариотипа: “10А”. На “воронежском” участке присутствовали рекомбинанты “9А”, “13А” и “19А” (дополн. табл.). Характеристики всего одного экземпляра (№ 747, самка, “владимирско-нижегородская” трансекта, пункт № 12) из всех полевых, исследованных в настоящей работе, соответствовали таковым, ожидаемым у гибрида F1: гетерозигота по гену *tp53* и кариотип “14А”. Все четыре особи (один самец и три самки), пойманные на “нижегородском” участке ГЗ и имеющие кариотип “14А”, оказались гомозиготами “*arvalis*” по гену *tp53* (*tp53A*) (дополн. табл.).

На “нижегородском” участке ГЗ инверсия аутосомы № 5 была выявлена в пункте № 13 (рис. 2, а). Эта перестройка встречалась у семи особей (все с кариотипом “20А”): у трех особей с генотипом *cytb obscurus*–*tp53 obscurus* (*cytbO*–*tp53O*),

одной особи с генотипом *cytb arvalis*–*tp53 obscurus* (*cytbA*–*tp53O*) и трех особей *cytb obscurus*–*tp53 arvalis* (*cytbO*–*tp53A*) (дополн. табл.). Частота инверсии составила 13.5% (табл. 2). На “владимирско-нижегородском” участке инверсия аутосомы № 5 присутствовала в пунктах № 16, 21–23, 25, и 27–29 (рис. 2, б) у 11 полевых с кариотипом “20А” и одной полевки с “19А”. Семь особей с кариотипом “20А”, несущих инверсию, характеризовались генотипом *cytbO*–*tp53O*, три особи – генотипом *cytbA*–*tp53O*, и одна особь – *cytbA*–*tp53A*/O; особь с кариотипом “19А” характеризовалась генотипом *cytbA*–*tp53O*. Частота инверсии варьировала от 1.5 до 25.0% (табл. 2). На “липецком” участке инверсия аутосомы № 5 не была выявлена. На “воронежском” участке инверсия аутосомы № 5 наблюдалась в пунктах № 6–10 (рис. 2, в) у 17 животных с кариотипом “20А”: 15 особей с генотипом *cytbO*–*tp53O* и двух с генотипом *cytbA*–*tp53O*. Частота инверсии варьировала от 7.5 до 22.2% (табл. 2). Единственная гомозигота по инверсии, выявленная в пункте № 8 на “воронежском” участке, характеризовалась кариотипом “20А” и генотипом *cytbO*–*tp53O* (табл. 2; дополн. табл.). Во всех остальных выборках на трех участках ГЗ инверсия аутосомы № 5 была отмечена только в гетерозиготном состоянии. Численность гомозигот по субтелоцентрику и гетерозигот по инверсии ни в одной из 14 выборок на трех участках ГЗ не отличалась от ожидаемой согласно HWE (табл. 2).

Анализ клинальной генетической изменчивости по *cytb*, *tp53*, *SMCY11* и хромосомам на “нижегородской”, “владимирско-нижегородской” и “воронежской” трансектах (рис. 3, табл. 3) показал, что клина по *cytb* самая широкая, клина по *SMCY11* – самая узкая, а клина по *tp53* занимает промежуточное положение между ними. Различия по ширине между клиной по *cytb* и клинами по *tp53* и *SMCY11* на трех выше-названных трансектах достоверны (доверительные интервалы не перекрываются). Центр клины по *cytb* на “владимирско-нижегородской” и “воронежской” трансектах достоверно смещен относительно центров клин по *tp53*, *SMCY11* и центра хромосомной клины в сторону ареала *M. obscurus*; на “нижегородской” трансекте смещение центра клины по *cytb* относительно центров клины по *SMCY11* и хромосомной клины достоверно, а относительно центра клины по *tp53* недостоверно (табл. 3).

Клины по *cytb*, *tp53*, *SMCY11* и кариотипам на “липецкой” трансекте очень узкие, различия между ними по ширине и по расположению

**Таблица 1.** Численность гетерозигот по гену *tp53* на четырех участках ГЗ: наблюдаемая и ожидаемая в соответствии с уравнением Харди–Вайнберга

| Трансекта                                   | Пункт | Частота гетерозигот, % | Генотип    | Наблюдаемая | Ожидаемая | $\chi^2$<br>( <i>d.f.</i> = 1) |
|---------------------------------------------|-------|------------------------|------------|-------------|-----------|--------------------------------|
| “Нижегородская”                             | 11    | 14.5                   | <i>A/A</i> | 10          | 3.391     | 21.934**                       |
|                                             |       |                        | <i>A/O</i> | 9           | 22.218    |                                |
|                                             |       |                        | <i>O/O</i> | 43          | 36.391    |                                |
| “Владимирско-Нижегородская”                 | 12    | 15.8                   | <i>A/A</i> | 14          | 12.645    | 4.280 *                        |
|                                             |       |                        | <i>A/O</i> | 3           | 5.711     |                                |
|                                             |       |                        | <i>O/O</i> | 2           | 0.645     |                                |
|                                             | 13    | 33.3                   | <i>A/A</i> | 2           | 1.361     | 0.803                          |
|                                             |       |                        | <i>A/O</i> | 3           | 4.278     |                                |
|                                             |       |                        | <i>O/O</i> | 4           | 3.361     |                                |
|                                             | 14    | 38.1                   | <i>A/A</i> | 1           | 1.191     | 0.053                          |
|                                             |       |                        | <i>A/O</i> | 8           | 7.619     |                                |
|                                             |       |                        | <i>O/O</i> | 12          | 12.191    |                                |
|                                             | 15    | 37.5                   | <i>A/A</i> | 2           | 1.563     | 0.259                          |
|                                             |       |                        | <i>A/O</i> | 6           | 6.875     |                                |
|                                             |       |                        | <i>O/O</i> | 8           | 7.563     |                                |
|                                             | 16    | 28.2                   | <i>A/A</i> | 7           | 5.134     | 1.034                          |
|                                             |       |                        | <i>A/O</i> | 40          | 43.732    |                                |
|                                             |       |                        | <i>O/O</i> | 95          | 93.134    |                                |
|                                             | 17    | 7.7                    | <i>A/A</i> | 1           | 0.173     | 5.049 *                        |
|                                             |       |                        | <i>A/O</i> | 1           | 2.654     |                                |
|                                             |       |                        | <i>O/O</i> | 11          | 10.173    |                                |
|                                             | 18    | 6.3                    | <i>A/A</i> | 4           | 1.266     | 11.436 **                      |
|                                             |       |                        | <i>A/O</i> | 1           | 6.469     |                                |
|                                             |       |                        | <i>O/O</i> | 11          | 8.266     |                                |
|                                             | 20    | 31.3                   | <i>A/A</i> | 0           | 0.391     | 0.549                          |
|                                             |       |                        | <i>A/O</i> | 5           | 4.219     |                                |
|                                             |       |                        | <i>O/O</i> | 11          | 11.391    |                                |
|                                             | 21    | 15.4                   | <i>A/A</i> | 0           | 0.231     | 0.271                          |
|                                             |       |                        | <i>A/O</i> | 6           | 5.539     |                                |
|                                             |       |                        | <i>O/O</i> | 33          | 33.231    |                                |
|                                             | 22    | 9.7                    | <i>A/A</i> | 3           | 0.653     | 11.538 **                      |
|                                             |       |                        | <i>A/O</i> | 3           | 7.694     |                                |
|                                             |       |                        | <i>O/O</i> | 25          | 22.653    |                                |
|                                             | 23    | 18.2                   | <i>A/A</i> | 2           | 0.818     | 3.227                          |
|                                             |       |                        | <i>A/O</i> | 2           | 4.364     |                                |
|                                             |       |                        | <i>O/O</i> | 7           | 5.818     |                                |
| “Липецкая”                                  | 5     | 8.0                    | <i>A/A</i> | 0           | 0.040     | 0.043                          |
|                                             |       |                        | <i>A/O</i> | 2           | 1.920     |                                |
|                                             |       |                        | <i>O/O</i> | 23          | 23.040    |                                |
| Владимирская обл.,<br>Ковровский р-н<br>[9] |       |                        | <i>A/A</i> |             |           | 25.5 **                        |
|                                             |       |                        | <i>A/O</i> | 8           | 23        |                                |
|                                             |       |                        | <i>O/O</i> |             |           |                                |

Примечание. [9] – ранее опубликованные данные (сведения о численности гомозигот *tp53A/A*, *tp53O/O* не представлены); \* – уровень значимости  $p < 0.05$ , \*\* – уровень значимости  $p < 0.001$ .



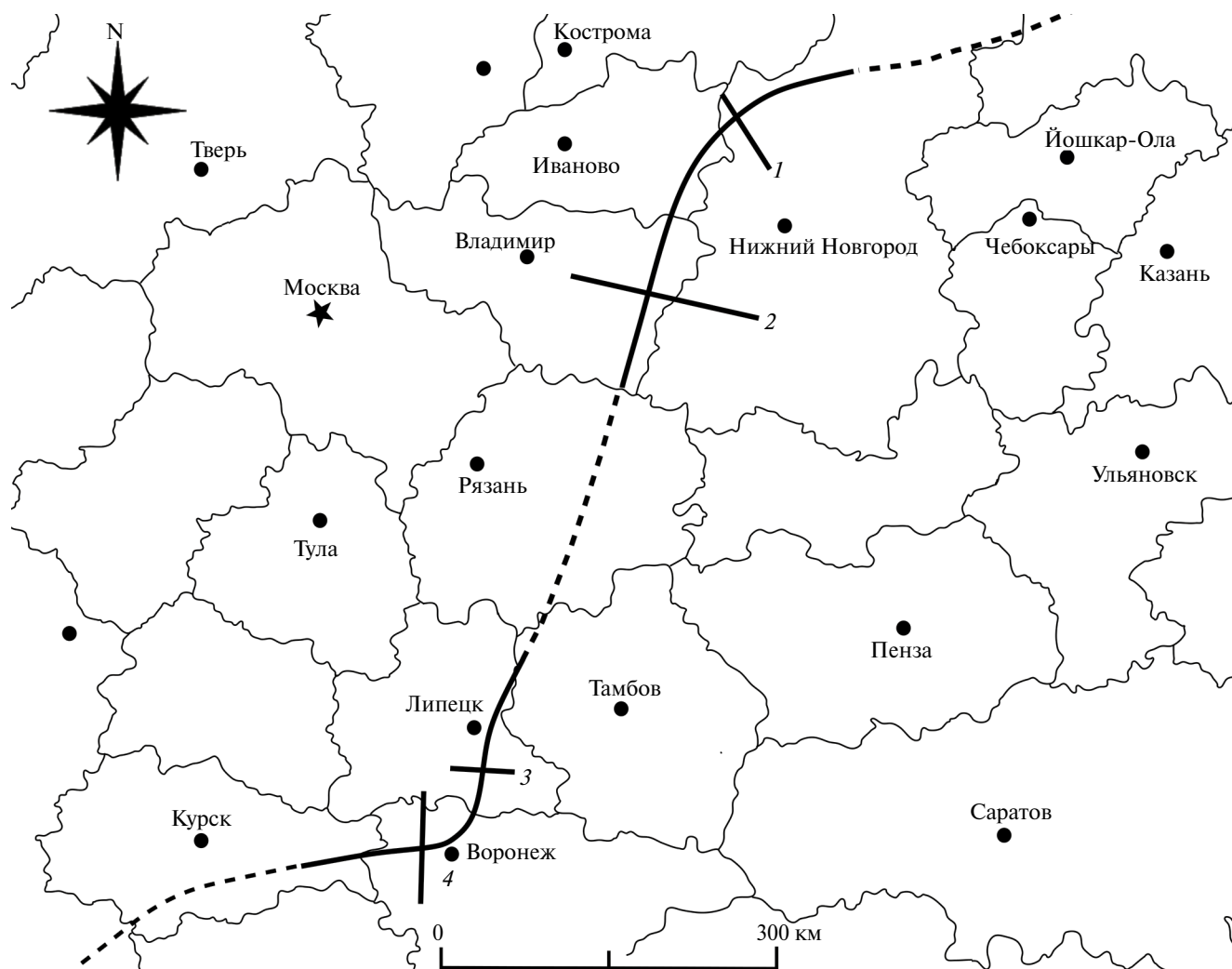


Рис. 1. Зона гибридизации между 46-хромосомными видами обыкновенной полевки (*Microtus arvalis* s. str. и *M. obscurus*) и рассматриваемые трансекты через эту зону. Сплошными изогнутыми линиями показано прослеженное положение ГЗ, пунктиром показано предполагаемое положение ГЗ. Прямыми отрезками показаны трансекты: 1 – “нижегородская”, 2 – “владимирско-нижегородская”, 3 – “липецкая” и 4 – “воронежская”.

их центров недостоверны (рис. 3, табл. 3). На всех четырех изученных участках ГЗ не выявлено какого-либо пространственного совпадения центра клин по молекулярно-генетическим и хромосомным маркерам с границами между различающимися местообитаниями (экотонами).

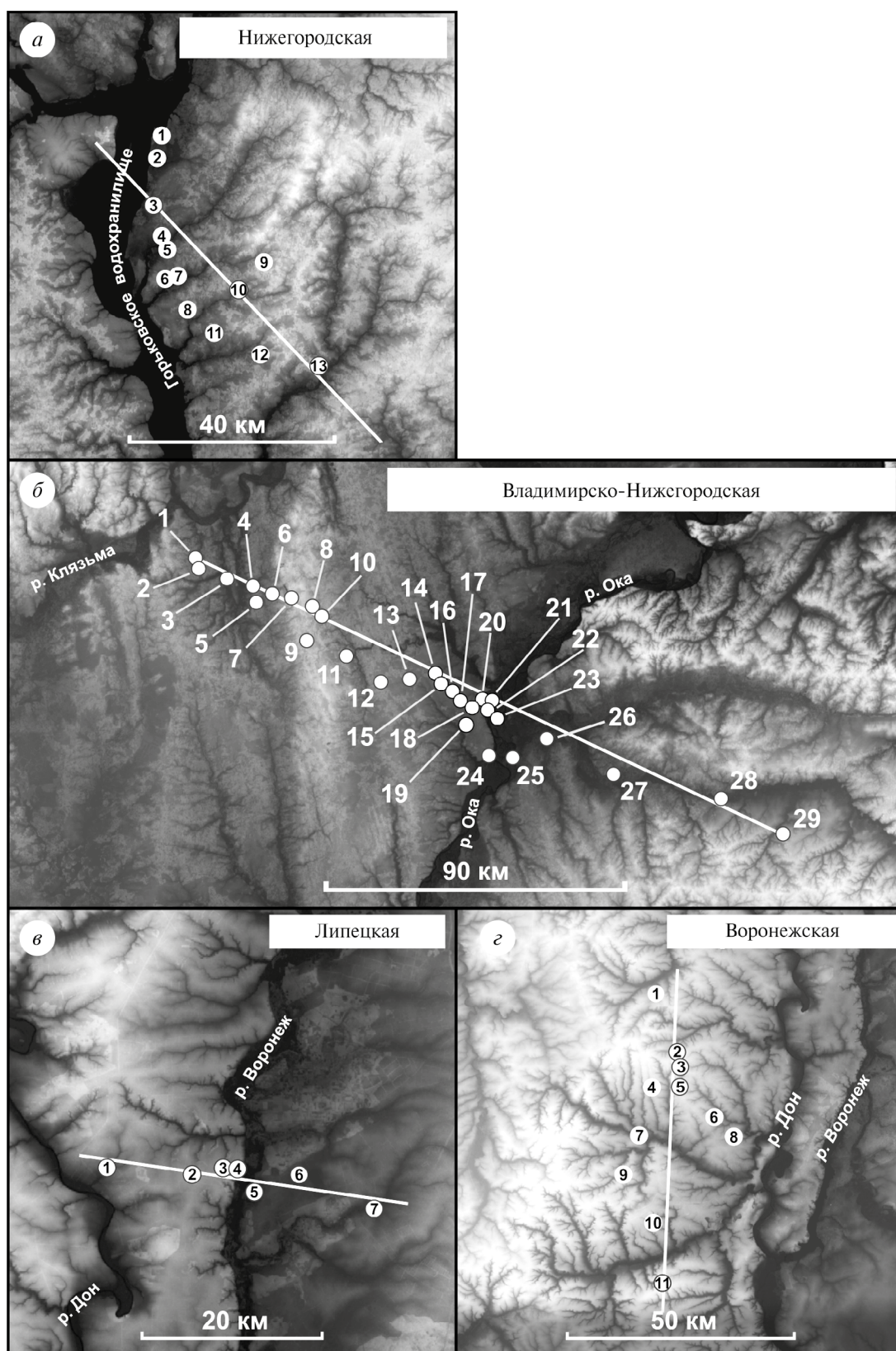
## ОБСУЖДЕНИЕ

### Генетические характеристики участков гибридной зоны: гетерозиготы по гену *tp53* и инверсия аутосомы № 5

Четыре участка гибридной зоны различаются между собой по распространению и частоте встречаемости гетерозигот по гену *tp53*: гетерозиготы были выявлены в 11 пунктах на “владимирско-нижегородском” участке, в одном пункте на

“нижегородском” и “липецком” участках и отсутствовали на “воронежском” участке. Частота гетерозигот на “владимирско-нижегородском” участке значительно варьировала (табл. 1). Одно из возможных объяснений неодинакового распространения и различающейся частоты гетерозигот по гену *tp53* – дрейф генов в малых популяциях под влиянием случайных стохастических процессов. Но, поскольку в шести из 14 выборок на трех участках ГЗ численность гетерозигот по гену *tp53* была ниже ожидаемой согласно HWE (табл. 1), можно предполагать, что приспособленность гетерозигот по гену *tp53* несколько ниже, чем приспособленность гомозигот.

Инверсия аутосомы № 5, зарегистрированная на “нижегородском”, “владимирско-нижегород-



**Рис. 2.** Трансекты (показаны прямыми линиями) через гибридную зону между *Microtus arvalis* s. str. и *M. obscurus*: а – “нижегородская”, б – “владимирско-нижегородская”, в – “липецкая”, з – “воронежская”. Нумерация мест отлова соответствует таковой в дополнительных материалах. Высота рельефа показана градиентным цветом: черный – самый низкий, светло-серый – самый высокий.

**Таблица 2.** Численность гетерозигот по инверсии аутосомы № 5: наблюдаемая и ожидаемая согласно уравнению Харди–Вайнберга

| Трансекта                   | Пункт | Частота инверсии, % | Генотип      | Наблюдаемая | Ожидаемая | $\chi^2$ ( $d.f. = 1$ ) |
|-----------------------------|-------|---------------------|--------------|-------------|-----------|-------------------------|
| “Нижегородская”             | 13    | 13.5                | <i>ST/ST</i> | 19          | 19.471    | 0.629                   |
|                             |       |                     | <i>ST/A</i>  | 7           | 6.058     |                         |
|                             |       |                     | <i>A/A</i>   | 0           | 0.471     |                         |
| “Владимирско-Нижегородская” | 16    | 1.5                 | <i>ST/ST</i> | 65          | 65.015    | 0.015                   |
|                             |       |                     | <i>ST/A</i>  | 2           | 1.970     |                         |
|                             |       |                     | <i>A/A</i>   | 0           | 0.015     |                         |
|                             | 21    | 4.8                 | <i>ST/ST</i> | 19          | 19.048    | 0.053                   |
|                             |       |                     | <i>ST/A</i>  | 2           | 1.905     |                         |
|                             |       |                     | <i>A/A</i>   | 0           | 0.048     |                         |
|                             | 22    | 3.8                 | <i>ST/ST</i> | 12          | 12.019    | 0.021                   |
|                             |       |                     | <i>ST/A</i>  | 1           | 0.962     |                         |
|                             |       |                     | <i>A/A</i>   | 0           | 0.019     |                         |
|                             | 23    | 16.7                | <i>ST/ST</i> | 2           | 2.083     | 0.12                    |
|                             |       |                     | <i>ST/A</i>  | 1           | 0.833     |                         |
|                             |       |                     | <i>A/A</i>   | 0           | 0.083     |                         |
|                             | 25    | 25.0                | <i>ST/ST</i> | 1           | 1.125     | 0.222                   |
|                             |       |                     | <i>ST/A</i>  | 1           | 0.750     |                         |
|                             |       |                     | <i>A/A</i>   | 0           | 0.125     |                         |
|                             | 27    | 2.2                 | <i>ST/ST</i> | 22          | 22.011    | 0.012                   |
|                             |       |                     | <i>ST/A</i>  | 1           | 0.978     |                         |
|                             |       |                     | <i>A/A</i>   | 0           | 0.011     |                         |
|                             | 28    | 2.9                 | <i>ST/ST</i> | 33          | 33.029    | 0.030                   |
|                             |       |                     | <i>ST/A</i>  | 2           | 1.943     |                         |
|                             |       |                     | <i>A/A</i>   | 0           | 0.029     |                         |
|                             | 29    | 14.3                | <i>ST/ST</i> | 5           | 5.143     | 0.194                   |
|                             |       |                     | <i>ST/A</i>  | 2           | 1.714     |                         |
|                             |       |                     | <i>A/A</i>   | 0           | 0.143     |                         |

ском” и “воронежском” участках ГЗ, отсутствовала на “липецком” участке. Не исключено, что на “липецком” участке она не была выявлена из-за меньшего размера выборки (26 кариотипов) по сравнению с тремя остальными участками ГЗ (“нижегородский” – 105 кариотипов, “владимирско-нижегородский” – 347 кариотипов и “воронежский” – 110 кариотипов) (дополн. табл.). Численность гомозигот по субтелоцентрическому варианту аутосомы № 5 и гетерозигот по инверсии соответствовала ожидаемой согласно HWE на всех трех вышеназванных участках. Следовательно, приспособленность гетерозигот, вероятно, не ниже, чем приспособленность гомозигот по субтелоцентрическому варианту аутосомы № 5. При этом гомозигота по инверсии была обнаружена лишь в одной из 14 выборок: в пункте № 8 на “воронежском” участке. Допустимо предположить, что приспособленность гомозигот по ин-

версии ниже, чем приспособленность гетерозигот и гомозигот по субтелоцентрическому варианту аутосомы № 5. Одно из следствий из закона Харди–Вайнберга состоит в том, что редкие аллели присутствуют в популяции преимущественно в гетерозиготном, а не в гомозиготном состоянии. При очень низкой частоте аллеля действие естественного отбора значительно замедляется, так как редкий аллель сохраняется в гетерозиготном состоянии [22].

На “нижегородском”, “владимирско-нижегородском” и “воронежском” участках инверсия была отмечена только у особей с кариотипом “20А” (в единственном случае – с кариотипом “19А”) и преимущественно с генотипом *cytB-tp53O*, хотя обнаруживалась также у особей с генотипом *cytB-tp53O*, *cytB-tp53A* и *cytB-tp53A/O*. Распространение данной инверсии на трех участ-

Продолжение таблицы 2

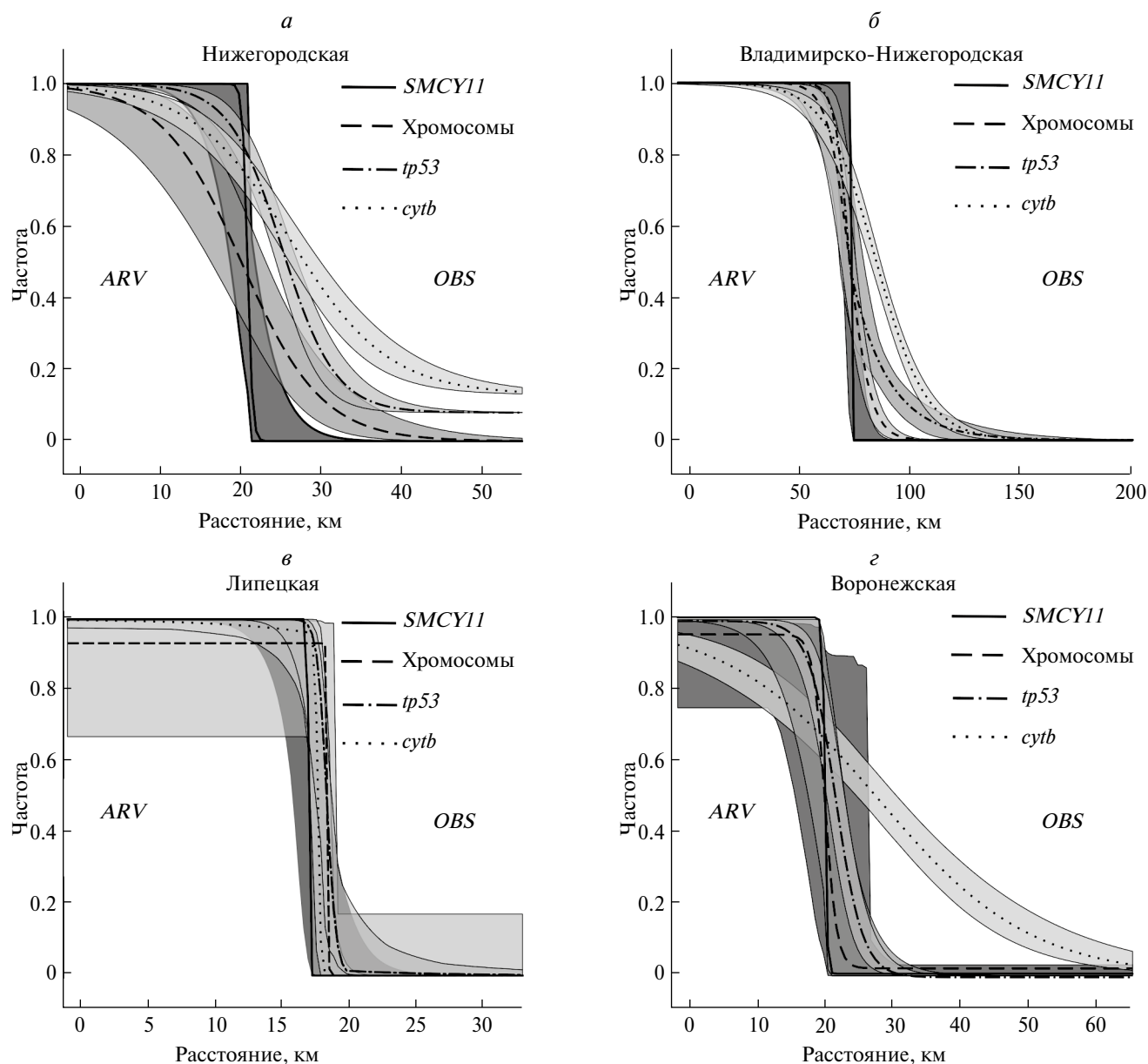
| Трансекта     | Пункт | Частота инверсии, % | Генотип      | Наблюдаемая | Ожидаемая | $\chi^2$ ( $d.f. = 1$ ) |
|---------------|-------|---------------------|--------------|-------------|-----------|-------------------------|
| “Воронежская” | 6     | 16.6                | <i>ST/ST</i> | 8           | 8.333     | 0.480                   |
|               |       |                     | <i>ST/A</i>  | 4           | 3.333     |                         |
|               |       |                     | <i>A/A</i>   | 0           | 0.333     |                         |
|               | 7     | 11.5                | <i>ST/ST</i> | 10          | 10.173    | 0.221                   |
|               |       |                     | <i>ST/A</i>  | 3           | 2.654     |                         |
|               |       |                     | <i>A/A</i>   | 0           | 0.173     |                         |
|               | 8     | 22.2                | <i>ST/ST</i> | 6           | 5.444     | 1.148                   |
|               |       |                     | <i>ST/A</i>  | 2           | 3.111     |                         |
|               |       |                     | <i>A/A</i>   | 1           | 0.444     |                         |
|               | 9     | 12.5                | <i>ST/ST</i> | 12          | 12.250    | 0.327                   |
|               |       |                     | <i>ST/A</i>  | 4           | 3.500     |                         |
|               |       |                     | <i>A/A</i>   | 0           | 0.250     |                         |
|               | 10    | 7.5                 | <i>ST/ST</i> | 17          | 17.113    | 0.132                   |
|               |       |                     | <i>ST/A</i>  | 3           | 2.775     |                         |
|               |       |                     | <i>A/A</i>   | 0           | 0.113     |                         |

Примечание. *ST/ST* – гомозиготы по субтелоцентрическому варианту аутосомы № 5; *ST/A* – гетерозиготы по инверсии аутосомы № 5; *A/A* – гомозиготы по инверсии.

**Таблица 3.** Оптимальные модели, полученные для отдельных генетических маркеров и “гибридного” хромосомного индекса, по четырем трансектам через зону гибридизации между *Microtus arvalis* s. str. и *M. obscurus*

| Маркер                                | Оптимальная модель (масштабирование, “хвосты”) | Центр клины (2LL low-high) | Ширина клины (2LL low-high) |
|---------------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| “Нижегородская” трансекта             |                                                |                            |                             |
| <i>cytb</i>                           | фиксированное, нет                             | 26.06 (23.99–28.19)        | 24.5 (19.37–31.15)          |
| <i>tp53</i>                           | фиксированное, нет                             | 25.07 (23.62–26.6)         | 13.17 (9.64–17.84)          |
| <i>SMCY11</i>                         | нет, нет                                       | 20.84 (18.64–22.00)        | 0.9 (0.06–10.75)            |
| Хромосомы                             | нет, нет                                       | 20.05 (15.72–23.44)        | 19.9 (13.13–31.72)          |
| “Владимирско-Нижегородская” трансекта |                                                |                            |                             |
| <i>cytb</i>                           | нет, нет                                       | 84.31 (81.46–86.86)        | 45.87 (37.84–55.74)         |
| <i>tp53</i>                           | нет, правый                                    | 72.35 (70.34–76.94)        | 15.17 (9.43–29.72)          |
| <i>SMCY11</i>                         | нет, нет                                       | 72.91 (69.06–75.42)        | 0.49 (0.10–14.65)           |
| Хромосомы                             | нет, нет                                       | 72.23 (68.11–75.68)        | 19.81 (14.52–27.25)         |
| “Липецкая” трансекта                  |                                                |                            |                             |
| <i>cytb</i>                           | нет, левый                                     | 17.65 (17.24–18.69)        | 0.37 (0.11–1.56)            |
| <i>tp53</i>                           | нет, нет                                       | 18.76 (17.74–18.87)        | 0.36 (0.01–2.14)            |
| <i>SMCY11</i>                         | нет, нет                                       | 17.0 (15.8–18.44)          | 0.33 (0.008–6.16)           |
| Хромосомы                             | нет, левый                                     | 17.86 (17.48–17.86)        | 0.61 (0.53–1.94)            |
| “Воронежская” трансекта               |                                                |                            |                             |
| <i>cytb</i>                           | нет, нет                                       | 27.72 (24.34–31.08)        | 45.13 (35.76–58.74)         |
| <i>tp53</i>                           | нет, нет                                       | 21.47 (19.91–23.00)        | 7.97 (5.83–10.83)           |
| <i>SMCY11</i>                         | нет, нет                                       | 19.93 (17.07–23.03)        | 1.27 (0.52–15.31)           |
| Хромосомы                             | свободное, нет                                 | 19.83 (16.32–22.42)        | 1.85 (0.14–11.87)           |

Примечание. Полученные оценки положения центра (от начала трансекты, в км) и ширины клины (в км) даны с двумя достоверными 95%-ными интервалами (2LL low-high).



**Рис. 3.** Клины четырех генетических признаков, диагностических для *Microtus arvalis* s. str. и *M. obscurus*, выявленные на четырех рассматриваемых трансектах через зону гибридизации между этими видами. Различными оттенками серого обозначены доверительные 95%-ные интервалы (2LL low-high) для каждой клины. *cytb* – митохондриальный ген, *tp53* – ядерный ген, *SMCY11* – маркер Y-хромосомы, хромосомы – “гибридный” хромосомный индекс. ARV – *M. arvalis* s. str., OBS – *M. obscurus*.

ках ГЗ ограничивается только отрезками ГЗ, где преобладают генотипы и кариотипы *M. obscurus*.

По-видимому, инверсия аутосомы № 5 несовместима с некоторыми генными комплексами, присущими *M. arvalis*. Аналогичная ситуация была отмечена в ГЗ между двумя подвидами домовых мышей *Mus m. musculus* и *M. m. domesticus*, где популяция второго подвида характеризуется множественными хромосомными перестройками [23, 24]. Интрогрессия определенных хромосомных перестроек от

*M. m. domesticus* к *M. m. musculus* не была обнаружена. Анализ генов, сцепленных с определенными Rb-транслокациями, обнаружил несовместимость некоторых перичентрических районов *M. m. domesticus* с генами *M. m. musculus* [24].

*Анализ клинальной генетической изменчивости: факторы, влияющие на структуру гибридной зоны*

При сравнении четырех трансект, заметно сходство между “нижегородским”, “владимир-



ско-нижегородским” и “воронежским” участками ГЗ: клина по *cytb* является самой широкой из четырех клин, клина по *SMCY11* оказалась самой узкой, а клина по гену *tp53* занимает промежуточное положение между ними (рис. 3, табл. 3). Этот результат достаточно ожидаем, поскольку Р. Пети и Л. Эскофье [25] показали, что у видов, среди которых расселяющиеся особи представлены гетерогаметным полом (самцы в случае большинства млекопитающих), наиболее выраженный характер имеет интрогрессия маркеров, связанных с противоположным полом (мтДНК в случае млекопитающих). При изучении пространственной генетической структуры популяции *M. arvalis* с использованием микросателлитных локусов было обнаружено, что у данного вида активно расселяются самцы [26].

Узкая клина Y-сцепленных генов отмечена и в других ГЗ млекопитающих, например в ГЗ между европейскими филогенетическими линиями *M. arvalis* [27] и подвидами домового мыши *Mus m. musculus* и *M. m. domesticus* [28]. Ограничение интрогрессии Y-сцепленных генов может быть обусловлено тем, что в соответствии с правилом Холдейна [29] приспособленность особей гетерогаметного пола при гибридизации снижается значительнее, чем особей гомогаметного пола.

На трех вышеупомянутых трансектах выявлено существенное смещение на восток, юго-восток или на юг (в сторону ареала *M. obscurus*) центра клины по *cytb* относительно центров остальных клин (рис. 2,а–г; рис. 3, табл. 3). Это смещение достоверно, т.е. доверительный интервал клины по *cytb* не перекрывается с интервалами других маркеров (единственное исключение – клина по *tp53* “нижегородской” трансекты) (табл. 3). Подобный феномен находится в полном соответствии с результатами симуляционного моделирования [30, 31], полевых экспериментов [32] и исследований реальных природных ситуаций [33–36], согласно которым при вселении одного вида в ареал другого направление интрогрессии мтДНК противоположно направлению расселения. При исследовании поведения самцов *M. arvalis* и *M. obscurus* в тесте “перегородка” и “открытое поле” было обнаружено, что самцы *M. obscurus* более активны в освоении новой территории, чем самцы *M. arvalis* [37, 38]. Поэтому весьма вероятно, что исследуемая ГЗ сформировалась в результате вселения *M. obscurus* в ареал *M. arvalis*.

“Липецкая” трансекта отличается от трех вышеупомянутых трансект очень узкими клинами

по всем исследованным маркерам и совпадением их центров (рис. 3,г; табл. 3). Подобные характеристики явно обусловлены локализацией ГЗ на юге Липецкой области вдоль р. Воронеж: центры клин на данном участке совпадают с поймой реки. Даже такие большие реки, как Волга, преодолимы для *M. arvalis* и *M. obscurus* [2]. Водная преграда, р. Ока (рис. 2,б), присутствует и на территории, на которой находится “владимирско-нижегородский” участок ГЗ. Гибридная зона локализована здесь на левом берегу, а на правом обнаружены только популяции *M. obscurus* (генетические маркеры *M. arvalis* отсутствуют). Этот факт позволяет предположить, что на “владимирско-нижегородском” участке р. Ока ограничивает распространение генетических маркеров (гаплотипов *cytb*) *M. arvalis*. Однако водная преграда не оказывает заметного влияния на структуру ГЗ на данном участке, хотя р. Ока здесь значительно шире (500 м), чем р. Воронеж на “липецком” участке (50 м). Вероятно, это связано с тем, что на “владимирско-нижегородском” участке центр ГЗ локализован в 43 км от р. Ока (рис. 2,б). Столь значительное расстояние обуславливает возможное влияние данной водной преграды лишь на элиминацию наиболее восточной части потенциальной клины по *cytb*, что приводит к незначительному уменьшению ширины ГЗ на этом участке. Таким образом, различия в структуре изученных участков ГЗ между *Microtus arvalis* s. str. и *M. obscurus* определяются преимущественно пространственным совпадением (или несовпадением) центра ГЗ с локальными физическими преградами, что отчетливо видно на примере ее “липецкого” участка.

В качестве одного из факторов, влияющих на структуру ГЗ, традиционно рассматривается ее возраст. На “липецком” и “воронежском” участках (в лесостепной зоне) *M. arvalis* и *M. obscurus* могли вступить в контакт раньше, чем на “нижегородском” и “владимирско-нижегородском” участках (в лесной зоне), где формирование открытых биотопов было связано исключительно со сведением лесов человеком. Однако предположение о влиянии возраста отдельных участков ГЗ между *M. arvalis* и *M. obscurus* на их структуру находится в противоречии с резким отличием ширины и взаимного положения клин по отдельным признакам, выявленным на “липецкой” трансекте, от таковых на трех остальных трансектах.

Отсутствие связи локализации изученных участков ГЗ с границами между различающи-

мися местообитаниями, общее пространственное совпадение выявленных клин по отдельным признакам на каждой трансекте, а также крайняя редкость гибридов F1 позволяют отнести ее к категории “зон напряжения” (“tension zones”), которым свойственна стабилизация вдоль физико-географических преград [39]. Пока сложно ответить на вопрос о том, связана ли локализация ГЗ на “липецком” участке вдоль р. Воронеж с формированием здесь исходной зоны контакта между *Microtus arvalis* s. str. и *M. obscurus*, или же с ее прошлой пространственной динамикой и последующей стабилизацией вдоль данной преграды. Рассмотренная нами протяженная ГЗ между *Microtus arvalis* s. str. и *M. obscurus* является подходящей моделью для дальнейшего изучения (в том числе и с использованием геномных методов) влияния множества разнообразных факторов на ее структуру.

Авторы выражают благодарность Т.А. Мирановой, А.В. Щеголькову, П.Г. Власенко, Н.А. Илларионовой за помощь в сборе материала.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-24-00324, <https://rscf.ru/project/22-24-00324/>).

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. Hewitt G.M. Hybrid Zones — Natural laboratories for evolutionary studies // Trends Ecol. Evol. 1988. V. 3. P. 158–167.
2. Булатова Н.Ш., Голенищев Ф.Н., Ковальская Ю.М. и др. Цитогенетическое изучение парапатрической зоны контакта двух 46-хромосомных форм обыкновенной полевки в Европейской России // Генетика. 2010. Т. 46. № 4. С. 502–508. <https://doi.org/10.1134/S1022795410040095>
3. Баскевич М.И., Окулова Н.М., Потапов С.Г. и др. Новые данные о распространении видов-двойников и гибридизации 46-хромосомных форм *Microtus arvalis* sensu lato (Rodentia, Arvicolinae) в Центральном Черноземье // Зоол. журн. 2012. Т. 91. № 8. С. 994–1005.
4. Баскевич М.И., Миронова Т.А., Черепанова Е.В., Кривоногов Д.М. Новые данные по хромосомной изменчивости видов-двойников и гибридизации 46-хромосомных форм *Microtus arvalis* sensu lato (Rodentia, Arvicolinae) в Верхнем Поволжье // Зоол. журн. 2016. Т. 95. № 9. С. 1096–1107. <https://doi.org/10.1134/S1062359016110042>
5. Stojak J., McDevitt A.D., Herman J.S. et al. Between the Balkans and the Baltic: Phylogeography of a common vole mitochondrial DNA lineage limited to central Europe // PLoS One. 2016. V. 11. № 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168621>
6. Tougaard C., Montuire S., Volobouev V. et al. Exploring phylogeography and species limits in the Altai vole (Rodentia: Cricetidae) // Biol. J. Linnean Society. 2013. V. 108. № 2. P. 434–452. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2012.02034.x>
7. Сибиряков П.А., Товпинец Н.Н., Дунал Т.А. и др. Филогеография обыкновенной полевки *Microtus arvalis* (Rodentia, Arvicolinae) формы *obscurus*: новые данные по изменчивости митохондриальной ДНК // Генетика. 2018. Т. 54. № 10. С. 1162–1176. <https://doi.org/10.1134/S1022795418100137>
8. Голенищев Ф.Н., Мейер М.Н., Булатова Н.Ш. Гибридная зона между двумя кариоморфами *Microtus arvalis* (Rodentia, Arvicolidae) // Тр. Зоол. ин-та РАН. 2001. Т. 289. С. 89–94.
9. Лавренченко Л.А., Потапов С.Г., Булатова Н.Ш., Голенищев Ф.Н. Изучение естественной гибридизации двух форм обыкновенной полевки (*Microtus arvalis*) молекулярно-генетическими и цитогенетическими методами // Докл. РАН. 2009. Т. 426. № 1. С. 135–138.
10. Lavrenchenko L.A., Gromov A.R., Martynov A.A. et al. Genetic, chromosomal and phenotypic variation across a hybrid zone between two common vole species (*Microtus arvalis* and *M. obscurus*) // Hystrix. 2023. V. 34. № 1. P. 24–32. <https://doi.org/10.4404/hystrix-00588-2022>
11. Малыгин В.М. Сравнительный морфологический анализ кариотипов двух географических форм 46-хромосомной обыкновенной полевки (*Microtus arvalis*) // Зоол. журн. 1974. Т. 53. № 5. С. 769–777.
12. Král B., Lapunova E.A. Karyotypes of 46-chromosome *Microtus arvalis* (Microtinae, Rodentia) // Zool. Listy. 1975. V. 24. P. 1–11.
13. Воронцов Н.Н., Ляпунова Е.А., Белянин А.Н. и др. Сравнительно-генетические методы диагностики и оценки степени дивергенции видов-двойников *Microtus arvalis* и *Microtus epiroticus* // Зоол. журн. 1984. Т. 63. № 10. С. 1555–1565.
14. Мейер М.Н., Голенищев Ф.Н., Раджабли С.И., Саблина О.В. Серые полевки (подрод *Microtus* Schrank) фауны России и сопредельных территорий. СПб.: Зоол. ин-т РАН, 1996. 320 с.
15. Раджабли С.И., Графодатский А.С. Эволюция кариотипов млекопитающих (структурные перестройки хромосом и гетерохроматин) // Цитогенетика гибридов, мутации и эволюция кариотипа. Новосибирск: Наука, 1977. С. 231–248.
16. Козловский А.И., Булатова Н.Ш., Новиков А.Д. Двой-

- ной эффект инверсии в кариотипе обыкновенной полевки // Докл. АН СССР. 1988. Т. 298. № 4. С. 994–997.
17. Fink S., Excoffier L., Heckel G. Mitochondrial gene diversity in the common vole *Microtus arvalis* shaped by historical divergence and local adaptations // Mol. Ecol. 2004. V. 13. № 11. P. 3501–3514.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02351.x>
  18. Булатова Н.Ш., Потапов С.Г., Лавренченко Л.А. Генетическая и хромосомная полипатия в исследовании маркеров митохондриальной и ядерной ДНК у обыкновенных полевых (группа *Microtus arvalis*) // Генетика. 2010. Т. 46. № 5. С. 668–676  
<https://doi.org/10.1134/S1022795410050121>
  19. Ford C.E., Hamerton J.L. A colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes // Stain Technol. 1956. V. 31. № 6. P. 247–251.  
<https://doi.org/10.3109/10520295609113814>
  20. The R Project for Statistical Computing.  
URL <https://www.r-project.org>.
  21. Derryberry E.P., Derryberry G.E., Maley J.M., Brumfield R.T. HZAR: Hybrid zone analysis using an R software package // Mol. Ecol. Resources. 2014. V. 14. № 3. P. 652–663.  
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12209>
  22. Георгиевский А.Б. К истории закона Харди–Вейнберга // Историко-биологические исследования. 2011. Т. 3. № 1. С. 63–75.
  23. Nance V., Vanlerberghe F., Nielsen J.T. et al. Chromosomal introgression in house mice from the hybrid zone between *M. m. domesticus* and *M. m. musculus* in Denmark // Biol. J. Linnean Society. 1990. V. 41. № 1–3. P. 215–227.  
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1990.tb00831.x>
  24. Fel-Clair F., Lenormand T., Catalan J. et al. Genomic incompatibilities in the hybrid zone between house mice in Denmark: Evidence from steep and non-coincident chromosomal clines for Robertsonian fusions // Genet. Res. Camb. 1996. V. 67. № 2. P. 123–134.  
<https://doi.org/10.1017/S0016672300033589>
  25. Petit R.J., Excoffier L. Gene flow and species delimitation // Trends Ecol. Evol. 2009. V. 24. P. 386–393.  
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.02.011>
  26. Gauffre B., Petit E., Brodier S. et al. Sex-biased dispersal patterns depend on the spatial scale in a social rodent // Proc R. Soc. B. 2009. V. 276. P. 3487–3494.  
<https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0881>
  27. Beysard M., Krebs-Wheaton R.K., Heckel G. Tracing reinforcement through asymmetrical partner preference in the European common vole *Microtus arvalis* // BMC Evol. Biol. 2015. V. 15. P. 170–181.  
<https://doi.org/10.1186/s12862-015-0455-5>
  28. Vanlerberghe F., Dod B., Boursot P. et al. Absence of Y-chromosome introgression across the hybrid zone between *Mus musculus domesticus* and *Mus musculus musculus* // Genet. Res. 1986. V. 48. P. 191–197.
  29. Haldane J.B.S. Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals // J. Genetics. 1922. V. 12. № 2. P. 101–109.
  30. Currat M., Ruedi M., Petit R.J., Excoffier L. The hidden side of invasions: massive introgression by local genes // Evolution. 2008. V. 62. № 8. P. 1908–1920.  
<https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00413.x>
  31. Excoffier L., Foll M., Petit R.J. Genetic consequences of range expansions // Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst. 2009. V. 40. P. 481–501.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.39.110707.173414>
  32. Mastrantonio V., Porretta D., Urbanelli S. et al. Dynamics of mtDNA introgression during species range expansion: insights from an experimental longitudinal study // Sci. Rep. 2016. V. 6. P. 303–355.  
<https://doi.org/10.1038/srep30355>
  33. Toews D.P.L., Brelsford A. The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals // Mol. Ecol. 2012. V. 21. № 16. P. 3907–3930.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05664.x>
  34. Drovetski S.V., Semenov G., Red'kin Y.A. et al. Effects of asymmetric nuclear introgression, introgressive mitochondrial sweep, and purifying selection on phylogenetic reconstruction and divergence estimates in the Pacific clade of *Locustella* warblers // PLoS One. 2015. V. 10. № 4.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122590>
  35. Levanen R., Kunnasranta M., Pohjoismaki J. Mitochondrial DNA introgression at the northern edge of the brown hare (*Lepus europaeus*) range // Ann. Zool. Fenn. 2018. V. 55. P. 15–24.  
<https://doi.org/10.5735/086.055.0103>
  36. Kinoshita G., Nunome M., Kryukov A.P. et al. Contrasting phylogeographic histories between the continent and islands of East Asia: Massive mitochondrial introgression and long-term isolation of hares (Lagomorpha: *Lepus*) // Mol. Phylogenet. and Evol. 2019. V. 136. P. 65–75.  
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.04.003>
  37. Саблина С.А., Белозерцева И.В. Поведение самцов обыкновенной полевки (*Microtus arvalis*) хромосомных форм *arvalis* и *obscurus* в тестах предпочтения ольфакторных сигналов и открытое поле // Зоол. журн. 2012. Т. 91. № 2. С. 208–218.
  38. Саблина С.А., Тихонова Е.П., Белозерцева И.В. Поведение самцов обыкновенной полевки (*Microtus arvalis* Pallas, 1779) хромосомных форм “*arvalis*” и “*obscurus*” в тесте “перегородка” // Тр. Зоол. ин-та РАН. 2017. Т. 321. № 2. С. 218–227.  
<https://doi.org/10.31610/trudyzin/2017.321.2.218>
  39. Hewitt G.M. The subdivision of species by hybrid zones // Speciation and Its Consequences. / Eds Otte D., Endler J, Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 1989. С. 85–110.



## STRUCTURE OF THE HYBRID ZONE BETWEEN ALLIED SPECIES OF THE COMMON VOLE, *Microtus arvalis* AND *M. obscurus*: INFLUENCE OF GENETIC FACTORS AND LANDSCAPE-GEOGRAPHIC CONDITIONS

L. A. Lavrenchenko<sup>a,\*</sup>, A. R. Gromov<sup>a</sup>, A. A. Martynov<sup>a</sup>, D. S. Kostin<sup>a</sup>,

V. A. Komarova<sup>a</sup>, D. M. Krivonogov<sup>b</sup>, E. V. Cherepanova<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

<sup>b</sup>Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod (Arzamas Branch), Arzamas, 607220 Russia

\*e-mail: llavrenchenko@gmail.com

Patterns of introgression of several genetic markers across the hybrid zone between allied species of the common vole *Microtus arvalis* s. str. и *M. obscurus* were studied in four its sections: in northwest Nizhny Novgorod region, east Vladimir and southwest of Nizhny Novgorod regions, south Lipetsk region, and northwest Voronezh region. Analysis of the clinal variability for three molecular-genetic markers (*cytb*, *tp53*, *SMCY11*) and for karyotypes showed a structural similarity between the “Vladimir – Nizhny Novgorod”, “Nizhny Novgorod”, and “Voronezh” sections. The maximal width was shown for the *cytb* cline, the minimal width – for the *SMCY11* cline; the *tp53* cline and chromosomal cline occupy intermediate position for this parameter. Furthermore, in these transects the centre of the cline for the *cytb* is shifted southeastward (into the distribution range of *M. obscurus*) from the centres of three other clines. The revealed asymmetric introgression of mitochondrial genome from *M. arvalis* to *M. obscurus* may be explained by the fact that the hybrid zone was formed as a result of invasion of *M. obscurus* into the range of *M. arvalis*. The “Lipetsk” transect differs from three above-mentioned transects by very narrow clines with nearly coinciding centres. Such characteristics of the “Lipetsk” transect are obviously caused by localization of the hybrid zone in this section along river Voronezh. The obtained results led us to suppose that the structure of the studied hybrid zone is determined mainly by coinciding (or non-coinciding) of its centre with local physical barriers.

**Keywords:** introgressive hybridization, mitochondrial DNA, nuclear genes, chromosomal rearrangements, rodents, mammals.

УДК 636.2+636.082.2

# СТРУКТУРА СУБПОПУЛЯЦИЙ АЙРШИРСКОГО, ГОЛШТИНСКОГО И ДЖЕРСЕЙСКОГО СКОТА ЮЖНЫХ РЕГИОНОВ РОССИИ ПО *CSN2* (RS43703011), *CSN3* (RS43703016) И МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМ ЛОКУСАМ (*BM1818*, *BM1824*, *BM2113*, *ETH10*, *ETH225*, *ETH3*, *INRA023*, *SPS115*, *TGLA126*, *TGLA122*, *TGLA227*, *TGLA53*)

© 2024 г. Н. В. Ковалюк<sup>1</sup>, \*, А. Е. Волченко<sup>1</sup>, Е. В. Ширяева<sup>1</sup>, Л. И. Якушева<sup>1</sup>,  
Ю. Ю. Шахназарова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии, Краснодар, 350055 Россия

\*e-mail: NVK1972@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.08.2023 г.

После доработки 02.10.2023 г.

Принята к публикации 10.10.2023 г.

В ходе исследований с использованием молекулярно-биологических методов генотипировано по локусам *BM1818*, *BM1824*, *BM2113*, *ETH10*, *ETH225*, *ETH3*, *INRA023*, *SPS115*, *TGLA126*, *TGLA122*, *TGLA227*, *TGLA53*, *CSN2*(rs43703011) и *CSN3*(rs43703016) 3000 образцов крови коров айрширской, голштинской и джерсейской пород из стад Краснодарского и Ставропольского краев. В среднем частота встречаемости гомозиготных генотипов по 12 микросателлитным локусам у джерсейского скота составила 0.38, у голштинского и айрширского – 0.30 и 0.27 соответственно; наиболее высокое аллельное разнообразие выявлено у голштинского скота ( $9.0 \pm 1.7$  аллелей на локус). Следует отметить значительные отличия генетического профиля айрширского скота. Для айрширских животных типичными (но малораспространенными у скота джерсейской и голштинской пород) оказались аллельные варианты: 270 локуса *BM1818*, 137 локуса *BM2113*, 213 локуса *ETH10*, 119 локуса *ETH3*, 142 локуса *ETH225*, 87 локуса *TGLA227*, 166 локуса *TGLA53*. В изученной субпопуляции джерсейского скота частота встречаемости генотипа A2A2 локуса *CSN2*(rs43703011) (бета-казеина) составила 0.68, а в группах айрширского и голштинского лишь 0.25 и 0.31 соответственно. Генотип BB локуса *CSN3*(rs43703016) (каппа-казеина) встречался в джерсейской группе животных с частотой 0.76, а у айрширов и голштинов – 0.04 и 0.15 соответственно. Генотипированные группы джерсейских, айрширских и голштинских животных значительны по объему; предполагаем, что выявленные закономерности характерны для скота указанных пород на юге России. Считаем, что полученные данные в дальнейшем можно использовать в практической работе по отнесению тех или иных групп скота к типичным голштинским, айрширским или джерсейским и при создании стад – продуцентов молока определенного типа (например молока типа A2).

**Ключевые слова:** голштинский, айрширский, джерсейский скот, микросателлитные локусы, *CSN2*, *CSN3*.

**DOI:** 10.31857/S0016675824030055 **EDN:** DPECЕМ

Микросателлиты – участки ДНК, состоящие из тандемно повторяющихся мономеров. Генотипирование по микросателлитным локусам используется в генетических исследованиях и для подтверждения происхождения животных, так STR-маркеры *BM1818*, *BM1824*, *BM2113*, *ETH10*, *ETH225*, *ETH3*, *INRA023*, *SPS115*, *TGLA126*, *TGLA122*, *TGLA227*, *TGLA53* рекомендованы для этой цели ISAG (International Society for Animal Genetics)[1–5].

Из описанных в литературных источниках генетических вариантов каппа-казеина крупного рогатого скота наиболее распространенными

являются аллели *A* и *B* (rs43703016). Установлено, что аллель *A* в большинстве исследованных групп встречается значительно чаще аллеля *B* [6, 7]. Установлено, что молочные системы, полученные из молока животных *CSN3BB*, имеют самую короткую продолжительность коагуляции, лучшие значения прочности сгустка и повышенный выход по сравнению с молоком от коров *CSN3AA* [8].

Для гена β-казеина (*CSN2*) описано 13 полиморфных вариантов. В зависимости от кодона, кодирующего аминокислоту в позиции 67β-казеина (гистидин или пролин), животные произ-

водят молоко двух типов: *A1* и *A2* и имеют генотипы *A1A1*, *A1A2*, *A2A2* [9].

Исследования, проведенные в ряде стран, показали, что существует связь между потреблением  $\beta$ -казеина типа *A1* (rs43703011) и различными заболеваниями. При расщеплении ферментами ЖКТ молока, содержащего фракцию  $\beta$ -казеина *A1*, образуется пептид  $\beta$ -казоформин 7 (BCM-7) в значительно большем количестве, чем при соответствующем расщеплении молока, содержащего фракцию  $\beta$ -казеина *A2* (полученного от коров с генотипом *A2A2*).

Вероятно, опиоидный пептид BCM-7 имеет более высокое сродство, по сравнению с иными метаболитами, к ряду рецепторов мозговой ткани, иммунных клеток и клеток кишечника и запускает реакции воспаления, особенно у детей и людей с нарушениями функции пищеварения [9,10].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ходе исследований с использованием молекулярно-биологических методов проанализировано 3000 образцов крови коров айрширской породы ( $n = 1000$ ) (АО “Агрокомплекс Павловский” Павловского района, ООО “ПЗ “Дружба” Калининского района, ПАО “ПЗ им. В.И. Чапаева” Динского района Краснодарского края); голштинской породы ( $n = 1000$ ) (АО “Родина” Каневского района, ОАО Агрофирма племзавод “Победа” Каневского района, АО “Рассвет” Усть-Лабинского района Краснодарского края) и джерсейской породы ( $n = 1000$ ) (ООО “Агроальянс Инвест” Александровского района Ставропольского края). Анализировались животные с подтвержденным по матери и отцу происхождением.

ДНК выделяли из цельной крови с антикоагулянтом (ЭДТА) при помощи ПЦР-совместимого реагента для проведения быстрого лизиса CorDIS Sprint. ПЦР проводили с использованием набора CorDIS Cattle (ООО “Гордиз”, Россия). Продукты амплификации анализировали с применением генетического анализатора Applied Biosystems 3500 Series Genetic Analyzer. Учитывались следующие STR-маркеры: *BM1818*, *BM1824*, *BM2113*, *ETH10*, *ETH225*, *ETH3*, *INRA023*, *SPS115*, *TGLA126*, *TGLA122*, *TGLA227*, *TGLA53*.

Для амплификации участка локуса *CSN2* использовали разработанные нами праймеры следующей последовательности [11]:

BK1 5'-AGG GAT GTT TTG TGG GAG GCT  
CTT-3';  
BK2 5'-ATA AAA TCC ACC CCT TTG CCC  
AGA-3'.

и наборы реагентов Gene Pak PCR Core (ООО Лаборатория “Изоген”, г. Москва). Фрагменты, амплифицированные с участка гена  $\beta$ -казеина (температура отжига 63°C), расщеплялись эндонуклеазой BstDEI (№ E227, НПО “СибЭнзим”) в случае наличия аллеля *A2* на два фрагмента: 64 и 22 пн. Фрагмент, амплифицированный с аллеля *A1*, сайта рестрикции не имел (размер его составлял 86 пн). Результаты рестрикции оценивали в 2.5%-ном агарозном геле.

Для амплификации участка локуса *CSN3* использовали следующие праймеры [12]:

KKAZ 1 5'-TGT GCT GAG TAG GTA TCC TAG  
TTA TGG-3';  
KKAZ 2 5'-GCG TTG TCT TCT TTG ATG TCT  
CCT TAG-3'

Условия амплификации: 94°C — 3.5 мин; 94°C — 30 с, 62°C — 30 с, 72°C — 30 с — 32 цикла; 72°C — 3 мин. В результате фрагменты, которые амплифицировались с участка гена каппа-казеина варианта *A*, расщеплялись эндонуклеазой HinfI (№ E076, НПО “СибЭнзим”) на три фрагмента: 326, 100 и 27 пн. Фрагмент, амплифицированный с аллеля *B*, расщеплялся на 2 фрагмента: 426 и 27 пн. Результаты рестрикции оценивали в 2.0%-ном агарозном геле.

Фактические частоты встречаемости отдельных генотипов определяли путем соотношения количества особей носителей генотипа к общему количеству особей в анализируемой группе.

Для подсчета частот аллелей использовали формулу

$$P = (2N1 + N2) / 2n,$$

где  $N1$  — число гомозигот по исследуемому аллелю, а  $N2$  — число гетерозигот,  $n$  — объем выборки.

Наблюдаемую и ожидаемую гетерозиготность, индекс фиксации Райта рассчитывали следующим образом:

$$H_o = h_j / n,$$

где  $H_o$  — наблюдаемая гетерозиготность по одному локусу,  $h_j$  — количество гетерозиготных гено-

типов в локусе,  $n$  — общее количество генотипов в локусе;

$$H_e = 1 - \sum p_i^2,$$

где  $H_e$  — ожидаемая гетерозиготность по одному локусу,  $p_i$  — частота встречаемости  $i$ -го аллеля;

$$F_{IS} = (H_e - H_o)/H_e,$$

где  $F_{IS}$  — индекс фиксации Райта,  $H_e$  — ожидаемая гетерозиготность,  $H_o$  — наблюдаемая гетерозиготность.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ частоты встречаемости гомозиготных вариантов микросателлитных локусов (*BM1818*, *BM1824*, *BM2113*, *ETH10*, *ETH225*, *ETH3*, *INRA023*, *SPS115*, *TGLA126*, *TGLA122*, *TGLA227*, *TGLA53*) в выборках животных айрширской, джерсейской и голштинской пород показал, что количество гомозиготных генотипов оказалось в целом выше у особей джерсейской породы. В среднем частота встречаемости гомозиготных генотипов по 12 локусам у джерсейского скота составила 0.38, у голштинского и айрширского — 0.30 и 0.27 соответственно (табл. 1).

У представителей всех трех пород отмечен достаточно высокий процент встречаемости гомозиготных по локусу *TGLA126* животных. Однако у голштинов и джерсеев такие животные несли преимущественно генотип 117\*117, а гомозиготные по *TGLA126* айрширы — 115\*115.

Установить связь между индивидуумами отдельной субпопуляции и субпопуляцией в целом позволяет индекс фиксации Райта ( $F_{IS}$ ). Он количественно отражает отклонение частот встречаемости гетерозиготных генотипов от теоретически ожидаемой по Харди–Вайнбергу доли гетерозигот при случайном спаривании внутри популяции и может рассматриваться в качестве одного из критериев инбредности популяции. При этом положительное значение  $F_{IS}$  означает нехватку гетерозигот в данной популяции, в то время как отрицательное значение указывает на их избыток.

В исследуемой выборке джерсейского скота, несмотря на более высокий уровень гомозиготности, в среднем наблюдался минимальный избыток гетерозигот ( $F_{IS} = -0.03$ ), в выборке айрширского — минимальный недостаток ( $F_{IS} = 0.01$ ) (табл. 1).

Наиболее высокое аллельное разнообразие оказалось у голштинского скота. Так, среднее

**Таблица 1.** Структура субпопуляций крупного рогатого скота джерсейской, айрширской и голштинской пород по гомо- и гетерозиготности микросателлитных локусов

| Микросателлитные локусы              | Частота встречаемости локусов у животных |              |                              |              |                               |              |
|--------------------------------------|------------------------------------------|--------------|------------------------------|--------------|-------------------------------|--------------|
|                                      | джерсейской породы (n = 1000)            |              | айрширской породы (n = 1000) |              | голштинской породы (n = 1000) |              |
|                                      | гетерозиготные                           | гомозиготные | гетерозиготные               | гомозиготные | гетерозиготные                | гомозиготные |
| BM1818                               | 0.74                                     | 0.26         | 0.81                         | 0.19         | 0.63                          | 0.37         |
| BM1824                               | 0.55                                     | 0.45         | 0.74                         | 0.26         | 0.76                          | 0.24         |
| BM2113                               | 0.34                                     | 0.66         | 0.88                         | 0.12         | 0.74                          | 0.26         |
| ETH10                                | 0.70                                     | 0.30         | 0.83                         | 0.17         | 0.78                          | 0.22         |
| ETH225                               | 0.67                                     | 0.33         | 0.83                         | 0.17         | 0.67                          | 0.33         |
| ETH3                                 | 0.51                                     | 0.49         | 0.79                         | 0.21         | 0.67                          | 0.33         |
| INRA023                              | 0.73                                     | 0.27         | 0.68                         | 0.32         | 0.66                          | 0.34         |
| SPS115                               | 0.56                                     | 0.44         | 0.42                         | 0.58         | 0.60                          | 0.40         |
| TGLA126                              | 0.55                                     | 0.45         | 0.57                         | 0.43         | 0.53                          | 0.47         |
| TGLA122                              | 0.70                                     | 0.30         | 0.80                         | 0.20         | 0.78                          | 0.22         |
| TGLA227                              | 0.75                                     | 0.25         | 0.58                         | 0.42         | 0.77                          | 0.23         |
| TGLA53                               | 0.69                                     | 0.31         | 0.78                         | 0.22         | 0.86                          | 0.14         |
| В среднем по 12 локусам              | 0.62 ± 0.07                              | 0.38 ± 0.07  | 0.73 ± 0.07                  | 0.27 ± 0.08  | 0.70 ± 0.05                   | 0.30 ± 0.05  |
| $H_o$ (наблюдаемая гетерозиготность) | 0.62                                     |              | 0.73                         |              | 0.70                          |              |
| $H_e$ (ожидаемая гетерозиготность)   | 0.60                                     |              | 0.74                         |              | 0.70                          |              |
| $F_{IS}$                             | -0.03                                    |              | 0.01                         |              | 0.00                          |              |

количество аллелей на локус у джерсеев составило  $5.8 \pm 0.8$ , у айрширов —  $7.8 \pm 0.9$ , а у голштинов —  $9.0 \pm 1.7$  (табл. 2).

Однако число информативных аллелей (т.е. встречающихся с частотой от 5% и выше) оказалось схоже в выборках джерсейского и голштинского скота (3.8 и 3.9 соответственно) и было значительно выше в выборке айрширского скота и составило  $6.5 \pm 0.7$  аллелей на локус. На наш взгляд объяснить этот факт можно тем, что группы голштинского и джерсейского скота в представленных хозяйствах были сформированы преимущественно завезенными из-за рубежа чистопородными голштинскими или джерсейскими животными, а группа айрширских — путем погложительного скрещивания (улучшаемая порода — красная степная, а улучшающая — айрширская).

**Таблица 2.** Характеристика аллелофонда по 12 микросателлитным локусам у животных джерсейской, айрширской и голштинской пород

| Микросателлитные локусы          | Джерсейская<br>( <i>n</i> = 1000) |                           | Айрширская<br>( <i>n</i> = 1000) |                           | Голштинская<br>( <i>n</i> = 1000) |                           |
|----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|----------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
|                                  | <i>N<sub>a</sub></i>              | <i>N<sub>a</sub></i> > 5% | <i>N<sub>a</sub></i>             | <i>N<sub>a</sub></i> > 5% | <i>N<sub>a</sub></i>              | <i>N<sub>a</sub></i> > 5% |
| <i>BM1818</i>                    | 6                                 | 5                         | 7                                | 6                         | 7                                 | 3                         |
| <i>BM1824</i>                    | 5                                 | 3                         | 6                                | 5                         | 5                                 | 4                         |
| <i>BM2113</i>                    | 6                                 | 3                         | 6                                | 6                         | 8                                 | 4                         |
| <i>ETH10</i>                     | 6                                 | 4                         | 8                                | 6                         | 8                                 | 4                         |
| <i>ETH225</i>                    | 5                                 | 4                         | 7                                | 7                         | 7                                 | 4                         |
| <i>ETH3</i>                      | 4                                 | 2                         | 7                                | 6                         | 8                                 | 4                         |
| <i>INRA023</i>                   | 7                                 | 3                         | 9                                | 7                         | 12                                | 4                         |
| <i>SPS115</i>                    | 6                                 | 4                         | 6                                | 6                         | 7                                 | 3                         |
| <i>TGLA126</i>                   | 4                                 | 4                         | 7                                | 5                         | 7                                 | 2                         |
| <i>TGLA122</i>                   | 7                                 | 4                         | 11                               | 7                         | 14                                | 4                         |
| <i>TGLA227</i>                   | 9                                 | 5                         | 9                                | 9                         | 11                                | 4                         |
| <i>TGLA53</i>                    | 5                                 | 4                         | 10                               | 8                         | 14                                | 7                         |
| Число аллелей на локус в среднем | 5.8±0.8                           | 3.8±0.5                   | 7.8±0.9                          | 6.5±0.7                   | 9.0±1.7                           | 3.9±0.7                   |

Примечание. *N<sub>a</sub>* — число аллелей на локус; *N<sub>a</sub>* > 5% — число информативных аллелей.

Аллельные варианты исследуемых локусов и их встречаемость в группах джерсейского, айрширского и голштинского скота представлены для наглядности в виде диаграмм (рис. 1) и в табл. 3. Абсолютные значения встречаемости каждого из аллельных вариантов отражены на оси Y.

У голштинских животных выявлены аллельные варианты, которые не встречались у джерсейского и айрширского скота: для локуса *ETH3* — 129 (0.30), для локуса *INRA023* — 202 (0.18), для *TGLA 227* — 99 (0.09, для *TGLA53* — 176 (0.08), 184 (0.08) и 186 (0.10).

Установлено, что уникальными для представленной выборки джерсейской породы является аллель 101 локуса *TGLA227* с частотой встречаемости 0.06, аллель 261 локуса *SPS115* (частота встречаемости 0.05) и аллель 198 локуса *INRA023* (0.21).

Уникальными для айрширских животных являются аллели 184 локуса *BM1824* (0.05) и 178 локуса *TGLA53* (распространен с частотой 0.08).

С самой высокой частотой в группе особей джерсейской породы встретился аллель 135 локуса *BM2113* (частота встречаемости 0.81), у айрширских животных — аллель 115 локуса *TGLA126* — с частотой 0.58; у животных голштинской породы — аллель 117 локуса *TGLA126* (частота встречаемости 0.64).

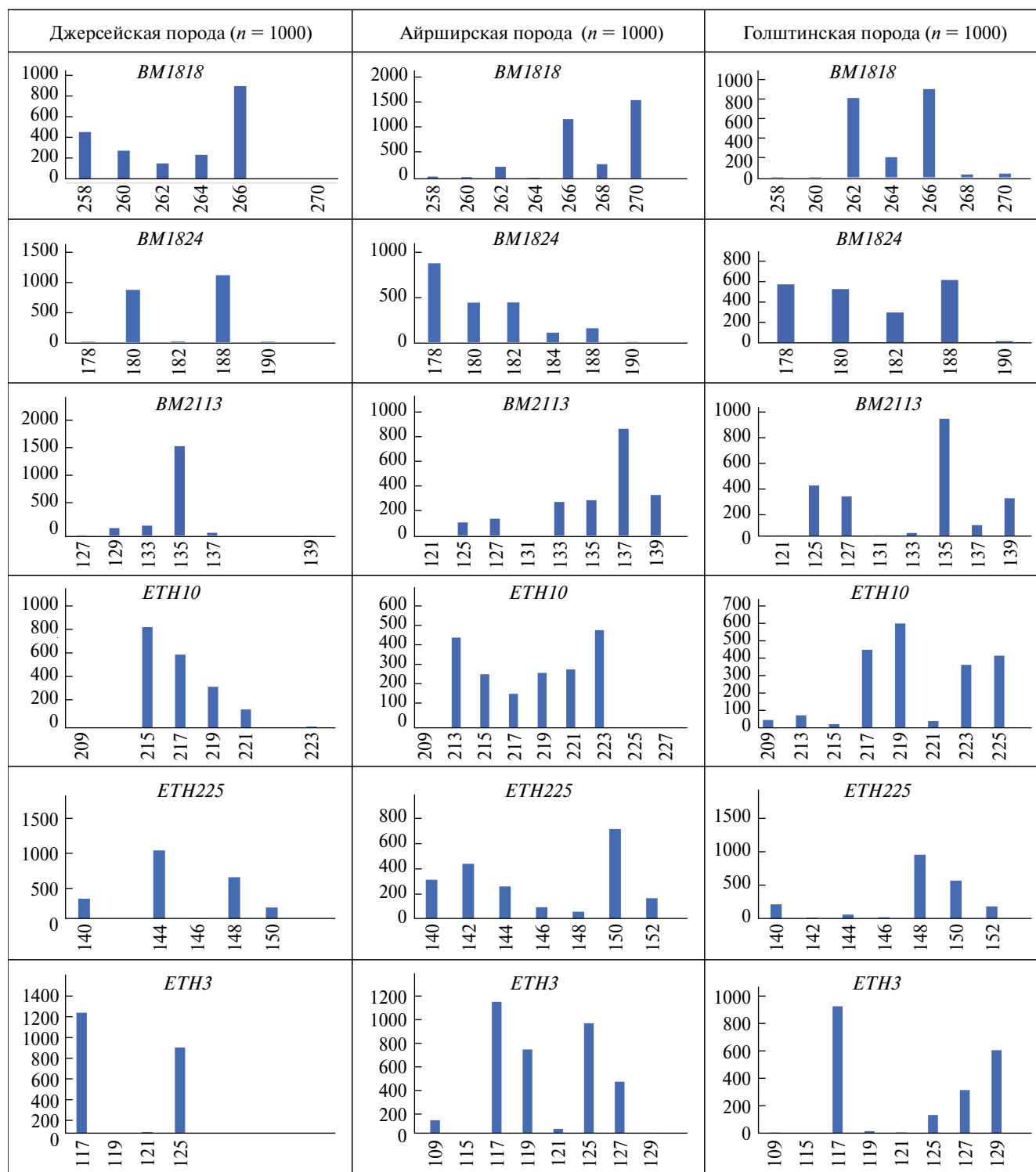
Типичными для голштинского скота и малораспространенными (либо не встречающимися) у представителей айрширской и джерсейской пород являются аллели 129 локуса *ETH3*, 176, 184, 186 локуса *TGLA53*.

Типичным для джерсейского скота оказался аллель 198 локуса *INRA023*.

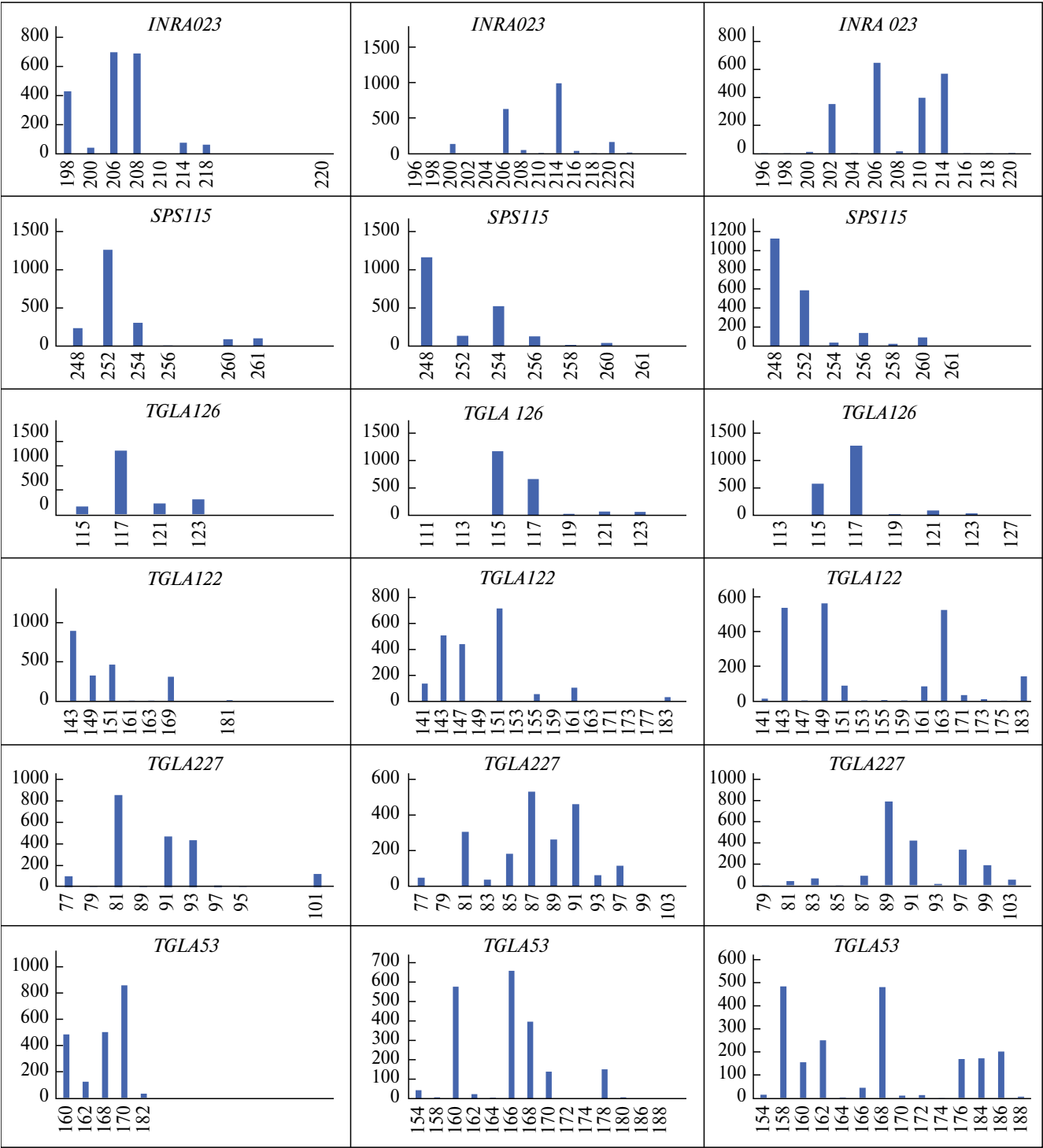
Следует отметить значительные отличия микросателлитного профиля айрширского скота. Для айрширских животных типичными (но малораспространенными у джерсеев и голштинов) оказались аллели 270 локуса *BM1818*, 137 локуса *BM2113*, 213 локуса *ETH10*, 119 локуса *ETH3*, 142 локуса *ETH225*, 87 локуса *TGLA227*, 166 локуса *TGLA53*. Интересно, что айрширская порода значительно отличается по частотам встречаемости аллельных вариантов и других полиморфных локусов [13,14].

Полученные закономерности по частотам встречаемости и видовому разнообразию аллелей у голштинского скота нашей выборки сходны с таковыми у голштинизированного крупного рогатого скота Урала [15].

Как нам представляются практические возможности использования полученных данных? Например, ряд айрширских стад в нашем крае голштинизируется. Считается, что пятое поколение, полученное от чистопородных голштинских быков, — это чистопородные голштинские



**Рис. 1.** Аллельные варианты микросателлитных локусов (ось X) и их количество (ось Y) в выборках крупного рогатого скота



**Рис. 1.** (Окончание.) Аллельные варианты микросателлитных локусов (ось X) и их количество (ось Y) в выборках крупного рогатого скота

**Таблица 3.** Частота встречаемости аллелей микросателлитных локусов в субпопуляциях айрширского, голштинского и джерсейского скота

| Локус          | Аллельный вариант | Джерсейский | Айрширский | Голштинский | Локус           | Аллельный вариант | Джерсейский | Айрширский | Голштинский |
|----------------|-------------------|-------------|------------|-------------|-----------------|-------------------|-------------|------------|-------------|
| <i>BM1818</i>  | 258               | 0.23        | 0.01       | —           | <i>SPS 115</i>  | 210               | 0.00        | 0.00       | 0.20        |
|                | 260               | 0.14        | 0.01       | —           |                 | 214               | 0.04        | 0.49       | 0.28        |
|                | 262               | 0.07        | 0.07       | 0.41        |                 | 216               | —           | 0.02       | —           |
|                | 264               | 0.12        | 0.00       | 0.10        |                 | 218               | 0.03        | —          | —           |
|                | 266               | 0.45        | 0.36       | 0.45        |                 | 220               | —           | 0.08       | —           |
|                | 268               | —           | 0.08       | 0.02        |                 | 222               | —           | 0.01       | —           |
|                | 270               | 0.00        | 0.47       | 0.02        |                 | 248               | 0.12        | 0.58       | 0.56        |
| <i>BM1824</i>  | 178               | 0.00        | 0.43       | 0.28        |                 | 252               | 0.63        | 0.07       | 0.29        |
|                | 180               | 0.43        | 0.22       | 0.26        |                 | 254               | 0.15        | 0.26       | 0.02        |
|                | 182               | 0.01        | 0.22       | 0.15        |                 | 256               | —           | 0.06       | 0.07        |
|                | 184               | —           | 0.05       | —           |                 | 258               | —           | 0.01       | 0.01        |
|                | 188               | 0.55        | 0.08       | 0.31        |                 | 260               | 0.05        | 0.02       | 0.05        |
| <i>BM2113</i>  | 190               | 0.00        | 0.00       | 0.01        | <i>TGLA 126</i> | 261               | 0.05        | —          | —           |
|                | 121               | —           | —          | —           |                 | 115               | 0.08        | 0.58       | 0.29        |
|                | 125               | —           | 0.05       | 0.20        |                 | 117               | 0.66        | 0.33       | 0.64        |
|                | 127               | —           | 0.07       | 0.15        |                 | 119               | —           | 0.01       | 0.01        |
|                | 131               | 0.07        | —          | —           |                 | 121               | 0.11        | 0.04       | 0.04        |
|                | 133               | 0.09        | 0.14       | 0.01        | <i>TGLA 122</i> | 123               | 0.15        | 0.03       | 0.02        |
|                | 135               | 0.81        | 0.14       | 0.46        |                 | 141               | —           | 0.07       | 0.01        |
| <i>ETH10</i>   | 137               | 0.03        | 0.43       | 0.04        |                 | 143               | 0.45        | 0.25       | 0.27        |
|                | 139               | —           | 0.17       | 0.15        |                 | 147               | —           | 0.22       | —           |
|                | 209               | —           | —          | 0.02        |                 | 149               | 0.16        | —          | 0.28        |
|                | 213               | —           | 0.23       | 0.04        |                 | 151               | 0.23        | 0.36       | 0.04        |
|                | 215               | 0.43        | 0.14       | 0.01        |                 | 155               | —           | 0.03       | —           |
|                | 217               | 0.31        | 0.09       | 0.22        | <i>TGLA 227</i> | 161               | 0.00        | 0.05       | 0.04        |
|                | 219               | 0.18        | 0.14       | 0.30        |                 | 163               | 0.00        | 0.00       | 0.26        |
|                | 221               | 0.08        | 0.15       | 0.02        |                 | 169               | 0.15        | —          | —           |
|                | 223               | 0.01        | 0.25       | 0.18        |                 | 171               | —           | —          | 0.02        |
|                | 225               | —           | —          | 0.21        |                 | 183               | —           | 0.02       | 0.07        |
| <i>ETH225</i>  | 140               | 0.14        | 0.15       | 0.11        |                 | 77                | 0.05        | 0.02       | —           |
|                | 142               | —           | 0.22       | 0.01        |                 | 81                | 0.43        | 0.15       | 0.02        |
|                | 144               | 0.49        | 0.13       | 0.03        |                 | 83                | —           | 0.02       | 0.03        |
|                | 146               | 0.00        | 0.04       | 0.01        |                 | 85                | —           | 0.09       | —           |
|                | 148               | 0.29        | 0.03       | 0.48        |                 | 87                | —           | 0.27       | 0.05        |
|                | 150               | 0.08        | 0.35       | 0.28        |                 | 89                | 0.00        | 0.13       | 0.40        |
| <i>ETH3</i>    | 152               | —           | 0.08       | 0.09        |                 | 91                | 0.24        | 0.23       | 0.20        |
|                | 109               | —           | 0.03       | 0.00        | <i>TGLA 53</i>  | 93                | 0.22        | 0.03       | 0.01        |
|                | 117               | 0.58        | 0.33       | 0.46        |                 | 95                | 0.01        | —          | —           |
|                | 119               | 0.00        | 0.21       | 0.01        |                 | 97                | 0.01        | 0.06       | 0.16        |
|                | 121               | 0.01        | 0.01       | —           |                 | 99                | —           | —          | 0.09        |
|                | 125               | 0.41        | 0.28       | 0.07        |                 | 101               | 0.06        | —          | —           |
|                | 127               | —           | 0.13       | 0.16        |                 | 103               | —           | —          | 0.03        |
|                | 129               | —           | —          | 0.30        |                 | 154               | —           | 0.02       | 0.01        |
|                | 198               | 0.21        | —          | —           |                 | 158               | —           | —          | 0.23        |
| <i>INRA023</i> | 200               | 0.02        | 0.07       | 0.01        |                 | 160               | 0.24        | 0.29       | 0.08        |
|                | 202               | —           | —          | 0.18        |                 | 162               | 0.05        | 0.02       | 0.13        |
|                | 206               | 0.35        | 0.31       | 0.32        |                 | 166               | —           | 0.34       | 0.02        |
|                | 208               | 0.34        | 0.02       | 0.01        |                 | 168               | 0.25        | 0.20       | 0.24        |



Таблица 3. Окончание

| Локус | Аллельный вариант | Джерсейский | Айрширский | Голштинский |
|-------|-------------------|-------------|------------|-------------|
|       | 170               | 0.43        | 0.07       | 0.01        |
|       | 172               | —           | —          | 0.01        |
|       | 176               | —           | —          | 0.08        |
|       | 178               | —           | 0.08       | —           |
|       | 182               | 0.02        | —          | —           |
|       | 184               | —           | —          | 0.08        |
|       | 186               | —           | —          | 0.10        |

Таблица 4. Частота встречаемости генотипов и аллелей по локусам *CSN2* и *CSN3* у крупного рогатого скота голштинской, айрширской и джерсейской пород

| Локус       | Генотип/аллель | Джерсейская<br>( <i>n</i> = 1000) | Айрширская<br>( <i>n</i> = 1000) | Голштинская<br>( <i>n</i> = 1000) |
|-------------|----------------|-----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| <i>CSN2</i> | <i>A1A1</i>    | 0.02                              | 0.24                             | 0.19                              |
|             | <i>A1A2</i>    | 0.30                              | 0.51                             | 0.50                              |
|             | <i>A2A2</i>    | 0.68                              | 0.25                             | 0.31                              |
|             | <i>A1</i>      | 0.18                              | 0.49                             | 0.44                              |
|             | <i>A2</i>      | 0.82                              | 0.51                             | 0.56                              |
| <i>CSN3</i> | <i>AA</i>      | 0.01                              | 0.57                             | 0.33                              |
|             | <i>AB</i>      | 0.23                              | 0.39                             | 0.52                              |
|             | <i>BB</i>      | 0.76                              | 0.04                             | 0.15                              |
|             | <i>A</i>       | 0.13                              | 0.77                             | 0.59                              |
|             | <i>B</i>       | 0.87                              | 0.23                             | 0.41                              |

животные. Никаких анализов это подтверждающих не производится. Возможно, что наши исследования позволят в дальнейшем разработать доступную методику оценки чистопородности в подобных ситуациях.

Кроме того, проведено генотипирование выборок голштинского (*n* = 1000), айрширского (*n* = 1000) и джерсейского (*n* = 1000) скота по локусам *CSN2* и *CSN3*.

Полученные результаты по частотам встречаемости генотипов и аллелей по *CSN2* и *CSN3* представлены в табл. 4.

Анализ данных табл. 4 показывает, что если оценивать субпопуляции животных джерсейской, айрширской и голштинской пород с позиций перспектив селекции по локусам *CSN2* и *CSN3* (считая предпочтительными вариант *A2A2* локуса *CSN2* и вариант *BB* локуса *CSN3*) то проще всего добиться значимого результата с группой животных джерсейской породы. Так, в изученной субпопуляции джерсейского скота частота встречаемости генотипа *A2A2* локуса

*CSN2* составила 0.68, а в группах айрширского и голштинского лишь 0.25 и 0.31 соответственно. Генотип *BB* локуса *CSN3* встречался в джерсейской группе животных с частотой 0.76, а у айрширов и голштинов — 0.04 и 0.15 соответственно.

Сравнение полученных результатов с результатами исследований других авторов [9] показало, что субпопуляции юга России соответствуют у голштинской породы субпопуляции голштинской породы США (частота встречаемости аллеля *A1* локуса *CSN2* в ней — 0.42), у айрширской породы — субпопуляции Финляндии (0.50), а у генотипированной группы джерсейской породы частота встречаемости аллеля *A1* оказалась выше (составила 0.18), чем в группе животных джерсейской породы США (0.02) [9].

Проведенное исследование показывает, что ограничиться подбором быков с гомозиготным генотипом (например, *A2A2* или *A2A2 BB*) как стратегии создания стад — продуцентов молока желательного типа, можно только у джерсейских животных.

В голштинских и айрширских стадах нежелательные аллели *A1 CSN2* и *A CSN3* будут встречаться с достаточно высокой частотой в четырех—пяти следующих поколениях. А ограничение выбора быков-производителей быками с генотипами *A2A2* и *BB* значительно сузит спектр производителей и приведет к потере других хозяйственно полезных признаков. У голштинских и айрширских животных правильная стратегия, на наш взгляд, — отбор животных с желательными генотипами, выделение их в отдельные группы, получение и переработка продукции именно от этих животных.

Следует отметить, что в мире нет единого мнения по поводу вредности молока типа *A1* [9, 10]. Несмотря на это, селекционные программы в некоторых странах (например, Германии, США) направлены на элиминацию аллеля *A1* локуса *CSN2* из генотипа молочного скота.

Генотипированные группы джерсейских, айрширских и голштинских животных достаточны по объему, поэтому с большой степенью вероятности можно утверждать, что выявленные закономерности характерны для скота указанных пород на юге России (Ставропольский, Краснодарский край). Полученные данные можно использовать в исследовательской работе по отнесению тех или иных групп скота к типичным

голштинским, айрширским или джерсейским группам и при создании стад — продуцентов молока определенного типа (например, молока типа A2).

Работа выполнена при поддержке Государственного задания и внебюджетных хозяйственных средств. Номер регистрации темы “Разработать эффективные селекционные и биотехнологические методы сохранения и совершенствования существующих пород, создания новых типов и линий для рентабельного производства продукции в условиях современной технологии содержания и полноценного питания сельскохозяйственных животных” 0688-2019-0017.

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. Волкова В.В., Денискова Т.Е., Костюнина О.В. и др. Характеристика аллелофонда локальных пород крупного рогатого скота России по микросателлитным маркерам // Генетика и разведение животных. 2018. № 1. С. 3–10. <https://doi.org/10.31043/2410-2733-2018-1-3-10>
2. Киселева Т.Ю., Kantanen J., Воробьев Н.И. и др. Неравновесие по сцеплению микросателлитных локусов у шести локальных популяций крупного рогатого скота // Генетика. 2014. Т. 50. № 4. С. 464–473. <https://doi.org/10.1134/S1022795414040048>
3. Кольцов Д.Н., Волкова В.В., Гладырь Е.А. и др. Характеристика аллелофонда сычевской породы крупного рогатого скота по ДНК микросателлитам // Достижения науки и техники АПК. 2012. № 8. С. 56–57
4. Стрекозов Н.И., Зиновьева Н.А., Горелов П.В. и др. Генетическая характеристика созданных типов скота бурой швицкой и сычевской пород с использованием полиморфизма микросателлитных локусов // С.-х. биология. 2009. Т. 44. № 2. С. 10–15.
5. Li Y., Liu L., Zunongjiang A. et al. Analysis of the relationship between short tandem repeats and lactation performance of Xinjiang Holstein cows // Trop. Anim. Health Prod. 2023. V. 55(4). P. 238. <https://doi.org/10.1007/s11250-023-03651-y>
6. Prinzenberg E.M., Jianlin H., Erhardt G. Genetic variation in kappa-casein gene (CSN3) of Chinese yak (*Bos grunniens*) and phylogenetic analysis of CSN3 sequences in the genus *Bos* // J. Dairy Sci. 2008. V. 91(3). P. 1198–1203. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0746>
7. Heck J.M., Schennink A., Van Valenberg H.J. et al. Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk // J. Dairy Sci. 2009. № 92. P. 1192–1202. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1208>
8. Kruchinin A.G., Illarionova E.E., Galstyan A.G. et al. Effect of CSN3 gene polymorphism on the formation of milk gels induced by physical, chemical, and biotechnological factors // Foods. 2023. V. 12(9). <https://doi.org/10.3390/foods12091767>
9. Demirel A.F. Discussions of effect A1 and A2 milk beta-casein gene on health // Appr. in Poultry, Dairy & Veterinary Sci. 2018. V. 3. <https://doi.org/10.31031/APDV.2018.03.000556>
10. Jaiswal K.P., De S., Sarsavan A. Review on bovine beta-casein (A1,A2) gene polymorphism and their potentially hazardous on human health // Int. J. Environment & Animal Conservation. 2014. V. 3(1). P. 1–12. <https://doi.org/10.31031/APDV.2018.03.000556>
11. Ковалюк Н.В., Сацук В.Ф., Ковалюк М.А., Мачульская Е.В. Селекция крупного рогатого скота по гену бета-казеина в Краснодарском крае // Генетика и разведение животных. 2019. № 1. С. 22–27. <https://doi.org/10.31043/2410-2733-2019-1-22-26>
12. Barroso A., Dunner S., Canon J. Technical note: Detection of bovine kappa-casein variants A, B, C, and E by means of polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) // J. Anim. Sci. 1998. № 76. P. 1535–1538. <https://doi.org/10.2527/1998.7661535x>
13. Ковалюк Н.В., Сацук В.Ф., Волченко А.Е. Изменчивость гена BoLADRB3 у крупного рогатого скота молочного направления продуктивности и его влияние на параметры жизнеспособности // Генетика. 2012. Т. 48. № 8. С. 962–965. <https://doi.org/10.1134/S1022795412070083>
14. Ковалюк Н.В., Сацук В.Ф., Мачульская Е.В., Шахназарова Ю.Ю. Возможные причины и последствия распространения отдельных аллельных вариантов локуса LEP в группах айрширского и голштинского скота // Генетика. 2018. № 12. С.1–6. <https://doi.org/10.1134/S0016675818120068>
15. Шаталина О.С., Ткаченко И.В., Ярышкин А.А. Генетическая структура популяции голштинизированного черно-пестрого скота по микросателлитным локусам // Генетика. 2021, Т. 57. № 2. С. 205–213. <https://doi.org/10.31857/S0016675821020090>

**STRUCTURE OF SUBOPOPULATIONS OF AIRESHIRE, HOLSTIN AND JERSEY CATTLE IN THE SOUTHERN REGIONS OF RUSSIA BY *CSN2* (RS43703011), *CSN3* (RS43703016) AND MICROSATELLITE LOCUSES (*BM1818*, *BM1824*, *BM2113*, *ETH10*, *ETH225*, *ETH3*, *INRA023*, *SPS115*, *TGLA126*, *TGLA122*, *TGLA227*, *TGLA53*)**

**N. V. Kovalyuk<sup>1</sup>, \*, A. E. Volchenko<sup>1</sup>, E. V. Shiryaeva<sup>1</sup>, L. I. Yakusheva<sup>1</sup>, Yu. Yu. Shakhnazarova<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Krasnodar Scientific Center for Animal Science and Veterinary Medicine, Krasnodar, 350055 Russia*

*\*e-mail: NVK1972@yandex.ru*

During studies using molecular biological methods, the following loci were genotyped: *BM1818*, *BM1824*, *BM2113*, *ETH10*, *ETH225*, *ETH3*, *INRA023*, *SPS115*, *TGLA126*, *TGLA122*, *TGLA227*, *TGLA53*, *CSN2* (rs43703011) and *CSN3* (rs43703016) 3000 cow blood samples Ayrshire, Holstein and Jersey breeds from the herds of the Krasnodar and Stavropol territories. On average, the frequency of occurrence of homozygous genotypes for 12 microsatellite loci in Jersey cattle was 0.38, in Holstein and Ayrshire cattle – 0.30 and 0.27, respectively; the highest allelic diversity was found in Holstein cattle ( $9.0 \pm 1.7$  alleles per locus). It should be noted that there are significant differences in the genetic profile of Ayrshire cattle. For Ayrshire animals, the following alleles turned out to be typical (but rare in Jersey and Holstein cattle): 270 locus *BM1818*, 137 locus *BM2113*, 213 locus *ETH10*, 119 locus *ETH3*, 142 locus *ETH225*, 87 locus *TGLA227*, 166 locus *TGLA53*. In the studied subpopulation of Jersey cattle, the frequency of occurrence of the *A2A2* genotype of the *CSN2* locus (rs43703011) (beta casein) was 0.68, and in the Ayrshire and Holstein groups it was only 0.25 and 0.31, respectively. The *BB* genotype of the *CSN3* locus (rs43703016) (casein kappa) was found in the Jersey group of animals with a frequency of 0.76, and in Ayrshires and Holsteins – 0.04 and 0.15, respectively. The genotyped groups of Jersey, Ayrshire and Holstein animals are significant in volume; we assume that the identified patterns are typical for cattle of these breeds in the south of Russia. We believe that the data obtained can be used in the future in practical work on classifying certain groups of livestock as typical Holstein, Ayrshire or Jersey and when creating herds that produce milk of a certain type (for example, type A2 milk).

**Keywords:** Holstein, Ayrshire, Jersey cattle, microsatellite loci, *CSN2*, *CSN3*.

УДК 575.174.015.3

# ПОЛИМОРФИЗМ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ В ПОПУЛЯЦИЯХ КАВКАЗСКИХ СКАЛЬНЫХ ЯЩЕРИЦ И ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ОЦЕНКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ КОМПЛЕКСА *Darevskia raddei*<sup>§</sup>

© 2024 г. Д. О. Одегов<sup>1</sup>, А. А. Валяева<sup>1</sup>, М. С. Аракелян<sup>2</sup>, А. П. Рысков<sup>1</sup>, В. И. Корчагин<sup>1</sup>, И. А. Мартиросян<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, 117334 Россия

<sup>2</sup>Ереванский государственный университет, Ереван, 0025 Армения

\*e-mail: irena-m@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.09.2023 г.

После доработки 04.10.2023 г.

Принята к публикации 12.10.2023 г.

Изучение кавказских скальных ящериц комплекса *Darevskia raddei* sensu lato, представленного несколькими подвидами, имеет большой интерес и научную значимость в связи с их участием в межвидовых гибридизациях с образованием пяти из семи известных однополых (партеногенетических) видов рода *Darevskia*. В статье приведены генетические параметры для популяций (подвидов) *D. r. raddei* и *D. r. nairensis*, полученные на основе анализа изменчивости десяти микросателлитных локусов 230 особей из 17 популяций Армении и Арцаха (Нагорного Карабаха). Согласно этим параметрам, популяции *D. r. raddei* характеризуются большим разнообразием по числу аллелей и генотипов по сравнению с популяциями *D. r. nairensis*. Анализ генетической дифференциации показал, что популяции *D. r. raddei* подразделяются на две группы, одна из которых ближе к *D. r. nairensis*, чем к *D. r. raddei*. Анализ индекса ассоциаций показал отсутствие свободной рекомбинации аллелей между подвидами, что говорит об их изоляции и отсутствии скрещивания между особями. Таким образом, на основе расширенной популяционной выборки и разработанной панели микросателлитных маркеров получены новые данные о популяционной структуре вида *D. raddei*, о генетическом разнообразии и дифференциации популяций *D. r. raddei* и *D. r. nairensis*.

**Ключевые слова:** подвид, популяция, ящерицы *Darevskia*, генетическое разнообразие, популяционная структура, генетическая дифференциация.

DOI: 10.31857/S0016675824030069 EDN: DPBCHD

Кавказские скальные ящерицы *Darevskia raddei* [1] широко распространены на территории Армянского нагорья и представляют комплекс из четырёх подвидов (*Darevskia raddei raddei* [2], *Darevskia raddei nairensis* [3], *Darevskia raddei vanensis* [4], *Darevskia raddei chaldoranensis* [5]). Подвиды различаются по морфологии (фолидоз; верхняя сторона тела может иметь разнообразную окраску в коричневых тонах, полоса вдоль спины состоит из множества темных пятен, образуя сетчатый узор; брюшная сторона может быть окрашена в белые, голубые и зеленые тона), высоте обитания над уровнем моря, а также поведенческим паттерном, например способом

удержания самцом самки во время спаривания. В настоящее время наиболее изученными являются подвиды *D. r. nairensis* и *D. r. raddei*, однако, несмотря на имеющиеся сведения о дивергенции данных подвидов, их таксономическое положение и степень монофилии остаются дискуссионными. Анализ аллельных вариантов ряда аллозимных локусов показал невысокий уровень генетического полиморфизма, а в ходе изучения митохондриальной ДНК было выяснено, что различные популяции *D. r. raddei* имеют разную степень дивергенции с *D. r. nairensis*. Вид *D. raddei* sensu lato является материнским видом для пяти из семи известных партеногенетических представителей рода *Darevskia* — *D. rostombekowi*, *D. unisexualis*, *D. sapphirina*, *D. bendimahiensis* и *D. uzzelli* [6, 7]. Для последних четырех партеновидов отцовским является вид *D. valentini* [8, 9].

<sup>§</sup> Дополнительные материалы для этой статьи доступны по ссылке: doi 10.31857/S0016675824030069 для авторизованных пользователей

Таким образом, изучение внутривидового разнообразия *Darevskia raddei* представляет интерес в связи с его участием в межвидовых гибридизациях с образованием однополых дочерних видов, а также с проблемой естественной гибридизации двуполых и дочерних однополых видов скальных ящериц в зоне симпатрии с образованием триплоидных гибридов [10, 11].

Анализ аллельных вариантов 36 аллозимных локусов из шести популяций *D. r. nairensis* и четырех популяций *D. r. raddei* также показал невысокий уровень генетического полиморфизма — половина из всех 36 локусов оказались моноаллельными [8]. В нашей предыдущей работе [12] при использовании трех тетрануклеотидных микросателлитных локусов был показан высокий уровень генетической дифференциации этих популяций. В настоящей работе для определения генетических параметров были использованы увеличенные выборки *D. r. raddei* и *D. r. nairensis* и новые, более полиморфные, ди- и тринуклеотидные микросателлитные локусы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор материала (фрагменты хвостов) проводили на территории Армении и Арцаха (Нагорного Карабаха) с 1997 г. по 2021 г. Было собрано 225 образцов *D. raddei* из 17 локалитетов (табл. П1). Образцы из Лчапа, Айраванка и Лчашена были объединены в одну популяцию “Лчашен”, таким образом в работе проанализировано 15 популяций *D. raddei*.

Работа с животными проводилась в строгом соответствии с правилами Министерства охраны природы Армении (номер разрешения 5/22.1/51043) и этического комитета Московского государственного университета (номер разрешения 24-01). После забора биоматериала ящерицы выпускались в места их обитания. Для сравнения использовали восемь ранее полученных коллекционных образцов ДНК ящериц *D. valentini* из локалитетов Лчашен, Тэж и Адис (табл. П1). Образцы ДНК были выделены стандартным фенольно-хлороформным методом с использованием протеиназы К.

Поиск микросателлитных локусов в геноме ящерицы *D. valentini* [13] проводили с использованием конвейера, включающего несколько программ и скриптов на языке Python. На первом этапе с использованием perl-скрипта MISA [14] в геноме был осуществлен поиск микроса-

теллитных повторов с заданной длиной мономера 2 и 3 нуклеотида и с числом повторов не менее 10. Далее с использованием BedTools v2.30.0 [15] и дополнительных скриптов из генома были выбраны все последовательности, удовлетворяющие следующим критериям: 1) размер последовательностей, прилегающих к 5' и 3' концам микросателлита, составляет не менее 100 пн; 2) микросателлит и фланкирующие области не содержат N; 3) фланкирующие области не содержат повторы и последовательности, затрудняющие гибридизацию праймеров. Аналогичный поиск обнаружил ортологичные локусы в черновых геномных сборках *D. unisexualis* и *D. raddei*, что позволило использовать данные локусы для анализа внутривидового разнообразия комплекса *D. raddei*. Для подбора ПЦР-праймеров использовали программу Primer3 [16, 17] при заданной длине искомого продукта, включающего микросателлитный повтор не менее 100 пн, расстоянии от праймеров до микросателлита не менее 10 пн, длине праймеров 20–25 пн и температуре плавления 58–62°C. Наиболее подходящие пары праймеров были проверены на уникальность амплифицируемого продукта локальным поиском *in silico* в геноме *D. valentini* с помощью BLAST+ 2.12.0 [18]. Для молекулярно-генетического анализа (генотипирования ДНК) было отобрано 11 микросателлитных локусов (табл. П2).

ПЦР проводили в объеме 20 мкл на 50 нг ДНК с использованием набора “GenPakPCRCore” (Isogene Laboratory) согласно протоколу фирмы-производителя при следующих температурных режимах: денатурация при 94°C — 3 мин, амплификация в течение 30 циклов (денатурация 94°C — 1 мин, отжиг 60°C — 40 с, элонгация 72°C — 30 с, последний цикл — 5 мин при 72°C). Концентрация каждого праймера составляла 0.2 мкМ. Один из праймеров для амплификации индивидуальных локусов был помечен флуоресцентным красителем по 5' концу. В табл. П2 приведены характеристики локусов и праймеров, использованных в работе. Продукты ПЦР-амплификации фракционировали в 0.8%-ном агарозном геле с последующим выделением фрагментов ДНК с помощью набора GeneJET Gel Extraction Kit (ThermoScientific). Анализ длин амплифицированных фрагментов проводили с помощью капиллярного электрофореза (фрагментный анализ) в компании “Синтол” с использованием генетического анализатора “НАНОФОР-05”. Для определения размеров амплифицированных фрагментов использовали программное обеспечение Peak Scanner v1.0 (Applied Biosystems).

Каждый продукт амплификации рассматривался как биаллельный локус: гетерозиготный при наличии двух фрагментов разного размера (два пика при анализе длин амплифицированных фрагментов) и гомозиготный (один пик), если обнаруживался единственный фрагмент.

Результаты генотипирования всех локусов сведены в таблицу и конвертированы с помощью функции *df2genind* пакета *adegenet* [19, 20] в объект класса *genind* для последующего анализа в среде R v4.2.0 [21]. Расчеты частоты нуль-аллелей (т.е. отсутствия ПЦР-продукта вследствие мутаций в последовательностях ДНК, фланкирующих микросателлит, на которые гибридизуются праймеры, что приводит к появлению ложных гомозигот) проводились в программе Rstudio с помощью пакета PopGenReport. Оценку частот аллелей, анализ аллельного и генетического разнообразия проводили с помощью пакетов *hierfstat* [22], *pegas* [23] и *poppr* [24]. Степень генетической дифференциации между *D. r. raddei* и *D. r. nairensis* определяли, рассчитывая показатель  $F_{ST}$  [25] и модифицированный вариант  $G_{ST}$  Хедрика [26, 27], учитывающий тенденцию стандартного критерия  $G_{ST}$  недооценивать степень дифференциации между небольшим числом популяций.

Чтобы определить популяционно-генетическую структуру вида *D. raddei* на основании данных микросателлитного анализа был использован дискриминантный анализ главных компонент (DAPC) [28], реализованный в пакете *adegenet* [19, 20]. В качестве внешней груп-

пы была добавлена выборка *D. valentini*, при этом анализ проводили без учета имеющихся сведений о популяционной структуре вида. Оптимальное количество генетических кластеров в популяциях определяли с помощью алгоритма  $k$  средних ( $k$ -means), использующего байесовский информационный критерий. Далее рассчитывалась вероятность отношения конкретных особей к генетическим кластерам.

Индекс ассоциации, использующийся для оценки мультилокусного неравновесия по сцеплению, определяли с использованием пакета *poppr* [24, 29].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Характеристика микросателлитных локусов

На выборке *D. raddei* для шести тринуклеотидных и пяти динуклеотидных локусов были получены генетические характеристики, такие как число аллелей и генотипов, наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность, а также выравниенность (степень равномерности распределения генотипов) и индекс Симпсона (табл. 1). В качестве внешней группы была использована небольшая выборка особей вида *D. valentini*. Было обнаружено, что наименьшим числом аллелей и генотипов характеризуется локус *sc12962*, а также для этого локуса характерно наибольшее отклонение наблюдаемой гетерозиготности от ожидаемой. Это связано с неравномерным распределением аллелей в популяциях (рис. 1) и значительным количеством

**Таблица 1.** Генетические характеристики микросателлитных локусов на выборках *D. raddei* и *D. valentini* (238 особей)

| Локус   | Число аллелей | Число генотипов | $I - D$ | $H_{exp}$ | $H_{obs}$ | Evenness |
|---------|---------------|-----------------|---------|-----------|-----------|----------|
| sc12962 | 13            | 28              | 0.82    | 0.74      | 0.26      | 0.53     |
| sc4525  | 52            | 134             | 0.99    | 0.96      | 0.79      | 0.81     |
| sc1422  | 33            | 90              | 0.98    | 0.94      | 0.76      | 0.79     |
| sc138   | 27            | 65              | 0.96    | 0.91      | 0.69      | 0.68     |
| sc149   | 41            | 107             | 0.98    | 0.94      | 0.86      | 0.76     |
| sc12560 | 51            | 139             | 0.99    | 0.96      | 0.82      | 0.76     |
| sc7287  | 35            | 85              | 0.98    | 0.93      | 0.67      | 0.73     |
| sc1872  | 73            | 148             | 0.99    | 0.97      | 0.71      | 0.86     |
| sc4045  | 25            | 56              | 0.94    | 0.86      | 0.71      | 0.59     |
| sc10877 | 56            | 128             | 0.98    | 0.95      | 0.68      | 0.67     |
| sc6476  | 53            | 145             | 0.99    | 0.96      | 0.85      | 0.80     |
| Среднее | 42            | 102             | 0.96    | 0.92      | 0.70      | 0.73     |

Примечание.  $I - D$  – индекс Симпсона (Simpson index);  $H_{exp}$  – ожидаемая гетерозиготность (Nei's, 1978);  $H_{obs}$  – наблюдаемая гетерозиготность; Evenness – выравниенность.

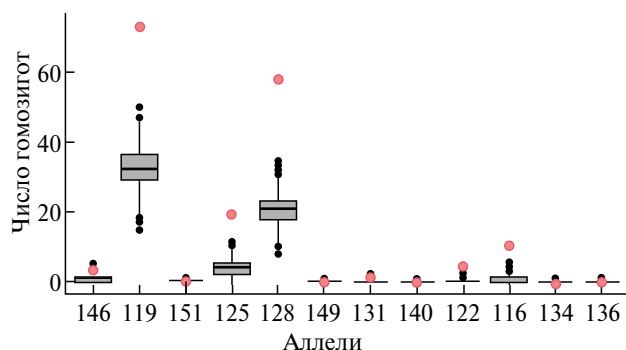


Рис. 1. Число гомозиготных особей по микросателлитному локусу sc12962 на выборках *D. raddei* и *D. valentini*.

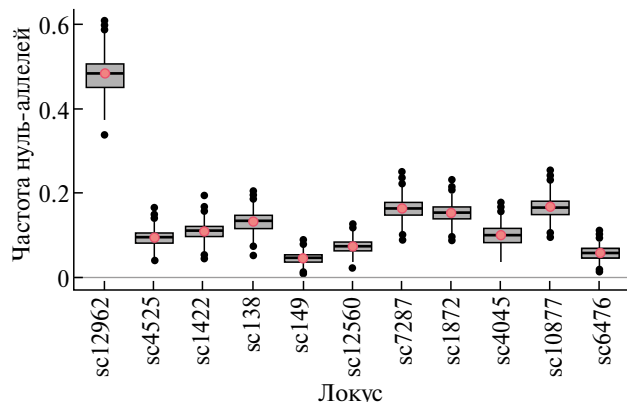


Рис. 2. Частота нуль-аллелей по каждому локусу на выборках *D. raddei* и *D. valentini*.

гомозигот по аллелям “119” и “128” (названия аллелей соответствуют размерам в парах нуклеотидов, полученных при анализе длин амплифицированных фрагментов — фрагментом анализа). Отклонения значений наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности были выявлены по всем проанализированным локусам, в связи с этим мы предположили наличие нуль-аллелей по каждому локусу (рис. 2). Как видно из рис. 2, наиболее вероятно присутствие подобных аллелей в случае локуса sc12962. Так как изучаемые локусы характеризуются высоким уровнем полиморфизма и поскольку данные виды относятся к одному роду кавказских скальных ящериц, была проведена оценка совпадающих аллельных вариантов у проанализированных особей *D. raddei* (оба подвида) и *D. valentini* (табл. ПЗ). Согласно полученным результатам, наибольшее число совпадающих аллелей между разными видами было выявлено по локусу sc12962. На основании полученных данных мы исключили локус sc12962 из дальнейшего анализа, и таким образом оценка внутривидового разнообразия *D. raddei* проводилась на основании полиморфизма десяти микросателлитных локусов.

В табл. П4 приведены генетические параметры (ожидаемая и наблюдаемая гетерозиготность по Нею, выравненность (evenness) и индекс разнообразия Симпсона ( $1 - D$ )), полученные на основании полиморфизма десяти микросателлитных локусов и характеризующие внутривидовое разнообразие *D. raddei*. Они различаются для *D. r. raddei* и *D. r. nairensis*: *D. r. raddei* характеризуется большим числом аллелей и генотипов по сравнению с *D. r. nairensis*, при этом среднее значение выравненности отличается незначительно. Наиболее полиморфным является локус sc1872 — 71 аллель комбинируется в 142 гено-

типа. Однако значение наблюдаемой гетерозиготности по этому локусу было ниже, чем для большинства локусов. Наименее полиморфным является локус sc138: 27 аллелей образуют 65 генотипов, при этом величина наблюдаемой гетерозиготности составляет 0.72.

#### Генетические параметры популяций *D. raddei*

Популяции *D. raddei sensu lato* характеризуются различным количеством аллелей и выявленных генотипов, однако полиморфизм для каждого локуса случаен для каждой популяции. Наибольшее число аллелей и генотипов выявлено в популяции “Ереван” (табл. П5), в то время как значение параметра выравненности генотипов в этой популяции самое низкое. Наименьшее значение наблюдаемой гетерозиготности выявлено в популяции Горис, а наибольшее — в популяции Гандзасар и соответственно наиболее близкое к значению ожидаемой гетерозиготности. Частоты аллелей и генотипов для каждой популяции послужили основой для подсчета генотипического разнообразия и генетических дистанций.

Графическое выражение внутривидовой дифференциации и популяционной структуры комплекса *Darevskia raddei sensu lato* на основе генетических дистанций по Нею, рассчитанных по данным полиморфизма микросателлитных локусов, представлено на рис. 3. Все популяции разделились на три группы: в одну входят популяции *D. r. raddei* Гегард, Горис, Егегнадзор, Каджаран и Селимский перевал (группа *D. r. raddei* GG); в другую — популяции *D. r. raddei* Зуар, Гандзасар, Тартар, Татев и Нрнадзор (группа *D. r. raddei* TT); в отдельную группу входят все популяции *D. r. nairensis* и популяция *D. r. raddei* Гош.

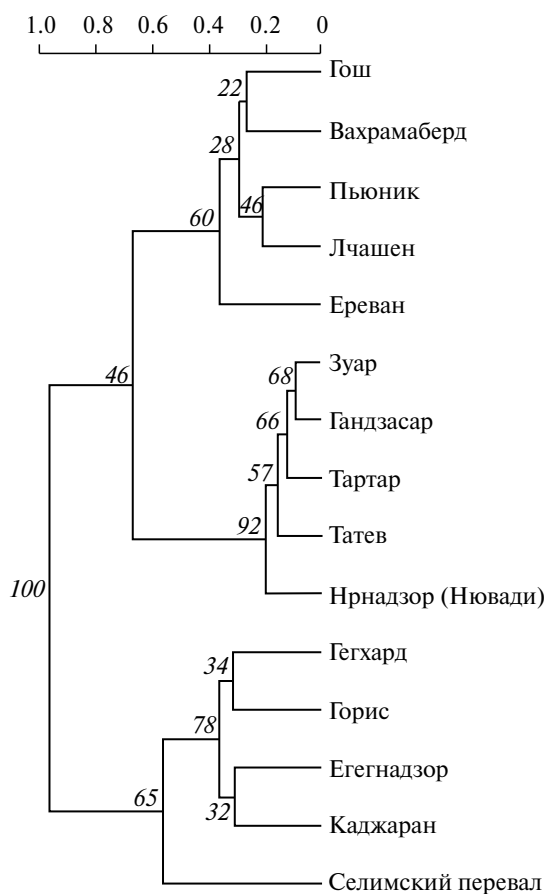


Рис. 3. Неукорененное филогенетическое дерево популяций *D. raddei*, построенное на основании генетических расстояний по Нею с бутстреп-поддержкой в 100 итераций.

Внутривидовую дифференциацию *D. raddei* оценивали с помощью параметра  $G_{ST}$ , полученного при попарном сравнении популяций. Значения данного параметра представлены в виде тепловой карты на рис. П1. Все популяции разделяются на те же популяционные группы, как и при использовании генетических дистанций по Нею. Значения  $G_{ST}$ , полученные при попарном сравнении популяций *D. r. raddei* Гош и популяций *D. r. nairensis*, варьируют в пределах от 0.31 до 0.6, а при сравнении с популяциями *D. r. raddei* – в пределах от 0.62 до 0.93 (рис. П1). Таким образом, в дальнейшей работе мы объединили популяцию Гош с популяциями *D. r. nairensis*.

В табл. 2 приведены результаты оценки внутривидовой дифференциации *D. raddei* с помощью параметра  $G_{ST}$  с разбиением на три группы, описанные выше. Согласно проведенной оценке группы *D. r. raddei* ТТ и *D. r. nairensis* генетически ближе друг другу, нежели группы *D. r. raddei*

Таблица 2. Внутривидовая дифференциация *D. raddei* на основании генетических дистанций  $G_{ST}$

| Попарные сравнения                             | $G_{ST}$ |
|------------------------------------------------|----------|
| <i>D. r. raddei</i> – <i>D. r. nairensis</i>   | 0.36     |
| <i>D. r. raddei</i> ТТ– <i>D. r. nairensis</i> | 0.44     |
| <i>D. r. raddei</i> GG– <i>D. r. nairensis</i> | 0.65     |
| <i>D. r. raddei</i> GG– <i>D. r. raddei</i> ТТ | 0.81     |

ТТ и *D. r. raddei* GG – в первом случае значение индекса  $G_{ST}$  составляет величину 0.44, во втором случае – величину 0.81. Значение параметра  $G_{ST}$  при сравнении групп *D. r. raddei* GG и *D. r. nairensis* составляет 0.65. Это может свидетельствовать о более значительной дифференциации этих групп популяций.

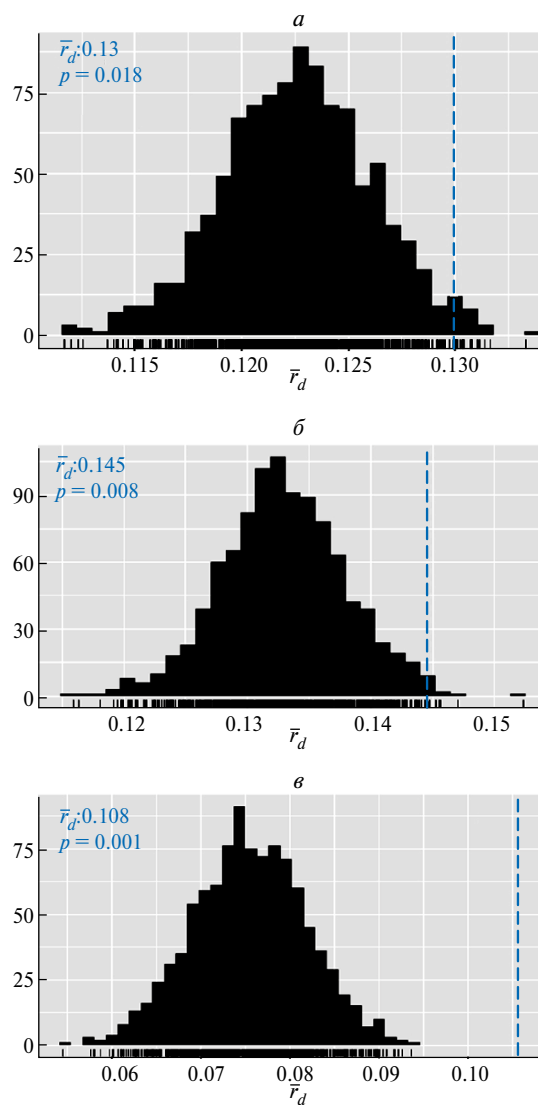


Рис. 4. Индекс ассоциации ( $\bar{r}_d$ ) подвидов *D. raddei*. а – без разделения на подвиды; б – *D. r. raddei*; в – *D. r. nairensis*.



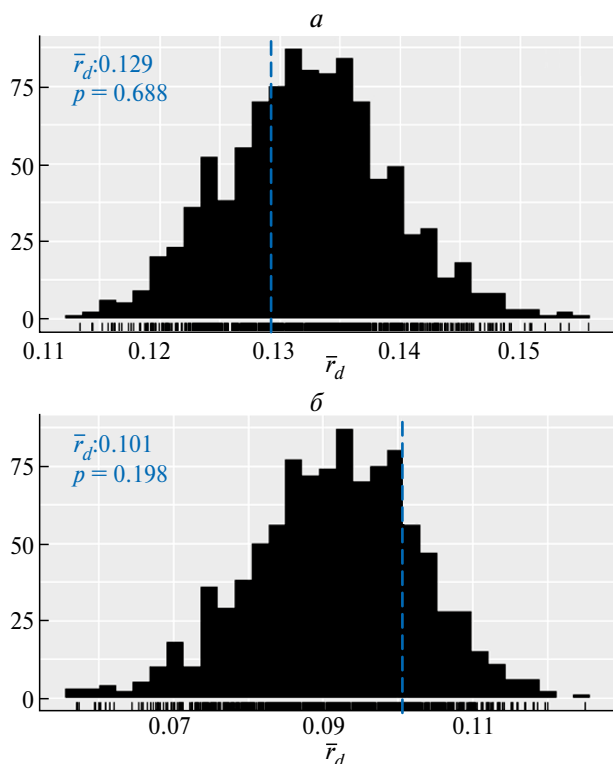


Рис. 5. Индекс ассоциации ( $\bar{r}_d$ ) групп популяций *D. r. raddei* GG (a) и *D. r. raddei* TT (б).

Оценку свободной рекомбинации аллелей в пределах подвидов *D. raddei* проводили с помощью стандартизированного индекса ассоциаций ( $\bar{r}_d$ ). Значение ( $\bar{r}_d$ ) равное 0.13 ( $p = 0.018$ ) для вида *D. raddei* в целом (т.е. для обоих подвидов) указывает на незначительную вероятность рекомбинации аллелей между подвидами (рис. 4,а), т.е. данные подвиды изолированы и скрещивание между их особями отсутствует. Значение индекса ассоциации для подвида *D. r. raddei* (рис. 4,б) составляет 0.145 ( $p = 0.008$ ), а для подвида *D. r. nairensis* – 0.106 ( $p = 0.001$ ) (рис. 4,в), что может свидетельствовать о значительной обособленности популяций в пределах каждого подвида. Анализ значений индекса ассоциаций в пределах групп *D. r. raddei* GG и *D. r. raddei* TT (рис. 5,а и 5,б соответственно) показал высокую вероятность свободного скрещивания между особями популяций внутри каждой группы.

Использование метода дискриминантного анализа главных компонент (DAPC) на всей выборке вида *D. raddei* и внешней группе *D. valentini* позволило определить наличие трех генетических кластеров ( $K = 3$ ), соответствующих виду *D. valentini* (красный цвет) и подвидам *D. r. raddei*

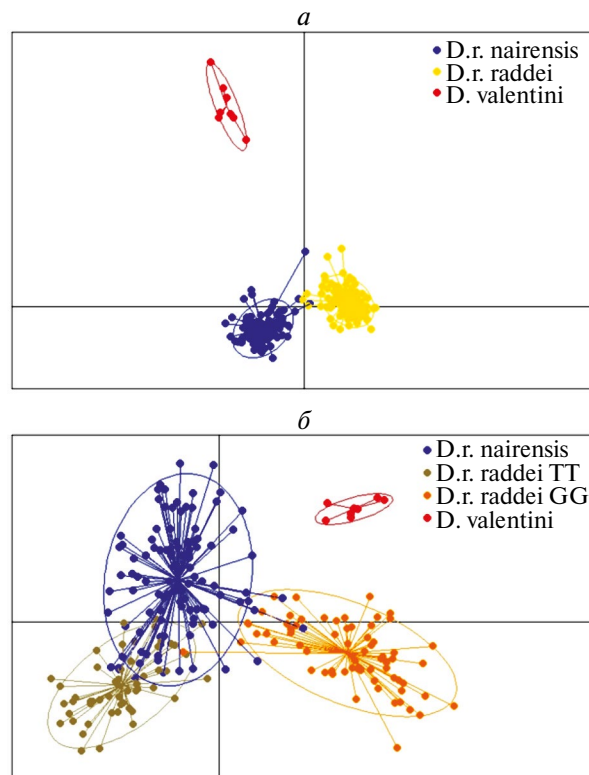


Рис. 6. Кластеризация особей видов *D. raddei* и *D. valentini* на основании дискриминантного анализа главных компонент. а – число кластеров  $K = 3$ ; б – число кластеров  $K = 4$ .

(желтый цвет) и *D. r. nairensis* (синий цвет) (рис. 6,а). При разделении подвида *D. r. raddei* на две группы GG и TT и соответственно увеличении числа кластеров ( $K = 4$ ) популяции вида *D. raddei* образуют три незначительно перекрывающиеся облака, соответствующих группам популяций *D. r. raddei* GG, *D. r. raddei* TT и *D. r. nairensis* (рис. 6,б).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение внутривидового полиморфизма является одной из важных проблем биоразнообразия, особенно для некоторых видов позвоночных, участвующих в сетчатой эволюции. Одним из таких видов является *Darevskia raddei*, структура которого, несмотря на большой объем накопленной информации, до сих пор вызывает много вопросов. Особенностью данного вида является участие в качестве материнского при образовании ряда партеногенетических видов, таким образом имеющих гибридное происхождение и соответственно гибридные кариотипы [30]. При этом популяции *D. r. raddei* относят к материнским для партеновида *D. rostombekowi*, а популяции *D. r. nairensis* – для партеновидов *D. unisexualis* и *D. uzzeli* [6, 7]. В этой

связи особую значимость получила проблема генетической дифференциации и таксономического статуса этих популяций. В разное время популяции *D. r. raddei* и *D. r. nairensis* относили к видам, подвидам или одному виду в зависимости от характера исследования, типа генетических маркеров, ареалов изучаемых популяций [31]. Ранее при использовании трех микросателлитных локусов нами были получены высокие показатели генетической дифференциации *D. r. raddei* и *D. r. nairensis* [12]. В настоящей работе они были подтверждены на расширенной популяционной выборке особей при использовании новой панели из 10 микросателлитных локусов и свидетельствуют о глубокой дивергенции этих популяций, позволяющей разделять их на подвидовые группы. Кроме того, показано, что популяции *D. r. raddei* характеризуются большим разнообразием по сравнению с *D. r. nairensis* и в свою очередь подразделены на две группы с различным составом популяций. Это свидетельствует о сложной популяционной структуре вида *D. raddei* в соответствии с его значительным морфологическим и цитогенетическим разнообразием [32]. В работе впервые проведен анализ индекса ассоциаций, который показал отсутствие свободной рекомбинации аллелей между подвидами, что свидетельствует об их изоляции и отсутствии скрещивания между особями.

Значение параметра  $G_{ST} = 0.36$  между подвидами *D. r. raddei* и *D. r. nairensis* относительно невелико (табл. 2), несмотря на высокие показатели данного параметра при попарном сравнении групп популяций *D. r. raddei* GG, *D. r. raddei* TT и *D. r. nairensis*. Это может быть вызвано сходной частотой аллельных вариантов в данных группах, связанной с потоком генов между популяциями до разделения на подвиды [33]. Этим может объясняться частичное перекрытие спектров при дискриминантном анализе главных компонент.

Таким образом, в настоящей работе продемонстрирована возможность использования новых микросателлитных локусов для популяционно-генетических исследований кавказских скальных ящериц. По данным полиморфизма этих локусов подтвержден высокий уровень генетической дифференциации популяций *D. r. raddei* и *D. r. nairensis* на группы подвидового статуса. Кроме этого, отсутствие свободной рекомбинации аллелей позволяет предположить и репродуктивную изоляцию подвидов *D. raddei*, это в совокупности с молекулярно-генетической дифференциацией свидетельствует о глубокой

их дивергенции. Новые характеристики популяционной структуры вида *D. raddei* связаны с обнаружением двух генетически различающихся групп популяций у самого подвида *D. r. raddei*, одна из которых оказалась генетически ближе другому подвиду *D. r. nairensis*. Выявлена достоверная кластеризация особей из популяции Гош с образцами подвида *D. r. nairensis*. Таким образом подтверждено генетическое сходство этих групп, ранее обсуждавшееся в ряде работ [6, 34]. Ящерицы из Южной Армении разделяются на два основных кластера, где имеются видимые различия по окраске и размерным характеристикам. Все ящерицы из популяций Зуар, Гандзасар, Тартар, Татев и Нрнадзор (группа *D. r. raddei* TT) отличаются наличием зеленого цвета в окраске спины и брюха, ярким паттерном рисунка и крупными размерами. В кластере *D. r. raddei* из популяций Гегард, Горис, Егегнадзор, Каджаран и Селимский перевал (группа *D. r. raddei* GG) большая часть ящериц не имеет зеленого цвета в окраске, отличается наличием больше желтого цвета на брюхе и слабым рисунком вдоль хребта, а также более мелкими размерами, особенно среди самок. У большинства из них характер фolidоза преанальной области, рисунок спины и окраска не отличаются от таковых у партеногенетического дочернего вида *D. rostombekowi*, что наталкивает на определенные предположения о локации материнской популяции, давшей начало данному партеновиду.

Авторы выражают благодарность В.Е. Спангенбергу за помощь в сборе биологического материала.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 19-14-00083 и с использованием приборов ЦКП ИБГ РАН.

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. Arribas O.J. Phylogeny and relationships of the mountain lizards of Europe and Near East (*Archaeolacerta* Merttens, 1921, sensu lato) and their relationships among the Eurasian Lacertid lizards // Rus. J. Herpetol. 1999. V. 6. № 1. P. 1–22.

- <https://doi.org/10.30906/1026-2296-1999-6-1-1-22>
2. Boettger O. Kriechthiere der Kaukasusländer, gesammelt durch die Radde-Valentin'sche Expedition nach dem Karabagh und durch die Herren Dr. J. Valentin und P. Reibisch // *Ber Senck Ges.* 1892: 131–150 P.
  3. Даревский И. С. Скальные ящерицы Кавказа (Систематика, экология и филогения полиморфной группы кавказских ящериц подрода *Archaeolacerta*). Л.: Наука, Ленингр. отд., 1967. 214 с.
  4. Eiselt J., Schmidle J.F., Darevsky I.S. Untersuchungen an Felseidechsen (*Lacerta saxicola*-Komplex) in der östlichen Türkei. 2. Eine neue Unterart der *Lacerta raddei* BOETTGER, 1892 (Squamata: Sauria: Lacertidae) // *Herpetozoa*. 1993. V. 6. № 1/2. P. 65 – 70.
  5. Rastegar-Pouyani N., Karamiani R., Oraei H. et al. A New Subspecies of *Darevskia raddei* (Boettger, 1892) (Sauria: Lacertidae) from the West Azerbaijan Province, Iran // *Asian Herpetol. Research*. 2011. V. 2. № 4. P. 216–222. <https://doi.org/10.3724/sp.j.1245.2011.00216>
  6. Moritz C., Uzzel T., Spolsky C. et al. The maternal ancestry and approximate age of parthenogenetic species of Caucasian rock lizards (*Lacerta*: Lacertidae) // *Genetica*. 1992. V. 87. P. 53–62. <https://doi.org/10.1007/bf00128773>
  7. Freitas, S., Rocha S., Campos J. et al. Parthenogenesis through the ice ages: A biogeographic analysis of the parthenogenetic rock lizards (genus *Darevskia*) // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2016. V. 102. P. 117–127. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.05.035>
  8. Bobyn M.L., Darevsky I.S., Kupriyanova L.A. Allozyme variation in populations of *Lacerta raddei* and *Lacerta nairensis* from Armenia // *Amphibia–Reptilia*. 1996. V. 17. P. 233–246. <https://doi.org/10.1163/156853896X00414>
  9. Yanchukov A., Tarkhnishvili D., Erdolu M. et al. Precise paternal ancestry of hybrid unisexual ZW lizards (genus *Darevskia*: Lacertidae: Squamata) revealed by Z-linked genomic markers // *Biol. J. Linnean Society*. 2022. V. 136. № 2. P. 293 – 305. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blac023>
  10. Carretero M.A., García-Muñoz E., Argaña E. et al. Parthenogenetic *Darevskia* lizards mate frequently if they have the chance: A quantitative analysis of copulation marks in a sympatric zone // *J. Nat. History*. V. 52. № 7–8. P. 405–413. <https://doi.org/10.1080/00222933.2018.1435832>
  11. Гурнык А.Е., Вергун А.А., Рысков А.П. Идентификация гибридных особей скальных ящериц *Darevskia armenica* × *Darevskia valentini* на основе микросателлитного генотипирования // *Генетика*. 2023. Т. 59. № 6. С. 723–727. <https://doi.org/10.31857/S0016675823060073>
  12. Омельченко А.В., Гурнык А.Е., Осипов Ф.А. и др. Генетическая дифференциация природных популяций ящериц комплекса *Darevskia raddei* по данным микросателлитного маркирования геномов // *Генетика*. 2016. Т. 52. № 2. С. 260–264. <https://doi.org/10.1134/S1022795416020083>
  13. Ochkalova S., Korchagin V., Vergun A. et al. First genome of rock lizard *Darevskia valentini* involved in formation of several parthenogenetic species // *Genes*. 2022. V. 13. № 9. <https://doi.org/10.3390/genes13091569>
  14. Thiel T., Michalek W., Varshney R. et al. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.) // *Theor Appl Genet*. 2003. V. 106. № 3. P. 411–422. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-1031-0>
  15. Quinlan A.R., Hall I.M. BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features // *Bioinformatics*. 2010. V. 26. № 6. P. 841–842. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>
  16. Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T. et al. Primer3 – new capabilities and interfaces // *Nucl. Acids Res*. 2012. V. 40. № 15. P. 115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
  17. Koressaar T., Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3 // *Bioinformatics*. 2007. V. 23. № 10. P. 1289–1291. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm091>
  18. Camacho C., Coulouris G., Avagyan V. et al. BLAST+: architecture and applications // *BMC Bioinformatics*. 2009. V. 10. P. 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
  19. Jombart T. *adeigenet*: A R package for the multivariate analysis of genetic markers // *Bioinformatics*. 2008. V. 24. № 11. P. 1403–1405. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129>
  20. Jombart T., Ahmed I. *adeigenet* 1.3-1: New tools for the analysis of genome-wide SNP data // *Bioinformatics*. 2011. V. 27. № 21. P. 3070–3071. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr521>
  21. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2022. <https://www.R-project.org/>
  22. Goudet J. Hierfstat, a package for R to compute and test hierarchical *F*-statistics // *Mol. Ecol. Notes*. 2005. V. 5. № 1. P. 184–186. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00828.x>
  23. Paradis E. *pegas*: An R package for population genetics with an integrated–modular approach // *Bioinformatics*. 2010. V. 26 № 3. P. 419–420. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp696>
  24. Kamvar Z.N., Tabima J.F., Grünwald N.J. *Poppr*: An R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction // *PeerJ*. 2014. <https://doi.org/10.7717/peerj.281>
  25. Nei M. *Molecular Evolutionary Genetics*, N. Y. Chichester, West Sussex: Columbia Univ. Press, 1987. 514 p. <https://doi.org/10.7312/nei-92038>
  26. Hedrick P.W. A standardized genetic differentiation measure // *Evolution*. 2005. V. 59. № 8. P. 1633–1638. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2005.tb01814.x>
  27. Meirmans P.G., Hedrick P.W. Assessing population structure:  $F_{ST}$  and related measures // *Mol. Ecol. Resources*. 2011. V. 11. № 1. P. 5–18. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02927.x>

28. Jombart T., Devillard S. and Balloux F. Discriminant analysis of principal components: A new method for the analysis of genetically structured populations // BMC Genetics. 2010. V. 11. № 94. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-94>
29. Kamvar Z.N., Brooks J.K., Grunwald N.J. New R tools for analyzing genome-wide population genetic data with a focus on clonality // Front. Genet. 2015. V. 6. <https://doi.org/10.3389/fgen.2015.00208>
30. Spangenberg V., Kolomiets O., Stepanyan I. et al. Evolution of the parthenogenetic rock lizard hybrid karyotype: Robertsonian translocation between two maternal chromosomes in *Darevskia rostombekowi* // Chromosoma. 2020. V. 129. № 3–4. P. 275–283. <https://doi.org/10.1007/s00412-020-00744-7>
31. Гречко В.В., Банникова А.А., Косушкин С.А. и др. Молекулярно-генетическое разнообразие комплекса ящериц *Darevskia raddei* (Lacertidae: Sauria): ранние этапы видообразования // Мол. биология. 2007. Т. 41. № 5. С. 839–851. <https://doi.org/10.1134/S0026893307050093>
32. Spangenberg V., Arakelyan M., Galoyan E. et al. Extraordinary centromeres: Differences in the meiotic chromosomes of two rock lizards species *Darevskia portschinskii* and *Darevskia raddei* // PeerJ 2019. <https://doi.org/10.7717/peerj.6360>
33. Cota L.G., Moreira P.A., Brandão M.M. et al. Structure and genetic diversity of *Anacardium humile* (Anacardiaceae): A tropical shrub // Genet. and Mol. Research. 2017. V. 16. № 3. P. 1–13. <http://dx.doi.org/10.4238/gmr16039778>
34. Валяева А.А., Мартirosyan И.А. Генетический полиморфизм локуса du47g в популяциях скальных ящериц *Darevskia raddei* Армении // Актуальные вопросы зоологии, экологии и охраны природы. 2021. Вып. 3. С. 30–34.

## POLYMORPHISM OF MICROSATELLITE LOCI IN POPULATIONS OF CAUCASIAN ROCK LIZARDS AND ITS USE FOR ASSESSING THE GENETIC DIVERSITY OF *Darevskia raddei*

D. O. Odegov<sup>1</sup>, A. A. Valyaeva<sup>1</sup>, M. S. Arakelyan<sup>2</sup>, A. P. Ryskov<sup>1</sup>, V. I. Korchagin<sup>1</sup>,  
I. A. Martirosyan<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Gene Biology Russian Academy of Sciences, Moscow, 117334 Russia

<sup>2</sup>Yerevan State University, Erevan, 0025 Armenia

\*e-mail: irena-m@yandex.ru

The study of Caucasian rock lizards of the *Darevskia raddei* complex, represented by several subspecies, is of great interest and scientific significance in connection with their participation in interspecific hybridizations with the formation of five of the seven known unisexual (parthenogenetic) species of the genus *Darevskia*. Here are presented genetic parameters for populations (subspecies) of *D. r. raddei* and *D. r. nairensis* based on the analysis of the variability of 10 microsatellite loci of 230 individuals from 17 populations of Armenia and Nagorno-Karabakh. According to these parameters, *D. r. raddei* are characterized by greater diversity in the number of alleles and genotypes compared to *D. r. nairensis*. Genetic differentiation analysis showed that *D. r. raddei* populations are divided into two groups, one of which is genetically closer to *D. r. nairensis* than *D. r. raddei*. Analysis of the association index showed the absence of free recombination of alleles between subspecies, which indicates their isolation and the absence of crossing between individuals. Thus, based on the expanded population sample and the developed panel of microsatellite markers, new data on the population structure of *D. raddei* species, genetic diversity and differentiation of *D. r. raddei* and *D. r. nairensis* were obtained.

**Keywords:** subspecies, population, *Darevskia* lizards, genetic diversity, population structure, genetic differentiation.

УДК 636.2:575.17

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЙ АНАЛИЗ ЗЕБУВИДНОГО СКОТА С ПОРОДАМИ *Bos taurus*

© 2024 г. С. В. Бекетов<sup>1,2,\*</sup>, Г. Р. Свищева<sup>1</sup>, В. П. Упельник<sup>2</sup>, С. А. Сенатор<sup>2</sup>, С. Б. Кузнецов<sup>1</sup>,  
Э. А. Николаева<sup>1</sup>, Ю. А. Столповский<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук, Москва, 127276 Россия

\*e-mail: svbeketov@gmail.com

Поступила в редакцию 13.10.2023 г.

После доработки 31.10.2023 г.

Принята к публикации 07.11.2023 г.

С использованием 14 STR-локусов (*BM1824*, *BM2113*, *CSRM60*, *CSSM66*, *ETH3*, *ETH10*, *ETH225*, *ILSTS006*, *INRA023*, *SPS115*, *TGLA53*, *TGLA122*, *TGLA126*, *TGLA227*) проведено сравнительное генотипирование популяции зебувидного скота (*Bos taurus* × *Bos indicus*) и восьми популяций пород *B. taurus*, включая шесть отечественных (холмогорская, ярославская, красная горбатовская, костромская, тагильская, серая украинская), а также двух трансграничных европейских пород (голландская и бурая швейцарская). Всего было исследовано 562 особи. По результатам STR-анализа установлено, что все популяционные выборки *B. taurus* характеризовались средним аллельным разнообразием  $A_R = 4.87–6.7$  и достаточно высоким уровнем генетической изменчивости  $H_E = 0.68–0.76$  с незначительным преобладанием случайных спариваний  $F_{IS} = -0.1... 0.0$ . У зебувидного скота соответствующие показатели составили  $A_R = 5.96$ ,  $H_E = 0.72$  и  $F_{IS} = -0.0278$ . При этом различия в генетической структуре рассматриваемых пород *B. taurus* в значительной степени определялись популяционно-демографическими колебаниями, а выявляемые в популяции зебувидного скота генетическая и фенотипическая неоднородности связаны с уменьшением действия искусственного отбора.

**Ключевые слова:** зебувидный скот, породы *Bos taurus*, микросателлиты, генетическая структура, изменчивость, филогения.

**DOI:** 10.31857/S0016675824030079 **EDN:** DOVSFO

В 2022 г. общая численность крупного рогатого скота (*Bos taurus* и *Bos indicus*, включая их помесные формы) во всем мире составила около 940 млн голов [1], причем более половины мирового поголовья приходилось на две страны: Индию и Бразилию, где в структуре крупного рогатого скота традиционно преобладают зебу (*B. indicus*). Несмотря на низкое качество мяса и незначительную молочную продуктивность, зебу, в отличие от европейского скота (*B. taurus*), обладает резистентностью к ряду заболеваний и высокой способностью переваривать трудноусвояемые растительные корма [2]. При этом молоко коров зебу по своим качественным показателям характеризуется высоким содержанием жира (5–6%) и белка (3.7–4.2%) [3]. Указанные преимущества позволяют использовать зебу для выведения помесных форм и пород, получаемых на основе межвидовой гибридизации (*B. taurus* × *B. indicus*).

Среди наиболее известных примеров гибридного скота с использованием зебу можно назвать

такие породы мясного направления, как санта-гертруда, брангус, бифмастер, чербрей, индубразил, из молочных пород – это австралийский молочный зебувидный скот, ямайка-хоуп, кубинская сибонья и др. [4–7].

В нашей стране идея использования зебу для получения гибридов и создания новых жирно- и белкомолочных пород крупного рогатого скота, устойчивых к заболеваниям и неблагоприятному климату, впервые возникла в “Аскания-Нова” и была реализована в 30-е гг. прошлого столетия М.Ф. Ивановым, И.С. Журавком и А.Е. Мокеевой, затем Е.П. Стеклёвым, П.Н. Буйной, Ю.С. Мусиенко и др. [8]. Впоследствии селекционная работа по созданию высокопродуктивных форм зебувидного скота продолжилась на Кавказе и в Средней Азии, где имелись местные породы зебу (азербайджанская и туркменская), а также примитивный зебувидный скот хорасанского типа (Узбекистан, Таджикистан, Туркмения). На основе этого по-

головья были созданы крупные массивы швице-зебувидных и красных зебувидных коров [9–11].

В 1956 г. на базе научно-экспериментального хозяйства (НЭХ) “Снегири” Главного ботанического сада АН СССР (Московская обл.) впервые в нечерноземной зоне России начался эксперимент по получению и разведению гибридов коров черно-пестрой породы с быками азербайджанского зебу [12]. В дальнейшем создание новых групп животных проводили с прилитием крови кубинского и новозеландского зебу, а также пенджабского зебу породы сахивал. В 1999 г. для увеличения молочности и улучшения формы вымени у гибридных животных в скрещиваниях стали использовать голштинских быков [12, 13].

Однако несмотря на то, что стадо зебувидного скота в Московской обл. существует вот уже более 60 лет, имеется всего лишь одна работа, в которой проводилось сравнение генотипов зебувидных коров с породами *B. taurus* по ISSR-маркерам [14]. Целью нашего исследования стало сравнительное изучение зебувидного скота НЭХ “Снегири” и пород *B. taurus* с использованием микросателлитной пролиферации ДНК. В отличие от ISSR этот метод является более эффективным и востребованным при изучении генетической структуры популяций. Достаточно сказать, что по данным мировых научных публикаций за период с 2005 по 2020 гг. при генотипировании разных видов сельскохозяйственных животных чаще всего применялись именно STR-маркеры – 48% [15].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований являлись образцы биоматериала (кровь) зебувидного скота НЭХ “Снегири” (Московская обл.) (NewKRS,  $n = 73$ ) и животных восьми пород *B. taurus*, в т. ч. двух европейских: бурой швицкой (Костромская обл., Костромской р-н) (BrSwis,  $n = 50$ ) и голштинской (Московская обл.) (Holst,  $n = 176$ ), также шести отечественных: холмогорской (Республика Коми, Интинский р-н) (Kholm,  $n = 50$ ), ярославской (Ярославская обл., Ярославский р-н) (Yaros,  $n = 50$ ), тагильской (Пермская обл., Октябрьский р-н) (Tagil,  $n = 49$ ), красной горбатовской (Нижегородская обл., Павловский р-н) (RedGor,  $n = 50$ ), костромской (Костромская обл., Костромской р-н) (Kostr,  $n = 20$ ) и серой украинской (Республика Алтай, Шебалинский р-н) (Grey,  $n = 44$ ). ДНК выделяли из лейкоцитарной фракции крови с помощью набора реагентов Diatom™ DNA Prep 200 (ООО

“ИзогенЛаб”, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя.

Всего было прогенотипировано 562 животных по 14 STR-маркерам (*BM1824*, *BM2113*, *CSRM60*, *CSSM66*, *ETH3*, *ETH10*, *ETH225*, *ILSTS006*, *INRA023*, *SPS115*, *TGLA53*, *TGLA122*, *TGLA126*, *TGLA227*).

Мультиплексный ПЦР-анализ микросателлитных локусов, содержащих короткие tandemные повторы, проводили с использованием набора COrDIS Cattle (“Гордиз”, Москва, Россия) согласно инструкции производителя. После начальной денатурации 94°C 3 мин амплификацию фрагментов осуществляли в следующем температурно-временном режиме: четыре цикла при 98°C 30 с, 59°C 120 с, 72°C 90 с, с 6 циклами при 94°C 30 с, 59°C 120 с, 72°C, 90 с, с 18 циклами при 90°C 30 с, 59°C 120 с, 72°C, 75 с и окончательным удлинением при 68°C 15 мин. Полимеразную цепную реакцию выполняли на термоциклере Veriti (ThermoFisherScientific, США). Капиллярный электрофорез продуктов ПЦР-реакции проводили на генетическом анализаторе ABI 3130XL (Applied Biosystems, США) с последующим определением длин аллелей микросателлитов в программном обеспечении GeneMapper v. 4.0. (Applied Biosystems).

Для оценки структуры популяций зебувидного скота и пород *B. taurus* использовали следующие показатели: среднее число индивидуумов, генотипированных по локусам ( $N$ ), аллельное разнообразие ( $A_R$ ), наблюдаемая ( $H_O$ ) и ожидаемая ( $H_E$ ) гетерозиготности, доля полиморфных локусов, коэффициент инбридинга ( $F_{IS}$ ) [16]. Расчет уровней аллельного и генетического разнообразия, определение приват-аллелей,  $F$ -статистик Райта, оценку равновесия Харди–Вайнберга и анализ главных компонент по исследованным локусам (Principal Component Analysis, PCA) проводили с помощью программного обеспечения PopGenReport Version 3.0.4. [17, 18]. Межпородные филогенетические отношения устанавливали путем построения дендрограммы по методу NJ (Neighbor-Joining) [19] на основе генетических расстояний  $D_A$  Нея [20].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

С использованием STR-маркеров были определены генотипы крупного рогатого скота, включая популяцию зебувидного скота НЭХ “Снегири”. Как показано в табл. 1, наибольшие значения доли

Таблица 1. Параметры аллельного и генетического разнообразия популяций крупного рогатого скота

| Породы КРС | <i>N</i> | Полиморфные локусы, % | <i>A<sub>R</sub></i> | <i>H<sub>O</sub></i> | <i>H<sub>E</sub></i> | <i>F<sub>IS</sub></i> | <i>HWE</i> |
|------------|----------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|------------|
| Holst      | 176      | 62.36                 | 5.52                 | 0.72                 | 0.71                 | −0.0141               | 0.8067     |
| Tagil      | 49       | 71.16                 | 6.7                  | 0.77                 | 0.76                 | −0.0132               | 0.0704     |
| Kholm      | 50       | 60.36                 | 5.8                  | 0.73                 | 0.73                 | 0                     | 0.0980     |
| RedGorb    | 50       | 68.8                  | 6.21                 | 0.78                 | 0.73                 | −0.0685               | 0.9987     |
| BrSwitsk   | 50       | 50.09                 | 5.28                 | 0.77                 | 0.70                 | −0.1                  | 0          |
| Grey       | 44       | 54.46                 | 4.87                 | 0.73                 | 0.65                 | −0.0441               | 0.0023     |
| Yaros      | 50       | 58.4                  | 5.57                 | 0.72                 | 0.70                 | −0.0286               | 0.6586     |
| Kostr      | 20       | 54.48                 | 5.44                 | 0.71                 | 0.68                 | −0.0441               | 0.6156     |
| NewKRS     | 73       | 63.81                 | 5.96                 | 0.74                 | 0.72                 | −0.0278               | 0.7029     |

Примечание. *N* – число проанализированных образцов; *A<sub>R</sub>* – аллельное разнообразие; *H<sub>O</sub>* – наблюдаемая гетерозиготность; *H<sub>E</sub>* – ожидаемая гетерозиготность; *F<sub>IS</sub>* – коэффициент инбридинга; *HWE* – уровень значимости для отклонений от равновесия Харди–Вайнберга.

полиморфных локусов – 71.16% и уровня аллельного разнообразия – 6.7 были отмечены у тагильского скота, а наименьшие у бурого швицкого – 50.09 и 5.28 соответственно. Зебувидный скот по этим показателям занимал промежуточное положение с долей полиморфных локусов – 63.81% и величиной аллельного разнообразия равной 5.96.

Значения наблюдаемой (*H<sub>O</sub>*) и ожидаемой гетерозиготности (*H<sub>E</sub>*) во всех рассматриваемых популяциях оказались очень близки между собой. Особенно это было характерно для хол-

могорских коров (*H<sub>O</sub>* = 0.73, *H<sub>E</sub>* = 0.73) и в наименьшей степени для серого украинского скота (*H<sub>O</sub>* = 0.73, *H<sub>E</sub>* = 0.65). При этом за исключением холмогорской породы у которой коэффициент инбридинга *F<sub>IS</sub>* оказался равным 0, во всех остальных популяциях крупного рогатого скота, включая зебувидный скот, отмечали незначительное преобладание случайных спариваний – *F<sub>IS</sub>* от −0.01 до −0.0685. Тем не менее достоверные отклонения от равновесия Харди–Вайнберга получены только по двум породам: бурой швицкой и серой украинской (табл. 1).

Всего в рассматриваемых популяциях крупного рогатого скота было обнаружено 24 приват-аллеля, в т. ч. по одному у костромского, бурого швицкого и голштинского скота и 7 – в популяции серых украинских коров. У зебувидного скота выявлены 4 приват-аллеля, три из которых превышали вероятность появления равную 0.1. Приват-аллель 123 встречался в локусе *Eth3* только у ярославского скота, 284 в локусе *Ilts006* – у серого украинского, 106 в локусе *Csrn60* – у холмогорского и 121 в локусе *Bm2113* – у тагильского, причем из всех пород с наибольшей частотой (30%) выявлялся только аллель 171 в локусе *Tgla122* в популяции голштинского скота (табл. 2). При рассмотрении *F*-статистик по исследованным локусам значение *F<sub>IS</sub>* = −0.0268 указывает на незначительный избыток гетерозиготных генотипов, с невысокой вероятностью встречи аллелей общего предка в рассматриваемых популяциях *F<sub>IT</sub>* = 0.07, а уровень *F<sub>ST</sub>* = 0.0942 свидетельствует о их средней дивергенции, наибольший вклад в которую вносит локус *Tgla126* (табл. 3). Определенный интерес представляет сравнение дендрограммы Neighbor-Joining и графика главных компонент (PCA) (рис. 1 и 2). Можно видеть, что согласно Neighbor-Joining взаимоотношениям

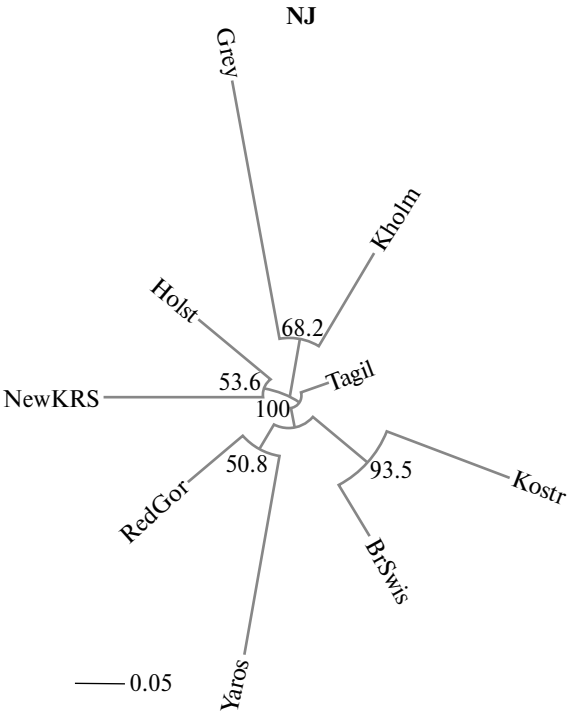
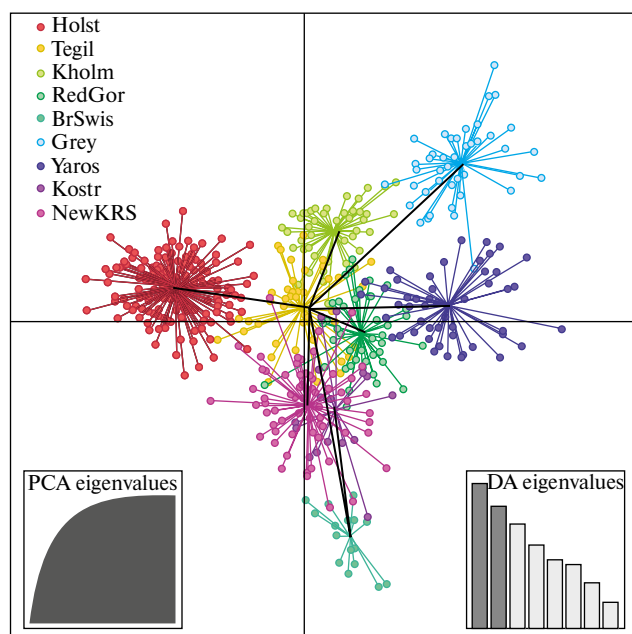


Рис. 1. Филогенетическое дерево популяционных выборок пород *B. taurus* и зебувидного скота НЭХ “Снегири” методом NJ с генетическими расстояниями *D<sub>A</sub>* Нея.



**Рис. 2.** Проекция особей исследуемых популяций пород *B. taurus* и зебувидного скота НЭХ “Снегири” на плоскости двух координат по данным PCA-анализа.

**Таблица 2.** Приват-аллели в локусах и популяциях крупного рогатого скота

| Локус           | Популяция | Аллель | Частота встречаемости, % |
|-----------------|-----------|--------|--------------------------|
| <i>Eth3</i>     | Yaros     | 123    | 3                        |
| <i>Inra023</i>  | Grey      | 196    | 14                       |
| <i>Inra023</i>  | Tagil     | 204    | 1                        |
| <i>Inra023</i>  | RedGor    | 216    | 5                        |
| <i>Ilsts006</i> | Grey      | 284    | 1                        |
| <i>Tgla227</i>  | NewKRS    | 085    | 5                        |
| <i>Tgla122</i>  | Kholm     | 139    | 3                        |
| <i>Tgla122</i>  | Tagil     | 145    | 2                        |
| <i>Tgla122</i>  | Kostr     | 159    | 1                        |
| <i>Tgla122</i>  | Holst     | 171    | 30                       |
| <i>Sps115</i>   | NewKRS    | 250    | 3                        |
| <i>Sps115</i>   | Grey      | 261    | 1                        |
| <i>Sps115</i>   | Grey      | 262    | 1                        |
| <i>Eth225</i>   | BrSwis    | 156    | 4                        |
| <i>Eth225</i>   | NewKRS    | 160    | 9                        |
| <i>Tgla53</i>   | NewKRS    | 152    | 1                        |
| <i>Tgla53</i>   | Tagil     | 182    | 3                        |
| <i>Tgla53</i>   | Tagil     | 188    | 1                        |
| <i>Csrm60</i>   | Kholm     | 106    | 1                        |
| <i>Bm2113</i>   | Tagil     | 121    | 1                        |
| <i>Bm2113</i>   | Grey      | 143    | 2                        |
| <i>Bm1824</i>   | RedGor    | 174    | 13                       |
| <i>Bm1824</i>   | Grey      | 176    | 1                        |
| <i>Bm1824</i>   | Grey      | 184    | 1                        |

**Таблица 3.**  $F$ -статистики по исследованным локусам популяций крупного рогатого скота

| Локус           | $F_{IS}$ | $F_{ST}$ | $F_{IT}$ |
|-----------------|----------|----------|----------|
| <i>Eth225</i>   | −0.0342  | 0.0663   | 0.0344   |
| <i>Eth10</i>    | −0.0549  | 0.0716   | 0.0206   |
| <i>Csrm60</i>   | −0.0404  | 0.0719   | 0.0344   |
| <i>Csrm66</i>   | 0.0157   | 0.0885   | 0.1028   |
| <i>Tgla227</i>  | −0.0228  | 0.0892   | 0.0685   |
| <i>Bm1824</i>   | 0.0135   | 0.0926   | 0.1049   |
| <i>Tgla122</i>  | −0.0403  | 0.0927   | 0.0561   |
| <i>Eth3</i>     | 0.0016   | 0.0928   | 0.0943   |
| <i>Tgla53</i>   | −0.0143  | 0.0945   | 0.0816   |
| <i>Sps115</i>   | −0.0169  | 0.0956   | 0.0803   |
| <i>Bm2113</i>   | −0.0432  | 0.1008   | 0.0620   |
| <i>Ilsts006</i> | −0.0518  | 0.1102   | 0.0641   |
| <i>Inra023</i>  | −0.0033  | 0.1170   | 0.1142   |
| <i>Tgla126</i>  | −0.0839  | 0.1345   | 0.0618   |
| Средняя         | −0.0268  | 0.0942   | 0.0700   |

(рис. 1), зебувидный скот формирует один подкластер с голштинской породой, входя в общий кластер с холмогорским и серым украинским скотом. Действительно, голштинская порода использовалась для повышения продуктивности зебувидного скота НЭХ “Снегири” [3]. В свою очередь основой голштинского скота послужила голландская остфризская порода, которая использовалась и при создании холмогорского скота [21]. Что же касается близости никак не связанных между собой серой украинской и холмогорской пород, то в данном случае скорее всего проявляется эффект “романовской овцы” [22], когда популяция не родственная ни одной из рассматриваемых групп животных случайным образом объединяется с разными породами. В нашем случае это серая украинская порода, которая ведет свое происхождение от серого степного скота, включающего подольскую и романскую породы, в прошлом широко распространенных в южной части Европы, а также степной в зоне Средиземноморья и Причерноморья [23].

С другой стороны, не вызывает сомнений обнаруживаемое на дендрограмме родство бурой швицкой и костромской пород, так как последняя была создана путем скрещивания местного костромского скота с альгаузской и бурой швицкой породами. Вполне естественным выглядит также объединение ярославских и красных горбатовских коров, являющихся в своей основе отродьями двух ветвей великорусского скота: северного и приокского. В то время как относительная обособленность тагильской породы объясняется тем, что она была выведена из местного



низко продуктивного уральского скота с участием ярославской и холмогорской пород [21].

При последующем рассмотрении тех же самых популяций с использованием метода главных компонент (PCA) (рис. 2) мы видим несколько иную картину межпородных взаимодействий. Так, в отличие от Neighbor-Joining-дендрограммы популяции голштинского, бурого швицко-го и серого украинского скота локализируются на графике PCA достаточно обособленно, при том что совершенно неродственные друг другу породы, представленные популяциями тагильского, красного горбатовского, костромского и зебуидного скота оказались сближенными. В частности, популяция зебуидного скота в значительной степени перекрывается с животными костромской породы, несколько менее — с красным горбатовским и тагильским скотом, и совсем незначительно — с бурыми швицкими и голштинскими коровами. Такое несоответствие, вероятнее всего, определяется внутрипопуляционной генетической неоднородностью зебуидного скота НЭХ “Снегири”, выявляемой и путем визуальной экстерьерной оценки.

Например в стаде зебуидного скота встречаются четыре основных окрасочных фенотипа (рис. 3, 4): два преобладающих — практически черный и пегий (черно-белый), и два редких —

красный и коричневый с затемненной головой и подпалинами. Следует сказать, что выявляемые цвета характерны для исходных родительских форм зебуидного скота НЭХ “Снегири”: пегая и черная соответствуют масти холмогорского и голштинского скота, а красная и коричневая — нативной окраске зебу.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В современной научной литературе имеется большое количество работ, посвященных изучению полиморфных структур ДНК крупного рогатого скота, в т. ч. по STR-маркерам. Чаще всего с использованием микросателлитного генотипирования сравнивали породы *B. taurus* и *B. indicus* в пределах одного, либо обоих таксонов [24–29]. Гораздо меньше изучены помеси или породы, созданные при участии зебу [30, 31] и практически отсутствуют исследования по сравнительному анализу популяционно-генетической структуры и родства пород *B. taurus* и *B. indicus* с зебуидным скотом [32, 33].

В этом контексте достаточно близка алгоритму нашего исследования работа бразильских ученых, изучавших пять местных креольских пород крупного рогатого скота, две европейские породы молочного направления и три породы зебу [34]. Согласно их данным, рассматриваемые породы



Рис. 3. Зебуидный скот НЭХ “Снегири” масти черно-пестрого и голштинского скота.



Рис. 4. Зебуидный скот НЭХ “Снегири” масти зебу.

*B. taurus* и *B. indicus* отличались высоким аллельным и генетическим разнообразием и незначительным уровнем инбридинга. При этом параметры  $F$ -статистик для исследуемых популяций характеризовали их, как имеющих дефицит гетерозигот  $F_{IS} = 0.071$ , со средней дифференциацией  $F_{ST} = 0.078$  и отклонением от случайного спаривания в сторону незначительного инбридинга  $F_{IT} = 0.144 > F_{ST}$ .

Примечательно, что сходные значения своих оценок  $F$ -статистик отмечают для подавляющего большинства пород *B. taurus* и *B. indicus* [35]. Значительно реже при изучении генетической структуры популяций крупного рогатого скота выявляют избыток гетерозигот и преобладание неродственных спариваний. Чаще всего подобные отклонения могут быть обусловлены снижением селекционного отбора, влиянием интрогрессии пород-улучшателей или же проведением специальных мероприятий, направленных на сохранение малочисленных пород [36].

Кроме того, большинство авторов отмечают, что аборигенные и региональные культурные породы крупного рогатого скота в отличие от специализированных трансграничных пород, характеризуются более высокой генетической изменчивостью [27, 32, 34]. Тем не менее в нашем исследовании эта закономерность не подтвердилась для костромской, ярославской и серой украинской пород, ожидаемая гетерозиготность которых ( $H_E = 0.65–0.70$ ) оказалась меньшей или была одинаковой при сравнении с популяциями бурого швицкого и голштинского скота ( $H_E = 0.70–0.71$ ) (табл. 1).

Возможная причина подобного отклонения кроется в популяционно-демографических изменениях. Общеизвестно, что уменьшение популяции приводит к снижению ее генетической изменчивости [27], и напротив, увеличение поголовья – к повышению [37]. Так, рост единственной в стране популяции тагильского скота, которая за 11 лет увеличилась в 2.5 раза со 104 до 260 голов [38], мог сказаться на увеличении ее ожидаемой гетерозиготности до  $H_E = 0.76$ , а следствием уменьшения численности алтайской популяции серого украинского скота стал невысокий уровень генетической изменчивости –  $H_E = 0.65$  относительно крупных стад этой породы в украинских хозяйствах ООО “Голосеево” и КСП “Вороньков”, где этот же самый показатель составил  $H_E = 0.80$  и  $0.81$  соответственно [39]. Если же рассматривать породы в целом, то за период с

2010 по 2021 гг. общая численность костромского скота в Российской Федерации сократилась на 31.9%, а ярославского – на 45.9%, что также не могло не сказаться на изменении генетической структуры их популяций [38].

Что же касается зебувидного скота НЭХ “Снегири”, то здесь значения аллельного разнообразия  $A_R = 5.96$  и уровня гетерозиготности  $H_E = 0.72$  оказались примерно сходными с соответствующими показателями у африканского зебувидного скота санга ( $A_R = 6.07–6.25$ ,  $H_E = 0.71–0.72$ ) и зенга ( $A_R = 5.97–6.27$ ,  $H_E = 0.71–0.72$ ) [33]. Считается, что санга образовался путем гибридизации местного безгорбого крупного рогатого скота *Bos taurus africanus* с зебу, а зенга – скрещиванием зебу с санга [40, 41]. Однако если у скота зенга и санга наблюдается дефицит гетерозигот, то в популяции зебувидного скота НЭХ “Снегири” отмечается их избыток.

Таким образом, при сравнении зебувидного скота (*B. indicus* × *B. taurus*) с породами *B. taurus* по микросателлитным маркерам было установлено, что все рассматриваемые выборки характеризовались средним аллельным разнообразием и достаточно высоким уровнем генетической изменчивости, с незначительным преобладанием случайных спариваний. При этом различия в генетической структуре рассматриваемых пород *B. taurus* преимущественно определялись популяционно-демографическими колебаниями, а выявляемая в популяции зебувидного скота (*B. indicus* × *B. taurus*) генетическая и фенотипическая (по масти) неоднородность обусловлена уменьшением действия искусственного отбора.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РНФ – проект № 23-16-00059 и Государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ “Оценка генетического потенциала национальных пород крупного рогатого скота” № 122020800034-4.

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. *Shahbandeh M.* Cattle Population Worldwide 2012–2023. 2023. <https://www.statista.com>.

2. Negussie B., Brannang E., Rottmann O.J. Reproductive performance and herd life of dairy cattle at Asella livestock farm, Arsi, Ethiopia. II. Crossbreds with 50, 75 and 87.5% European inheritance // *J. of Animal Breeding and Genetics*. 1999. V. 116. I. 3. P. 225–234.
3. Амерханов Х.А., Соловьева О.И., Морозова Н.И. и др. Оценка экономического эффекта использования в молочном скотоводстве животных черно-пестрой породы с кровностью зебу // *Известия ТСХА*. 2020. Вып. 2. С. 116–133.  
<https://doi.org/10.26897/0021-342X-2020-2-116-135>
4. Яковлев А.А. Вопросы использования зебу в селекционно-племенной работе с крупным рогатым скотом в Российской Федерации // *Мат. Всесоюз. совещ. по гибридизации крупного рогатого скота с зебу*. Тбилиси, 1982. С. 29–46.
5. Schneeberger C.P., Wellington K.E., MacDowell R.E. Performance of Jamaica Hope cattle in commercial dairy herds in Jamaica // *J. Dairy Sci.* 1982. 65. P. 1364–1371.
6. Suárez M.A., Zubizarreta I., Pérez T. Genotype by environment interaction in “Siboney de Cuba” cattle // *Livestock Res. for Rural Development*. 2009. V. 21. № 9. P. 31–42.
7. Amer P.R., Santos B., Byrne T.J. et al. Updates to the New Zealand national breeding objective for dairy cattle // *Proc. Assoc. Advmt. Anim. Breed. Genet.* 2013. V. 20. P. 471–474.
8. Гузев Ю. Зебувидный скот – перспективы развития в Украине // *Тваринництво України*, 2012. Т. 42. № 12. С. 17–20.
9. Вердиев З.К. Зебуводство. М., 1986. 240 с.
10. Амерханов Х.А., Шевхужев А.Ф., Эльдаров Б.А. Гибридизация крупного рогатого скота на Северном Кавказе. М.: Илекса, 2014. 424 с.
11. Аюбов Б.М. Молочная продуктивность, качество и некоторые технологические свойства молока коров разводимых в Таджикистане: Дис. ... канд. с.-х. наук. Душанбе: Таджикский аграр. ун-т им. Ширинашох Шотемур, 2016. 123 с.
12. Упельник В.П., Завгородний С.В., Махнова Е.Н., Сенатор С.А. История происхождения и перспективы распространения зебувидного типа черно-пестрой породы крупного рогатого скота (обзор) // *Достижения науки и техники АПК*. 2020. Т. 34. № 11. С. 66–72.  
<https://doi.org/10.24411/0235-2451-2020-11211>
13. Рубенков А.А. Высокопродуктивное гибридное молочное стадо. Москва: Колос, 1977. 127 с.
14. Kosovsky G.Yu., Glazko T.T., Arkhipov A.V. et al. The use of ISSR markers for characterization of genetic differentiation of cattle breeds // *Проблемы биологии продуктивных животных*. 2016. № 3. С. 91–97.
15. Olschewsky A., Hinrichs D. An overview of the use of genotyping techniques for assessing genetic diversity in local farm animal breeds // *Animals*. 2021. V. 11. № 7. <https://www.mdpi.com>.  
<https://doi.org/10.3390/ani11072016>
16. Кузнецов В.М. Сравнение методов оценки генетической дифференциации популяций по микросателлитным маркерам // *Зоотехния*. 2020. Т. 21. № 2. С. 169–182.  
<https://doi.org/10.30766/2072-9081.2020.21.2.169-182>
17. Adamack A.T., Gruber B. PopGenReport: Simplifying basic population genetic analyses in R. *Methods // Ecol. Evol.* 2014. № 5. P. 384–387.  
<https://doi.org/10.1111/2041-210X.12158>
18. Gruber B., Adamack A.T. landgenreport: A new R function to simplify landscape genetic analysis using resistance surface layers // *Mol. Ecol. Resour.* 2015. V. 15. P. 1172–1178.  
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12381>
19. Huson D., Bryant D. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies // *Mol. Bio. and Evol.* V. 23. № 2. P. 254–267.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msj030>
20. Takezaki N. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA // *Genetics*. 1996. V. 144 № 1. P. 389–399.  
<https://doi.org/10.1093/genetics/144.1.389>
21. Столповский Ю.А. Гостева Е.Р., Солоднева Е.В. Генетические и селекционные аспекты истории развития скотоводства на территории России. М.: Акварель, 2022. 87 с.
22. Бекетов С.В., Денискова Т.Е., Доцев А.В. и др. Популяции тувинских короткожирнохвостых овец в структуре генофонда пород овец Российской Федерации // *Генетика*. 2024. Т. 60. №1. С. 80–93.
23. Столповский Ю.А. Серая украинская порода. Генетические ресурсы крупного рогатого скота: редкие и исчезающие отечественные породы. М.: Наука, 1993. С. 94–111.
24. Beja-Pereira A., Alexandrino P., Bessa I. et al. Genetic characterization of southwestern European bovine breeds: A historical and biogeographical reassessment with a set of 16 microsatellites // *J. of Heredity*. 2003. V. 94. P. 243–50.  
<https://doi.org/10.1093/jhered/esg055>
25. Tapio I., Varv S., Bennewitz J. et al. Prioritization for conservation of northern European cattle breeds based on analysis of microsatellite data // *Conservation Biology*. 2006. V. 20. P. 1768–1779.  
<https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2006.00488.x>
26. Li M.H., Kantanen J. Genetic structure of Eurasian cattle (*Bos taurus*) based on microsatellites: Clarification for their breed classification // *Animal Genetics*. 2009. V. 41. P. 150–158. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.01980.x>
27. Sodhi M., Mukesh M., Mishra B.P. et al. Microsatellite analysis of genetic population structure of zebu cattle (*Bos indicus*) breeds from north-western region of India // *Animal Biotechnology*. 2011. V. 22. P. 16–29.
28. Sharma R., Maitra A., Singh P.K., Tandia M.S. Genetic diversity and relationship of cattle populations of East India: Distinguishing lesser known cattle populations and established breeds based on STR markers // *Free PMC Article*. 2013. № 2. P. 359.  
<https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-359>

29. Lokugalappatti L.G. S., Wickramasinghe S., PABD A. et al. Indigenous cattle of Sri Lanka: Genetic and phylogeographic relationship with Zebu of Indus Valley and South Indian origin // PLoS One. 2023. V. 18. № 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.028276>
30. Bicalho H.M.S., Pimenta C.G., Mendes I.K.P. et al. Determination of ancestral proportions in synthetic bovine breeds using commonly employed microsatellite markers // Genet. Mol. Res. 2006. V. 5. № 3. P. 432–437.
31. Baimukanov D.A., Semenov V.G., Nurbaev S.D. et al. Inter-population genetic diversity of cattle of the Kazakhstan population of Santa Gertrude breed of Zhetysu type by microsatellite DNA // IOP Conf. Series: Earth and Envir. Sci. Int. AgroScience Conf. (AgroScience-2020). Cheboksary, Russia: IOP Publishing, 2020. V. 604. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/604/1/012043>
32. Brennen R.A., Chase Jr. C.C., Olson T.A. et al. Genetic diversity among Angus, American Brahman, SenepolRomosinuano cattle breeds // Animal Genetics. 2007. V. 38. P. 50–53. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2006.01551.x>
33. Zerabruk M., Li M.H., Kantanen J. et al. Genetic diversity and admixture of indigenous cattle from North Ethiopia: Implications of historical introgressions in the gateway region to Africa // Animal Genetics. 2012. V. 43. P. 257–266. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2011.02245.x>
34. Egito A.A., Paiva S.R., Albuquerque M do S.M. et al. Microsatellite based genetic diversity and relationships among ten Creole and commercial cattle breeds raised in Brazil // BMC Genetics 2007. <https://www.researchgate.net/publication/5780025>. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-8-83>
35. Кузнецов В.М. F-статистики Райта: оценка и интерпретация // Проблемы биологии продуктивных животных. 2014. № 4. С. 80–104.
36. Manatriron S., Fischerleitner F., Baumung R. Genetic characterization among some Austrian and Hungarian cattle breeds // Arch. Tierz. 2008. V. 51. №. 5. P. 426–437.
37. Кушнир А.В., Глазко В.И. Серый украинский скот и его близкородственные формы // Сибирский экологический журнал. 2009. Т. 16. № 3. С. 495–506. <https://doi.org/10.1134/S1995425509030205>
38. Ежегодник по племенной работе в молочном скотоводстве в хозяйствах Российской Федерации. М.: Изд-во ВНИИплем, 2021. 262 с.
39. Гузев Ю.В., Мельник О.В., Спиридонов В.Г., Мельничук С.Д. Сравнительный анализ генетической структуры микропопуляции серой украинской породы крупного рогатого скота по ДНК-маркерам // Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького. 2015. Т. 17 № 3 (63) С. 166–171.
40. Rege J.E.O. The state of African cattle genetic resources I. Classification framework and identification of threatened and extinct breeds // Animal Gen. Res. 1999. V. 25. P. 1–25. <https://doi.org/10.1017/S1014233900003448>
41. Kwondo K., Taehyung K., Tadelle D. et al. The mosaic genome of indigenous African cattle as a unique genetic resource for African pastoralism // Nature Genetics. 2020. V. 52. № 10. P. 1099–1110. <https://doi.org/10.1038/s41588-020-0694-2>

## COMPARATIVE MICROSATELLITE ANALYSIS OF ZEBOID CATTLE WITH BREEDS OF *Bos taurus*

S. V. Beketov<sup>a,b,\*</sup>, G. R. Svishcheva<sup>a</sup>, V. P. Upelnik<sup>b</sup>, S. A. Senator<sup>b</sup>, S. B. Kuznetsov<sup>a</sup>,  
E. A. Nikolaeva<sup>a</sup>, Yu. A. Stolpovsky<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Vavilov Institute of General Genetics of Russian Academy of Sciences, Moscow,  
119991 Russia

<sup>b</sup>Tsitsin Main Botanical Garden, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127276 Russia

\*e-mail: svbeketov@gmail.com

Comparative genotyping of a population of zeboid cattle (*Bos taurus* × *Bos indicus*) and eight populations of *B. taurus* breeds, including six domestic (Holmogorskaya, Yaroslavskaya, Red Gorbatskaya, Kostromskaya, Tagil'skaya, Gray Ukrainian) and two transboundary European breeds (Holstein and Brown Swiss). A total of 562 individuals were examined. Based on the results of the STR analysis, it was found that all population samples of *B. taurus* were characterized by an average allelic diversity  $A_r = 4.87–6.7$  and a fairly high level of genetic variability  $H_E = 0.68–0.76$  with a slight predominance of random matings  $F_{IS} = -0.1... 0.0$ . In zeboid cattle, the corresponding indicators were  $A_r = 5.96$ ,  $H_E = 0.72$  and  $F_{IS} = -0.0278$ . At the same time, differences in the genetic structure of the *B. taurus* breeds under consideration were largely determined by population-demographic fluctuations, and the genetic and phenotypic heterogeneity detected in the population of zeboid cattle was determined by a decrease in the effect of artificial selection.

Keywords: zeboid cattle, *Bos taurus* breeds, microsatellites, genetic structure, variability, phylogeny.

УДК 616.248+616.211-002

## ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ГЕНОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В МЕТАБОЛИЗМЕ ГИСТАМИНА, В РАЗВИТИИ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

© 2024 г. О. Н. Савельева<sup>1, 2, 4, \*</sup>, А. С. Карунас<sup>1, 3, 4, \*\*</sup>, А. Р. Бикташева<sup>3</sup>, А. О. Власова<sup>1</sup>,  
И. М. Хидиятова<sup>1, 2, 4</sup>, Э. И. Эткина<sup>3</sup>, Э. К. Хуснутдинова<sup>1, 2, 4</sup>

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

<sup>2</sup>Уфимский университет науки и технологий, Уфа, 450076 Россия

<sup>3</sup>Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, 450008 Россия

<sup>4</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

\*e-mail: olyasavelie@yandex.ru

\*\*e-mail: carunas@list.ru

Поступила в редакцию 19.07.2023 г.

После доработки 21.08.2023 г.

Принята к публикации 06.09.2023 г.

В основе патогенеза аллергических заболеваний (АЗ) находится взаимодействие генетических, эпигенетических и внешнесредовых факторов. Аллергический ринит (АР) и атопическая бронхиальная астма (БА) являются тесно взаимосвязанными и часто сочетающимися друг с другом АЗ дыхательных путей. Хроническое рецидивирующее течение этих заболеваний определяет необходимость дальнейшего и более глубокого исследования механизмов развития данных патологий. Гистамин является важнейшим медиатором воспаления, высвобождаемым при аллергических реакциях. Цель данной работы – изучение роли полиморфных вариантов генов *AOC1*, *HRH2*, *HRH3*, *ALDH7A1*, *ADCYAP1*, *HNMT*, *PSAP*, *SCG3*, участвующих в метаболизме гистамина, в развитии различных эндофенотипов АЗ дыхательных путей, у индивидов, проживающих в Республике Башкортостан. Материалом для исследования являлись образцы ДНК 358 больных АЗ дыхательных путей различной этнической принадлежности (русские – 165, татары – 143, башкиры – 50) и 200 индивидов контрольной группы с неотягощенной наследственностью в отношении АЗ (русские – 75, татары – 83, башкиры – 42). Генотипирование полиморфных вариантов проведено методом ПЦР в режиме реального времени и ПЦР-ПДРФ-анализа. Обнаружено, что генотип rs1049793\*CC и аллель rs1049793\*C гена *AOC1* ассоциированы с риском развития АЗ дыхательных путей и БА с сопутствующим АР у русских. Выявлен значительно более высокий уровень общего IgE у русских больных АЗ дыхательных путей с генотипом rs1049793\*CC гена *AOC1* по сравнению с носителями генотипов rs1049793\*CG и rs1049793\*GG. Установлена ассоциация аллеля rs17525472\*C полиморфного варианта, локализованного вблизи гена *SCG3*, с развитием АР у индивидов русской этнической принадлежности. Результаты исследования свидетельствуют о том, что гены *AOC1* и *SCG3*, участвующие в метаболизме гистамина, вовлечены в развитие различных эндофенотипов АЗ дыхательных путей у детей.

**Ключевые слова:** гистамин, ген, полиморфный вариант, аллергический ринит, бронхиальная астма.

**DOI:** 10.31857/S0016675824030089 **EDN:** DOPBIB

Аллергические заболевания (АЗ) являются распространенными хроническими заболеваниями многофакторной природы. К наиболее известным АЗ относятся бронхиальная астма (БА), аллергический ринит (АР) и атопический дерматит. БА и АР представляют собой сложные заболевания, проявляющиеся в виде хронического воспаления верхних и нижних дыхательных путей. Слизистые оболочки полости носа и бронхов у индивидов с БА и АР имеют единый профиль аллергенов и медиаторов воспаления, патоморфологические исследования показыва-

ют сходный клеточный состав воспалительного инфильтрата слизистой оболочки носа и бронхов у пациентов. БА и АР тесно взаимосвязаны между собой и часто сочетаются друг с другом. Предполагается, что данные заболевания могут быть разными стадиями единого процесса, единой болезнью, основой которой является сенсibilизация верхних дыхательных путей и бронхов [1].

БА представляет собой многофакторное и гетерогенное заболевание, часто характеризую-

щееся хрипами и одышкой, вызванными воспалением и гиперреактивностью дыхательных путей, наследуемость заболевания варьирует от 55 до 74% у взрослых и достигает 90% у детей [2]. Показано, что более 80% пациентов с аллергической БА имеют сопутствующие симптомы АР, в то время как от 20 до 50% пациентов с АР имеют клинические проявления БА [3]. АР является заболеванием, зачастую характеризующимся иммуноглобулин Е опосредованным воспалением слизистой оболочки носа, формирующимся и прогрессирующим под действием аллергенов [4]. Известно, что симптомы АР не опасны для жизни, они часто причиняют беспокойство и негативно влияют на работу и качество жизни, наследуемость АР составляет более 65% [5]. В мире от АР страдают около 400 миллионов человек, причем в последние десятилетия из-за роста индустриализации и загрязнения воздуха число больных увеличивается [3]. В основе развития аллергических заболеваний (АЗ) лежит сложное взаимодействие между генетической предрасположенностью и воздействием различных факторов окружающей среды, наиболее важными из которых являются аллергены. В ряде полногеномных ассоциативных исследований (GWAS) показано, что БА и АР имеют большое число как различных, так и общих полиморфных вариантов генов (*IL33*, *IL1RL1*, *IL13*, *RAD50*, *C11orf30*, *LRRC32*, *TSL* и др.), ассоциированных с развитием заболеваний и отдельных их фенотипов [6].

Гистамин играет центральную роль в патогенезе аллергических заболеваний, усиливает секрецию Th2-цитокинов (IL-5, IL-4, IL-10 и IL-13) и ингибирует продукцию Th1-цитокинов (IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-2), способствуя сдвигу баланса Т-клеток в сторону Th2-лимфоцитов. Гистамин также регулирует функции моноцитов, макрофагов, нейтрофилов, эозинофилов, В-клеток и дендритных клеток [7]. Синтез гистамина начинается с  $\alpha$ -декарбоксилирования L-гистидина ферментом гистидиндекарбоксилазой, биологическое воздействие гистамина реализуется при взаимодействии с HR1, HR2, HR3 и HR4 рецепторами. Гистамин расщепляется под действием ферментов гистамин-N-метилтрансферазы (HNMT) и диаминооксидазы (DAO или AOC1), известен широкий ряд генов, кодирующих белки, ответственные за синтез и метаболизм гистамина (*HDC*, *HRH1*, *HRH2*, *HRH3*, *HRH4*, *HNMT* и *AOC1*) [8]. Выполнен ряд исследований полиморфных локусов генов, участвующих в метаболизме гистамина, у больных АЗ по результатам которых обнаружены полиморфные варианты генов, ассоциированные

с риском развития аллергопатологий, а также с чувствительностью пациентов к использованию антигистаминных препаратов у индивидов различного происхождения [9, 10]. В Республике Башкортостан также проведен ряд работ, посвященных анализу генов, участвующих в метаболизме гистамина, в результате которых выявлены полиморфные варианты генов, связанные с риском развития и особенностями клинического течения БА (*HRH1*, *HRH4*, *HNMT*, *AOC1*) [11–13], однако анализ полиморфных вариантов генов рецепторов гистамина *HRH2* и *HRH3*, альдегиддегидрогеназы 7 члена семейства A1 *ALDH7A1*, полипептида 1, активирующего аденилатциклазу *ADCYAP1*, просапозина *PSAP*, секретогранина 3 *SCG3*, медьсодержащей аминоксидазы 1 *AOC1*, гистамин-N-метилтрансферазы *HNMT* в группах индивидов из РБ с различными эндофенотипами АЗ дыхательных путей ранее не проводился.

Цель данной работы – исследование роли полиморфных вариантов генов *AOC1*, *HRH2*, *HRH3*, *ALDH7A1*, *ADCYAP1*, *HNMT*, *PSAP*, *SCG3*, участвующих в метаболизме гистамина, в развитии различных эндофенотипов АЗ дыхательных путей, у индивидов, проживающих в Республике Башкортостан.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы ДНК 558 неродственных индивидов от 2 до 18 лет из Республики Башкортостан использованы в качестве материала исследования. Общая выборка пациентов составила 358 индивидов больных АЗ дыхательных путей различной этнической принадлежности (русские – 165, татары – 143, башкиры – 50). Все исследуемые индивиды с АЗ дыхательных путей были пациентами Клиники БГМУ, ГКБ № 21 г. Уфы и ГБУЗ РДКБ (г. Уфа). Диагноз заболеваний устанавливался на основании семейного анамнеза, истории болезни, результатов клинического осмотра и дополнительных лабораторных методов (кожная аллергопроба, уровень иммуноглобулина Е (IgE), общий анализ крови, риноскопия). При проведении анализа объединенная группа больных была разделена на несколько подгрупп: общая выборка пациентов, включающая всех индивидов с БА и АР, больных БА (без АР), больных АР (без БА) и больных БА с сопутствующим АР. В качестве контроля была использована группа, включающая 200 практически здоровых индивидов с неотягощенной наследственностью по АЗ (русские – 75, татары – 83, башкиры – 42), с низким уровнем общего IgE в сыворотке кро-



ви и показателями функции внешнего дыхания в пределах нормы. Исследование одобрено биоэтическими комитетами БГМУ (протокол № 28 от 29.10.2012 г.) и ИБГ УФИЦ РАН (протокол № 7 от 10.02.2011 г.).

Образцы ДНК выделены из периферической крови методом фенол-хлороформной экстракции. Генотипирование полиморфных вариантов генов *AOC1* (rs1049793, p.His664Asp) и *HNMT* (rs11558538, p.Thr105Ile) проведено методом ПДРФ-анализа, генов *HRH2* (rs2067474, с.-525-493G>A) и *HRH3* (rs3787429, p.Arg196His), *ALDH7A1* (rs13182402, с.517+395T>C), *ADCYAP1* (rs2231187, с.456A>G; p.Lys152=), *PSAP* (rs11000016, г.71819460C>T), полиморфного локуса rs17525472 (г.51677471T>C), локализованного вблизи гена *SCG3*, методом ПЦР в режиме реального времени.

Для сравнительного анализа частот аллелей и генотипов в группах использован критерий хи-квадрат для таблиц сопряженности 2×2 (с поправкой Йейтса), при статистически достоверных различиях выполнялась оценка показателя отношения шансов (OR, Odds Ratio) и 95%-ного доверительного интервала (CI95%) (MS Excel 2016, Plink 1.9). Тип распределения количественных данных оценивался критерием Колмогорова–Смирнова. Для оценки равенства генеральной дисперсии применялся критерий Левена, при нормальности распределения данных и равенстве генеральной дисперсии сравнение двух групп выполнялось *t*-тестом Стьюдента, трех и более — однофакторным дисперсионным анализом. Непараметрические тесты применялись в случае, если распределение не являлось нормальным или не было выполнено условие равенства вариаций (*t*-тест Манна–Уитни и *H*-тест Краскелла–Уоллиса). Мета анализ выполнен с применением пакетов программ Plink 1.9 и WinPepi v11.32.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведено исследование полиморфных вариантов восьми генов (*AOC1*, *HRH2*, *HRH3*, *ALDH7A1*, *ADCYAP1*, *HNMT*, *PSAP*, *SCG3*), участвующих в метаболизме гистамина, у больных АЗ дыхательных путей и в контрольной группе индивидов из РБ (табл. 1). Выполнен анализ ассоциаций анализируемых полиморфных вариантов генов с риском развития АЗ дыхательных путей, клинических проявлений только БА и только АР, а также БА с сопутствующим АР.

Распределение частот генотипов полиморфных вариантов соответствовало равновесию Харди–Вайнберга ( $p > 0.05$ ).

Статистически значимые различия в распределении частот аллелей и генотипов между выборками больных АЗ дыхательных путей и контроля выявлены при анализе полиморфного варианта rs1049793 гена *AOC1* (табл. 1). Обнаружена более высокая частота генотипа rs1049793\*CC и аллеля rs1049793\*C гена *AOC1* в выборке больных АЗ дыхательных путей у русских по этнической принадлежности (50.93 и 71.43%), чем в соответствующем контроле (35.14%,  $p = 0.02$ ; OR = 1.92, 95%CI 1.09–3.38 и 60.14%,  $p = 0.01$ ; OR = 1.66, 95%CI 1.1–2.49).

Далее был проведен более дифференцированный анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов с клиническими проявлениями только БА и только АР, а также БА с сопутствующим АР и с уровнем общего IgE. В группе русских больных БА с сопутствующим АР также установлена значительно более высокая частота генотипа rs1049793\*CC и аллеля rs1049793\*C (56.94 и 74.31%) чем в контроле (35.14%,  $p = 0.008$ ; OR = 2.44, 95%CI 1.25–4.76 и 60.14%,  $p = 0.01$ ; OR = 1.92, 95%CI 1.17–3.15). Аллель rs1049793\*G гена *AOC1* значительно реже встречался у русских больных АЗ дыхательных путей (28.57%,  $p = 0.01$ ; OR = 0.60, 95%CI 0.40–0.91) и больных БА с сопутствующим АР (25.69%,  $p = 0.01$ ; OR = 0.52, 95%CI 0.32–0.86), чем в контроле (39.86%). Обнаружено значительное увеличение уровня общего IgE у русских больных АЗ дыхательных путей, носителей генотипа rs1049793\*CC ( $432.9 \pm 45.89$ ) гена *AOC1*, по сравнению с больными, имеющими генотип rs1049793\*CG и rs1049793\*GG ( $291.6 \pm 23.72$  и  $251 \pm 64.87$  соответственно,  $p = 0.04$ ).

Проведено исследование полиморфных вариантов rs2231187 гена *ADCYAP1* и rs11558538 гена *HNMT* в выборках больных и контроля из РБ. Анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного варианта rs2231187 гена *ADCYAP1* выявил тенденцию к повышению частоты встречаемости аллеля rs2231187\*A у больных АЗ дыхательных путей (83.0%) и БА с сопутствующим АР (83.82%) башкирской этнической принадлежности по сравнению с контролем (71.43%,  $p = 0.06$  и  $p = 0.07$  соответственно), аналогичная тенденция была обнаружена в группе татар больных АЗ дыхательных путей ( $p = 0.08$ ). Выявлена тенденция к ассоциации аллеля

**Таблица 1.** Частоты аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов, участвующих в метаболизме гистамина, у больных АЗ дыхательных путей и в контроле

| Полиморфный вариант/ группа |         | Генотипы                                          |            |            | Аллели                                          |                                                | N   |
|-----------------------------|---------|---------------------------------------------------|------------|------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------|-----|
|                             |         | n (%)                                             | n (%)      | n (%)      | n (%)                                           | n (%)                                          |     |
| <i>AOC1</i> , rs1049793     |         | <i>CC</i>                                         | <i>CG</i>  | <i>GG</i>  | <i>C</i>                                        | <i>G</i>                                       |     |
| Больные                     | Русские | 82 (50.93)<br>$p = 0.02$<br>OR = 1.92 (1.09–3.38) | 66 (40.99) | 13 (8.07)  | 230 (71.43) $p = 0.01$<br>OR = 1.66 (1.1–2.49)  | 92 (28.57) $p = 0.01$<br>OR = 0.6 (0.4–0.91)   | 161 |
|                             | Татары  | 65 (45.77)                                        | 63 (44.37) | 14 (9.86)  | 193 (67.96)                                     | 91 (32.04)                                     | 142 |
|                             | Башкиры | 15 (30.0)                                         | 25 (50.0)  | 10 (20.0)  | 55 (55.0)                                       | 45 (45.0)                                      | 50  |
| Контроль                    | Русские | 26 (35.14)                                        | 37 (50.0)  | 11 (14.86) | 89 (60.14)                                      | 59 (39.86)                                     | 74  |
|                             | Татары  | 35 (43.21)                                        | 41 (50.62) | 5 (6.17)   | 111 (68.52)                                     | 51 (31.48)                                     | 81  |
|                             | Башкиры | 18 (42.86)                                        | 18 (42.86) | 6 (14.29)  | 54 (64.29)                                      | 30 (35.71)                                     | 42  |
| <i>HRH2</i> , rs2067474     |         | <i>GG</i>                                         | <i>GA</i>  | <i>AA</i>  | <i>G</i>                                        | <i>A</i>                                       |     |
| Больные                     | Русские | 147 (90.74)                                       | 14 (8.64)  | 1 (0.62)   | 308 (95.06)                                     | 16 (4.94)                                      | 162 |
|                             | Татары  | 128 (90.78)                                       | 13 (9.22)  | —          | 269 (95.39)                                     | 13 (4.61)                                      | 141 |
|                             | Башкиры | 41 (82.0)                                         | 9 (18.0)   | —          | 91 (91.0)                                       | 9 (9.0)                                        | 50  |
| Контроль                    | Русские | 68 (90.67)                                        | 7 (9.33)   | —          | 143 (95.33)                                     | 7 (4.67)                                       | 75  |
|                             | Татары  | 76 (92.68)                                        | 6 (7.32)   | —          | 158 (96.34)                                     | 6 (3.66)                                       | 82  |
|                             | Башкиры | 36 (85.71)                                        | 5 (11.9)   | 1 (2.38)   | 77 (91.67)                                      | 7 (8.33)                                       | 42  |
| <i>HRH3</i> , rs3787429     |         | <i>CC</i>                                         | <i>CT</i>  | <i>TT</i>  | <i>C</i>                                        | <i>T</i>                                       |     |
| Больные                     | Русские | 51 (31.10)                                        | 88 (53.66) | 25 (15.24) | 190 (57.93)                                     | 138 (42.07)                                    | 164 |
|                             | Татары  | 59 (41.84)                                        | 53 (37.59) | 29 (20.57) | 171 (60.64)                                     | 111 (39.36)                                    | 141 |
|                             | Башкиры | 16 (32.0)                                         | 27 (54.0)  | 7 (14.0)   | 59 (59.0)                                       | 41 (41.0)                                      | 50  |
| Контроль                    | Русские | 25 (33.33)                                        | 41 (54.67) | 9 (12.0)   | 91 (60.67)                                      | 59 (39.33)                                     | 75  |
|                             | Татары  | 32 (38.55)                                        | 41 (49.4)  | 10 (12.05) | 105 (63.25)                                     | 61 (36.75)                                     | 83  |
|                             | Башкиры | 17 (40.48)                                        | 18 (42.86) | 7 (16.67)  | 52 (61.9)                                       | 32 (38.1)                                      | 42  |
| <i>ALDH7A1</i> , rs13182402 |         | <i>AA</i>                                         | <i>AG</i>  | <i>GG</i>  | <i>A</i>                                        | <i>G</i>                                       |     |
| Больные                     | Русские | 133 (81.60)                                       | 27 (16.56) | 3 (1.84)   | 293 (89.88)                                     | 33 (10.12)                                     | 163 |
|                             | Татары  | 107 (76.43)                                       | 32 (22.86) | 1 (0.71)   | 246 (87.86)                                     | 34 (12.14)                                     | 140 |
|                             | Башкиры | 41 (82.0)                                         | 7 (14.0)   | 2 (4.0)    | 89 (89.0)                                       | 11 (11.0)                                      | 50  |
| Контроль                    | Русские | 57 (76.0)                                         | 17 (22.67) | 1 (1.33)   | 131 (87.33)                                     | 19 (12.67)                                     | 75  |
|                             | Татары  | 65 (79.27)                                        | 17 (20.73) | —          | 147 (89.63)                                     | 17 (10.37)                                     | 82  |
|                             | Башкиры | 32 (76.19)                                        | 10 (23.81) | —          | 74 (88.1)                                       | 10 (11.9)                                      | 42  |
| <i>ADCYAP1</i> , rs2231187  |         | <i>AA</i>                                         | <i>AG</i>  | <i>GG</i>  | <i>A</i>                                        | <i>G</i>                                       |     |
| Больные                     | Русские | 76 (47.2)                                         | 62 (38.51) | 23 (14.29) | 214 (66.46)                                     | 108 (33.54)                                    | 161 |
|                             | Татары  | 80 (57.55)                                        | 48 (34.53) | 11 (7.91)  | 208 (74.82) $p = 0.08$<br>OR = 1.46 (0.96–2.23) | 70 (25.18) $p = 0.08$<br>OR = 0.69 (0.45–1.05) | 139 |
|                             | Башкиры | 33 (66.0)                                         | 17 (34.0)  | —          | 83 (83.0) $p = 0.06$<br>OR = 1.95 (0.97–3.95)   | 17 (17.0) $p = 0.06$<br>OR = 0.51 (0.25–3.95)  | 50  |
| Контроль                    | Русские | 34 (45.33)                                        | 36 (48.0)  | 5 (6.67)   | 104 (69.33)                                     | 46 (30.67)                                     | 75  |
|                             | Татары  | 40 (48.78)                                        | 30 (36.59) | 12 (14.63) | 110 (67.07)                                     | 54 (32.93)                                     | 82  |
|                             | Башкиры | 20 (47.62)                                        | 20 (47.62) | 2 (4.76)   | 60 (71.43)                                      | 24 (28.57)                                     | 42  |
| <i>HNMT</i> , rs11558538    |         | <i>CC</i>                                         | <i>CT</i>  | <i>TT</i>  | <i>C</i>                                        | <i>T</i>                                       |     |
| Больные                     | Русские | 127 (78.4)                                        | 31 (19.14) | 4 (2.47)   | 285 (87.96)                                     | 39 (12.04)                                     | 162 |
|                             | Татары  | 105 (75.54)                                       | 34 (24.46) | —          | 244 (87.77)                                     | 34 (12.23)                                     | 139 |
|                             | Башкиры | 36 (72.0)                                         | 13 (26.0)  | 1 (2.0)    | 85 (85.0)                                       | 15 (15.0)                                      | 50  |
| Контроль                    | Русские | 58 (78.38)                                        | 13 (17.57) | 3 (4.05)   | 129 (87.16)                                     | 19 (12.84)                                     | 74  |
|                             | Татары  | 67 (81.71)                                        | 15 (18.29) | —          | 149 (90.85)                                     | 15 (9.15)                                      | 82  |
|                             | Башкиры | 36 (85.71)                                        | 6 (14.29)  | —          | 78 (92.86)                                      | 6 (7.14)                                       | 42  |



Таблица 1. Продолжение

| Полиморфный вариант/ группа |         | Генотипы    |            |          | Аллели      |            | N   |
|-----------------------------|---------|-------------|------------|----------|-------------|------------|-----|
|                             |         | n (%)       | n (%)      | n (%)    | n (%)       | n (%)      |     |
| Боль-<br>ные                | Русские | 117 (71.78) | 44 (26.99) | 2 (1.23) | 278 (85.28) | 48 (14.72) | 163 |
|                             | Татары  | 93 (66.43)  | 46 (32.86) | 1 (0.71) | 232 (8.,86) | 48 (17.14) | 140 |
|                             | Башкиры | 41 (82.0)   | 9 (18.0)   | —        | 91 (91.0)   | 9 (9.0)    | 50  |
| Кон-<br>троль               | Русские | 55 (74.32)  | 18 (24.32) | 1 (1.35) | 128 (86.49) | 20 (13.51) | 74  |
|                             | Татары  | 53 (65.43)  | 27 (33.33) | 1 (1.23) | 133 (82.1)  | 29 (17.9)  | 81  |
|                             | Башкиры | 33 (80.49)  | 6 (14.63)  | 2 (4.88) | 72 (87.8)   | 10 (12.2)  | 41  |
| SCG3, rs17525472            |         | TT          | TC         | CC       | T           | C          |     |
| Боль-<br>ные                | Русские | 119 (73.91) | 40 (24.84) | 2 (1.24) | 278 (86.34) | 44 (13.66) | 161 |
|                             | Татары  | 109 (77.86) | 26 (18.57) | 5 (3.57) | 133 (82.1)  | 29 (17.9)  | 140 |
|                             | Башкиры | 37 (75.51)  | 10 (20.41) | 2 (4.08) | 84 (85.71)  | 14 (14.29) | 49  |
| Кон-<br>троль               | Русские | 62 (82.67)  | 13 (17.33) | —        | 137 (91.33) | 13 (8.67)  | 75  |
|                             | Татары  | 63 (76.83)  | 19 (23.17) | —        | 145 (88.41) | 19 (11.59) | 82  |
|                             | Башкиры | 33 (78.57)  | 7 (16.67)  | 2 (4.76) | 73 (86.9)   | 11 (13.1)  | 42  |

Примечание. N — общее количество индивидов; n — численность групп, в скобках частоты аллелей и генотипов, %; p — уровень значимости, указан при  $p < 0.09$ ; OR — отношение шансов, в скобках — 95%-ный доверительный интервал.

rs11558538\**T* гена *HNMT* с развитием БА с сопутствующим АР у башкир ( $p = 0.08$ ).

При сравнительном анализе распределения частот аллелей и генотипов полиморфного локуса rs17525472 гена *SCG3* между группами больных АР-дыхательных путей и контроля выявлено, что аллель rs17525472\**C* достоверно чаще встречается у индивидов с АР русской этнической принадлежности (17.74%), чем в контрольной выборке (8.67%,  $p = 0.03$ ; OR=2.27, 95%CI 1.09–4.72). Частота более распространенного генотипа rs17525472\**TT* и аллеля rs17525472\**T* в группе больных АР была достоверно ниже (67.74 и 82.26%), чем в контроле у русских (82.67%,  $p = 0.04$ ; OR = 0.44, 95%CI 0.20–0.98 и 91.33%,  $p = 0.03$ ; OR = 0.44, 95%CI 0.21–0.91).

С целью обобщения полученных данных и обнаружения общих маркеров риска развития АЗ у индивидов различной этнической принадлежности проведен метаанализ ассоциаций исследуемых полиморфных вариантов генов с развитием АЗ дыхательных путей у русских, татар и башкир. Статистически достоверных различий между выборками больных АЗ дыхательных путей и контроля не обнаружено, но выявлена тенденция к ассоциации аллеля rs1049793\**C* гена *AOC1* с развитием АР (табл. 2,  $p = 0.07$ ), что предполагает возможную роль данного гена не только в развитии АЗ дыхательных путей у русских, но и в объединенной группе индивидов различного происхождения.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Рост распространенности АЗ дыхательных путей в мире ставит проблему профилактики аллергических патологий в число важнейших проблем современной клинической медицины. Более глубокое понимание молекулярно-генетических особенностей патогенеза АЗ может способствовать их своевременной диагностике и повышению эффективности лечения. В настоящей работе проведено исследование ряда полиморфных локусов генов *AOC1*, *HRH2*, *HRH3*, *ALDH7A1*, *ADCYAP1*, *HNMT*, *PSAP*, *SCG3*, участвующих в метаболизме гистамина, у больных АЗ дыхательных путей и контроля из Республики Башкортостан.

Ген *AOC1* расположен в хромосомной области 7q36.1, кодирует белок — медьсодержащую аминоксидазу 1, также известный как DAO, катализирующий окислительное дезаминирование гистамина (<https://omim.org/entry/104610>), полиморфный вариант rs1049793 влияет на уровень экспрессии *AOC1* в сыворотке крови (<https://www.ensembl.org>). В настоящем исследовании выявлена ассоциация генотипа rs1049793\**CC* и аллеля rs1049793\**C* гена *AOC1* с развитием АЗ дыхательных путей и БА с сопутствующим АР у русских, что согласуется с ранее опубликованными нами выводами об ассоциации аллеля rs1049793\**C* с БА и сниженными показателями спирометрии у русских [12, 13] и подтверждает значимость гена *AOC1* в развитии аллергического воспаления. В ряде опубликованных работ

**Таблица 2.** Результаты метаанализа ассоциации полиморфных локусов исследуемых генов с развитием АР у индивидов русской, татарской и башкирской этнической принадлежности

| Ген            | SNP        | A1 | A2 | N | Модель с фиксированным эффектом |      | Модель со случайным эффектом |        | Q    | I <sup>2</sup> |
|----------------|------------|----|----|---|---------------------------------|------|------------------------------|--------|------|----------------|
|                |            |    |    |   | P                               | OR   | P(R)                         | OR (R) |      |                |
| <i>AOC1</i>    | rs1049793  | G  | C  | 3 | 0.07                            | 0.69 | 0.07                         | 0.69   | 0.49 | 0              |
| <i>HRH2</i>    | rs2067474  | A  | G  | 3 | 0.36                            | 1.45 | 0.36                         | 1.45   | 0.58 | 0              |
| <i>HRH3</i>    | rs3787429  | T  | C  | 3 | 0.75                            | 1.06 | 0.75                         | 1.06   | 0.41 | 0              |
| <i>ALDH7A1</i> | rs13182402 | G  | A  | 3 | 0.26                            | 1.36 | 0.26                         | 1.36   | 0.39 | 0              |
| <i>ADCYAP1</i> | rs2231187  | G  | A  | 3 | 0.56                            | 0.88 | 0.46                         | 0.77   | 0.15 | 47.98          |
| <i>HNMT</i>    | rs11558538 | T  | C  | 3 | 0.94                            | 0.98 | 0.94                         | 0.98   | 0.81 | 0              |
| <i>PSAP</i>    | rs11000016 | T  | C  | 3 | 0.29                            | 1.31 | 0.41                         | 1.32   | 0.24 | 30.35          |
| <i>SCG3</i>    | rs17525472 | C  | T  | 3 | 0.15                            | 1.60 | 0.75                         | 1.24   | 0.06 | 71.74          |

Примечание. A2, A2 – аллели; N – число групп, включенных в исследование; P – p-value fixed; P(R) – p-value random; OR(R) – отношение шансов (random); Q – критерий гетерогенности Кохрена; I<sup>2</sup> – оценка индекса статистической гетерогенности.

других авторов также показана роль полиморфного варианта rs1049793 и белка экспрессии гена *AOC1* в развитии АЗ дыхательных путей. E. García-Martín с соавт. показано, что у больных АЗ дыхательных путей европейского происхождения, несущих генотип rs1049793\*GG гена *AOC1*, значительно чаще проявляются симптомы аллергии при низком уровне IgE, чем у носителей альтернативных аллелей [14]. Установлено, что уровень экспрессии белка данного гена в сыворотке крови выше у пациентов с atopической БА и АР, чем в контрольной группе индивидов из Египта, также установлена положительная корреляция между тяжестью АЗ и уровнем экспрессии белка, кодируемого геном *AOC1* [15]. Обнаружено, что чем ниже катаболическая активность *AOC1*, тем ниже пиковая скорость носового вдоха у взрослых пациентов европейского происхождения с персистирующим АР [16].

Ген *ADCYAP1* (18p11.32) кодирует белок, активирующий аденилатциклазу гипофиза (РАСАР). Белок РАСАР участвует в метаболизме гистамина [10], а также эндогенной регуляции тонуса гладких мышц дыхательных путей при БА [17]. В настоящем исследовании обнаружены лишь тенденции к ассоциации полиморфного варианта rs2231187 гена *ADCYAP1* с развитием АЗ дыхательных путей у башкир и татар, в то же время ранее нами было показано, что аллель rs2231187\*A гена *ADCYAP1* связан с развитием БА с началом в детском возрасте у башкир [12]. Обнаружена более низкая экспрессия белка *ADCYAP1* в эпителии носовой полости пациентов с хроническим риносинуситом из Хорватии по сравнению с контролем, причем наиболее низкий уровень экспрессии *ADCYAP1* отмечался у пациентов с тяжелой

формой заболевания. Показано, что воспаление в слизистой оболочке носа больных с хроническим риносинуситом может регулироваться через передачу сигналов *ADCYAP1* [18]. Полученные данные могут свидетельствовать об определенной роли гена *ADCYAP1* в патогенезе различных АЗ, однако для ее подтверждения необходимо проведение дальнейших исследований.

Полиморфный вариант rs11558538, локализованный в 4-м экзоне гена *HNMT* (2q22.1), кодирует аминокислотную замену Thr105Ile. Белок *HNMT* играет важную роль в деградации гистамина путем метилирования гистамин-N-метилтрансферазой. По данным ранее опубликованного нами исследования показано, что аллель rs11558538\*T гена *HNMT* ассоциирован со сниженными значениями МОС25 у татар больных БА [13]. Однако в настоящей работе выявлена тенденция к ассоциации аллеля rs11558538\*T гена *HNMT* с развитием БА с сопутствующим АР у башкир, не достигшая уровня статистической значимости. Полученные результаты неоднозначны и также требуют проведения дополнительных исследований данного гена у больных АЗ. В то же время в ряде опубликованных работ подтверждается роль гена *HNMT* в патогенезе АЗ дыхательных путей. L. Fernández-Novoa с соавт. показано, что аллель rs11558538\*T гена *HNMT* ассоциирован со снижением активности фермента *HNMT* [19]. Установлена ассоциация генотипа rs1801105\*TT и аллеля rs1801105\*T гена *HNMT* с развитием БА у детей европейского происхождения [20]. Выявлена ассоциация аллеля rs11558538\*T гена *HNMT* с ярко выраженными клиническими симптомами АР у индивидов детского возраста из Мексики [9].

Ген секретогранина 3 *SCG3* локализован в хромосомной области 15q21.2. Белок SCG3 относится к семейству нейроэндокринных секреторных белков гранинов, являющихся предшественниками ряда биологически активных белков. Показано, что некоторые гранины функционируют как вспомогательные белки при сортировке и протеолитическом процессинге прогормонов ([www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/29106](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/29106)). При GWAS обнаружено, что полиморфный вариант rs17525472 с высоким уровнем значимости ассоциирован с тяжелой БА у европейцев [21]. В настоящей работе показано, что аллель rs17525472\*С ассоциирован с развитием АР, что частично согласуется с результатами GWAS и подтверждает роль данного гена в развитии алергопатологий.

Таким образом, выполнено исследование полиморфных вариантов восьми генов, участвующих в метаболизме гистамина, у больных АЗ дыхательных путей и индивидов контрольной группы из РБ. У русских обнаружена ассоциация генотипа rs1049793\*СС и аллеля rs1049793\*С гена *AOC1* с развитием АЗ дыхательных путей и БА с сопутствующим АР, а также выявлено значительное повышение уровня общего IgE у больных АЗ дыхательных путей, являющихся носителями генотипа rs1049793\*СС. Установлена ассоциация аллеля rs17525472\*С гена *SCG3* с развитием АР у русских. Результаты исследования свидетельствуют о роли аллельных вариантов исследованных генов *AOC1* и *SCG3*, участвующих в метаболизме гистамина, в патогенезе АЗ дыхательных путей, что может быть использовано при подготовке новых современных способов ранней диагностики аллергических патологий.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (№ 122041400169-2), при частичной поддержке Мегагранта Минобрнауки РФ (№ 075-15-2021-595), Санкт-Петербургского государственного университета (**ID PURE**: 103964756). Для исследования использовано оборудование ЦКП “Биомика” (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП “Агидель”) и УНУ “КОДИНК”. Образцы ДНК для исследования использованы из “Коллекции биологических материалов человека” ИБГ УФИЦ РАН, поддержанной Программой биоресурсных коллекций ФАНО России (соглашение № 007-030164/2).

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. Рузикулов А. Клинико-аллергологические особенности и распространение аллергического ринита и бронхиальной астмы // Евраз. журн. медицинских и естественных наук. 2022. Т. 2. № 11. С. 87–96.
2. Gautam Y., Johansson E., Mersha T.B. Multi-omics profiling approach to asthma: An evolving paradigm // J. Pers. Med. 2022. V. 12(1). P. 66.  
<https://doi.org/10.3390/jpm12010066>
3. Zhang Y., Huang Y., Chen W. et al. Identification of key genes in allergic rhinitis by bioinformatics analysis // J. Intern. Med. Resh. 2021. V. 49(7). P. 1–14.  
<https://doi.org/10.1177/03000605211029521>
4. Астафьева Н.Г., Баранов А.А., Вишнева Е.А. и др. Аллергический ринит // Клинические рекомендации. 2020. Т. 28. № 4. С. 246–256.  
<https://doi.org/10.17116/rostrino202028041246>
5. Choi B.Y., Han M., Kwak J. W., Kim T.H. Genetics and epigenetics in allergic rhinitis // Genes. 2021. V. 12.  
<https://doi.org/10.3390/genes12122004>
6. Bousquet J., Anto J. M., Bachert C. et al. Allergic rhinitis // Nat. Rev. 2020. V. 6 (95). P. 1–17.  
<https://doi.org/10.1038/s41572-020-00227-0>
7. Thangam E.B., Jemima E.A., Singh H. et al. The role of histamine and histamine receptors in mast cell-mediated allergy and inflammation: The hunt for new therapeutic targets // Front. Immunol. 2018. V. 9.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01873>
8. Anvari S., Vyhlidal C. A., Dai H. et al. Genetic variation along the histamine pathway in children with allergic versus nonallergic asthma // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2015. V. 53(6). P. 802–809.  
<https://doi.org/10.1165/rcmb.2014-0493OC>
9. Meza-Velázquez R., López-Márquez F., Espinosa-Padilla S. et al. Association between two polymorphisms of histamine-metabolising enzymes and the severity of allergic rhinitis in a group of Mexican children // Allergol. Immunopathol. (Madr.). 2016. V. 44(5). P. 433–438.  
<https://doi.org/10.1016/j.aller.2016.01.002>

10. Кучер А.Н., Черевко Н.А. Гены гистаминового метаболического пути и многофакторные заболевания человека // Генетика. 2018. Т. 54. № 1. С. 15–32. <https://doi.org/10.7868/S0016675818010083>.
11. Савельева О.Н., Карунас А.С., Федорова Ю.Ю. и др. Анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов гистаминовых рецепторов (*HRH1*, *HRH2*, *HRH3*, *HRH4*) с развитием бронхиальной астмы у детей // Пульмонология. 2021. № 31(6). С. 729–738. <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2021-31-6-729-738>
12. Савельева О.Н., Карунас А.С., Федорова Ю.Ю. и др. Анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов *ALDH7A1*, *AOC1*, *PSAP*, *ADCYAP1*, участвующих в метаболизме гистамина, с развитием бронхиальной астмы у индивидов из Республики Башкортостан // Якутский мед. жур. 2023. №1 (81). С. 10–13. <https://doi.org/10.25789/YMJ.2023.81.02>
13. Савельева О.Н., Карунас А.С., Федорова Ю.Ю. и др. Анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов аминоксидазы 1 *AOC1* и гистамин-N-метилтрансферазы *HNMT* с развитием бронхиальной астмы у детей // Якутский мед. жур. 2020. №4 (72). С. 20–23. <https://doi.org/10.25789/YMJ.2020.72.05>
14. García-Martín E., García-Menaya J., Sánchez B. et al. Polymorphisms of histamine-metabolizing enzymes and clinical manifestations of asthma and allergic rhinitis // Clin. Exp. Allergy. 2007. V. 37(8). P. 1175–1182. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2007.02769.x>
15. Refaat M.M., Abdel-Rehim A.S., Elmahdi A.R. et al. Diamine oxidase enzyme: A novel biomarker in respiratory allergy // International Forum of Allergy & Rhinology. 2019. V. 9 (12). <https://doi.org/10.1002/alr.22426>
16. Mayo-Yáñez M., Díaz-Díaz A., Vázquez-Barro J.C. et al. Relationship between allergic rhinitis and diamine oxidase activity: A preliminary report // Allergol. Select. 2021. V.5. P. 187–194. <https://doi.org/10.5414/ALS400537>
17. Chiba Y., Ueda C., Kohno N. et al. Attenuation of relaxing response induced by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in bronchial smooth muscle of experimental asthma // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 2020. V. 319(5). P. L786–L793. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00315.2020>
18. Mihalj H., Butković J., Tokić S. et al. Expression of oxidative stress and inflammation-related genes in nasal mucosa and nasal polyps from patients with chronic rhinosinusitis. Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23(10). P. 5521. <https://doi.org/10.3390/ijms23105521>
19. Fernández-Novoa L., Corzo L., Seoane S. & Cacabelos R.A. Genomic approach to histamine function // J. Genomic Med. Pharmacogenomics. 2017. V. 1(2). P. 233–241.
20. Szczepankiewicz A., Breborowicz A., Sobkowiak P., Popiel A. Polymorphisms of two histamine-metabolizing enzymes genes and childhood allergic asthma: a case control study // Clin. Mol. Allergy. 2010. V. 8. <https://doi.org/10.1186/1476-7961-8-14>
21. Li X., Howard T.D., Zheng S.L. et al. Genome-wide association study of asthma identifies RAD50-IL13 and HLA-DR/DQ regions // J. Allergy Clin. Immunol. 2010. V. 125(2). P. 328–335. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.11.018>

## STUDY OF THE ROLE OF GENES INVOLVED IN THE METABOLISM OF HISTAMINE IN THE DEVELOPMENT OF ALLERGIC RESPIRATORY DISEASES

O. N. Savelieva<sup>1, 2, 4, \*</sup>, A.S. Karunas<sup>1, 3, 4, \*\*</sup>, A. R. Biktasheva<sup>3</sup>, A. O. Vlasova<sup>1</sup>,  
I. M. Khidiyatova<sup>1, 2, 4</sup>, E. I. Etkina<sup>3</sup>, E. K. Khusnutdinova<sup>1, 2, 4</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*

*Ufa University of Science and Technology, Ufa, 450076 Russia*

*Bashkir State Medical University, Ufa, 450000 Russia*

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

*\*e-mail: olyasavelie@yandex.ru*

*\*\*e-mail: carunas@list.ru*

The interaction of genetic, epigenetic and environmental factors underlies the pathogenesis of allergic diseases. Allergic rhinitis and atopic bronchial asthma are closely related and often concurrent respiratory allergic diseases. The chronic recurrent course of these diseases establishes the importance of further and more profound studies of the mechanisms underlying the development of these pathologies. Histamine is one of the most significant inflammatory mediators secreted during allergic reactions. The aim of the research was to study the role of polymorphic variants of *AOC1*, *HRH2*, *HRH3*, *ALDH7A1*, *ADCYAP1*, *HNMT*, *PSAP*, *SCG3*, genes involved in the histamine metabolism in the development of different endophenotypes of the allergic airway diseases in individuals living in the Republic of Bashkortostan. DNA samples of 358 individuals with allergic diseases of the respiratory tract of different ethnicity (Russians – 165, Tatars – 143, Bashkirs – 50) and 200 controls with unweighted heredity in allergic diseases (Russians – 75, Tatars – 83, Bashkirs – 42). Genotyping of polymorphic variants was performed by real-time PCR and PCR-RFLP analysis. It was revealed that the rs104979793\*CC genotype and the rs104979793\*C allele of the *AOC1* gene were associated with allergic diseases of the respiratory tract and asthma with concomitant allergic rhinitis in Russians. A significant increase of total IgE level was revealed in Russian patients with allergic diseases of the respiratory tract with the rs1049793\*CC genotype of the *AOC1* gene compared to carriers of the rs1049793\*CG and rs1049793\*GG genotypes. The association of the C allele of the rs17525472 polymorphic variant localized near the *SCG3* gene with allergic rhinitis in Russians was established. The results revealed that *AOC1* and *SCG3* genes involved in the metabolism of histamine are related to the development of different endophenotypes of airway diseases in children.

**Keywords:** histamine, gene, polymorphic variant, allergic rhinitis, bronchial asthma.

УДК 577.21

## ПОИСКИ ЭПИСТАТИЧЕСКИ ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ В СОСТАВЕ БИАЛЛЕЛЬНЫХ СОЧЕТАНИЙ С ВАЗОГАЛЬНЫМИ ОБМОРОКАМИ

© 2024 г. Б. В. Титов<sup>1,2</sup>, Н. А. Матвеева<sup>1,2</sup>, Е. А. Базылева<sup>1</sup>, А. В. Певзнер<sup>1</sup>,  
О. О. Фаворова<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. академика Е.И. Чазова Москва, 121552 Россия

<sup>2</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Москва, 117997 Россия

\*e-mail: olga.favorova@gmail.com

Поступила в редакцию 22.07.2023 г.

После доработки 14.08.2023 г.

Принята к публикации 18.08.2023 г.

Наиболее частой причиной внезапной потери сознания являются вазовагальные обмороки (ВВО), которые возникают вследствие гипоперфузии головного мозга из-за нарушения вегетативного контроля кровообращения, приводящего к артериальной гипотензии. Известно, что к ВВО существует генетическая предрасположенность, однако данные о роли отдельных генов довольно противоречивы. С помощью программного обеспечения APSampler, использующего метод Монте-Карло Марковскими цепями и Байесовскую непараметрическую статистику, мы выявили биаλληльные сочетания, ассоциированные с ВВО, и исследовали характер взаимодействия между их компонентами. Для анализа использовали полученные нами ранее результаты геномного типирования однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) пяти генов, продукты которых участвуют в нейрогуморальной регуляции, и четырех SNP, расположенных в локусе 2q32.1, пополненные данными для новых индивидов, включенных в исследование. В общую выборку вошло 175 больных с подтвержденным диагнозом ВВО и 200 индивидов контрольной группы без обмороков в анамнезе. Обнаружено 11 ассоциированных с ВВО парных сочетаний SNP различных генов. пять из этих сочетаний оказались эпистатическими, причем в четырех из них вовлечены SNP локуса 2q32.1, лежащие внутри или вблизи генов некодирующих РНК. Высказано предположение, что гены некодирующих РНК, локализованные на хромосоме 2, могут прямо или опосредованно (через каскады взаимодействий) участвовать в регуляции активности генов, образующих с ними эпистатические пары.

**Ключевые слова:** генетический полиморфизм, эпистатические взаимодействия, генетическая предрасположенность, синкопальные состояния, вазовагальные обмороки.

DOI: 10.31857/S0016675824030092 EDN: DOIQNH

Обморок (синкопе) представляет собой преходящую потерю сознания вследствие церебральной гипоперфузии и характеризуется внезапным началом и полным спонтанным восстановлением. Согласно последней патофизиологической классификации синкопальных состояний 2018 г. [1] (рекомендации на русском языке [2]), обмороки разделяют на рефлекторные (нейрогенные), ортостатические и кардиальные. Вазовагальные обмороки (ВВО) входят в группу рефлекторных обмороков и являются наиболее частой причиной преходящей потери сознания. Механизм развития ВВО включает снижение частоты сердечных сокращений (ЧСС) и тонуса сосудов на фоне нарушения работы вегетативной нервной системы и нейрогуморальной регуляции, что в конечном

итоге приводит к падению артериального давления (АД), уменьшению кровоснабжения головного мозга и потере сознания [3, 4].

ВВО относят к мультифакториальным полигенным заболеваниям; хотя причины развития ВВО до конца не ясны, не вызывает сомнения, что важная роль среди них принадлежит наследственной предрасположенности [5]. Поскольку в основе патогенеза ВВО лежит нарушение нейрогуморальной регуляции [6], в качестве возможных генов предрасположенности рассматривают гены, кодирующие рецепторы, белки-переносчики и ферменты, участвующие в синтезе нейромедиаторов и вазоактивных молекул, таких как адреналин, норадреналин, аденозин, оксид азота, вазопрессин, эндотелин и другие, однако довольно многочис-

ленные данные о роли отдельных генов-кандидатов как правило противоречивы [5].

Первое исследование генетической составляющей обмороков методом полногеномного поиска ассоциаций (GWAS) было проведено в 2020 г. на выборке пациентов из ресурса Британского биобанка (The UK Biobank resource), страдающих, согласно Международной классификации заболеваний, обмороками или коллапсом (рубрики 780.2 по МКБ-9 и R55 по МКБ-10), и валидировано на данных Датского биобанка неонатального скрининга [7]. В этой работе был идентифицирован новый локус в области 2q32.1 хромосомы 2, однонуклеотидные полиморфные варианты (SNP) которого оказались ассоциированными с заболеванием ( $p < 5 \times 10^{-8}$ ). Наиболее значимой была ассоциация с rs12465214 ( $p = 5.8 \times 10^{-15}$ ). В марте 2023 г. были опубликованы результаты мета-анализа данных пяти биобанков разных стран (Исландия, Британия, Дания, США и Финляндия) [8], который показал ассоциацию с риском развития обмороков и коллапса, снова без разделения их на патогенетические варианты, 18 независимых SNP, из которых rs12465214, локализованный в области 2q32.1, был обнаружен ранее в работе [7], а остальные 17 были новыми. Мета-анализ выявил общий генетический фон обмороков и коллапса с патологией сердечно-сосудистой системы, что свидетельствует о важности тщательного контроля за состоянием здоровья людей с синкопе.

Мы сосредоточили свои исследования генетической предрасположенности к обморокам на одном типе рефлекторных (нейрогенных) обмороков — на ВВО. Цель настоящей работы — поиск ассоциированных с ВВО биаллельных эпистатических сочетаний генов; термин “эпистаз” использовали для обозначения взаимодействия различных генов, при котором проявление одного гена находится под влиянием другого гена, неаллельного ему (независимо от направления эффекта) [9]. Для этого анализа использовали полученные нами ранее результаты геномного типирования полиморфных вариантов генов нейрогуморальной регуляции [10], дополненные данными для новых пациентов, включенных в исследование (далее — гены группы 1), и полиморфных вариантов в области 2q32.1 [11] (далее — гены группы 2). Провели поиск биаллельных сочетаний двух типов: а) включающих два варианта генов группы 1 и б) включающих вариант гена группы 1 совместно с вариантом

гена группы 2, а также исследовали характер взаимодействия между компонентами всех найденных сочетаний.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Объект исследования*

В исследование генетической предрасположенности к ВВО методом “случай—контроль” было включено 175 неродственных больных ВВО (средний возраст  $\pm$  стандартное отклонение  $35.89 \pm 15.7$  лет), из них 63 мужчины (средний возраст  $34.5 \pm 15.5$  лет) и 112 женщин (средний возраст  $36 \pm 15.7$  лет) из числа пациентов Института клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова ФГБУ НМИЦК им. акад. Е.И. Чазова Минздрава России. Всем пациентам проводилось стандартное клинико-инструментальное обследование, включавшее физикальный осмотр, регистрацию ЭКГ в 12 отведениях, суточное холтеровское мониторирование ЭКГ, эхокардиографию, оценку барорефлекторного контроля с помощью анализа временных последовательных изменений систолического АД и ЧСС, пробу Вальсальвы—Вебера, пробу с кистевым жимом, пробу с глубоким дыханием. Диагноз ВВО был поставлен на основании типичных провоцирующих факторов и клинических проявлений. Среди триггеров обмороков наиболее часто встречались пребывание в положении ортостаза в душном помещении (100%), венепункция или реакция на другое болевое воздействие (95%). 92% больных описывали наличие предвестников в виде тошноты, потливости, головокружения, ощущения “потемнения в глазах”. Во всех случаях бессознательный период был кратковременным (менее 1 мин), пациенты быстро “приходили в себя” после приступа, спутанности (характерной для эпилептических приступов) не отмечено ни у одного больного. Во всех случаях по результатам инструментального обследования были исключены иные (кардиальные, неврологические и метаболические) причины приступов потери сознания.

Контрольная группа включала 200 индивидов (средний возраст  $36.7 \pm 13.7$  лет) без обмороков в анамнезе, из них 108 мужчин (средний возраст  $36.1 \pm 12.9$  лет) и 92 женщины (средний возраст  $37.4 \pm 14.6$  лет). Эту группу составили 72 человека, у которых при проведении обследования не было выявлено каких-либо заболеваний, и 128 пациентов, проходивших стационарное обследование и лечение либо в связи с различными нарушениями ритма сердца (редкие пароксизмы атриовентри-

кулярной узловой реципрокной тахикардии, трепетания или фибрилляции предсердий), либо по поводу транзиторной артериальной гипертензии. При их обследовании ни в одном случае не было обнаружено признаков органического поражения миокарда, а также других соматических или неврологических заболеваний.

Критериями исключения из исследования являлись ишемическая болезнь сердца, стенокардия II–IV функционального класса, острый коронарный синдром (нестабильная стенокардия, острый инфаркт миокарда), злокачественная и рефрактерная артериальная гипертензия, хроническая сердечная недостаточность II–IV функционального класса (по NYHA), злокачественные желудочковые аритмии, почечная, печеночная недостаточность, онкологические заболевания, декомпенсация эндокринных патологий (сахарный диабет, тиреотоксикоз, гипотиреоз), невазовagalный генез синкопальных состояний, психические расстройства, алкоголизм, заболевания периферической и центральной нервной системы. От всех участников исследования было получено информированное согласие.

#### Генотипирование

Генотипирование было проведено для всех включенных в исследование индивидов. Геномную ДНК из периферической крови выделяли с использованием коммерческого набора QIAamp DNA BloodMiniKit (QIAGEN, Германия). Геномное типирование полиморфных участков rs2070744 в гене *NOS3*, rs1048101 в гене *ADRA1A*, rs1801253 в гене *ADRB1*, rs4680 в гене *COMT*, rs5751876 в гене *ADORA2A* и rs12465214, rs12621296, rs17582219, rs1344706 в области 2q32.1 проводили методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени с применением соответствующих коммерческих наборов TaqMan® SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems) по инструкциям производителя на приборе StepOnePlus™. Для подтверждения правильности анализа производили повторное генотипирование случайно выбранных проб в количестве 10% от исходной выборки. Все выбранные SNP имели частоту минорного аллеля не ниже 5%.

#### Статистический анализ результатов генотипирования

Оценку отклонения наблюдаемых частот генотипов от равновесия Харди–Вайнберга по критерию  $\chi^2$  проводили с помощью алгоритма максимизации математического ожидания (expectation

maximization, EM) с использованием программного обеспечения (ПО) Haploview 4.2 (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/index.php>).

Для сравнения в группах больных ВВО и здоровых индивидов частот носительства аллелей и генотипов отдельных полиморфных участков и их биаллельных сочетаний было использовано оригинальное ПО APSampler [12, 13]. APSampler использует метод Монте-Карло Марковскими цепями и Байесовскую непараметрическую статистику для выявления ассоциаций генотипа с фенотипическим признаком и проводит валидацию результатов на основании традиционного статистического подхода, для чего в комплекс включена программа, которая оценивает значимость ассоциаций каждого найденного основным алгоритмом аллеля/генотипа или их сочетания с признаком по значениям точного критерия Фишера, отношения шансов (ОШ) и его 95%-го доверительного интервала (ДИ). Применяется односторонний точный критерий, т.к. данное ПО при выявлении ассоциации указывает также и ее направление. Значимыми считали различия сравниваемых частот при значении  $p_f < 0.05$ , при условии, что значения 95%ДИ для ОШ не пересекают 1. Кроме того, для валидации полученных результатов APSampler использует пермутационный тест; значение  $p_{perm}$  для аллеля или аллельного сочетания определяется как вероятность того, что после сбалансированного перемешивания меток “больной” и “контроль” (100 пермутаций) и нового поиска с помощью APSampler оценка значимости ассоциации с заболеванием произвольно найденного аллеля или аллельного сочетания будет не хуже, чем исходная оценка. Значимыми считали величины  $p_{perm} < 0.05$ .

Найденные с помощью APSampler сочетания считали ассоциированными с заболеванием, если любой входящий в сочетание аллель/генотип характеризуется меньшей значимостью ассоциации, чем само сочетание. Исходя из представления о возможности аддитивного вклада компонентов сочетаний или же эпистатического взаимодействия между ними, оценивали их природу с помощью точного трехфакторного теста, подобного критерию Фишера (the exact three-way Fisher-like interaction numeric test, FLINT), и фактора синергии (ФС, synergy factor) [14], входящих в состав инструментов ПО APSampler. Взаимодействие компонентов сочетаний считали эпистатическим, если величина  $p_{FLINT}$  была менее 0.05, а значение 95%-ного ДИ для ФС не пересекало 1.



Таблица 1. Включенные в исследование полиморфные участки, их локализация и продукты близлежащих генов

| rs         | Ближайший(е) ген(ы)*                                           | Хромосомная локализация | Продукт гена(ов)                                             |
|------------|----------------------------------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------------------------------|
| rs17582219 | <i>LOC105373777</i>                                            | 2q32.1                  | нкРНК LOC105373777                                           |
| rs12621296 | <i>LOC105373777</i><br><i>LOC102724340</i>                     |                         | нкРНК LOC105373777<br>нкРНК LOC102724340                     |
| rs12465214 | <i>LOC102724340</i><br><i>LOC105373776</i><br><i>MIR548AE1</i> |                         | нкРНК LOC102724340<br>нкРНК LOC105373776<br>микроРНК 548ae-1 |
| rs1344706  | <i>ZNF804A</i>                                                 |                         | Белок цинкового пальца 804A                                  |
| rs2070744  | <i>NOS3 (eNOS)</i>                                             | 7q36.1                  | Синтаза оксида азота                                         |
| rs1048101  | <i>ADRA1A</i>                                                  | 8p21.2                  | Альфа 1A адренергический рецептор                            |
| rs1801253  | <i>ADRB1</i>                                                   | 10q25.3                 | Бета 1 адренергический рецептор                              |
| rs4680     | <i>COMT</i>                                                    | 22q11.21                | Катехол-О-метилтрансфераза                                   |
| rs5751876  | <i>ADORA2A</i>                                                 | 22q11.23                | Рецептор аденозина A2A                                       |

Примечание. нкРНК – некодирующая РНК, \* – гены выделены жирным шрифтом, если полиморфизм локализован непосредственно в гене.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для 175 неродственных больных ВВО и 200 индивидов контрольной группы проведено в настоящей работе или ранее [10, 11] генотипирование SNP, представленных в табл. 1. Это SNP, для которых мы ранее показали ассоциацию с ВВО; они локализованы в области генов, вовлеченных в нейрогуморальную передачу сигналов: rs104810 гена *ADRA1A*, rs1801253 гена *ADRB1*, rs5751876 гена *ADORA2A*, rs4680 гена *COMT*, rs2070744 гена *NOS3 (eNOS)* [10] (гены группы 1), и на хромосоме 2 в области 2q32.1: SNP

rs17582219, rs12621296, rs12465214 и rs1344706 [11] (гены группы 2).

Проведенный с использованием ПО Haploview 4.2 анализ не выявил отклонений от равновесия Харди–Вайнберга ( $p > 0.01$ ) для всех исследуемых SNP ни у пациентов с ВВО, ни в контрольной группе.

Полученные в настоящей работе данные по ассоциации с ВВО носительства отдельных аллелей и генотипов риска полиморфных участков генов группы 1 – *COMT*, *ADRA1A*, *ADORA2A* и

Таблица 2. Ассоциация с риском ВВО носительства аллелей и генотипов полиморфных участков генов, продукты которых участвуют в нейрогуморальной передаче сигналов (гены группы 1)

| Аллели/генотипы                | Данные настоящей работы<br>(175 больных ВВО и 200 контролей) |                                              | Данные из [10]<br>(157 больных ВВО и 161 контроль)** |                              |
|--------------------------------|--------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------|
|                                | Частота носительства,<br>случай/контроль                     | Величина $p$ ( $p_{perm}$ )*<br>[ОШ (95%ДИ)] | Частота носительства,<br>случай/контроль             | Величина $p$<br>[ОШ (95%ДИ)] |
| <i>COMT</i> *G<br>(G/G + A/G)  | 0.78/0.64                                                    | 0.0015 (0.018)<br>[2.04 (1.29–3.24)]         | 0.78/0.64                                            | 0.0050<br>[1.96 (1.2–3.22)]  |
| <i>ADRA1A</i> *G/G             | 0.63/0.49                                                    | 0.0041 (0.047)<br>[1.78(1.18–2.69)]          | 0.62/0.50                                            | 0.020<br>[1.64 (1.05–2.56)]  |
| <i>ADORA2A</i> *C/C            | 0.42/0.29                                                    | 0.0056<br>[1.78 (1.16–2.72)]                 | 0.41/0.30                                            | 0.0079<br>[1.83 (1.14–2.93)] |
| <i>ADRB1</i> *G<br>(G/G + C/G) | 0.69/0.57                                                    | 0.009<br>[1.70 (1.11–2.61)]                  | 0.68/0.58                                            | 0.027<br>[1.61 (1.02–2.55)]  |

Примечание. \* – в скобках представлены величины  $p_{perm}$ , если они достигают уровня значимости ( $<0.05$ ); \*\* – для сопоставления с данными настоящей работы результаты исследования [10] оценены с использованием одностороннего критерия Фишера.

**Таблица 3.** Результаты анализа эпистатических взаимодействий между компонентами ассоциированных с ВВО биаллельных сочетаний исследованных генов

| Биаллельные сочетания                                                                                                  | Частота носительства, случай/контроль | Величина $p$ ( $p_{\text{perm}}$ )*<br>[ОШ (95%ДИ)] | Величина $p_{\text{FLINT}}$<br>[ФС (95%ДИ)] |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| а) Совместное носительство вариантов генов, продукты которых участвуют в нейрогуморальной передаче сигналов (группа 1) |                                       |                                                     |                                             |
| <i>COMT</i> * <i>G</i> ( <i>G/G</i> + <i>A/G</i> ) + <i>ADORA2A</i> * <i>C/C</i>                                       | 0.33/0.15                             | 0.000032 (0.00041)<br>[2.78 (1.69–4.59)]            | НЗ                                          |
| <i>COMT</i> * <i>G</i> ( <i>G/G</i> + <i>A/G</i> ) + <i>NOS3</i> * <i>T</i> ( <i>T/T</i> + <i>C/T</i> )                | 0.73/0.56                             | 0.00031 (0.004)<br>[2.18 (1.40–3.37)]               | 0.043<br>[5.42 (1.16–25.4)]                 |
| <i>ADRA1A</i> * <i>A</i> ( <i>A/A</i> + <i>A/G</i> ) + <i>ADORA2A</i> * <i>T</i> ( <i>T/T</i> + <i>C/T</i> )           | 0.20/0.38                             | 0.00014 (0.002)<br>[0.42 (0.26–0.67)]               | НЗ                                          |
| б) Совместное носительство варианта гена группы 1 и варианта гена, локализованного в области 2q32.1 (группа 2)         |                                       |                                                     |                                             |
| <i>ADRA1A</i> * <i>G/G</i> + rs12465214* <i>A</i> ( <i>A/A</i> + <i>A/C</i> )                                          | 0.48/0.31                             | 0.0002 (0.0025)<br>[2.18 (1.43–3.32)]               | 0.01<br>[3.52 (1.42–8.74)]                  |
| <i>COMT</i> * <i>G</i> ( <i>G/G</i> + <i>A/G</i> ) + rs12465214* <i>A</i> ( <i>A/A</i> + <i>A/C</i> )                  | 0.52/0.32                             | 0.000051 (0.00066)<br>[2.33 (1.53–3.54)]            | НЗ                                          |
| <i>ADRA1A</i> * <i>A</i> ( <i>A/A</i> + <i>A/G</i> ) + rs17582219* <i>A</i> ( <i>A/A</i> + <i>A/G</i> )                | 0.29/0.47                             | 0.00024 (0.0030)<br>[0.46 (0.30–0.70)]              | 0.025<br>[0.16 (0.037–0.70)]                |
| <i>COMT</i> * <i>A/A</i> + rs17582219* <i>A</i> ( <i>A/A</i> + <i>A/G</i> )                                            | 0.16/0.34                             | 0.000026 (0.00034)<br>[0.36 (0.22–0.59)]            | 0.0053<br>[0.11 (0.023–0.53)]               |

Примечание. НЗ – не значимо; \* – в скобках после величины  $p$  представлены величины  $p_{\text{perm}}$ , если они достигают уровня значимости ( $<0.05$ ).

*ADRB1* (табл. 2) полностью подтвердили результаты, полученные нами ранее на меньшей выборке [10]. Увеличение размеров выборки больных со 157 до 175 человек и здоровых индивидов со 161 до 200 человек, не повлияв на частоты носительства найденных аллелей риска, привело к возрастанию уровня значимости ассоциаций. Значения  $p$  улучшились в диапазоне до почти 5-кратного, а результаты для вариантов генов *COMT* и *ADRA1A* стали выдерживать пермутационный тест.

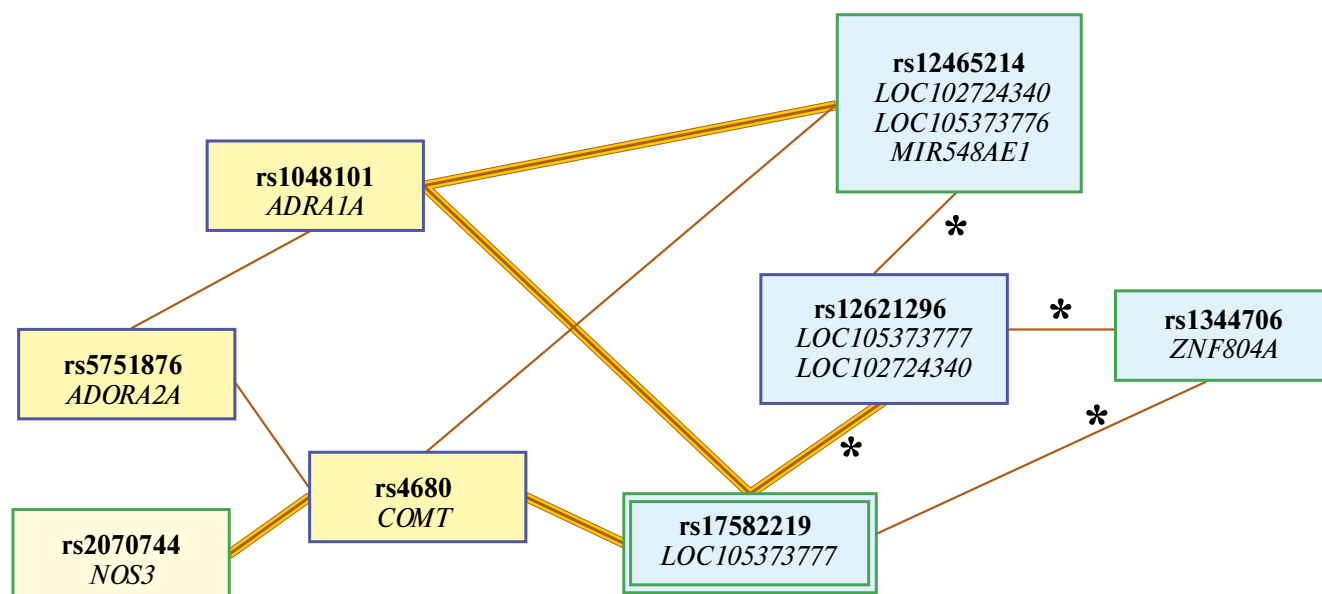
В табл. 3 представлены найденные с помощью мультилокусного анализа ассоциированные с ВВО биаллельные сочетания исследованных SNP и результаты оценки характера взаимодействий между компонентами этих сочетаний. Для сочетания *COMT*\**G* + *NOS3*\**T*, выявление которого в работе [10] позволило показать участие гена *NOS3* в формировании предрасположенности к ВВО, наблюдали эпистатический характер взаимодействия между компонентами:  $p_{\text{FLINT}} = 0.043$ ; ФС (95%ДИ) = 5.42 (1.16–25.4) (табл. 3, а).

Обнаружено четыре биаллельных сочетания, содержащие вариант гена, продукт которого

участвует в нейрогуморальной передаче сигналов (группа 1), совместно с вариантом, локализованным в области 2q32.1 (группа 2) (табл. 3, б). Аллель rs12465214\**A* входил в два сочетания, предрасполагающих к ВВО – одно с генотипом *ADRA1A*\**G/G* ( $p_{\text{perm}} = 0.0025$ , ОШ = 2.18, 95%ДИ: 1.43–3.32) и второе – с аллелем *COMT*\**G* ( $p_{\text{perm}} = 0.00066$ , ОШ = 2.33, 95%ДИ: 1.53–3.54). Аллель rs17582219\**A* был выявлен в составе двух протективных сочетаний с “зеркальными” вариантами тех же генов: с аллелем *ADRA1A*\**A* ( $p_{\text{perm}} = 0.003$ , ОШ = 0.46, 95%ДИ: 0.30–0.70) и с генотипом *COMT*\**A/A* ( $p_{\text{perm}} = 0.00034$ , ОШ = 0.36, 95%ДИ: 0.22–0.59). Эпистатическое взаимодействие наблюдалось между компонентами всех этих сочетаний, за исключением *COMT*\**G* + rs12465214\**A*.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Подход к анализу генетической предрасположенности к полигенным заболеваниям, основанный на анализе ассоциации признака с носительством сочетаний вариантов генов [15], показал свою высокую информативность благодаря повышению статистической мощности исследова-



**Рис. 1.** Схематическое изображение биаллельных сочетаний полиморфных участков различных генов, ассоциированных с ВВО. Каждое сочетание изображено в виде пары SNP как прямоугольники, соединенные оранжевыми линиями; тройные линии связывают компоненты эпистатических сочетаний, одинарные линии — компоненты сочетаний, эпистаза между которыми не обнаружено. Звездочка около линии означает, что сочетание описано в работе [11]. Желтые прямоугольники — SNP в генах, продукты которых участвуют в нейрогуморальной регуляции (группа 1), голубые — SNP, расположенные на хромосоме 2 в локусе 2q32.1 (группа 2). В зеленой рамке — SNP, ассоциация которых с ВВО была показана только в составе сочетаний, в синей рамке — еще и в одиночку.

ния [12]. Использование мультилокусного анализа, реализованного в ПО APSampler, позволяет выявлять сочетанные ассоциации вариантов нескольких генов благодаря кумулятивному эффекту между аллелями этих генов и вычленять из числа сочетаний те, компоненты которых эпистатически взаимодействуют между собой. Этот подход был применен нами ранее при анализе ассоциации с ВВО SNP в составе генов, продукты которых участвуют в нейрогуморальной передаче сигналов [10], а также SNP в области 2q32.1 [11]. В обеих работах он позволил пополнить список генов, вовлеченных в развитие ВВО, за счет генов, ассоциацию которых с заболеванием выявляли только в составе сочетаний.

В настоящем исследовании на выборке больных ВВО и здоровых контролей, для которой ранее исследовали ассоциацию с ВВО биаллельных сочетаний генов группы 2 [11], анализировали взаимодействие генов обеих групп. Для этого SNP группы 1 были протипированы у всех индивидов, включенных в анализ генов группы 2. Увеличение размеров выборок, использованных в работе [10] (157 больных и 161 контролей), до 175 больных и 200 контролей не отразилось на частотах носительства найденных аллелей риска

и привело, согласно данным табл. 2, к возрастанию уровня значимости для всех четырех ассоциированных с ВВО вариантов генов группы 1 (величина  $p$  уменьшилась в диапазоне от 1.41 до 4.88 раз). Для анализа причин, приведших к такому изменению значений  $p$ , мы оценили статистическую мощность выявления ассоциации этих вариантов в обеих выборках при использовании точного одностороннего критерия Фишера. Изменения мощности исследования оказались достаточными для объяснения полученных результатов. Так, для носительства аллеля *COMT*\**G*, который при увеличении размера выборки характеризуется возрастанием уровня значимости в 3.3 раза, статистическая мощность возросла с 0.75 до 0.90.

На рис. 1 представлено схематическое изображение 11 ассоциированных с ВВО биаллельных сочетаний полиморфных участков исследованных нами генов, из которых 5 оказались эпистатическими. В 4 из 5 выявленных эпистатических взаимодействий вовлечены SNP группы 2 — rs17582219, rs12621296 и rs12465214 на хромосоме 2, продуктами ближайших генов которых являются неохарактеризованные некодирующие РНК (нкРНК) LOC105373777, LOC102724340

и LOC105373776; rs12465214 локализован еще и рядом с геном *MIR548AE1*, кодирующим микроРНК 548ae-1 (см. табл. 1). Между этими тремя SNP выявлено значительное сцепление ( $D' < 1$ ,  $LOD > 2$ ) [11]. Эти данные могут указывать на вовлечение в развитие ВВО перечисленных некодирующих генов.

SNP rs1344706, локализованный в интроне 2 гена *ZNF804A*, не входит ни в одно из эпистатических сочетаний. Согласно [11], этот участок очень слабо сцеплен с rs12465214 ( $D' < 1$ ,  $LOD < 2$ ), а с rs17582219 и rs12621296 его сцепления не наблюдалось. Напротив, rs17582219 ассоциирован с ВВО в составе трех эпистатических пар, что может указывать на центральную роль гена *LOC105373777* в наблюдаемых взаимодействиях.

Мы обнаружили единственное эпистатическое сочетание *COMT*\*G + *NOS3*\*T, включающее два белок-кодирующих гена, продукты которых участвуют в нейрогуморальной передаче сигналов (группа 1). Это сочетание предрасполагает к развитию ВВО (см. табл. 3а); согласно [9], наличие эпистаза между его компонентами скорее всего связано со свойствами этих конкретных аллелей, а не локусов в целом.

Продукт гена *COMT* — фермент катехол-О-метил-трансфераза — участвует в метаболизме адреналина и норадреналина [16]. У носителей аллеля rs4680 *COMT*\*G (Val158) повышена активность катехол-О-метилтрансферазы [17], что может вследствие распада катехоламинов приводить к уменьшению активации адренорецепторов и, как следствие, к снижению АД и ЧСС. Продукт гена *NOS3* — эндотелиальная синтаза оксида азота (eNOS) — участвует в синтезе одного из основных вазодилататоров — оксида азота NO [18]. У носителей аллеля rs2070744 *NOS3*\*T наблюдается повышенная экспрессия гена [19] и более высокий уровень NO в плазме крови [20], что способствует вазодилатации и снижению АД. В хорошем соответствии с данными литературы, мы показали, что аллель rs4680 *COMT*\*G является фактором риска ВВО (см. табл. 2), однако значимых ассоциаций ВВО с носительством аллеля rs2070744 *NOS3*\*T поодиночке мы не наблюдали. В то же время, присутствующие в обнаруженном нами предрасполагающем сочетании *COMT*\*G + *NOS3*\*T аллели не только оказывают однонаправленное влияние на ключевые звенья патогенеза ВВО — снижение тонуса сосудов, ЧСС и АД, но и, согласно нашим данным, находятся в эпистатическом взаимодействии.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что ВВО имеет четкую генетическую архитектуру, подтверждая заключение, сделанное для объединенной группы синкопе и коллапса [8], однако два списка ассоциированных SNP пересекаются только для rs12465214, локализованного в области 2q32.1. При этом мы наблюдали существенный вклад эпистаза между выбранными нами кандидатными генами в развитие ВВО. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы установить, распространяется ли это положение на другие гены, участвующие в формировании генетической предрасположенности к ВВО. Привлекательно предположить, что гены некодирующих РНК, локализованные на хромосоме 2, прямо или опосредованно (через каскады взаимодействий) участвуют в регуляции активности генов, образующих с ними эпистатические пары.

Исследование выполнено в рамках Государственного задания ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. академика Е.И. Чазова” Минздрава России (№ 121031300196-1).

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. Brignole M., Moya A., de Lange F.J. et al. ESC Scientific Document Group. 2018 ESC Guidelines for the diagnosis and management of syncope // European Heart J. 2018. Vol. 39. P. 1883–1948. <https://doi.org/10.5603/KP.2018.0161>
2. Brignole M., Moya A., de Lange F.J. et al. Рекомендации ЕОК по диагностике и лечению синкопальных состояний 2018 // Росс. кардиол. журнал. 2019. Т. 24. № 7. С. 130–194. <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2019-7-130-194>
3. Buszko K., Kujawski S., Newton J.L., Zalewski P. Hemodynamic response to the head-up tilt test in patients with syncope as a predictor of the test outcome: A meta-analysis

- approach // *Front. Physiology*. 2019. V. 10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00184>
4. Dockx K., Avau B., De Buck E. et al. Physical manoeuvres as a preventive intervention to manage vasovagal syncope: A systematic review // *PLoS One*. 2019. V. 14. № 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212012>
  5. Matveeva N., Titov B., Bazyleva E. et al. Towards understanding the genetic nature of vasovagal syncope // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 19. <https://doi.org/10.3390/ijms221910316>
  6. Benditt D.G., van Dijk J.G., Krishnappa D. et al. Neurohormones in the Pathophysiology of Vasovagal Syncope in Adults // *Front. Cardiovascular Med.* 2020. V. 7. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00076>
  7. Hadji-Turdeghal K., Andreassen L., Hagen C.M. et al. Genome-wide association study identifies locus at chromosome 2q32.1 associated with syncope and collapse // *Cardiovascular Res.* 2020. V. 116. № 1. P. 138–148. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz106>
  8. Aegisdottir H.M., Thorolfsdottir R.B., Sveinbjornsson G. et al. Genetic variants associated with syncope implicate neural and autonomic processes // *European Heart J.* 2023. V. 44. № 12. P. 1070–1080. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehad016>
  9. Phillips P.C. Epistasis—the essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems // *Nat. Rev. Genetics*. 2008. V. 9. № 11. P. 855–867. <https://doi.org/10.1038/nrg2452>
  10. Titov B., Matveeva N., Kulakova O. et al. Vasovagal syncope Is associated with variants in genes involved in neurohumoral signaling pathways // *Genes (Basel)*. 2022. V. 13. № 9. <https://doi.org/10.3390/genes13091653>
  11. Матвеева Н.А., Титов Б.Б., Базылева Е.А. и др. Ассоциация полиморфных вариантов генома в области 2q32.1 с развитием вазовагальных обмороков // *Мол. биология*. Т. 57. № 5. С. 827 – 832.
  12. Favorov A.V., Andreewski T.V., Sudomoina M.A. et al. A Markov chain Monte Carlo technique for identification of combinations of allelic variants underlying complex diseases in humans // *Genetics*. 2005. V. 171. P. 2113–2121. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.048090>
  13. APSampler. — URL: <http://apsampler.sourceforge.net/>
  14. Barsova R.M., Lvovs D., Titov B.V. et al. Variants of the coagulation and inflammation genes area replicably associated with myocardial infarction and epistatically interact in Russians // *PLoS One*. 2015. V. 10. № 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144190>
  15. Lvovs D., Фаворова О.О., Фаворов А.В. Полигенный подход к исследованиям полигенных заболеваний // *Acta Naturae*. 2012. Т. 4. № 3 (14). С. 62–75 <https://doi.org/10.32607/20758251-2012-4-3-59-71>
  16. Benarroch E.E. The autonomic nervous system: Basic anatomy and physiology // *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*. 2007. V. 13. P. 13–32. <https://doi.org/10.1212/01.CON.0000299964.20642.9a>
  17. Chen J., Lipska B.K., Halim N. et al. Functional analysis of genetic variation in catechol-O-methyltransferase (COMT): Effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain // *Am. J. Human Genetics*. 2004. V. 75. № 5. P. 807–821. <https://doi.org/10.1086/425589>
  18. Vanhoutte P.M. Nitric oxide: From Good to bad // *Ann. Vasc. Diseases*. 2018. V. 1. № 1. P. 41–51. <https://doi.org/10.3400/avd.ra.17-00134>
  19. Augeri A.L., Tsongalis G.J., Van Heest J.L. et al. The endothelial nitric oxide synthase –786 T > C polymorphism and the exercise-induced blood pressure and nitric oxide responses among men with elevated blood pressure // *Atherosclerosis*. 2009. V. 204. № 2. P. e28–34. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.12.015>
  20. Ikenouchi-Sugita A., Yoshimura R., Kishi T. et al. Three polymorphisms of the eNOS gene and plasma levels of metabolites of nitric oxide in depressed Japanese patients: A preliminary report // *Human Psychopharmacology*. 2011. V. 26. № 7. P.531–534. <https://doi.org/10.1002/hup.1239>

## SEARCH FOR EPISTATICALLY INTERACTING GENETIC VARIANTS THAT ARE ASSOCIATED WITH VASOVAGAL SYNCOPE WITHIN BIALLELIC COMBINATIONS

**B. V. Titov<sup>1,2</sup>, N. F. Matveeva<sup>1,2</sup>, E. A. Bazyleva<sup>1</sup>, A. V. Pevzner<sup>1</sup>, O. O. Favorova<sup>1,2,\*</sup>**

<sup>1</sup>*Chazov National Medical Research Center of Cardiology, Moscow, 121552 Russia*

<sup>2</sup>*Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997 Russia*

*\*e-mail: olga.favorova@gmail.com*

The most common cause of transient loss of consciousness is vasovagal syncope (VVS), which occurs due to hypoperfusion of the brain due to the interruption of vegetative blood circulation control leading to arterial hypotension. It is known that there is a genetic predisposition to VVS, but the data on the role of individual genes are quite inconsistent. Using APSampler software, which based on a Markov chain Monte Carlo technique and Bayesian nonparametric statistics, we identified biallelic combinations associated with VVS and investigated the nature of interaction between their components. We used the previously obtained results of genomic typing of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of 5 genes, the products of which are involved in neurohumoral regulation, and 4 SNPs within locus 2q32.1, supplemented with data for new individuals included in the study. The total sample included 175 patients with a confirmed diagnosis of VVS and 200 control individuals without a history of syncope. Eleven pairwise combinations of SNPs of different genes were found to be associated with VVS. Five of these combinations were epistatic, four of which included SNPs at the 2q32.1 locus located within or near noncoding RNA genes. It is suggested that genes of noncoding RNAs localized on chromosome 2 may directly or indirectly (through cascades of interactions) participate in the regulation of the activity of genes forming epistatic combinations with them.

**Keywords:** genetic polymorphism, epistatic interaction, genetic predisposition, syncope, vasovagal syncope.

УДК616-006.6

## ЭКЗОСОМАЛЬНЫЕ микроРНК-146а И микроРНК-424 КАК ВОЗМОЖНЫЕ ПРЕДИКТОРЫ ОТВЕТА НА ТЕРАПИЮ ИНГИБИТОРАМИ ИММУННЫХ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК ПРИ СВЕТЛОКЛЕТОЧНОЙ ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЕ

© 2024 г. Д. Д. Асадуллина<sup>1,2,\*</sup>, И. Р. Гилязова<sup>1,2,\*\*</sup>, Е. А. Иванова<sup>1</sup>, С. М. Измайлова<sup>2</sup>,  
Г. Р. Гилязова<sup>2</sup>, В. Н. Павлов<sup>2</sup>, Э. К. Хуснутдинова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия

<sup>2</sup>Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, 450008 Россия

\*e-mail: dilara.asadullina@yandex.ru

\*\*e-mail: gilyasova\_irina@mail.ru

Поступила в редакцию 12.09.2023 г.

После доработки 03.10.2023 г.

Принята к публикации 06.10.2023 г.

Светлоклеточная почечно-клеточная карцинома (скПКК) — злокачественная опухоль почки с плохим прогнозом и трудно поддающаяся лечению. Несмотря на значительные успехи в лечении скПКК, ингибиторы контрольных точек иммунного ответа (ИКТИ) все еще имеют ограниченную терапевтическую эффективность. Все больше работ показывают, что экзосомальные микроРНК являются ключевыми модуляторами опухолевой сигнализации и детерминантами опухолевого микроокружения. Нарушение регуляции микроРНК может влиять на иммуногенность рака и ответ на терапию ИКТИ, что делает их привлекательными для использования в качестве прогностических молекулярно-генетических биомаркеров. Мы оценили уровень экспрессии экзосомальных микроРНК (микроРНК-424, -146а, -503, -144) до и после терапии ИКТИ в образцах плазмы, полученных от 42 больных со скПКК. Анализ экспрессии проводили методом ПЦР в режиме реального времени. Результаты показали, что уровни экспрессии микроРНК-424 и микроРНК-146а были повышены после терапии ИКТИ (микроРНК-424 = Mean  $\pm$  SEM  $1.202 \pm 0.15$  и микроРНК-146а =  $12.22 \pm 1.45$ ) по сравнению с уровнями экспрессии до терапии (микроРНК-424 = Mean  $\pm$  SEM  $0.63 \pm 0.17$ ;  $p$ -value = 0.03 и микроРНК-146а =  $7.03 \pm 0.90$ ;  $p$ -value = 0.006). МикроРНК-424 и микроРНК-146а могут быть использованы для создания панели молекулярных маркеров для оценки эффективности терапии ингибиторами иммунных контрольных точек. Несмотря на то что полученные данные являются весьма предварительными и требуют дальнейшего изучения на более крупной выборке, они еще больше повышают интерес к использованию микроРНК в качестве дополнительных маркеров терапии ИКТИ, способных модулировать иммунную толерантность.

**Ключевые слова:** ингибиторы контрольных точек иммунитета, резистентность, экзосомальные микроРНК, прогностические маркеры; почечно-клеточная карцинома.

**DOI:** 10.31857/S001667582403107 **EDN:** DOGQTN

В последние годы произошла существенная эволюция в терапии рака, направленная главным образом на применение иммунотерапевтических подходов, заменяющих классические методы лечения, такие как химиотерапия, лучевая терапия и хирургия, или в сочетании с ними [1]. Ингибиторы контрольных точек иммунитета (ИКТИ) являются хорошо зарекомендовавшими себя высокоэффективными препаратами для лечения различных видов рака, включая светлоклеточную почечно-клеточную карциному (скПКК). Несмотря на прогресс и беспрецедент-

ные достижения в области иммунотерапии рака, резистентность остается серьезной клинической проблемой [2, 3].

Некодирующие РНК в последние несколько лет стали ключевыми игроками в эпигенетической регуляции генов, среди них микроРНК (miRNAs) широко изучаются на предмет их потенциальной роли в регуляции различных клеточных процессов в норме и патологии. МикроРНК — это некодирующие РНК длиной около 22 нуклеотидов, которые являются пост-

**Таблица 1.** Анализ экспрессии экзосомных микроРНК

| МикроРНК | До терапии ИКТИ (Mean $\pm$ SEM) | После терапии ИКТИ (Mean $\pm$ SEM) | <i>p</i> -value |
|----------|----------------------------------|-------------------------------------|-----------------|
| 146a     | 7.03 $\pm$ 0.90                  | 12.22 $\pm$ 1.45                    | <b>0.006</b>    |
| 424      | 0.63 $\pm$ 0.17                  | 1.202 $\pm$ 0.15                    | <b>0.03</b>     |
| 503      | 0.77 $\pm$ 0.05                  | 0.71 $\pm$ 0.05                     | 0.18            |
| 144      | 2.42 $\pm$ 0.46                  | 2.58 $\pm$ 0.65                     | 0.668           |

Примечание. Полужирным шрифтом даны статистически значимые результаты.

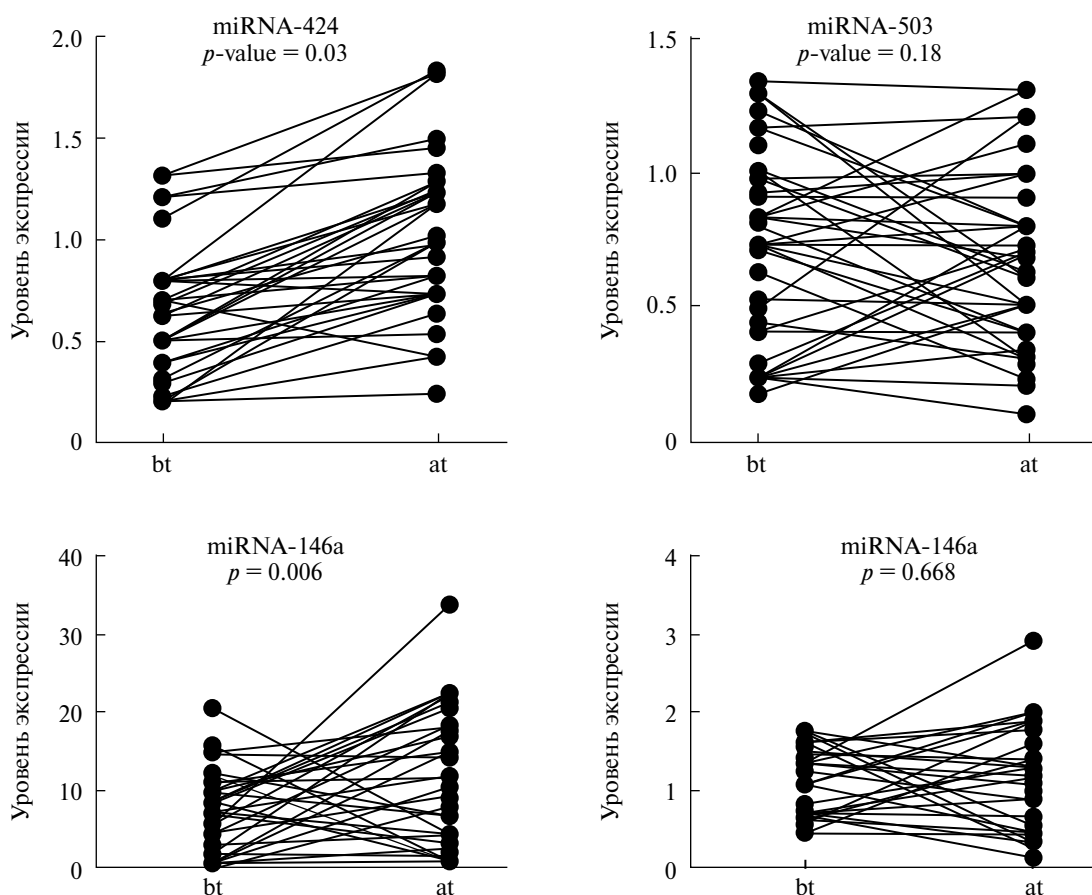
транскрипционными регуляторами экспрессии генов [4]. Способность микроРНК ингибировать трансляцию онкогенов и опухолевых супрессоров предполагает их участие в канцерогенезе [5–7]. Предыдущие исследования показали, что микроРНК стабильны в плазме или сыворотках крови, тканеспецифичны и имеют прогностическую клиническую ценность в качестве биомаркеров [8, 9].

Цель данного исследования – оценка профиля экспрессии экзосомальных микроРНК (микроРНК-424, -146a, -503, -144) у пациентов

со светлоклеточной почечно-клеточной карциномой до и после терапии ингибиторами контрольных точек иммунного ответа для поиска дополнительных биомаркеров эффективности иммунотерапии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 42 пациента с гистологически подтвержденным диагнозом “светлоклеточная почечно-клеточная карцинома”, получавших терапию ингибиторами контрольных точек иммунного ответа в период



**Рис. 1.** Уровни экспрессии экзосомальных микроРНК у пациентов с скПМК, получавших терапию ИКТИ. *a* – miRNA-424; *б* – miRNA-503; *в* – miRNA-146a; *г* – miRNA-144. Уровень значимости *p*-value рассчитывался с использованием критерия Вилкоксона. bt – до терапии; at – после терапии.



с 2020 по 2023 г., проживающих на территории Республики Башкортостан. Забор образцов венозной крови у пациентов до и после терапии осуществлялся сотрудниками Республиканского клинического онкологического диспансера, отделения онкологии и урологии клиники Башкирского государственного медицинского университета. От каждого пациента было получено информированное согласие на забор биологического материала и проведение молекулярно-генетического исследования.

Выделение экзосомальных микроРНК из 1 мл плазмы крови, синтез кДНК и количественную ПЦР в реальном времени проводили, как описано ранее [10] с использованием соответствующих наборов miRCURY LNA (Qiagen, Hilden, Германия) на приборе для ПЦР в реальном времени Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden). МикроРНК-16 и микроРНК-1228 были использованы в качестве референсных генов (эндогенный контроль), а UniSp2, UniSp4, UniSp5, UniSp6 и синтетическая микроРНК-39 – в качестве экзогенных контролей выделения, обратной транскрипции и амплификации, входящих в состав наборов (Qiagen, Hilden). Уровень экзосомальных микроРНК оценивали методом  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ экспрессии был проведен с помощью количественной ПЦР в реальном времени. Наблюдалась статистически значимая дисрегуляция экспрессии экзосомальных микроРНК-424 и микроРНК-146а. Уровни экспрессии микроРНК увеличились после терапии (микроРНК-424 = Mean  $\pm$  SEM 1.202  $\pm$  0.15 и микроРНК-146а = 12.22  $\pm$  1.45) по сравнению с уровнями до терапии (микроРНК-424 = Mean  $\pm$  SEM 0.63  $\pm$  0.17;  $p$ -value = 0.03 и микроРНК-146а = 7.03  $\pm$  0.90;  $p$ -value = 0.006). Остальные микроРНК не продемонстрировали существенных различий в уровнях экспрессии микроРНК между двумя группами ( $p$ -value > 0.05) (рис. 1,  $a-g$ ; табл. 1).

Целевые микроРНК обладают широким спектром биологических функций. Было обнаружено, что многие из изученных генов – функциональные, тесно связанные с ПКК и иммунитетом. Анализ KEGG-путей показал, что микроРНК-424 и микроРНК-146а были значительно обогащены в нескольких путях (табл. 2, рис. 2).

Для оценки участия валидированных генов-мишеней микроРНК-424 и микроРНК-146а в соответствующих сигнальных путях, разви-

Таблица 2. Анализ путей обогащения KEGG для экзосомальных микроРНК-146а и микроРНК-424

| FDR                   | Число генов-мишеней | Число генов сигнального пути | Название сигнального пути                                        |
|-----------------------|---------------------|------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| 2.9 *10 <sup>-8</sup> | 5                   | 89                           | Экспрессия PD-L1 и сигнальный путь контрольных точек в онкологии |
| 4.8*10 <sup>-7</sup>  | 4                   | 76                           | Коклюш                                                           |
| 1.1*10 <sup>-6</sup>  | 4                   | 101                          | Болезнь Шагаса                                                   |
| 2.5*10 <sup>-5</sup>  | 3                   | 76                           | Лейшманиоз                                                       |
| 1.1*10 <sup>-6</sup>  | 4                   | 103                          | Сигнальный путь Toll-подобных рецепторов                         |
| 1.1*10 <sup>-6</sup>  | 4                   | 104                          | Сигнальный путь NF-каппа В                                       |
| 1.4*10 <sup>-7</sup>  | 5                   | 139                          | Корь                                                             |
| 1.4*10 <sup>-6</sup>  | 4                   | 112                          | Токсоплазмоз                                                     |
| 1.9*10 <sup>-7</sup>  | 5                   | 161                          | Гепатит В                                                        |
| 2.8*10 <sup>-6</sup>  | 4                   | 137                          | Иерсиниозная инфекция                                            |
| 2.9*10 <sup>-6</sup>  | 4                   | 141                          | Алкогольная болезнь печени                                       |
| 2.4*10 <sup>-7</sup>  | 5                   | 179                          | Туберкулез                                                       |
| 6.7*10 <sup>-5</sup>  | 3                   | 109                          | Сигнальный путь NIF-1                                            |
| 4.4*10 <sup>-7</sup>  | 5                   | 210                          | Инфекция вируса иммунодефицита человека 1                        |
| 1.0*10 <sup>-5</sup>  | 4                   | 197                          | Инфекция патогенной кишечной палочки                             |
| 1.0*10 <sup>-5</sup>  | 4                   | 202                          | Инфекция вируса Эпштейна-Барр                                    |
| 1.2*10 <sup>-5</sup>  | 4                   | 214                          | Липиды и атеросклероз                                            |
| 1.6*10 <sup>-5</sup>  | 4                   | 232                          | Коронавирусная инфекция                                          |
| 2.0*10 <sup>-5</sup>  | 4                   | 249                          | Инфекция сальмонелл                                              |
| 3.4*10 <sup>-5</sup>  | 4                   | 294                          | Сигнальный путь MAPK                                             |

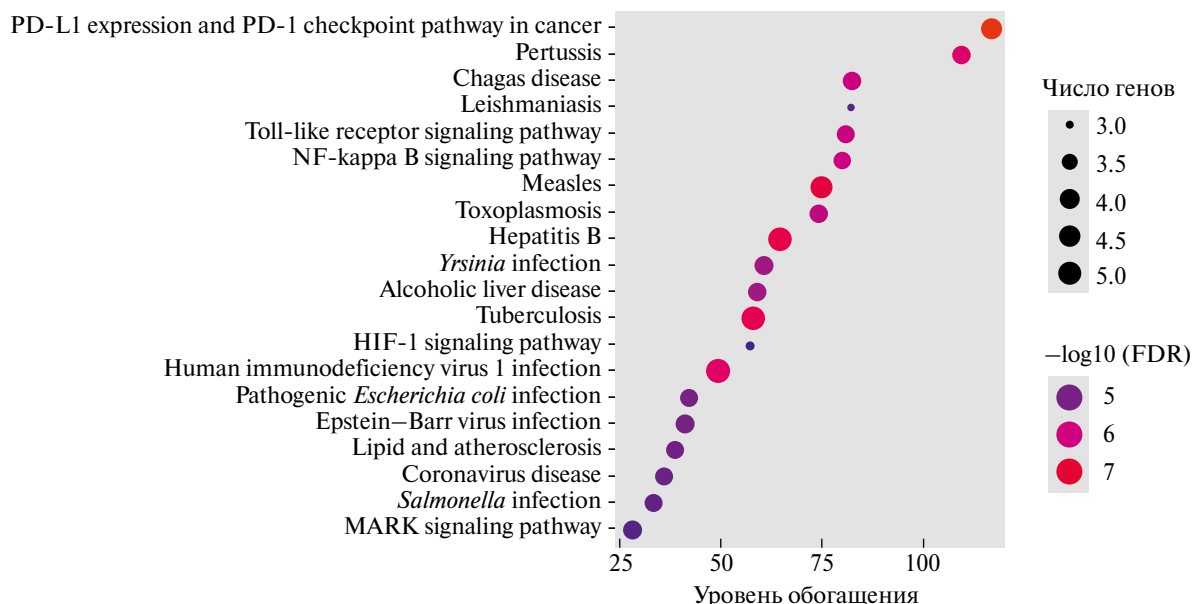


Рис. 2. Анализ обогащения сигнальных путей GO и диаграмма, отражающая результаты анализа обогащения KEGG-путей, проведенного для микроРНК-146а и микроРНК-424 и их валидированных мишеней.

вающих иммуновоспалительные реакции при раке, был проведен анализ Gene Ontology (GO) (рис. 3).

Для оценки диагностической точности экзосомальных микроРНК как маркеров эффективности терапии ИКТИ были построены ROC-кривые. Результаты показали, что площадь под кривой (AUC) микроРНК-424 составляет 0.804 (95% ДИ: 0.7082–0.9006) и обеспечивает 73.8% специфичности и 88.1% чувствительности; диагностическая точность микроРНК-424 выше, чем у комбинации микроРНК (рис. 4).

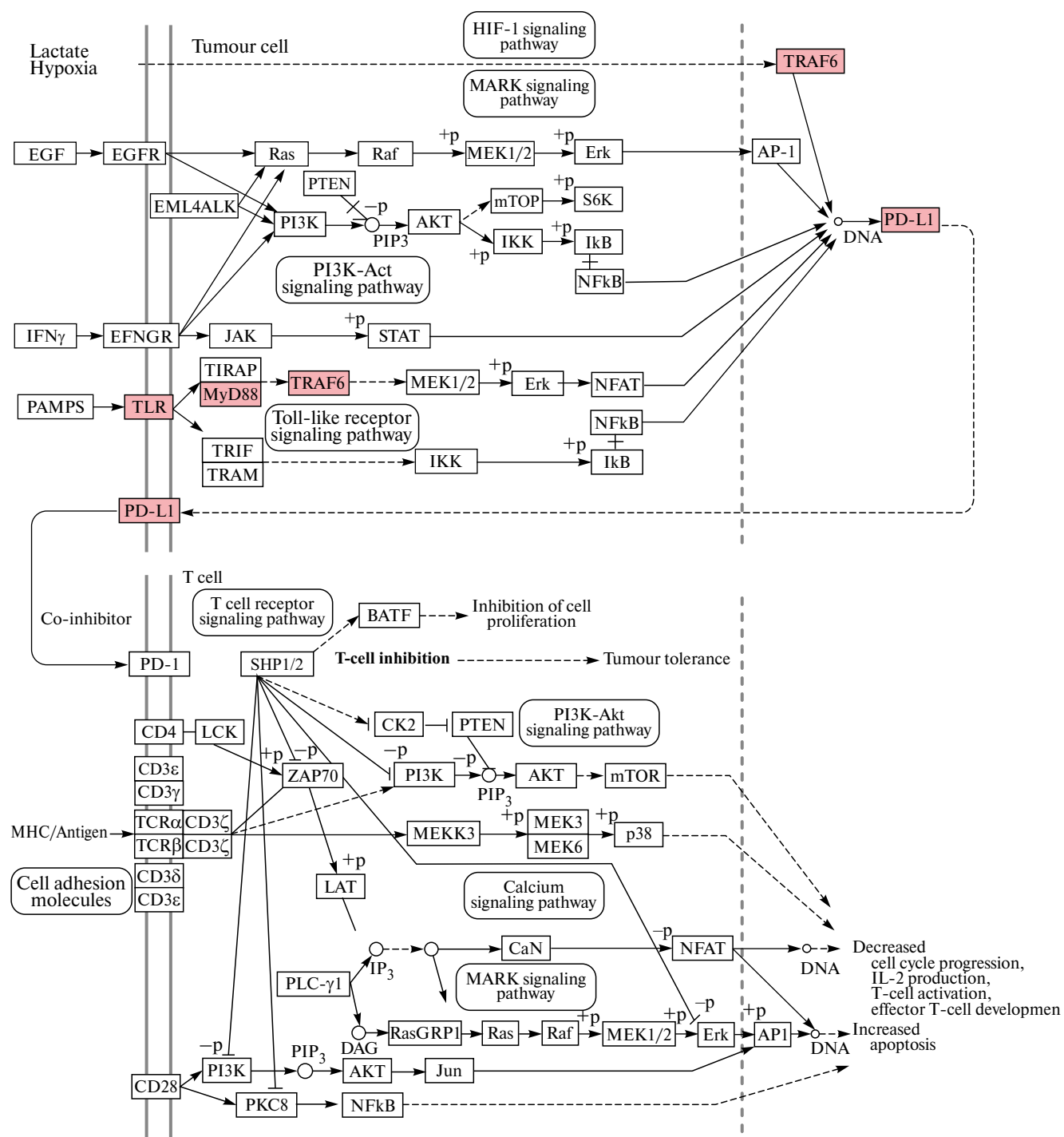
## ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на то что иммунотерапия высокоэффективна при многих видах рака на поздних стадиях, часть пациентов остается резистентной к терапии или вынуждена отменить терапию из-за тяжелых побочных эффектов, связанных с иммунитетом. Ввиду того, что для назначения иммунотерапии используется опухолевая (тканевая) экспрессия PD-L, которая не является специфичным и точным маркером, существует острая потребность в более достоверных биомаркерах для прогнозирования ответа на иммунотерапию, что позволит избирательно стратифицировать пациентов. Экспрессия микроРНК у пациентов, получавших иммунотерапию, и потенциальная роль микроРНК в реакции пациентов на терапию — на сегодняшний день актуаль-

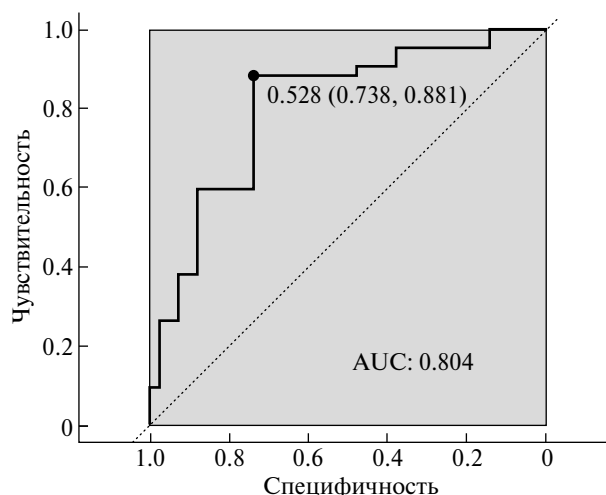
ная тема для исследования. Работы по изучению профиля экспрессии экзосомальных микроРНК у пациентов с скПМК, получающих терапию ИКТИ, представлены единичными исследованиями, что требует более детального изучения роли микроРНК в прогнозировании эффективности терапии ИКТИ.

В исследовании Z. Wang с соавт. сообщалось, что циркулирующая микроРНК-21 функционирует как неинвазивный прогностический биомаркер ответа при иммунотерапии рака [11]. L. Chen с соавт. [12] продемонстрировали, что микроРНК-200 ингибирует PD-L1, предотвращая эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) и метастазирование при раке легких. Известно, что p53 регулирует PD-L1 с помощью микроРНК-34a [13], которая непосредственно связывается с 3'-нетранслируемой областью PD-L1 при немелкоклеточном раке легкого (НМРЛ), подавляя экспрессию PD-L1.

Лекарственная устойчивость — одна из наиболее значимых проблем в клинической практике. Было показано, что потеря микроРНК-424(322)/503 способствует развитию химиорезистентности за счет регуляции двух ее мишеней — регулятора апоптоза *BCL-2* и рецептора инсулиноподобного фактора роста-1 *IGF1R*, а таргетная терапия, блокирующая aberrantную активность этих мишеней, восстанавливает чувствительность к химиотерапии [14].



**Рис. 3.** Сигнальный путь экспрессии PD-L1 и контрольных точек PD-1, включая валидированные гены-мишени микроРНК-146а и микроРНК-424 (выделены красным цветом), согласно базе данных KEGG.



**Рис. 4.** ROC-анализ для прогнозирования ответа на терапию ИКТИ при скПМК на основе анализа экспрессии экзосомальной микроРНК-424.

Имеются данные, что микроРНК-424 участвует в формировании лекарственной устойчивости больных раком желудка, получающих химиотерапию препаратами платины. Одним из генов-мишеней микроРНК-424 является *SMURF1*, который участвует в убиквитиназной активности. У пациентов, резистентных к цисплатину, снижение экспрессии микроРНК-424 увеличивало экспрессию гена E3-убиквитин-протеинлигазы *SMURF1*, а также стимулировало экспрессию гена члена семейства гомологов Ras A *RHOA*, который играет роль в лекарственной устойчивости [15]. В другом исследовании было показано, что снижение экспрессии микроРНК-424-3р препятствует увеличению экспрессии гена *ABCC2*, кодирующего белок 2, связанного с множественной лекарственной устойчивостью, и приводит к лекарственной устойчивости и прогрессии опухоли, а противоположные результаты были получены Y. Li с соавт., которые показали, что как *in vivo*, так и *in vitro* сверхэкспрессия микроРНК-424-3р играет важную роль в устойчивости клеток рака желудка к цисплатину [16]. Известно, что гипоксия индуцирует экспрессию микроРНК-424, а сверхэкспрессия этой микроРНК подавляет опухолевый супрессор *PDCD4*, участвующий в апоптозе. В исследовании D. Zhang с соавт. снижение регуляции микроРНК-424 повышало гибель клеток под воздействием доксорубина, обусловленную усилением апоптоза [17].

В другом исследовании стимуляция экспрессии микроРНК-424-3р способствовала сенситизации клеток рака яичников к цисплатину

за счет снижения экспрессии белка галектина-3, кодируемого геном *LGALS3* [18]. Также был идентифицирован ряд микроРНК (микроРНК-34a, -34b, -187, -199a, -199b, -146a, -15b, -130a, -214, и -424), которые дифференциально экспрессируются при лечении доксорубином. Исследование биологической значимости идентифицированных микроРНК выявило взаимосвязь с функцией кардиомиоцитов и кардиотоксичностью, что позволит в дальнейшем использовать определенные сигнатуры микроРНК в качестве потенциальных биомаркеров лекарственно-индуцированной кардиотоксичности [19].

Известно, что в формировании лекарственной резистентности при остеосаркоме большую роль играет длинная некодирующая РНК (lncRNA) *LINC01116*, которая ингибирует экспрессию микроРНК-424-5р, связываясь с геном *EZH2*, кодирующим гистон-лизин-N-метилтрансферазу, и тем самым повышает устойчивость клеток остеосаркомы к доксорубину [20]. В. Ralla с соавт. исследовали роль микроРНК-9-5р в резистентности к другой группе препаратов, ингибиторам тирозинкиназ (ИТК), в сравнении с другими клиническими признаками (возраст, пол, стадия опухоли, статус метастазирования и др). Сверхэкспрессия микроРНК-9-5р и пониженная экспрессия микроРНК-489-3р были ассоциированы с отсутствием ответа на терапию ИТК у пациентов с метастатической ПКК [21]. В другом исследовании, проведенном A. Gamez-Pozo с соавт., изучалась прогностическая способность моделей, включающих экспрессию микроРНК, в отношении резистентности к терапии сунитинибом. При сравнении таких моделей с классификацией риска MSKCC для прогнозирования общей выживаемости модель, включающая микроРНК-192, -193-3р и -501-3р, показала хорошую способность выявлять пациентов с плохим ответом на терапию и хорошую точность прогнозирования общей выживаемости [22]. По данным исследования, проведенного J. Kovacova и соавт., микроРНК-376b-3р может быть использована для прогнозирования ответа на терапию сунитинибом при метастатических опухолях [23].

J. He с соавт. [24] предположили, что микроРНК-31-5р, транспортируемая внеклеточными везикулами, участвует в развитии резистентности к мультитаргетному рецептору тирозинкиназ сорафенибу. Y. Liu с соавт. исследовали систему доставки лекарственных средств в виде нановезикул, нагруженных комбинацией анти PD-L1 и микроРНК-424. Эти нановезикулы активиро-

вали Т-клетки, которые высвобождали большое количество цитокинов, таких как IFN- $\gamma$  и IL-2, для активации макрофагов и NK-клеток, что способствовало ингибированию роста подкожно трансплантированной гепатоцеллюлярной карциномы у мышей [25].

Во многих исследованиях микроРНК-146а рассматривается как негативный регулятор иммунной активации, сопоставимый с молекулами иммунных чекпоинтов. Известно, что микроРНК-146а играет центральную роль в оси STAT1/IFN $\gamma$  в микроокружении меланомы, влияя на миграцию, пролиферацию, функцию митохондрий и уровень PD-L1 [26]. Установлено, что при снижении экспрессии микроРНК-146а развиваются заметно более тяжелые иммуноопосредованные нежелательные явления (иоНЯ). А полиморфный вариант (SNP) rs2910164, приводящий к снижению экспрессии микроРНК-146а, ассоциирован с повышенным риском развития тяжелых иоНЯ [27]. В нашей работе мы также подтвердили, что снижение экспрессии микроРНК-146 у больных с скПМК с тяжелыми иоНЯ и SNP rs2910164 коррелирует с повышенным риском развития тяжелых осложнений [10]. Ранее было описано, что регуляция микроРНК-146а играет важную роль в усилении иммунной супрессии путем увеличения популяции регуляторных Т-клеток и может модулировать лекарственную устойчивость опухолевых клеток [28].

В другом исследовании выявили снижение микроРНК-150, -146а и -424 в мононуклеарных клетках периферической крови у пациентов с сахарным диабетом 1-го типа, вероятно ассоциированных с позитивностью аутоантител и разрушением эндогенной остаточной функции бета-клеток, что указывает на участие этих микроРНК в регуляции иммунного ответа [29].

Х.-Х. Peng и соавт. оценили возможность использования экзосомальных микроРНК плазмы крови в качестве биомаркеров у пациентов с НМРЛ, получающих иммунотерапию [30]. В этом исследовании три микроРНК семейства hsa-miRNA-320 (микроРНК-320d, -320c и -320b) были определены как потенциальные предикторы ответа, поскольку их уровни были значительно повышены в группе пациентов с прогрессирующим заболеванием по сравнению с группой пациентов с частичным ответом на исходном уровне до начала лечения. Кроме того, было обнаружено, что уровень микроРНК-125b-5p снижен у пациентов, ответивших на лечение ИКТИ.

A.R. Halvorsen и соавт. провели секвенирование следующего поколения (NGS) с профилированием микроРНК в образцах сыворотки крови, собранных у пациентов с НМРЛ до начала иммунотерапии ниволумабом [31]. Они выявили сигнатуру, состоящую из семи микроРНК (микроРНК-215-5p, -411-3p, -493-5p, -494-3p, -495-3p, -548-5p и -93-3p), которая была статистически значимо связана с общей выживаемостью. M. Voeri и соавт. проспективно оценивали экспрессию микроРНК плазмы крови у пациентов с НМРЛ до начала терапии ИКТИ. Анализ профиля ряда микроРНК позволил оценить взаимосвязь с такими показателями как общая частота ответа, выживаемость без прогрессирования и общая выживаемость. Уровень экспрессии микроРНК во время терапии снижался и оставался низким до прогрессирования опухоли у пациентов, отвечающих на терапию. Анализ профиля ряда микроРНК позволил оценить взаимосвязь с такими показателями как общая частота ответа, выживаемость без прогрессирования и общая выживаемость. Уровень экспрессии микроРНК во время терапии снижался и оставался низким до прогрессирования опухоли у пациентов, отвечающих на терапию [32].

N. Rajakumar и соавт. также оценивали профиль экспрессии различных микроРНК при НМРЛ и выявили пять микроРНК (микроРНК-2115-3p, -218-5p, -224-5p, -4676-3p, 6503-5p) для оценки риска, позволяющие предсказать общую выживаемость пациентов с НМРЛ IV стадии, получающих монотерапию ингибитором PD-1 [33]. Другие итальянские исследователи признали экзосомальную микроРНК-625-5p новым независимым биомаркером ответа и выживаемости у пациентов, получающих ИКТИ в первой, второй или третьей линии терапии при НМРЛ [34].

Ответ на иммунотерапию, вероятно, определяется сложным взаимодействием между опухолью и иммунозависимыми факторами, что по своей сути ограничивает прогнозирование ответа на основе отдельно взятых биомаркеров и односторонних параметров опухоли. К тому же ограниченность выборки, гетерогенность опухоли, межпопуляционные различия также требуют дальнейшего углубленного изучения для восполнения пробела в знаниях. Очевидно, что выявление и валидация дополнительных прогностических биомаркеров для оценки эффективности и безопасности иммунотерапии будут активным направлением исследований на несколько лет вперед. В эпоху персонализированной меди-

цины необходимы дальнейшие исследования и подтверждение результатов на более крупной независимой когорте пациентов, а также моделирование *in vitro* и *in vivo*, что позволит внедрить микроРНК для мониторинга и прогнозирования реакции на лечение и резистентности терапии ИКТИ в клинических условиях.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-00392, <https://rscf.ru/project/23-25-00392/>.

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. *Najberg M., Mansor M.H., Boury F. et al.* Reversing the tumor target: establishment of a tumor trap // *Front. Pharmacol.* 2019. V. 10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00887>
2. *Jackson C.M., Choi J., Lim M.* Mechanisms of immunotherapy resistance: Lessons from glioblastoma // *Nat. Immunol.* 2019. V. 20. № 9. P. 1100–1109. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0433-y>
3. *Gilyazova I.R., Asadullina D.D., Ivanova E.A. et al.* Germ-line mutations as possible biomarkers of immune checkpoint inhibitor therapy efficacy in patients with renal cell carcinoma (mini review) // *Res. Results in Biomed.* 2022. V. 8. № 2. P. 164–179. <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2022-8-2-0-3>
4. *Vishnoi A., Rani S.* miRNA biogenesis and regulation of diseases: An updated overview // *Methods Mol. Biol.* 2023. P. 1–12. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2823-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2823-2_1)
5. *Hill M., Tran N.* miRNA interplay: Mechanisms and consequences in cancer // *Dis. Model Mech.* 2021. V. 14. № 4. <https://doi.org/10.1242/dmm.047662>
6. *Khan A., Ahmed E.I., Elareer N.R. et al.* Role of miRNA-regulated cancer stem cells in the pathogenesis of human malignancies // *Cells.* 2019. V. 8. № 8. <https://doi.org/10.3390/cells8080840>
7. *Hussen B.M., Hidayat H.J., Salihi A. et al.* MicroRNA: A signature for cancer progression // *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2021. V. 138. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111528>
8. *He B., Zhao Zh., Cai Q. et al.* miRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in cancer // *Int. J. Biol. Sci.* 2020. V. 16. № 14. P. 2628–2647. <https://doi.org/10.7150/ijbs.47203>
9. *Tao M., Zheng M., Xu Y. et al.* CircRNAs and their regulatory roles in cancers // *Mol. Medicine.* 2021. V. 27. № 1. P. 94. <https://doi.org/10.1186/s10020-021-00359-3>
10. *Ivanova E., Asadullina D., Gilyazova G. et al.* Exosomal MicroRNA levels associated with immune checkpoint inhibitor therapy in clear cell renal cell carcinoma // *Bio-medicines.* 2023. V. 11. № 3. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11030801>
11. *Wang Z., Han J., Cui Y. et al.* Circulating microRNA-21 as noninvasive predictive biomarker for response in cancer immunotherapy // *Med. Hypotheses.* 2013. V. 81. № 1. P. 41–43. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2013.03.001>
12. *Chen L., Gibbons D.L., Goswami S. et al.* Metastasis is regulated via microRNA-200/ZEB1 axis control of tumour cell PD-L1 expression and intratumoral immunosuppression // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. № 1. <https://doi.org/10.1038/ncomms6241>
13. *Cortez M.A., Ivan C., Valdecana D. et al.* PDL1 regulation by p53 via miR-34 // *J. Nat. Cancer Institute.* 2016. V. 108. № 1. <https://doi.org/10.1093/jnci/djv303>
14. *Rodriguez-Barrueco R., Nekritz E.A., Bertucci F. et al.* miR-424(322)/503 is a breast cancer tumor suppressor whose loss promotes resistance to chemotherapy // *Genes Dev.* 2017. V. 31. № 6. P. 553–566. <https://doi.org/10.1101/gad.292318.116>
15. *Lu L., Wu M., Lu Y. et al.* MicroRNA-424 regulates cisplatin resistance of gastric cancer by targeting SMURF1 based on GEO database and primary validation in human gastric cancer tissues // *Onco. Targets Ther.* 2019. V. 12. P. 7623–7636. <https://doi.org/10.2147/OTT.S208275>
16. *Li Y., Liu H., Cui Y. et al.* miR-424-3p contributes to the malignant progression and chemoresistance of gastric cancer // *Onco. Targets Ther.* 2020. V. 13. P. 12201–12211. <https://doi.org/10.2147/OTT.S280717>
17. *Zhang D., Shi Z., Li M. et al.* Hypoxia-induced miR-424 decreases tumor sensitivity to chemotherapy by inhibiting apoptosis // *Cell Death Dis.* 2014. V. 5. № 6. P. e1301–e1301. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.240>
18. *Bieg D., Synniewski D., Nowak E. et al.* MiR-424-3p suppresses galectin-3 expression and sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin // *Arch. Gynecol. Obstet.* 2019. V. 299. № 4. P. 1077–1087. <https://doi.org/10.1007/s00404-018-4999-7>
19. *Holmgren G., Synnergren J., Andersson Ch. X. et al.* MicroRNAs as potential biomarkers for doxorubicin-induced cardiotoxicity // *Toxicology in Vitro.* 2016. V. 34. P. 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.03.009>

20. Li R., Ruan Q., Zheng J. *et al.* LINC01116 promotes doxorubicin resistance in osteosarcoma by epigenetically silencing miR-424-5p and inducing epithelial-mesenchymal transition // *Front. Pharmacol.* 2021. V. 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.632206>
21. Ralla B., Busch J., Flörcken A. *et al.* miR-9-5p in nephrectomy specimens is a potential predictor of primary resistance to first-line treatment with tyrosine kinase inhibitors in patients with metastatic renal cell carcinoma // *Cancers (Basel)*. 2018. V. 10. № 9. <https://doi.org/10.3390/cancers10090321>
22. Gámez-Pozo A., Antón-Aparicio L.M., Bayona Ch. *et al.* MicroRNA expression profiling of peripheral blood samples predicts resistance to first-line sunitinib in advanced renal cell carcinoma patients // *Neoplasia*. 2012. V. 14. № 12. P. 1144–1150. <https://doi.org/10.1593/neo.12734>
23. Kovacova J., Juracek J., Poprach Al. *et al.* MiR-376b-3p is associated with long-term response to sunitinib in metastatic renal cell carcinoma patients // *Cancer Genomics—Proteomics*. 2019. V. 16. № 5. P. 353–359. <https://doi.org/10.21873/cgp.20140>
24. He J., He J., Min L. *et al.* Extracellular vesicles transmitted miR-31-5p promotes sorafenib resistance by targeting MLH1 in renal cell carcinoma // *Int. J. Cancer*. 2020. V. 146. № 4. P. 1052–1063. <https://doi.org/10.1002/ijc.32543>
25. Liu Y., Xie Q., Ma Y. *et al.* Nanobubbles containing PD-L1 Ab and miR-424 mediated PD-L1 blockade, and its expression inhibition to enable and potentiate hepatocellular carcinoma immunotherapy in mice // *Int. J. Pharm.* 2022. V. 629. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122352>
26. Mastroianni J., Stickel N., Andrlova H. *et al.* miR-146a controls immune response in the melanoma microenvironment // *Cancer Res.* 2019. V. 79. № 1. P. 183–195. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-1397>
27. Marschner D., Falk M., Javorniczky N.R. *et al.* MicroRNA-146a regulates immune-related adverse events caused by immune checkpoint inhibitors // *JCI Insight*. 2020. V. 5. № 6. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.132334>
28. Bhaumik D., Scott G.K., Schokrpur S. *et al.* Expression of microRNA-146 suppresses NF- $\kappa$ B activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells // *Oncogene*. 2008. V. 27. № 42. P. 5643–5647. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.171>
29. Wang G., Gu Y., Xu N. *et al.* Decreased expression of miR-150, miR146a and miR424 in type 1 diabetic patients: Association with ongoing islet autoimmunity // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018. V. 498. № 3. P. 382–387. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.06.196>
30. Peng X.-X., Yu R., Wu X. *et al.* Correlation of plasma exosomal microRNAs with the efficacy of immunotherapy in *EGFR/ALK* wild-type advanced non-small cell lung cancer // *J. Immunother. Cancer*. 2020. V. 8. № 1. <https://doi.org/10.1136/jitc-2019-000376>
31. Halvorsen A.R., Sandhu V., Sprauten M. *et al.* Circulating microRNAs associated with prolonged overall survival in lung cancer patients treated with nivolumab // *Acta. Oncol. (Madr)*. 2018. V. 57. № 9. P. 1225–1231. <https://doi.org/10.1080/0284186X.2018.1465585>
32. Boeri M., Milione M., Proto C. *et al.* Circulating miRNAs and PD-L1 tumor expression are associated with survival in advanced NSCLC patients treated with immunotherapy: A prospective study // *Clin. Cancer Research*. 2019. V. 25 № 7. P. 2166–2173. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1981>
33. Rajakumar T., Horos R., Jehn J. *et al.* A blood-based miRNA signature with prognostic value for overall survival in advanced stage non-small cell lung cancer treated with immunotherapy // *NPJ Precis. Oncol.* 2022. V. 6. № 1. P. 19. <https://doi.org/10.1038/s41698-022-00262-y>
34. Pantano F., Zalfa Fr., Iuliani M. *et al.* Large-scale profiling of extracellular vesicles identified miR-625-5p as a novel biomarker of immunotherapy response in advanced non-small-cell lung cancer patients // *Cancers (Basel)*. 2022. V. 14. № 10. <https://doi.org/10.3390/cancers14102435>

## EXOSOMAL miRNA-146a AND miRNA-424 AS POSSIBLE PREDICTORS OF IMMUNE CHECKPOINT INHIBITORS THERAPY RESPONSE IN CLEAR CELL RENAL CELL CARCINOMA

D. D. Asadullina<sup>1, 2, \*</sup>, I. R. Gilyazova<sup>1, 2, \*\*</sup>, E. A. Ivanova<sup>1</sup>, S. M. Izmailova<sup>2</sup>, G. R. Gilyazova<sup>2</sup>, V. N. Pavlov<sup>2</sup>, E. K. Khusnutdinova<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biochemistry and Genetics — Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*

<sup>2</sup>*Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Bashkir State Medical University” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Ufa, 450008 Russia*

\*e-mail: [dilara.asadullina@yandex.ru](mailto:dilara.asadullina@yandex.ru)

\*\*e-mail: [gilyazova\\_irina@mail.ru](mailto:gilyazova_irina@mail.ru)

Clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) is a malignant kidney tumor with a poor prognosis and difficult to treat. Despite significant advances in the treatment of ccRCC, immune checkpoint inhibitors (ICI) still have limited therapeutic efficacy. A growing body of work has demonstrated that exosomal microRNAs are key modulators of tumor signaling and determinants of the tumor microenvironment. Disruption of microRNA regulation may affect ccRCC immunogenicity and response to ICI therapy, making them attractive for use as prognostic molecular genetic biomarkers. We evaluated exosomal miRNAs (miRNA-424, -146a, -503, -144) expression levels before and after ICI therapy in plasma samples obtained from 42 ccRCC patients. Expression analysis was performed by real-time PCR method. The results showed that the expression levels of miRNA-424 and miRNA-146a were upregulated after ICI therapy treatment (miRNA-424 = Mean  $\pm$  SEM  $1.202 \pm 0.15$  and miRNA-146a =  $12.22 \pm 1.45$ ) compared expression levels before therapy (miRNA-424 = Mean  $\pm$  SEM  $0.63 \pm 0.17$ ;  $p$ -value = 0.03 and miRNA-146a =  $7.03 \pm 0.90$ ;  $p$ -value = 0.006). miRNA-424 and miRNA-146a can be used to create a panel of molecular markers for evaluating the effectiveness of immune checkpoint inhibitors therapy. Even though this is very preliminary and requires further studying on a larger sample, it further increases the interest in using microRNAs, as additional ICI therapeutic markers capable of modulating immune tolerance.

**Keywords:** immune checkpoint inhibitors, resistance, exosomal microRNAs, prognostic markers; renal cell carcinoma.



УДК 575.162+616.895.8

## ИССЛЕДОВАНИЕ СВЯЗИ МЕЖДУ ПОЛИМОРФИЗМОМ ГЕНА ОКСИТОЦИНОВОГО РЕЦЕПТОРА, НЕВЗГОДАМИ ДЕТСТВА И НЕГАТИВНЫМИ СИМПТОМАМИ ШИЗОФРЕНИИ

© 2024 г. Т. В. Лежейко<sup>1, \*</sup>, В. А. Михайлова<sup>1</sup>, М. В. Габаева<sup>1</sup>, В. Е. Голимбет<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научный центр психического здоровья, Москва, 115522 Россия

\*e-mail: [Lezheiko@list.ru](mailto:Lezheiko@list.ru)

Поступила в редакцию 16.08.2023 г.

После доработки 15.09. 2023 г.

Принята к публикации 21.09.2023 г.

Известно, что нейрогормон окситоцин играет важную роль в патогенезе психических заболеваний, а также моделирует связь между стрессовыми факторами, особенно действующими на ранних этапах развития, и развитием психических расстройств. Основываясь на этих данных, мы исследовали эффекты взаимодействия средового фактора, в качестве которого рассматривали невзгоды детства (НД) и генотипов гена окситоцинового рецептора (*OXTR*) в полиморфных сайтах rs4686302 и rs7632287 на выраженность негативных симптомов шизофрении. В исследовании приняли участие 592 больных шизофренией (рубрики F20. по МКБ-10). Информация о наличии НД была получена из историй болезни и опроса пациента и ближайших родственников. Для статистической обработки данных применяли ковариационный анализ (GML); при post-hoc попарном сравнении применяли критерий Тьюки. Выявлен значимый эффект взаимодействия НД и полиморфизма гена *OXTR* rs7632287(G/A) на выраженность негативных симптомов у больных шизофренией. У больных без НД полиморфизмы не оказывали значимого эффекта на изучаемый фенотип. Таким образом, в нашем исследовании впервые показано, что полиморфизм rs7632287(G/A) и НД оказывают взаимное влияние на тяжесть негативных симптомов шизофрении.

**Ключевые слова:** шизофрения, невзгоды детства, генетический полиморфизм, окситоцинэргическая система, PANSS.

**DOI:** 10.31857/S0016675824030114 **EDN:** DOGDMT

Шизофрения представляет собой сложное, хроническое психическое расстройство с гетерогенным генетическим и нейробиологическим фоном. Основные особенности шизофрении включают в себя различные психотические симптомы, такие как бред, слуховые галлюцинации, измененную эмоциональную реактивность, неорганизованное поведение, социальную изоляцию и когнитивные нарушения. Многие исследования доказали значительную роль средовых воздействий в комбинации с генетическими факторами на развитие и тяжесть проявлений шизофрении [1–3]. Тем не менее, механизмы, лежащие в основе биологически различных кластеров симптомов, остаются не ясными [4]. Известно, что негативная симптоматика у больных шизофренией неблагоприятно влияет на уровень социальных взаимодействий, которое ведет к снижению адаптации больных и ухудшению качества их жизни [5, 6].

Окситоцин в настоящее время является одним из наиболее интенсивно изучаемых нейропептидов. Так в ряде работ было показано, что окситоцин оказывает модулирующий эффект на различные формы социального поведения у психически здоровых людей [7], а также влияние этого нейрогормона на социальные когниции у больных шизофренией, снижение которых является предиктором ухудшения как клинического состояния, в частности негативных симптомов, так и социального функционирования больного [8, 9]. Доказано, что связь окситоцина с социальным поведением чувствительна к воздействиям окружающей среды [10, 11], а шизофрения, как известно, относится к заболеваниям, которые обусловлены как генетическими, так и средовыми факторами, причем часто имеет место взаимодействие этих факторов между собой [12, 13]. Молекулярно-генетические исследования указывают на связь между вариациями в генах окситоцинэргической системы и основными

**Таблица 1.** Клинико-демографические характеристики групп больных шизофренией с НД и без них

| Показатель                                           | НД ( <i>n</i> = 250) | Отсутствие НД ( <i>n</i> = 342) |
|------------------------------------------------------|----------------------|---------------------------------|
| Женщины, <i>n</i> (%)                                | 160 (42.8)           | 212 (57.2)                      |
| Мужчины, <i>n</i> (%)                                | 90 (40.9)            | 130 (59.1)                      |
| Возраст на момент обследования, годы                 | 33.1 (13.2)          | 30.7 (11.2)                     |
| Длительность болезни, годы                           | 11.0 (10.8)          | 12.0 (12.2)                     |
| PANSS, (P)-позитивные симптомы, балл                 | 23.6 (8.9)           | 23.2 (9.0)                      |
| PANSS, (N)-негативные симптомы, балл                 | 23.7 (7.8)           | 23.9 (8.3)                      |
| PANSS, (OP)-общие психопатологические симптомы, балл | 39.5 (13.1)          | 39.6 (14.2)                     |

Примечание. В скобках приведено стандартное отклонение.

симптомами шизофрении [14]. В тоже время известно, что окситоцин опосредует связь между стрессовыми факторами, в особенности действующими на ранних этапах развития, и развитием психических расстройств [15–17]. Ранее нами была обнаружена ассоциация полиморфизма гена окситоцинового рецептора (*OXTR* rs53576 со способностью формировать межличностные отношения у больных шизофренией, при этом показано, что ассоциация опосредована средовым фактором риска, в качестве которого рассматривали перинатальные осложнения [16].

Цель настоящей работы — продолжение исследований в этом направлении, в частности, изучение ассоциации между полиморфизмами гена *OXTR* rs468302 и rs7632287 и негативными симптомами шизофрении с учетом средового фактора риска этого заболевания. Полиморфизмы rs7632287, rs4686302 представляют интерес в связи с тем, что ранее обнаружена их ассоциация с рядом социальных поведенческих признаков (способность формировать социальные связи) и расстройств (аутизм и расстройства аутистического спектра) [18–23]. В качестве средового фактора рассматривали невзгоды детства (НД), т.е. события, которые могли неблагоприятно воздействовать на психоэмоциональное состояние и развитие ребенка в период до 18 лет [24, 25]. К НД относят жестокое обращение в семье, наличие у родителей алкогольной или наркотической зависимости, психических расстройств. Обобщенные литературные данные свидетельствуют, что НД существенно увеличивают риск развития психоза [1, 26, 27].

Для формирования исследуемой группы были проанализированы истории болезней и структурированные интервью больных с диагнозом “шизофрения” (рубрика F20 по МКБ-10). Все больные подписали информированное согласие на участие в исследовании и сдали кровь для вы-

деления ДНК. Критериями включения в группу являлись указание в истории болезни на наличие НД (алкоголизация, злоупотребление психоактивными веществами, наличие психических заболеваний одного или обоих родителей, жестокое обращение в семье) или же их отсутствие, как описано ранее [28]. Для исследования сформирована выборка из 592 больных с диагнозом шизофрения (F20 по МКБ-10); 372 женщины и 220 мужчин, средний возраст  $32.1 \pm 12.4$  лет, возраст к началу заболевания  $20.6 \pm 8.0$  лет). Все больные прошли клиническое обследование, которое предусматривало количественную оценку выраженности симптомов, приведенных в шкале позитивных и негативных синдромов PANSS (The Positive and Negative Syndrome Scale). Выборка была разделена на две группы — с НД (*n* = 250) и без них (*n* = 342).

Генотипирование проводили с использованием ПЦР методом плавления с высоким разрешением (High Resolution Melting). Метод включал в себя амплификацию интересующего фрагмента в присутствии флюоресцентного красителя (Evagreen). Для проведения генотипирования были подобраны олигонуклеотидные праймеры *OXTR*(C/T) rs4686302 прямой — CCAGATCTTGAAGCTGATAAGGCCG и (обратный) TGCTGGGCCGTCTTCATCCA, 94°C — 5'(94°C — 25" 64°C — 35" 72°C — 20") × 40, *OXTR* (G/A) rs7632287 прямой — CTCTTCGTGCATGTCCCAGC и (обратный) GGAGAAGAGAGGCTTGCACTGA, 94°C — 5'(94°C — 25" 66°C — 15" 72°C — 20") × 40.

Проведено сравнение этих групп между собой по клиническим характеристикам и поиск ассоциаций между полиморфизмами rs468302 и rs7632287 и клиническими характеристиками в каждой из групп. Статистическая обработка результатов проводилась с помощью таблицы сопряженности программы (Statistica) с исполь-

Таблица 1. Клинико-демографические характеристики групп больных шизофренией с НД и без них

| Показатель                                           | НД ( <i>n</i> = 250) | Отсутствие НД ( <i>n</i> = 342) |
|------------------------------------------------------|----------------------|---------------------------------|
| Женщины, <i>n</i> (%)                                | 160 (42.8)           | 212 (57.2)                      |
| Мужчины, <i>n</i> (%)                                | 90 (40.9)            | 130 (59.1)                      |
| Возраст на момент обследования, годы                 | 33.1 (13.2)          | 30.7 (11.2)                     |
| Длительность болезни, годы                           | 11.0 (10.8)          | 12.0 (12.2)                     |
| PANSS, (P)-позитивные симптомы, балл                 | 23.6 (8.9)           | 23.2 (9.0)                      |
| PANSS, (N)-негативные симптомы, балл                 | 23.7 (7.8)           | 23.9 (8.3)                      |
| PANSS, (OP)-общие психопатологические симптомы, балл | 39.5 (13.1)          | 39.6 (14.2)                     |

Примечание. В скобках приведено стандартное отклонение.

Таблица 2. Распределение аллелей и генотипов в исследуемой группе больных шизофренией

| Ген, полиморфизм                     | Частота аллеля, % |          | Частота генотипа, % ( <i>n</i> ) |             |           |
|--------------------------------------|-------------------|----------|----------------------------------|-------------|-----------|
|                                      | <i>C</i>          | <i>T</i> | <i>CC</i>                        | <i>CT</i>   | <i>TT</i> |
| <i>OXTR</i> ( <i>C/T</i> ) rs4686302 | 83                | 17       | 68.52 (407)                      | 28.96 (170) | 2.53 (15) |
| <i>OXTR</i> ( <i>G/A</i> ) rs7632287 | <i>G</i>          | <i>A</i> | <i>GG</i>                        | <i>GA</i>   | <i>AA</i> |
|                                      | 77                | 23       | 57.07 (338)                      | 36.20 (214) | 6.73 (40) |

зованием критерия  $\chi^2$  Пирсона для качественных признаков. Для оценки ассоциации генетического варианта с количественными признаками использовали модуль General Linear Models (GLM); при post-hoc попарном сравнении применяли критерий Тьюки, в качестве зависимой переменной использовали выраженность симптомов в баллах; в качестве групповых факторов – генотип и наличие/отсутствие НД, в качестве ковариат – пол и длительность болезни. С помощью метода Колмогорова–Смирнова был проведен анализ показателей PANSS на нормальность распределения, было показано, что распределение по субшкалам не отличалось от нормального распределения. Различия считались значимыми при  $p < 0.05$ .

Клинико-демографические характеристики и оценка клинических симптомов по шкале PANSS приведены в табл. 1. В группах больных с НД и без них различий в клинических показателях (возраст на момент обследования, длительность болезни, общий балл по шкалам PANSS) выявлено не было. Частоты аллелей и генотипов для каждого из исследованных полиморфизмов представлены в табл. 2. Отклонений от равновесия Харди–Вайнберга не выявлено ( $p > 0.05$ ), частоты минорного аллеля соответствовали ожидаемым для европейской популяции (0.12, 0.24 соответственно). Далее было изучено влияние генотипов на выраженность негативных симптомов в группах с НД и без них. Данные представлены в табл. 3.

По отдельности ни генотип, ни НД не оказывали статистически значимого влияния на

выраженность негативных симптомов. Однако обнаружен взаимный эффект полиморфизмов *OXTR* (*G/A*) rs7632287 ( $p = 0.04$ ), *OXTR* (*C/T*) rs4686302 ( $p = 0.01$ ) и НД на выраженность негативных симптомов. Пол не влиял на выявленные эффекты ( $F = 0.07$ ,  $p = 0.9$ ). В группе без НД полиморфизмы не оказывали значимого эффекта на этот показатель. Значимые различия были обнаружены в группе с НД, больные с генотипом *GG* полиморфизма rs7632287 демонстрировали большую выраженность симптомов, чем носители генотипа *AA* ( $p = 0.03$ ). У носителей генотипа *TT* полиморфизма rs4686302 (*C/T*) отмечены более высокие баллы по субшкале негативных симптомов по сравнению с носителями генотипа *CC*, однако различия не достигали принятого уровня значимости ( $p = 0.08$ ).

Литературные данные показывают, что полиморфизмы *OXTR* rs468302 и rs7632287 связаны с различными признаками, относящимися к социальному поведению, а также с расстройствами аутистического спектра (РАС), для которых характерно нарушение социального взаимодействия и коммуникаций. Однако данные о направленности этой связи достаточно противоречивы. Сообщалось об ассоциации генотипа *GG* полиморфизма rs7632287 с основными фенотипами РАС, включая дисфункцию в социальной сфере [18], а также со способностью распознавать лица, которую оценивали по активности миндалевидного тела, измеренной с помощью fMRI [23]. В то же время по данным других исследований аллель *A* был связан с симптомами дефицита социального взаимодействия из спектра аутизма

**Таблица 3.** Выраженность негативных симптомов по шкале PANSS (баллы) в зависимости от генетического варианта в группах больных шизофренией с НД и без них

| Субшкала PANSS,<br>генотипы | Группа с НД          |             |             | Группа без НД |              |             |
|-----------------------------|----------------------|-------------|-------------|---------------|--------------|-------------|
|                             | OXTR (C/T) rs4686302 |             |             |               |              |             |
|                             | CC (n = 176)         | CT (n = 67) | TT (n = 7)  | CC (n = 230)  | CT (n = 104) | TT (n = 8)  |
|                             | 23.3 (7.8)           | 24.4 (7.9)  | 29.0 (8.1)* | 24.7 (8.7)    | 22.7 (7.5)   | 18.6 (6.9)  |
| Негативные<br>симптомы      | OXTR (G/A) rs7632287 |             |             |               |              |             |
|                             | GG (n = 148)         | GA (n = 84) | AA (n = 18) | GG (n = 190)  | GA (n = 130) | AA (n = 22) |
|                             | 25.1 (8.1)*          | 22.0 (7.1)  | 20.7 (6.1)  | 23.6 (8.5)    | 24.7 (8.4)   | 22.1 (6.4)  |

Примечание. В скобках приведено стандартное отклонение. \* — различия значимы при  $p < 0.05$ .

[19], в также с антисоциальным поведением у мальчиков-подростков из Швеции [21]. Полиморфизм rs4686302 был связан с дефицитом социального познания. В частности, носители аллеля Т с СДВГ (синдром дефицита внимания и гиперактивности) значительно хуже распознавали эмоции на лице, чем люди с генотипом СС [29]. Также исследование на клеточных моделях показало связь rs4686302 с генетическими нарушениями регуляции, связанными с РАС [30]. В гендерных исследованиях с полиморфизмом rs4686302 наблюдался значимый эффект на выраженность эмоциональной эмпатии: в китайской популяции женщины-носители аллеля Т проявляли большую эмпатию, чем мужчины [20]. В другом исследовании аллель Т полиморфизма rs4686302 был ассоциирован со способностью формировать социальные связи у мужчин, тогда как у женщин направление ассоциации было противоположным [31]. Одной из возможных причин разнонаправленного влияния генетических вариантов rs468302 и rs7632287 на исследуемые фенотипы является отсутствие оценки роли средового фактора. Показано, например, что у пациентов с обсессивно-компульсивным расстройством, которые имели в анамнезе психологические травмы детства, увеличивался уровень метилирования в CpG сайтах cg04523291 в гене *OXTR*, что являлось предиктором худшего ответа на когнитивно-поведенческую терапию [33].

Нужно отметить, что в доступной нам литературе отсутствуют сведения об ассоциации полиморфизмов rs468302 и rs7632287 с шизофренией или ее клиническими проявлениями. В то же время известно, что выраженность социальных когний, в том числе способности распознавать лица, находится в обратной корреляционной связи с выраженностью негативных симптомов у больных шизофренией [34].

Таким образом, в нашем исследовании на большой выборке больных шизофренией по-

казано, что полиморфизмы *OXTR* rs468302 и rs7632287, ранее ассоциированные с фенотипами, относящимися к социальному поведению, могут быть связаны с негативными симптомами шизофрении, при этом связь опосредована наличием в анамнезе психотравмирующих событий, действующих на раннем этапе развития.

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. Radua J., Ramella-Cravaro V., Ioannidis J.P.A. et al. What causes psychosis? An umbrella review of risk and protective factors // *World Psychiatry*. 2018. V. 17. № 1. P. 49–66. <https://doi.org/10.1002/wps.20490>
2. Robinson N., Bergen S.E. Environmental risk factors for schizophrenia and bipolar disorder and their relationship to genetic risk: Current knowledge and future directions // *Front. Genetics*. 2021. V. 12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.686666>
3. Harvey P.D., Deckler E., Jarskog F. et al. Predictors of social functioning in patients with higher and lower levels of reduced emotional experience: Social cognition, social competence, and symptom severity // *Schizophrenia Res.* 2019. V. 206. P. 271–276. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2018.11.005>
4. Mäki P., Veijola J., Jones P.B. et al. Predictors of schizophrenia // *British Med. Bull.* 2005. V. 9. P. 73–74. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldh046>

5. *Reichenberg A.* The assessment of neuropsychological functioning in schizophrenia // *Dialogues in Clin. Neuroscience*. 2010. V. 12. № 3. P. 383–392.  
<https://doi.org/10.31887/DCNS.2010.12.3>
6. *Feldman R., Monakhov M., Pratt M. et al.* Oxytocin pathway genes: Evolutionary ancient system impacting on human affiliation, sociality, and psychopathology // *Biol. Psychiatry*. 2016. V. 79. № 3. P. 174–184.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.08.008>
7. *Marsh N., Marsh A.A., Lee M.R. et al.* Oxytocin and the neurobiology of prosocial behavior // *Neuroscientist*. 2021. V. 27. № 6. P. 604–619.  
<https://doi.org/10.1177/1073858420960111>
8. *Strauss G.P., Chapman H.C., Keller W.R. et al.* Endogenous oxytocin levels are associated with impaired social cognition and neurocognition in schizophrenia // *J. Psychiatric Res.* 2019. V. 12. P. 38–43.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2019.02.017>
9. *Ettinger U., Hurlmann R., Chan R.C.K.* Oxytocin and schizophrenia spectrum disorders // *Curr. Topics in Behavioral Neurosciences*. 2018. V. 35. P. 515–527.  
[https://doi.org/10.1007/7854\\_2017\\_27](https://doi.org/10.1007/7854_2017_27)
10. *Malhi G.S., Das P., Outhred T. et al.* Interactions of *OXTR* rs53576 and emotional trauma on hippocampal volumes and perceived social support in adolescent girls // *Psychoneuroendocrinology*. 2020. V. 115.  
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2020.104635>
11. *Zheng S., Masuda T., Matsunaga M. et al.* Oxytocin receptor gene (*OXTR*) and childhood adversity influence trust // *Psychoneuroendocrinology*. 2020. V. 121.  
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2020.104840>
12. *Zwicker A., Denovan-Wright E.M., Uher R.* Gene-environment interplay in the etiology of psychosis // *Psychol. Medicine*. 2018. V. 48. № 12. P. 1925–1936.  
<https://doi.org/10.1017/S003329171700383X>
13. *Montag C., Brockmann E.M., Bayerl M. et al.* Oxytocin and oxytocin receptor gene polymorphisms and risk for schizophrenia: A case-control study // *World J. Biol. Psychiatry*. 2013. V. 14. № 7. P. 500–508.  
<https://doi.org/10.3109/15622975.2012.677547>
14. *Mongan D., Ramesar M., Föcking M. et al.* Role of inflammation in the pathogenesis of schizophrenia: A review of the evidence, proposed mechanisms and implications for treatment // *Early Interv. Psychiatry*. 2020. V. 14. № 4. P. 385–397.  
<https://doi.org/10.1111/eip.12859>
15. *Womersley J.S., Hemmings S.M.J., Ziegler C. et al.* Childhood emotional neglect and oxytocin receptor variants: Association with limbic brain volumes // *World J. Biol. Psychiatry*. 2020. V. 21. № 7. P. 513–528.  
<https://doi.org/10.1080/15622975.2019.1584331>
16. Михайлова В.А., Лежейко Т.В., Колесина Н.Ю., Голиббет В.Е. Исследование связи между генами окситоцинэргической системы, перинатальными осложнениями и формированием межличностных отношений у больных шизофренией // *Журнал неврол. и психиатрии* м. С.С. Корсакова. 2021. Т. 121. № 10. С. 95–100.  
<https://doi.org/10.17116/jnevro202112110195>
17. *Veras A.B., Getz M., Froemke R.C. et al.* Rare missense coding variants in oxytocin receptor (*OXTR*) in schizophrenia cases are associated with early trauma exposure, cognition and emotional processing // *Psychiatric Res.* 2018. V. 97. P. 58–64.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2017.11.011>
18. *Campbell D.B., Datta D., Jones S.T. et al.* Association of oxytocin receptor (*OXTR*) gene variants with multiple phenotype domains of autism spectrum disorder // *J. of Neurodevelopmental Disorders*. 2011. V. 3. № 2. P. 101–112.  
<https://doi.org/10.1007/s11689-010-9071-2>
19. *Walum H., Lichtenstein P., Neiderhiser J.M. et al.* Variation in the oxytocin receptor gene is associated with pair-bonding and social behavior // *Biol. Psychiatry*. 2012. V. 71. № 5. P. 419–426.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.09.002>
20. *Wu N., Li Z., Su Y.* The association between oxytocin receptor gene polymorphism (*OXTR*) and trait empathy // *J. of Affective Disorders*. 2012. V. 138. № 3. P. 468–472.  
<https://doi.org/10.1016/j.jad.2012.01.009>
21. *Hovey D., Lindstedt M., Zettergren A. et al.* Antisocial behavior and polymorphisms in the oxytocin receptor gene: Findings in two independent samples // *Mol. Psychiatry*. 2016. V. 21. № 7. P. 983–938.  
<https://doi.org/10.1038/mp.2015.144>
22. *LoParo D., Waldman I.D.* The oxytocin receptor gene (*OXTR*) is associated with autism spectrum disorder: A meta-analysis // *Mol. Psychiatry*. 2015. V. 20. № 5. P. 640–646.  
<https://doi.org/10.1038/mp.2014.77>
23. *Westberg L., Henningsson S., Zettergren A. et al.* Variation in the oxytocin receptor gene is associated with face recognition and its neural correlates // *Front. Behav. Neurosci.* 2016. V. 10.  
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2016.00178>
24. *Kalmakis K.A., Chandler G.E.* Adverse childhood experiences: Towards a clear conceptual meaning // *J. Adv. Nursing*. 2014. V. 70. № 7. P. 1489–1501.  
<https://doi.org/10.1111/jan.12329>
25. *Reichl C., Kaess M., Fuchs A. et al.* Childhood adversity and parenting behavior: The role of oxytocin receptor gene polymorphisms // *Neural Transmission*. 2019. V. 126. № 6. P. 777–787.  
<https://doi.org/10.1007/s00702-019-02009-9>
26. *Popovic D., Schmitt A., Kaurani L. et al.* Childhood trauma in schizophrenia: Current findings and research perspectives // *Front. Neurosci.* 2019. V. 13. P. 274.  
<https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00274>
27. *Kogan S.M., Bae D., Cho J. et al.* Childhood adversity, socioeconomic instability, oxytocin-receptor-gene methylation, and romantic-relationship support among young

- african american men // Psychol. Sci. 2019. V. 30. № 8. P. 1234–1244.  
<https://doi.org/0.1177/0956797619854735>
28. Алфимова М.В., Коровайцева Г.И., Габаева М.В. и др. Генетический полиморфизм цитокинов ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-4 и TNF- $\alpha$  как фактор, модулирующий влияние невзгод детства на симптоматику шизофрении // Журн. неврол. и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2022. Т. 122. № 9. С. 110–117.  
<https://doi.org/10.17116/jnevro202212209111023>
29. Kalyouncu T., Ozbaran B., Kose S. et al. Variation in the oxytocin receptor gene is associated with social cognition and ADHD // J. of Attention Disorders. 2019. V. 23. № 7. P. 702–711.  
<https://doi.org/10.1177/1087054717706757>
30. Meyer M., Jurek B., Alfonso-Prieto M. et al. Structure-function relationships of the disease-linked A218T oxytocin receptor variant // Mol. Psychiatry. 2022. V. 27. № 2. P. 907–917.  
<https://doi.org/10.1038/s41380-021-01241-8>
31. Chang S.C., Glymour M.M., Rewak M. et al. Are genetic variations in *OXTR*, *AVPR1A*, and *CD38* genes important to social integration? Results from two large U.S. cohorts // Psychoneuroendocrinology. 2014. V. 39. P. 257–268.  
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.09.024>
32. Kohlhoff J., Cibralic S., Hawes D.J. et al. Oxytocin receptor gene (*OXTR*) polymorphisms and social, emotional and behavioral functioning in children and adolescents: A systematic narrative review // Neuroscience & Biobehavioral Reviews. 2022. V. 135. P. 104573.  
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2022.104573>
33. Bey K., Campos-Martin R., Klawohn J. et al. Hypermethylation of the oxytocin receptor gene (*OXTR*) in obsessive-compulsive disorder: Further evidence for a biomarker of disease and treatment response // Epigenetics. 2022. V. 17. № 6. P. 642–652.  
<https://doi.org/10.1080/15592294.2021.1943864>
34. Muros N.I., García A.S., Forner C. et al. Facial affect recognition by patients with schizophrenia using human avatars // J. Clin. Medicine. 2021. V. 28. № 9.  
<https://doi.org/10.3390/jcm10091904>

## STUDY OF THE ASSOCIATION BETWEEN OXYTOCIN RECEPTOR GENE POLYMORPHISM, CHILDHOOD ADVERSITY AND NEGATIVE SYMPTOMS OF SCHIZOPHRENIA

T. V. Lezheiko<sup>1</sup>\*, V. A. Mikhailova<sup>1</sup>, M. V. Gabaeva<sup>1</sup>, V. E. Golimbet<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Mental Health Research Center, Moscow, 115522 Russia

\*e-mail: Lezheiko@list.ru

Is known that the neurohormone oxytocin plays an important role in the pathogenesis of mental illness, and also models the relationship between stress factors, especially those acting in the early stages of development, and the development of mental disorders. Based on these data, we investigated the effects of the interaction of the environmental factor, which was considered the adversity of childhood (ND) and the oxytocin receptor (*OXTR*) genotypes in the polymorphic sites rs4686302 and rs7632287, on the severity of negative symptoms of schizophrenia. The study involved 592 patients with schizophrenia (headings F20. according to ICD-10). Information about the presence of ND was obtained from case histories and patient interviews. Analysis of covariance (GML) was used for statistical data processing; in post-hoc pairwise comparison, Tukey's test was used. A significant effect of the interaction between ND and *OXTR* gene polymorphism rs7632287(G/A) on the severity of negative symptoms in patients with schizophrenia was revealed. In patients without ND, polymorphisms did not have a significant effect on the studied phenotype. Thus, our study showed for the first time that the rs7632287(G/A) polymorphism and ND have a mutual effect on the severity of negative symptoms of schizophrenia.

**Keywords:** schizophrenia, childhood adversity, genetic polymorphism, oxytocinergic system, PANSS.

УДК 577.21:631.52:633.12

## АНАЛИЗ ГЕНОТИПОВ ГРЕЧИХИ, ПОЛУЧЕННЫХ НА СЕЛЕКТИВНЫХ СРЕДАХ С ЦИНКОМ *in vitro*, С ПОМОЩЬЮ ISSR-МАРКЕРОВ

© 2024 г. С. А. Боровая<sup>1</sup>\*, А. Г. Клыков<sup>1</sup>, Н. Г. Богинская<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральный научный центр агробиотехнологий Дальнего Востока  
им. А.К. Чайки, Приморский край, пос. Тимирязевский, 692539 Россия

\*e-mail: borovayasveta@mail.ru

Поступила в редакцию 18.10.2023 г.

После доработки 09.11.2023 г.

Принята к публикации 14.11.2023 г.

Показана эффективность использования четырех ISSR-маркеров (M1, M2, M7 и M11) для исследования генетической изменчивости регенерантов *Fagopyrum esculentum*, полученных на селективных средах с высокими дозами  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  (808–1313 мг/л) *in vitro*. Обнаружен высокий уровень полиморфизма в объединенной выборке – 74.4%. Полученные образцы могут быть использованы в селекции для создания сортов с хозяйственно-ценными признаками.

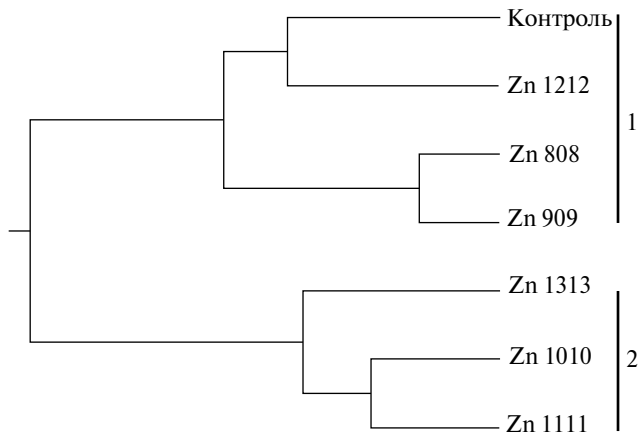
**Ключевые слова:** гречиха посевная, селективные среды, цинк, ISSR-маркеры, полиморфизм, генетические дистанции, биометрические показатели.

DOI: 10.31857/S0016675824030126 EDN: DOBSZM

Гречиха посевная (*Fagopyrum esculentum* Moench) – традиционная крупяная культура во многих странах мира. Она обладает высокой пластичностью и большим потенциалом генетического улучшения [1]. Применение современных биотехнологических методов значительно расширяет возможности селекции *F. esculentum*. Маркеры межмикросателлитной последовательности (ISSR) успешно используются для исследования генетического разнообразия растений вследствие высокой информативности и получения воспроизводимых результатов [2–7]. ISSR-анализ внутривидового генетического полиморфизма видов и сортов гречихи проведен ранее Г.Д. Кадыровой с соавт. [8] с помощью 13 ISSR-праймеров. В результате было отобрано четыре наиболее информативных – M1 ((AC)<sub>8</sub>GC), M2 ((AC)<sub>8</sub>CTG), M7 ((CAG)<sub>5</sub>) и M11 ((CA)<sub>6</sub>AG), приводящих к формированию воспроизводимых, четких полиморфных спектров, состоящих не менее чем из 20 фрагментов. С использованием маркеров M1, M2, M7 и M11 нами были изучены генетическая изменчивость и хозяйственно ценные признаки *F. esculentum*, что позволило повысить результативность отбора перспективных линий и показало эффективность применяемой маркерной системы [9].

В настоящей работе с использованием четырех ISSR-маркеров (M1, M2, M7 и M11) проведено исследование пробирочных образцов гречихи сорта Изумруд регенерантного происхождения, полученных *in vitro* на средах Мурасиге и Скуга (МС) с высокой концентрацией тяжелого металла цинка ( $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  в дозах 808, 909, 1010, 1111, 1212 и 1313 мг/л). Асептические черенки гречихи культивировали с токсикантом в течение 21 сут, а затем выжившие генотипы субкультивировали и микроклонально размножали на средах МС. Для исследования морфобиологических признаков полученных генотипов пробирочные растения высаживали на вегетационной площадке с почвенным субстратом и проводили исследование биометрических показателей и продуктивности.

В результате проведенных исследований было выявлено, что четыре ISSR-маркера продуцировали 61 полиморфных ампликона. Полиморфизм в объединенной выборке составил 74.4%. На базе бинарных матриц проведен подсчет индекса генетических дистанций Нея ( $D_N$ ). Анализ полученных данных показал, что при сравнении с исходной формой (контролем *in vitro*) генотипы были распределены по двум группам. Первая группа (1) имела наименьшие  $D_N$  – 0.0796–0.1176.



**Рис. 1.** UPGMA-дендрограмма, основанная на значениях генетических дистанций  $D_N$  для регенерантов гречихи. 1 — группа вариантов, характеризующаяся наименьшими  $D_N$  по сравнению с исходной формой; 2 — группа вариантов, характеризующаяся наибольшим  $D_N$  по сравнению с исходной формой.

В эту группу, помимо контрольных растений, вошли образцы, полученные на среде с более низкими концентрациями  $ZnSO_4 \times 7H_2O$ , равными 808 и 909 мг/л, и вариант Zn 1212. Наибольшие генетические различия с исходной формой продемонстрировали растения из второй группы (2), полученные с помощью соли цинка в концентрациях 1010, 1111 и 1313 мг/л, показавшие максимальные значения  $D_N$ , равные 0.1793–0.2348 и образовавшие на древе отдельный кластер на UPGMA-дендрограмме (рис. 1).

Результаты исследования биометрических показателей пробирочных растений-регенерантов гречихи, высаженных в почву на вегетационной площадке, представлены в табл. 1. Растения, подвергшиеся воздействию соли цинка в дозе 1010, 1111 и 1313 мг/л (вторая группа с наиболь-

шими  $D_N$ ), характеризуются рядом преимуществ по сравнению с остальными образцами. Они превзошли контроль, а также группу растений вариантов Zn 808, Zn 909 и Zn 1212 по толщине первого междоузлия в 1.2–1.4 раза, варьируя в пределах 0.54–0.58 см. Число боковых ветвей второго порядка у второй группы больше, чем у первой, в среднем в 2.9 раза. Отмечено также наличие боковых ветвей третьего порядка у растений второй группы, в то время как у первой группы они отсутствуют. Соответственно, семенная продуктивность одного растения из второй группы составила 2.96–5.78 г, что в среднем на 38.1% выше, чем у первой.

По мнению ряда исследователей, ISSR-маркеры в высокой степени полиморфны у гречихи [8, 10, 11]. Полученные с их помощью паттерны ПЦР-продуктов видоспецифичны, а сам метод весьма успешен при идентификации генотипов.

Таким образом, используемая маркерная система, включающая ISSR-маркеры M1, M2, M7 и M11, пригодна для идентификации генетических различий и выявляет высокий уровень полиморфизма у регенерантов *F. esculentum*. Данные молекулярно-генетических исследований подтверждают, что применение селективных сред с высокими концентрациями ионов цинка приводит к появлению хозяйственно ценных признаков у исследуемых образцов.

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.

**Таблица 1.** Биометрические показатели регенерантов гречихи, полученных на селективных средах с цинком

| Содержание цинка в МС, мг/л | Высота растения, см | Толщина первого междоузлия, см | Длина первого междоузлия, см | Число боковых ветвей |              |              | Семенная продуктивность одного растения, г |
|-----------------------------|---------------------|--------------------------------|------------------------------|----------------------|--------------|--------------|--------------------------------------------|
|                             |                     |                                |                              | 1-го порядка         | 2-го порядка | 3-го порядка |                                            |
| Контроль <i>in vitro</i>    | 151.2 ± 15.0a       | 0.46 ± 0.06a                   | 2.0 ± 0.5b                   | 3.3 ± 1.5a           | 0a           | 0a           | 3.09a                                      |
| Zn 808                      | 159.8 ± 3.8a        | 0.42 ± 0.02a                   | 2.9 ± 0.5a                   | 2.3 ± 0.6b           | 1.0 ± 1.0b   | 0a           | 2.97a                                      |
| Zn 909                      | 140.9 ± 7.2b        | 0.42 ± 0.02a                   | 2.4 ± 0.4ab                  | 4.3 ± 0.6ac          | 1.0 ± 1.0b   | 0a           | 2.53a                                      |
| Zn 1010                     | 127.8 ± 8.7c        | 0.56 ± 0.06b                   | 2.7 ± 0.3a                   | 2.3 ± 0.6b           | 2.0 ± 1.0c   | 1.0 ± 1.0b   | 2.96a                                      |
| Zn 1111                     | 142.3 ± 48.5b       | 0.58 ± 0.04b                   | 2.7 ± 0.6a                   | 2.3 ± 0.6b           | 2.0 ± 1.7c   | 0.3 ± 0.6b   | 4.88b                                      |
| Zn 1212                     | 133.5 ± 2.1c        | 0.41 ± 0.01a                   | 3.1 ± 0.2a                   | 4.7 ± 0.6c           | 1.0 ± 1.0b   | 0a           | 2.65a                                      |
| Zn 1313                     | 136.2 ± 8.2c        | 0.54 ± 0.06b                   | 1.8 ± 0.3b                   | 4.7 ± 2.5c           | 3.0 ± 1.0cd  | 1.0 ± 0.0b   | 5.78d                                      |

Примечание. Разные строчные буквы в одном и том же столбце указывают на существенные различия между вариантами при  $p < 0.05$ .



Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Chrungoo N.K., Dohtdong L., Chettry U.* Phenotypic plasticity in buckwheat // *Mol. Breeding and Nutritional Aspects of Buckwheat*. London: Elsevier, Academic Press, 2016. P. 137–149.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803692-1.00010-9>
2. *Blair M., Panaud O., McCouch S.* Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.) // *Theor. Appl. Genetics*. 1999. V. 98. P. 780–792.  
<https://doi.org/10.1007/s001220051135>
3. *Gilbert J.E., Lewis R.V., Wilkinson M.J., Caligari P.D.S.* Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections // *Theor. Appl. Genetics*. 1999. V. 98. № 6–7. P. 1125–1131.  
<https://doi.org/10.1007/s001220051176>
4. *Sica M., Gamba G., Montieri S., Gaudio L., Aceto S.* ISSR markers show differentiation among Italian populations of *Asparagus acutifolius* // *BMC Genetics*. 2005. V. 6. P. 1–7.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2156-6-17>
5. *Meloni M., Perini D., Filigheddu R., Binelli G.* Genetic variation in five Mediterranean populations of *Juniperus phoenicea* as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers // *Ann. Bot.* 2006. V. 97. № 2. P. 299–304.  
<https://doi.org/10.1093/aob/mcj024>
6. *Alhasnawi A.N., Kadhimi A.A., Isahak A. et al.* Application of inter simple sequence repeat (ISSR) for detecting genetic analysis in rice (*Oryza sativa* L.) // *J. Pure Appl. Microbiology*. 2015. V. 9. № 2. P. 1091–11016.
7. *Aldaej M.I., Rezk A.A., El-Malky M., Shalaby T.A.* Comparative genetic diversity assessment and Marker-Trait Association using two DNA marker systems in rice (*Oryza sativa* L.) // *Agronomy*. 2023. V. 13. № 2.  
<https://doi.org/10.3390/agronomy13020329>
8. *Кадырова Г.Д., Кадырова Ф.З., Мартыросян Е.В., Рыжова Н.Н.* Анализ геномного разнообразия образцов и сортов гречихи посевной и татарской ISSR-методом // *С.-хоз. биология*. 2010. Т. 5. С. 42–48.
9. *Клыков А.Г., Барсукова Е.Н.* Биотехнология и селекция гречихи на Дальнем Востоке России. Владивосток: ООО “ПСР95”, 2021. 352 с.
10. *Sabreena N. M., Mahajan R., Hashim M.J. et al.* Deciphering allelic variability and population structure in buckwheat: An analogy between the efficiency of ISSR and SSR markers // *Saudi J. Biol. Sci.* 2021. V. 28. P. 6050–6056.  
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.07.061>
11. *Shukla A., Srivastava N., Suneja P. et al.* Genetic diversity analysis in Buckwheat germplasm for nutritional traits // *Indian J. Experim. Biology*. 2018. V. 56. № 11. P. 827–837.

## ANALYZING BUCKWHEAT GENOTYPES OBTAINED ON SELECTIVE MEDIA WITH ZINC *in vitro* USING ISSR MARKERS

S. A. Borovaya<sup>1, \*</sup>, A. G. Klykov<sup>1</sup>, N. G. Boginskaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Chaika Federal Scientific Center of Agricultural Biotechnology of the Far East  
Primorsky Krai, Timiriasevsky, 692539 Russia*

\*e-mail: borovayasveta@mail.ru

The paper evaluates four ISSR-markers (M1, M2, M7, and M11) for their effectiveness in research on the genetic distances of regenerated *Fagopyrum esculentum* plants, which were obtained *in vitro* on selective media with high doses of  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  (808–1313 mg/L). The level of polymorphism was determined to be high in the combined sample (74.4%). The obtained specimens might be used in the breeding of new varieties with economically important traits.

**Keywords:** common buckwheat, selective media, zinc, ISSR-markers, polymorphism, genetic distances, biometric parameters.