ISSN 0016-6758

Том 59, Номер 5

Май 2023

ГЕНЕТИКА

www.sciencejournals.ru

СОДЕРЖАНИЕ

Том 59, номер 5, 2023

Обзорные и теоретические статьи

Эуполиплоидия как способ видообразования у растений

А. В. Родионов 493

Общая генетика

Изучение генотоксичности бета-пропиолактона с помощью lux-биосенсоров *E. coli* и нематоды *Caenorhabditis elegans*

Э. А. Мачигов, С. К. Абилев, Е. В. Игонина, М. В. Марсова 507

Генетика растений

Характеристика генов антоцианидин-3-*O*-глюкозилтрансфераз перца (*Capsicum* spp.) и их роль в биосинтезе антоцианов

М. А. Филюшин, А. В. Щенникова, Е. З. Кочиева 517

Область пониженной рекомбинации группы сцепления 13 подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) включает кластеры генов восстановления фертильности (*Rf1*) и устойчивости (*Pl*) к ложной мучнистой росе

И. Н. Анисимова, Н. В. Алпатьева, О. Н. Воронова, В. А. Гаврилова, Ю. И. Карабицина, Е. Б. Кузнецова, Е. Е. Радченко 530

Генетика животных

Предполагаемый локус, вовлеченный в изменчивость размеров черепа лисиц (*Vulpes vulpes*)

А. В. Харламова, С. Г. Шихевич, А. В. Владимирова, А. В. Кукекова, В. М. Ефимов 544

Полногеномный поиск новых генов-кандидатов мясной продуктивности у овец северокавказской мясо-шерстной породы

А. Ю. Криворучко, Р. В. Зуев, А. И. Суров, А. В. Скокова, А. А. Каниболоцкая, А. А. Лиховид, О. А. Яцык 562

Математические модели и методы

Разработка математической модели прогнозирования риска шизофрении на основе оценки носительства полиморфных аллелей в 13 генетических локусах, влияющих на обмен птеринов

Т. В. Жиляева, А. П. Баврина, Е. Д. Касьянов, А. С. Благонравова, Г. Э. Мазо 573

Разработка тест-системы для ДНК-идентификации особей вида енотовидная собака

А. Е. Гребенчук, О. Н. Лукашкова, С. А. Котова, И. С. Цыбовский 584

Краткие сообщения

Географическая изменчивость частот встречаемости В-хромосом
у лесных мышей *Sylvaemus flavicollis* Восточной Европы

Ю. М. Борисов, И. А. Крищук, З. З. Борисова 601

Хроника

Первая университетская школа российской генетики

С. Г. Инге-Вечтомов, Е. В. Голубкова, Г. А. Журавлёва 606

Contents

Vol. 59, No. 5, 2023

Reviews and Theoretical Articles

Eupolyploidy as a Modeinplant Speciation

A. V. Rodionov 493

General Genetics

Study of the Genotoxicity of Beta-Propiolactone Using *E. coli* lux Biosensors and Nematode *Caenorhabditis elegans*

E. A. Machigov, S. K. Abilev, E. V. Igonina, and M. V. Marsova 507

Plant Genetics

Antocyanidin-3-*O*-Glucosyltransferase Genes in Pepper (*Capsicum* spp.) and Their Role in Anthocyanine Biosynthesis

M. A. Filyushin, A. V. Shchennikova, and E. Z. Kochieva 517

Recombination Suppressed Region of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Linkage Group 13 Covers Restoration of Fertility (*Rf1*) and Downy Mildew Resistance (*Pl*) Gene Clusters

I. N. Anisimova, N. V. Alpatieva, O. N. Voronova, V. A. Gavrilova, Yu. I. Karabitsina, E. B. Kuznetsova, and E. E. Radchenko 530

Animal Genetics

Putative Locus for Cranial Size Variability of the Fox (*Vulpes vulpes*)

A. V. Kharlamova, S. G. Shikhevich, A. V. Vladimirova, A. V. Kukekova, and V. M. Efimov 544

Genome-Wide Search of New Meat Productivity Candidate Genes in North Caucasian Meat and Wool Sheep Breed

A. Yu. Krivoruchko, R. V. Zuev, A. I. Surov, A. V. Skokova, A. A. Kanibolotskaya, A. A. Likhovid, and O. A. Yatsyk 562

Mathematical Models and Methods

Mathematical Model Development for Schizophrenia Risk Prediction Based on Assessment of Polymorphic Alleles Carriage in 13 Genetic Loci Affecting Pterin Metabolism

T. V. Zhilyaeva, A. P. Bavrina, E. D. Kasyanov, A. S. Blagonravova, and G. E. Mazo 573

Robust Test System for DNA Identification of Raccoon Dogs

A. E. Hrebianchuk, O. N. Lukashkova, S. A. Kotava, and I. S. Tsybovsky 584

Short Communications

Geographic Variability in the Frequency of B Chromosome Occurrence in the Wood Mice *Sylvaemus flavicollis* of Eastern Europe

Yu. M. Borisov, I. A. Kryshchuk, and Z. Z. Borisova 601

Chronicle

The First University School of Russian Genetics

S. G. Inge-Vechtomov, E. V. Golubkova, and G. A. Zhouravleva 606

ГЕНЕТИКА, 2023, том 59, № 5, с. 493–506

ОБЗОРНЫЕ И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 575.224.234.2

ЭУПОЛИПЛОИДИЯ КАК СПОСОБ ВИДООБРАЗОВАНИЯ У РАСТЕНИЙ

© 2023 г. А. В. Родионов*

Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук, Санкт-Петербург, 197376 Россия

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

Поступила в редакцию 17.07.2022 г.
После доработки 01.09.2022 г.
Принята к публикации 12.09.2022 г.

При описании явлений, связанных с событиями полногеномной дупликации геномов (WGD), используют термины неополиплоид, мезополиплоид и палеополиплоид в их современной “пост-геномной” интерпретации. По нашему мнению, в потоке меняющихся состояний генома между неополиплоидами и палеополиплоидами имеет смысл выделить стадию эуполиплоида – такое состояние полиплоида, когда его полиплоидная природа не вызывает никаких сомнений, но геном (кариотип) эуполиплоида в отличие от неополиплоида уже относительно стабилен. В состоянии эуполиплоида находится большинство геномов/кариотипов многочисленных полиплоидных видов растений, полиплоидная природа кариотипа которых не вызывает сомнений у исследователей – генетиков, кариологов и флористов. Факультативно эуполиплоиды могут вступать в новые раунды межвидовой гибридизации с сохранением у гибрида уровня плоидности родителей или с возникновением аллополиплоида более высокого уровня плоидности. Эуполиплоидизация генома – это радикальный и быстрый способ видо- и родообразования у растений. Таким путем возникли десятки тысяч видов современных растений. Удачные сочетания аллелей субгеномов эуполиплоида, характерные для высоких полиплоидов крупные размеры, частый переход к неполовому размножению могут способствовать успешному освоению эуполиплоидами новых ареалов, адаптации к экстремальным условиям существования на краю ареалов, но не обретению новых ароморфозов – это видообразование, но видообразование на уже освоенном уровне эволюционной сложности, шаг, не ведущий сам по себе к прогрессивной эволюции.

Ключевые слова: полиплоидия, эволюция геномов и кариотипов, цитогенетика растений.

DOI: 10.31857/S0016675823050119, **EDN:** DRWNGX

По оценкам кариосистематиков около половины видов цветковых растений полиплоиды [1]. Только в родах, где есть и диплоиды и полиплоиды и потому определение плоидности не вызывает сомнений, полиплоидных видов не менее 15%. Причем в родах с низким основным числом хромосом $x = 2–7$ доля полиплоидов существенно больше – до 50% [2]. Результаты сравнительного исследования групп сцепления представителей всех основных филогенетических ветвей наземных растений показали, что следы одного или нескольких актов полногеномной дупликации (WGD) есть в геномах всех исследованных в этом отношении голосеменных и покрытосеменных растений [3–5]. Поэтому удивляет не то, что полиплоидов много, а то, что есть много – около 50–85% – растений, у которых кариотип выглядит так, словно они диплоиды.

То, что один или несколько актов WGD имели место в эволюции геномов всех голосеменных и покрытосеменных растений, не кажется тривиальным. У представителей других филогенетических ветвей, сестринских ветви семенных растений (Spermatophyta), WGD выявляется не всегда. Не видно следов WGD в геномах предков многоклеточных наземных растений – харовых водорослей [6]. Дупликаций – последствий WGD не обнаружено в геномах плаунка *Selaginélla* [7], антоцеротового мха *Anthoceros angustus* [8], печеночного мха *Marchantia polymorpha* [9]. Напротив, предки настоящих мхов (Bryophyta), папоротников и гомоспоровых плауновидных, так же как цветковые растения, пережили по крайней мере один акт WGD в своей истории [10]. Примечательно, что около 70% зарегистрированных актов WGD у предков современных растений непосредственно предшествовали периоду экологической катастрофы на границе мелового периода и есть основания думать, что какие-то особенности появившихся тогда неополиплоидных геномов помогли их обладателям адаптироваться к новым экологическим условиям [3, 11].

WGD – АВТО- ИЛИ АЛЛОПОЛИПЛОИДИЗАЦИЯ?

Событие WGD может произойти двумя различными способами – может произойти удвоение генома вида, такой полиплоид с тремя и более идентичными геномами (AAA, AAAA, ...) называют автополиплоидом, в то время как полиплоид, возникший после межвидовой гибридизации в результате удвоения близких, но неодинаковых, гомеологичных геномов (AABB, AABBCC и т.п.), именуют аллополиплоидом. Как часто встречаются авто- и аллополиплоды в природе – неизвестно. Оценки разных авторов, даже когда речь идет о хорошо изученных семействах, значительно различаются (сравни: [12, 13]). Казалось бы, различия между автополиплоидами и аллополиплоидами очевидны – мультипликация генома одного вида в первом случае и мультипликация геномов как следствие объединения в одном ядре (геноме) субгеномов нескольких разных видов – во втором. Есть два основных методических подхода для дифференциации авто- и аллополиплоидов: таксономический и кариологический. Полиплоид относят к автополиплоидам, если опытный систематик считает, что диплоидные предки полиплоида были растениями одного вида, – это таксономический метод дифференциации. Не менее основательный вывод может быть сделан при кариологическом исследовании: если в мейозе I при конъюгации хромосом образуются мультиваленты – это автополиплоид, если хромосомы конъюгируют попарно, мультивалентов нет – аллополиплоид.

Проблема в том, что следует считать разными видами в мире растений. В ходе дискуссий о границах видов предложено различать виды “биологические” – репродуктивно изолированные друг от друга [1, 14, 15] и виды “морфологические” или “таксономические” – природные популяции, обладающие большими или меньшими морфологическими особенностями (морфологическим гиатусом) и определенным ареалом [1, 16–18]. Сравнительно часто морфологически хорошо различаемые виды растений способны при скрещивании давать жизнеспособное, полностью или частично фертильное потомство. Показано, что возможность давать жизнеспособные гибриды может сохраняться у географически разобщенных видов растений миллионы и десятки миллионов лет [18]. Когда вследствие изменений климата или деятельности человека ареалы “таксономических” видов смыкаются, эти виды достаточно часто вполне успешно могут скрещиваться, давая фертильное, часто полиплоидное потомство. Этот путь появления полиплоидных видов Дж.Л. Стеббинс назвал “the secondary contact hypothesis” [19, 20]. “Таксономические” виды в последнее время чаще всего выделяют на основе сочетания их морфологических особенностей и ДНК-штрихкода, подразумевая, что само по себе наличие своеобразного набора признаков и различий в ДНК-штрихкодах есть основание для предположения о наличии репродуктивного барьера, дополнительные доказательства существования которого в этом случае не требуются [21–23].

Поскольку вопрос, “что перед нами – авто- или аллополиплоид?” априорно означает, что мы, возможно, имеем дело с результатом межвидового скрещивания, следовательно “родителей” предполагаемого аллополиплоида нельзя отнести к “биологическим” видам на основе бесспорного критерия биологического вида – его репродуктивной изоляции. Остается предположить, что события межвидовой гибридизации, ведущие к появлению аллополиплоидов, происходят при участии “таксономических” или “морфологических” видов. Однако границы “таксономических” видов тоже вызывают дискуссию. Проблема в том, что некоторые таксономически значимые признаки растений определяются моногенно. Например, виды *Avena clauda* и *A. eriantha* хорошо различаются по морфологии цветка и колоска, но различия эти определяются аллелями одного гена. Оба вида можно видеть в смешанных популяциях и известно, что гибриды между ними образуются легко и они фертильны. Это пример двух “хороших” морфологических видов, однако с генетической точки зрения их видовой статус необоснован [15]. Противоположная ситуация с видами *A. damascena* и *A. prostrata* – по морфологии их трудно различить, однако они репродуктивно изолированы друг от друга [15]. По подсчетам Л. Райсберга и соавт. [24] только 70% “таксономических” видов репродуктивно изолированы. Частоту встречаемости репродуктивно изолированных, но морфологически неразличимых, криптических видов растений в настоящее время подсчитать невозможно [25, 26].

К нерешенным вопросам, имеющим отношение к таксономическому критерию авто- или аллополиплодии, относится проблема таксономического статуса циторас – растений, близких друг к другу по морфологии, но имеющих разные уровни плоидности. Это один вид или несколько разных видов? Как правило, циторасы автополиплоидного происхождения не имеют существенных морфологических различий, кроме, может быть, размеров клеток и размеров самого растения. Их лишь в редких случаях, когда ареалы циторас различаются, относят к разным видам [26, 27]. Напротив, циторасы аллополиплоидного происхождения часто относят к разным видам и даже родам, даже тогда, когда морфологические различия между природными популяциями с разной композицией генома/кариотипа не очевидны [25–28].

Кариологический критерий гибридного происхождения полиплоида независим от экспертной

оценки таксономистами-морфологами видового ранга его предков. Согласно ему вид считается аллополиплоидом, если у него нет аллосиндеза (конъюгации хромосом в мейозе I с образованием мультивалентов) и дисомное наследование аллелей. Напротив, для автополиплоидов характерны мультиваленты в мейозе I и полисомное наследование аллелей [13, 29]. Но получение и выращивание на экспериментальном поле межвидовых гибридов и исследование их хромосом в мейозе – трудоемкое, долговременное, плохо укладывающееся в современную практику планирования и финансирования научных проектов занятие. Крайне редко подобное исследование затрагивает объекты вне узкого круга модельных объектов генетики растений. Среди представителей 47 семейств растений Ж. Ли с соавт. [30] выявили только 208 полиплоидных видов растений, у которых хотя бы однажды было исследовано поведение хромосом в мейозе. Среди них, учитывая интегрированные филогенетические, цитологические и генетические данные, 118 видов были классифицированы авторами как аллополиплоиды, а 90 – как автополиплоиды [12, 30]. Однако в этой выборке только 92 вида демонстрировали строго бивалентное спаривание хромосом в мейозе I, в то время как у 116 видов в профазе мейоза формировались мультиваленты (по крайней мере один мультивалент). Что важно: среди полиплоидов, которые рассматривались авторами исследования как аллополиплоиды, 48% видов демонстрировали строго бивалентное спаривание, а у 52% видов наблюдались один или много мультивалентов. Среди автополиплоидов соответствующие частоты были равны 39 и 61% [30]. Как и ожидалось, частота строго бивалентного спаривания выше у аллополиплоидов, чем у автополиплоидов, однако различия между сравниваемыми типами полиплоидов незначительны. Высокая частота встречаемости мультивалентов у видов, которые считались аллополиплоидными, и частота строго бивалентного спаривания у автополиплоидов заставляют или отказаться от критерия “строго бивалентное спаривание” как индикатора аллополиплоидной природы полиплоида, или признать, что интегрированные “phylogenetic, cytological, and genetic data”, использованные авторами для дифференциации авто- и аллополиплоидов [12, 30], не позволяют корректно различить алло- или автополиплоиды.

Как результат, на сегодняшний день роль автополиплоидии в процессах видообразования у растений остается неясной или не вполне обоснованной [26, 27, 29–31]. Как правило, автополиплоид значительно в меньшей степени, чем аллополиплоид, отличается от своих диплоидных предков по морфологии [26, 27], по транскриптому [32, 33] и протеому [34]. Напротив, есть основания предполагать, что активное видообразование, появление таксономически значимых новаций в морфологии и физиологии предков современных дикорастущих растений, возникновение и/или целенаправленное создание многочисленных сельскохозяйственных культур были связаны с аллополиплоидами – полиплоидизацией геномов, сопровождавшей отдаленную гибридизацию [3, 11–13, 29, 35, 36].

НЕОПОЛИПЛОИДЫ, МЕЗОПОЛИПЛОИДЫ, ЭУПОЛИПЛОИДЫ, ПАЛЕОПОЛИПЛОИДЫ

При описании явлений, связанных с появлением нового полиплоида и его последующими трансформациями, используют предложенные С. Фаварже [37] термины неополиплоид, мезополиплоид и палеополиплоид в их современной “пост-геномной” интерпретации [38]. При этом неополиплоидом называют недавно возникшие полиплоиды с кариотипом (геномом), число хромосом в котором есть результат сочетания полных наборов хромосом (субгеномов) предковых диплоидных видов. Термин палеополиплоид используется при описании генома (кариотипа), у которого морфология хромосом и поведение хромосом в мейозе как у диплоида, а полиплоидное прошлое палеополиплоида становится очевидным только после анализа последовательностей ядерного генома. Мезополиплоидные виды демонстрируют диплоидоподобный мейоз, дисомное наследование аллелей, имеют уменьшенное в сравнении неополиплоидным предком, часто очень низкое “квазидиплоидное” число хромосом, однако родительские субгеномы в геноме мезополиплоида все еще можно различить цитогенетически или молекулярно-филогенетически [38]. По нашему мнению, в этом потоке меняющихся состояний генома между неополиплоидами и палеополиплоидами имеет смысл выделить стадию эуполиплоида (от эу, др.-греч. εὖ – “хорошо”, хороший, добротный; настоящий, подлинный, истинный) – такое состояние полиплоида, когда его полиплоидная природа не вызывает никаких сомнений (кариотип представляет собой сочетание кариотипов родителей), но геном (кариотип) эуполиплоида в отличие от неополиплоида уже относительно стабилен [39, 40].

ЭУПОЛИПЛОИДЫ: САЛЬТАЦИОННОЕ ВИДООБРАЗОВАНИЕ ПУТЕМ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ДЕСПЕЦИАЛИЗАЦИИ И ЧАСТИЧНОЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ ИЗОЛЯЦИИ

В состоянии эуполиплоида находится большинство геномов/кариотипов многочисленных полиплоидных видов растений, полиплоидная природа кариотипа которых не вызывает сомнений у исследователей флоры. Среди цветковых растений полиплоидные геномы чаще появлялись в сем. Poaceae; тоже часто, но в 3 раза реже, чем у злаков,

в семействах Montiaceae и Brassicaceae. Очень редко акты полиплоидизации имели место в порядке Arecales [41]. К типичным эуполиплоидам относятся многочисленные аллотетраплоидные виды с упорядоченным, диплоидного типа расхождением хромосом в мейозе. Такие полиплоиды называют амфидиплоидами (термин введен М.С. Навашиным [42: с. 136]).

Проблемы с расхождением хромосом в мейозе и митозе у неополиплоидов связаны с важной особенностью центромеров эукариот – правильно работающий кинетохор формируется как многокомпонентный нуклеино-протеиновый комплекс, в основе которого лежит взаимодействие быстро изменяющейся в ходе дивергенции таксонов центромерной ДНК и тех доменов центромерных белков CenH3 и CENP-C, которые взаимодействуют с центромерной ДНК и тоже быстро изменяются в эволюции [43, 44]. Способность связываться с центромерной ДНК другого вида у центромерных белков может сохраняться долго. Показано, например, что CenH3 *Lepidium* и *Zea* могут взаимодействовать с центромерной ДНК *Arabidopsis,* образуя работающие центромеры, разводящие хромосомы *Arabidopsis* в дочерние клетки, но в условиях конкуренции, когда в геноме присутствуют и CenH3 *Lepidium* и CenH3 *Arabidopsis,* хромосомы с "гетерогенными" кинетохорами расходятся хуже, часто попадают в микроядра и элиминируются [45]. Стабилизация расхождения хромосом у эуполиплоида может быть достигнута утратой центромерной ДНК одного из родителей, как это наблюдается у аллотетраплоидной *Zingeria trichopoda* [46], и/или гомогенизацией генов CenH3 в сторону одного из родителей [47].

Потери хромосом в мейозе нео- и мезополиплоидов связаны не только с несовершенством "бастардных" центромер, но и с аберрантным спариванием хромосом в мейозе. Мультиваленты у автополиплоидов и аллополиплоидов повышают вероятность неравного расхождения хромосом в мейозе I, появления зигот и эндосперма с несбалансированными хромосомными наборами [29]. Отбор к повышению фертильности полиплоида должен идти в направлении хромосомных наборов, в которых гомологичные и гомеологичные хромосомы преимущественно или исключительно конъюгировали бы с образованием бивалентов [12, 48, 49]. Несколько разных механизмов работают для достижения этого результата. Прежде всего предпочтительному спариванию гомологов, а не гомеологов, способствуют предусловия мейоза. В интерфазе в соматических клетках [46, 50, 51] и в премейотической интерфазе у полиплоидов [52] субгеномы разного происхождения в большей или меньшей степени пространственно разделены.

Преимущественному спариванию гомологов перед гомеологами способствует и то, что при дивергенции предковых видов аллополиплоида в хромосомах каждого вида накопились микроинверсии, такие, как найдены в геноме *Triticum* [53] и *Oryza* [54]. Не менее важно то, что за время дивергенции предков аллополиплоидов в их геномах происходили взрывная амплификация транспозонов одних семейств (новых или ранее малочисленных) и исчезновение всех или большей части последовательностей из семейств транспозонов общего предка. Такой сценарий изменений паттерна умеренных повторов в геноме называют моделью "рождение–и–смерть" [55]. Например, из 33 семейств ретротранспозонов в геноме вида *Oryza punctata* шесть семейств, занимающих 25 млн пн (6.3% генома), не найдены в геномах других видов риса [54]. Отслеживание судьбы 75 ортологичных локусов LTR-содержащих ретротранспозонов у восьми наиболее близкородственных видов из группы родства *O. sativa* показало, что эти последовательности теряются из генома со средней скоростью 3620 пн/млн лет на транспозон. Экстраполируя эти данные на весь геном, можно предсказать, что если не будет следующего взрыва транспозиций, то геном *O. sativa* ssp. *japonica* уменьшится на четверть своего размера в течение следующих 3–4 млн лет [54].

Процессы преимущественного спаривания гомологичных хромосом в мейозе аллополиплоидов находятся под генетическим контролем [49, 56]. Аллели, супрессоры спаривания гомеологичных хромосом, обнаружены у диплоидных предков полиплоидов в разных подсемействах растений, что неудивительно, поскольку мы знаем, что все они прошли через несколько актов WGD. По-видимому, неополиплоид в большинстве случаев получает их от своих диплоидных (палеополиплоидных) предков, но известны случаи, когда бивалентное спаривание хромосом объяснялось новыми мутациями [56–58]. Иногда переход от мультивалентного к бивалентному спариванию у неополиплоидов происходит настолько быстро, что заставляет предполагать эпигенетическую регуляцию процесса [56].

Второй этап, на котором исправляются ошибки спаривания гомологов, относится ко времени формирования синаптонемного комплекса (СК), когда образование СК между гомологами идет эффективно, а локальные участки СК, появившиеся было между гомеологами, разбираются [49, 59, 60].

Помимо проблем с расхождением хромосом, у неополиплоидов и мезополиплоидов в соматических клетках наблюдается повышенная частота фрагментов хромосом и межгеномных транслокаций [61, 62]. Существует точка зрения, что межгеномные транслокации являются одним из механизмов преодоления ядерно-цитоплазматиче-

ской несовместимости неополиплоидов [63, 64]. Вероятность межгеномных транслокаций затруднена тем, что субгеномы разного происхождения в интерфазном ядре у аллополиплоидов находятся в разных компартментах [46, 50, 51]. Можно предположить, что это же обстоятельство в какой-то степени ограничивает межгеномную миграцию транспозонов и иных рассеянных повторов. В существовании такого ограничения нас убеждает феномен GISH-гибридизации, при которой общегеномная ДНК одного предполагаемого "предка" гибридизируется с хромосомами только одного субгенома, но не с другими (см., например: 46, 65]). Как долго сохраняются различия в наборах рассеянных повторов между субгеномами у аллополиплоида в разных семействах – неизвестно. У тетра- и гексаплоидных овсов, сформировавшихся 8–10 млн лет назад [66], выявляемое с помощью GISH различие между A- и C-субгеномами по рассеянным повторам сохранилось [67], а у *Nicotiana nesophila,* возникшего около 4.5 млн лет назад, предками которого, как полагают, являлись *N. sylvestris* и *N. obtusifolia*, GISH уже не выявляет различия между субгеномами [68].

Факультативно эуполиплоиды могут вступать в новые раунды межвидовой гибридизации с сохранением у гибрида уровня плоидности или с появлением аллополиплоида более высокого уровня плоидности [69, 70]. Показано, что у полиплоидов высоких порядков постзиготическая изоляция циторас часто выражена слабее, чем при гибридизации диплоидов и тетраплоидов [71]. Среди полиплоидов высоких порядков часто встречаются разные варианты анеуплоидий, не коррелирующие с морфологическими гиатусами и интерпретируемые как проявление внутривидового разнообразия циторас. Неполная постзиготическая изоляция имеет следствием непрерывный поток аллелей между циторасами среди полиплоидов высоких порядков, что замедляет дивергенцию морфотипов у многохромосомных полиплоидов [71]. Таким путем возникают целые комплексы факультативно перекрестно-опыляющихся природных рас, отчасти апомиктических или самоопыляющихся "микровидов", которые невозможно разделить на какие-либо "крупные" ("морфологические") виды [17, 72]. Такая ситуация имеет место во многих родах злаков, например у *Poa, Elymus, Leymus, Thinopyrum* [73].

Появление вследствие межвидовой гибридизации эуполиплоидов с разными уровнями полиплоидии — это радикальный и быстрый способ видообразования. Таким путем возникли десятки тысяч видов современных растений [41, 74]. Так, в результате гибридизации между тетраплоидным североамериканским видом ($2n = 4x = 32$) *Symphyotrichum boreale* (Asteraceae) и гексаплоидом ($2n = 6x = 48$) *S. novi-belgii* появился редкий эндемичный вид – декаплоид ($2n = 10x = 80$) *S. anticostense* [75]. Наивысшие известные уровни полиплоидизации среди цветковых – 16× у *Artemisia* (Asteraceae) [76] и *Primula* (Primulaceae) [77], 24× у *Tradescantia* (Commelinaceae), 28× у *Eleocharis* и 32× у *Cyperus* (оба Cyperaceae) [78]. Относительно часто встречаются высокие полиплоиды у злаков: 18× у *Avenula adsurgens* [79], *Arundo donax* [80] и *Anthoxanthum amarum* [81], 20× у *Helictochloa lusitanica* [69], 36× у *Andropogon barbinodis* [82], 38× у *Poa litorosa* [83].

Анализ чисел хромосом в кариотипах около 30 тыс. видов цветковых растений, относящихся к 147 семействам 46 порядков, показал, что недавно возникшие полиплоиды (эуполиплоиды) есть во всех порядках и в 139 из 147 семейств[1] [41].

Типичный пример эуполиплоида – кариотип и геном сформировавшегося около 9 тыс. лет назад гексаплоидного вида *Triticum aestivum* ($2n = 42$, $x = 7$, BBAADD), возникшего в результате объединения геномов тетраплоидной полбы (эммера) *T. turgidum* ($2n = 28$, BBAA) и генома диплоидного (палеополиплоидного) вида *Aegilops tauschii* ($2n = 14$, DD). Это был только последний из раундов полиплоидизации, приведший к появлению вида *T. aestivum*. Примерно 500–800 тыс. лет назад ему предшествовало появление тетраплоидного генома эммера в результате гибридизации двух диплоидных (палеополиплоидных) видов: со стороны растения-опылителя, донора субгена A, это был вид, похожий на *T. urartu*, но дивергировавший от *T. urartu* на ~1.3 млн лет ранее, и материнского растения-донора субгенома B – вида, родственного *Ae. speltoides*, но дивергировавшего от общего предка с *Ae. speltoides* за ~4.5 млн лет до этого [84–87]. Подчеркнем, что геном и кариотип современных линий и сортов *T. aestivum* выглядят стабильными, но кариотип ресинтезированных аллополиплоидов с геномной конституцией BBAADD в первых поколениях в той или иной степени (в зависимости от линейной принадлежности родительских видов) нестабилен – в этот момент идет потеря части дуплицированных последовательностей протеин-кодирующих генов, реорганизация повторов (репитома). Однако, как правило, через несколько поколений геном стабилизируется, спаривание хромосом в мейозе идет без образования мультивалентов [85, 86].

Сходство групп сцепления трех субгеномов современных *T. aestivum* между собой и с группами сцепления диплоидных предков (макросинтения) высокое, однако в среднем через каждые 75 млн пн в геноме мягкой пшеницы встречаются микроинверсии со средней длиной 10.5 млн пн, преимущественно лежащие в обедненных генами районах [53]. По числу генов субгеномы A, B и D примерно равны (35345, 35643 и 34212 генов соответствен-

[1] Alstroemeriaceae, Fagaceae, Grossulariaceae, Nepenthaceae, Nothofagaceae, Schisandraceae, Smilacaceae, Tamaricaceae.

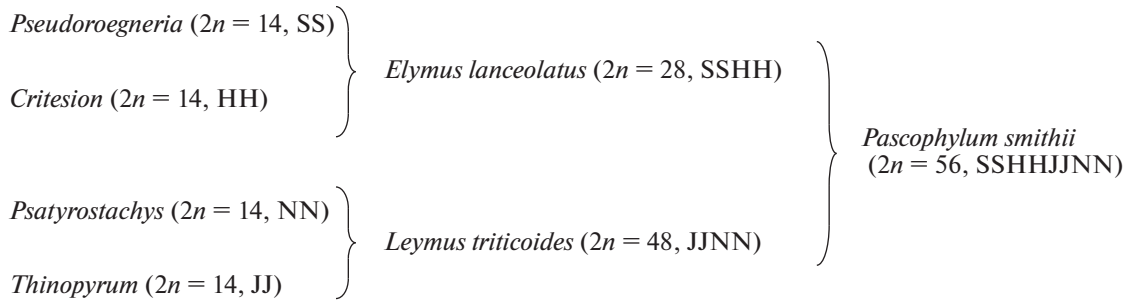


Рис. 1. Пример таксонообразования в трибе Пшеницевые (по [90], модифицировано).

но). Не различаются они существенно и по числу копий транспозонов разных классов. После полиплоидизации в геноме *T. aestivum* экспансии транспозонов не происходило [53]. Однако в геноме пшеницы шли и идут процессы постепенной геномной диплоидизации ("фракционирования генома" [38, 48]), но идут они равномерно, без дискриминации одного из субгеномов – в полиплоидном геноме *T. aestivum* каждый из субгеномов уже потерял примерно по 10% предковых генов [53]. Возможно это, как раз, и есть показатель квазистабильного состояния генома эуполиплоида. Несколько иная ситуация в аллополиплоидном геноме *Avena sativa* (кариотип AACCDD) – у овса в субгеноме C на 12% генов меньше, чем в субгеномах A и D, однако гены эти не утрачены, а транслоцированы из богатого генами участка C-субгенома длиной не менее 226 млн пн в хромосомы A и D-субгеномов – т.е. геном гексаплоидного овса также находится в квазистабильном состоянии [87].

Детально изучавшие кариотипы и процессы видообразования Пшеницевых А. Лёве [88, 89] и Д.Р. Дьюи [90] пришли к выводу, что новые рода и виды у Triticeae образуются путем межвидовой гибридизации и полиплоидизации через появление все новых и новых комбинаций субгеномов. А. Лёве [88, 89] предложил считать родом группу близкородственных видов, имеющих или специфический диплоидный геном, или особую, только для этого рода характерную комбинацию субгеномов. При этом автополиплоидное умножение генома или субгенома не считалось достаточным для того, чтобы относить автополиплоидные комбинации в разные рода (например: кариотипы JJHH, JJJJHH, JJJJHHHH – кариотипы видов одного рода). Привлекательная с генетической точки зрения идея близка к предложению Л.Н. Делоне [91] различать незначительные, микроэволюционные, идущие в пределах рода изменения размеров и морфологии хромосом и макроэволюционные, существенные реорганизации хромосомных наборов. "Кариотип Делоне" – это таксономическая единица, группа видов, отличающаяся по морфологии хромосомного набора от другой группы видов, другого "кариотипа Делоне" [91].

А. Лёве [89] выделил у Пшеницевых 24 варианта диплоидных геномов, обозначенных латинскими буквами от A до Z, и 15 вариантов полиплоидных геномов, в формировании которых принимали участие 13 из 24 возможных первичных диплоидных геномов. В предлагаемой А. Лёве системе количество родов в трибе Пшеницевые возросло, при этом, руководствуясь геномным критерием рода, пришлось раздробить некоторые общеизвестные традиционные рода, такие как *Triticum,* на несколько: *T. monococcum* и *T. urartu* с кариотипом AA вошли в род *Crithodium*, *T. durum* (AABB) отнесли в род *Gigachilon*, *T. aestivum* (BBAADD) – род *Triticum*. Геном *Hordeum vulgare* и *H. bulbosum* был обозначен как I, геном остальных представителей рода *Hordeum*, диплоидов и полиплоидов, был обозначен как H [89, 92]. Со временем букв английского алфавита для обозначения вариантов геномов стало не хватать, в частности оказалось, что у видов *H. murinum* другой первичный (диплоидный) геном – он был обозначен как Xu, геном видов *H. gussoneanum* и *H. marinum* назван Xa-геномом [92, 93]. Некоторые иные модификации обозначения геномов можно найти в статье [92].

В качестве примера можно привести три акта видо/родообразования у пшеницевых [90] (рис. 1).

Обсуждая особенности видо- и родообразования у растений, следует обратить внимание на то, что одни и те же комбинации субгеномов (один и тот же род) могут возникать неоднократно в разное время и в разных точках ареалов (рис. 2). Так, дизъюнкция ареалов эуполиплоидных видов в некоторых случаях может быть следствием независимого происхождения полиплоидных природных рас со схожей комбинацией субгеномов на разных территориях, на разных континентах.

Последовательное применение в таксономии геномной концепции рода часто не совпадало с дискретностью морфологических признаков, считавшихся таксономически значимыми в систематике Злаков, не поддерживалось или поддерживалось, но с оговорками и исключениями, опытными систематиками растений [28, 94–97]. Однако неслу-

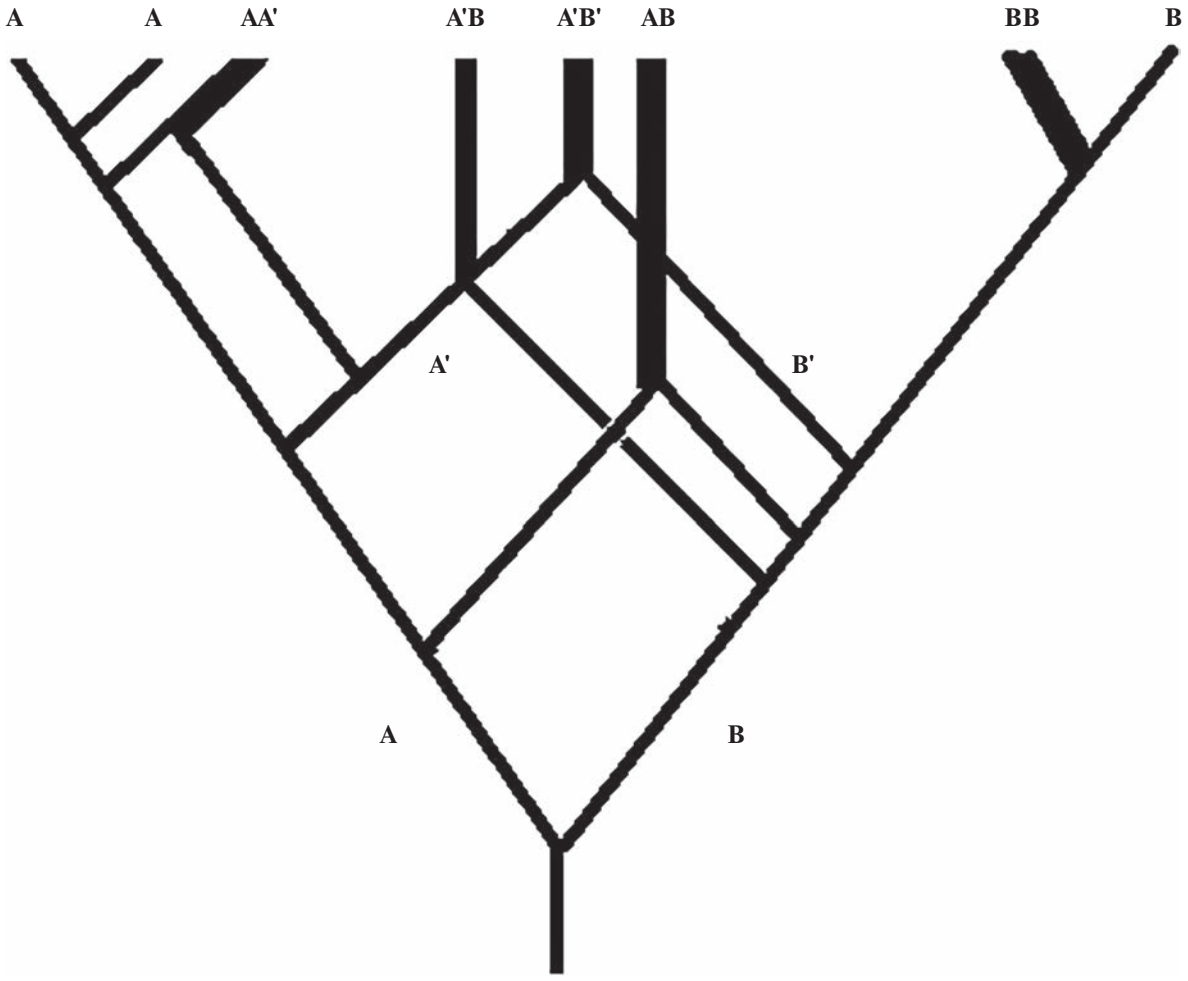


Рис. 2. Один и тот же эуполиплоидный вид/род может возникать неоднократно в разное время и в разных точках своего ареала.

чайно закон гомологических рядов Н.И. Вавилова [98, 99] был открыт, прежде всего, в работе с Пшеницевыми – при углубленном анализе морфологических вариаций у каждого вида злаков можно выявить едва ли не весь комплекс признаков, наблюдавшихся у других видов данной трибы. Лишь некоторые из признаков видоспецифичны и только их можно рассматривать как таксономически значимые радикалы [98, 99]. Особенно это заметно, когда анализируются морфологические признаки полиплоидов, как правило отличающихся удивительным морфологическим разнообразием [28, 100].

Р.В. Камелин [96: с. 98, 100] справедливо заметил, что установление геномного состава видов путем попарного скрещивания и трудоемкого анализа поведения хромосом в мейозе 1 [90, 97, 101] — задача трудно разрешимая, для многих природных видов едва ли возможная. Поэтому в первом десятилетии XXI в. предложенная Лёве концепция разграничения родов Пшеницевых (и не только Пшеницевых) по геномному критерию родов не казалась Р.В. Камелину и другим ботаникам-систематикам убедительной, поскольку геномы полиплоидных злаков сложны по составу, а в 2005 г. не было уверенности, что первичные геномы диплоидов и субгеномы полиплоидов определены однозначно правильно и что эволюция современных известных нам диплоидов и полиплоидов шла от диплоидов к полиплоидам, а не наоборот. Не зная результатов полногеномного секвенирования, Р.В. Камелин [96] вполне резонно допускал то, чему сейчас есть сравнительно-геномные доказательства: геномы, которые представляются нам первичными диплоидами, могут в действительности являться недавними дериватами полиплоидных геномов.

Но, с другой стороны, прав был и выдающийся агростолог Н.Н. Цвелев [28], 30 лет назад писавший о возможностях практического применения геномного критерия: “в настоящее время они [возможности], конечно, очень ограничены, так как геномный анализ [методами Кихары и Дьюи]

требует проведения очень трудоемких исследований. Однако то, что невозможно теперь, со временем может стать возможным. Вероятно будет разработана новая методика, значительно облегчающая генетический анализ, который, несомненно, очень перспективен. Не исключено, что в будущем станет возможным использование содержащейся в геномах избыточной информации, что откроет широкие возможности для создания новых таксонов, а может быть и для воссоздания уже вымерших таксонов, геномы которых сохранились в хромосомных наборах ныне живущих видов, но не используются ими в онтогенезе". Н.Н. Цвелев полагал [28, 100], что геномный критерий родов заслуживает внимания хотя бы потому, что в настоящее время однозначных синапоморфий для построения системы родов Пшеницевых на основании таксономически убедительных морфологических гиатусов или репродуктивной изоляции все равно не найдено, поэтому кажется вполне возможным, что новые и будущие методики исследования геномов вполне могут сделать геномный критерий родов инструментом в руках систематика-практика [28].

На важное обстоятельство, во многом определяющее особенности морфологии диплоидных и полиплоидных злаков, обратил внимание Н.Н. Цвелев [100, 102]. Один из базисных принципов теории эволюции гласит, что в пределах конкретной филогенетической ветви характеристики любого общего предка являются более примитивными, неспециализированными, чем характеристики потомков на различных ветвях его древа, которые всегда более или менее специализированы пропорционально времени их появления [103]. Традиционный взгляд на видообразование и эволюцию морфологических признаков у растений предполагал, что эволюционными потенциями обладают неспециализированные формы, в каждой из филогенетических ветвей идут разнонаправленные процессы специализации; специализированные формы не способны к диверсификации [100, 102]. Однако у злаков виды с диплоидными кариотипами, как правило, представляют собой высокоспециализированные формы; часто это виды с узкими или разорванными ареалами, в то время как возникшие в результате аллополиплоидизации их эуполиплоидные потомки с их сложной комбинацией субгеномов выглядят деспециализированными. Это проявляется в том, что у них появляются более древние, а потому и более примитивные в эволюционно-морфологическом смысле признаки, как это наблюдается, например, у полиплоидных *Elymus* в сравнении с их диплоидными предками из родов *Hordeum* и *Pseudoroegneria* [73, 97]. Многочисленные полиплоидные *Calamagrostis* sensu lato менее специализированы в сравнении с их вероятными диплоидными предками из родов *Agrostis, Trisetum* [73, 102, 104]. PacBio-секвенирование четырех протяженных (около 1 тпн) низкокопийных районов ядерного генома папоротников из рода *Botrychium* (сем. Ophioglossaceae) показало, что многочисленные полиплоиды в этом роде возникли недавно, не более 5 млн лет назад, в результате недавней быстрой "неадаптивной радиации", когда относительно небольшое количество диплоидных видов (12 из 20 исследованных) в результате независимых актов межвидовой гибридизации дали 19 тетраплоидов и один гексаплоидный вид, причем геномы трех диплоидных видов участвовали в формировании субгеномов тетраплоидов только один раз, а субгеном, полученый от *B. pallidum*, найден в геномах семи тетраплоидов и одного гексаплоида [105]. Таким образом, мы видим, что при сальтационном видообразовании путем аллополиплоидизации и интрогрессии эволюция словно идет вспять: высокоспециализированные эволюционно стазисные диплоидные (в действительности палеополиплоидные!) "предки" в результате гибридизации дают начало нескольким или многим эуполиплоидным родам, которые по совокупности признаков выглядят малоспециализированными.

Переход неополиплоида к эуполиплоидному, квазистабильному состоянию часто происходит в сочетании с переходом к многолетней форме жизни, самоопылению, апомиксису и вегетативному размножению, что важно при ограниченных возможностях найти полового партнера [74, 106–109]. Само по себе полиплоидное состояние генома не повышает устойчивости к низким температурам [19, 20], однако низкие температуры, соленость и иные неблагоприятные для данного вида экологические факторы, с которыми растениям приходится сталкиваться на границах их естественных ареалов, на нарушенных землях и во вновь осваиваемых экологических нишах, повышают вероятность появления гамет с нередуцированным числом хромосом у растений с облигатным или факультативным половым размножением [110–112]. Вероятно поэтому эуполиплоидов много среди инвазионных видов [113] и среди видов-эндемиков островной флоры [108]. В тундре Северного полушария 51% видов полиплоиды, в расположенной южнее тайге их 47% [74]. В западной Канаде, Гренландии и европейской Арктике 87% эндемиков полиплоиды, в Берингии таких эндемиков 69% [114, 115], на Аляске 55% [20].

В экстремальных условиях существования вероятность межвидовой гибридизации и появления аллополиплоидов увеличивается. Интересный и поучительный факт приводит Н.Н. Цвелев [102]: виды двух богатых видами секций рода Мятлик – *Poa* и *Stenopoa* – в умеренно-теплой зоне часто растут вместе не скрещиваясь. Гибриды между ними и гибридогенные, от них произошедшие, виды встречаются только в Арктике и в высокогорьях.

Влияя на частоту появления нередуцированных гамет, экстремальные климатические условия способствуют относительной многочисленности полиплоидов в Арктике, однако большого видового разнообразия и многочисленных популяций здесь нет. Эуполиплоидное стабильное состояние генома в сочетании с бесполым размножением, фиксированной гетерозиготностью, защитой от инбридинга и непредсказуемыми результатами генетического дрейфа позволяет арктическим полиплоидам длительное время успешно сосуществовать и успешно конкурировать с предварительно адаптированными и тоже немногочисленными диплоидными (палеополиплоидными) родственниками [74, 114].

Ахиллесова пята этих прекрасно адаптированных к условиям среды полиплоидов, часто клонально размножающихся и потому устойчиво передающих потомству весь комплекс прошедших отбор адаптивных признаков экстремалов, – низкий уровень внутривидовой изменчивости. Но нет уверенности в том, что следующие поколения этого вида не столкнутся с новыми радикальными вызовами со стороны видов-конкурентов или среды обитания. На этот случай природой создан механизм множественной изменчивости и генетического дрейфа на основе мейотической нестабильности и дисплоидии. Яркий пример явлений подобного рода приводит Йенс Клаусен [116]: в прериях северо-запада США растет крупный и многочисленный мятлик *Poa ampla* (сейчас: *Poa juncifolia*). В его кариотипе $2n = 63$ хромосомы. От 90 до 95 процентов жизнеспособных семян производятся видом апомиктически, в результате чего все растения в потомстве имеют 63 хромосомы, фенотипически они воспроизводят родителей. Однако небольшая часть потомства, от 5 до 10%, появляется на свет в результате оплодотворения. Как правило, это небольшие, слабые растения, различающиеся по числу хромосом. У них насчитывали $2n = 56$, 60–63, 66, 70, 82–84, 90–93, 98–102, 126, до $2n = 147$ хромосом. Очевидно, перед нами своеобразный резерв, целенаправленное продуцирование все новых и новых вариантов комбинаций аллелей, некоторые из которых могут оказаться более успешными, чем родительское поколение, при будущем непредсказуемом, новом по сочетанию экологических факторов, но, увы, неизбежном экологическом кризисе.

Прошедшие отбор удачные сочетания аллелей субгеномов эуполиплоида, характерные для высоких полиплоидов крупные размеры, переход к неполовому размножению – все эти факторы способствуют успешному освоению эуполиплоидами новых ареалов, адаптации к экстремальным условиям существования на краю ареалов. Но, в то же время, мутации в геномах полиплоидов забуферены, а экспериментально полученные полиплоиды, как правило, от своих диплоидных предков ничем принципиально новым не отличаются [19, 20, 35, 117]. Складывается впечатление, что, легко формируя многочисленные новые, в той или иной степени репродуктивно изолированные полиплоидные виды, видовая и родовая самостоятельность которых определяется оригинальным сочетанием субгеномов, сам по себе акт WGD ничего принципиально нового не создает, что большая часть многочисленных полиплоидных видов – “слепые” ветви на филогенетическом древе цветковых растений (“dead-end”) [19, 20, 48, 118]. Переход неополиплоида к состоянию эуполиплоида – это путь к созданию нового вида, но это видообразование на уже освоенном уровне эволюционной сложности, шаг, не ведущий сам по себе к прогрессивной эволюции.

Сравнительная геномика показывает, что в долговременной перспективе, через миллион–другой лет после WGD, носители палеополиплоидных геномов имеют шанс вступить в состояние “взрывного” видообразования (диверсификации) и дать начало новым крупным надвидовым таксонам [3, 48, 119, 120]. Этому, по-видимому, должны предшествовать радикальные перестройки генома полиплоида – должна произойти диплоидизация генома, его “фракционирование”, уменьшение числа хромосом в геноме за счет серии транслокаций (дисплоидия) [48, 119, 120]. Иначе говоря, видообразование путем создания новых сочетаний субгеномов и стабилизации генома у эуплоидов, разобранное в нашей статье, и создание новых форм, дающих начало новым ароморфозам – это два разных направления эволюции растений.

Работа выполнена в рамках проекта РНФ 22-24-01117.

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Grant V.* Plant Speciation. N.Y.; London: Columbia Univ. Press, 1971. 233 p.
2. *Wood T.E., Takebayashi N., Barker M.S. et al.* The frequency of polyploid speciation in vascular plants // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. P. 13875–13879. https://doi.org/10.1073/pnas.0811575106
3. *Van de Peer Y., Mizrachi E., Marchal K.* The evolutionary significance of polyploidy // Nature Rev. Genet. 2017. V. 18. P. 411–424. https://doi.org/10.1038/nrg.2017.26
4. *Liu H., Wang X., Wang G. et al.* The nearly complete genome of *Ginkgo biloba* illuminates gymnosperm evolution // Nature Plants. 2021. V. 7. P. 748–756. https://doi.org/10.1038/s41477-021-00933-x

5. *Liu Y., Wang S., Li L. et al.* The *Cycas* genome and the early evolution of seed plants // Nature Plants. 2022. V. 8. P. 389–401. https://doi.org/10.1038/s41477-022-01129-7
6. *Nishiyama T., Sakayama H., De Vries J. et al.* The *Chara* genome: secondary complexity and implications for plant terrestrialization // Cell. 2018. V. 174. P. 448–464. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.033
7. *Banks J.A., Nishiyama T., Hasebe M. et al.* The *Selaginella* genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants // Science. 2011. V. 332. P. 960–963 . https://doi.org/10.1126/science.1203810
8. *Zhang J., Fu X.X., Li R.Q. et al.* The hornwort genome and early land plant evolution // Nature Plants. 2020. V. 6. P. 107–118. https://doi.org/10.1038/s41477-019-0588-4
9. *Bowman J.L., Kohchi T., Yamato K.T. et al.* Insights into land plant evolution garnered from the *Marchantia polymorpha* genome // Cell. 2017. V. 171. P. 287–304. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.030
10. *Szövényi P., Gunadi A., Li F.W.* Charting the genomic landscape of seed-free plants // Nature Plants. 2021. V. 7. P. 554–565. https://doi.org/10.1038/s41477-021-00888-z
11. *Benton M.J., Wilf P., Sauquet H.* The Angiosperm terrestrial revolution and the origins of modern biodiversity // New Phytologist. 2022. V. 233. P. 2017–2035. https://doi.org/10.1111/nph.17822
12. *Barker M.S., Arrigo N., Baniaga A.E. et al.* On the relative abundance of autopolyploids and allopolyploids // New Phytologist. 2016. V. 210. P. 391–398.
13. *Doyle J.J., Sherman-Broyles S.* Double trouble: taxonomy and definitions of polyploidy // New Phytologist. 2017. V. 213. P. 487–493. https://doi.org/10.1111/nph.14276
14. *Mayr E.* The biological species concept // Species Concepts and Phylogenetic Theory: A Debate / Eds Wheeler Q.D., Meier R. N.Y. Chichester: Columbia Univ. Press, 2000. P. 17–29.
15. *Ladizinsky G.* Studies in Oat Evolution. Berlin; Heidelberg: Springer, 2012. P. 1–18.
16. *Комаров В.Л.* Учение о виде у растений (страница из истории биологии). М.; Л.: Изд-во Акад. наук СССР, 1940. 212 с.
17. *Цвелев Н.Н.* Вид как один из таксонов // Бюлл. МОИП. Отд. Биол. 1995. Т. 100. Вып. 5. С. 62–68.
18. *Levin D.A.* The long wait for hybrid sterility in flowering plants // New Phytologist. 2012. V. 196. P. 666–670.
19. *Stebbins G.L.* Polyploidy and the distribution of the arctic-alpine flora: New evidence and a new approach // Bot. Helvetica. 1984. V. 94. P. 1–13.
20. *Stebbins G.L.* The origin and success of polyploids in the boreal circumpolar flora: A new analysis // Trans. Bot. Sci. Edinburgh. 1986. V. 45. P. 17–31.
21. *Liu J., Moeller M., Gao L.-M. et al.* DNA barcoding for the discrimination of Eurasian yews (*Taxus* L., Taxaceae) and the discovery of cryptic species // Mol. Ecol. Resour. 2011. V. 11. P. 89–100. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02907.x
22. *Bell D., Long D.G., Forrest A.D. et al.* DNA barcoding of European *Herbertus* (Marchantiopsida, Herbertaceae) and the discovery and description of a new species // Mol. Ecol. Resources. 2012. V. 12. P. 36–47. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03053.x
23. *Gill F.B.* Species taxonomy of birds: Which null hypothesis? // The Auk: Ornithological Advances. 2014. V. 131. P. 150–161. https://doi.org/10.1642/AUK-13-206.1
24. *Riesberg L.H., Wood T.E., Baack E.J.* The nature of plant species // Nature. 2006. V. 440. P. 524–527. https://doi.org/10.1038/nature04402
25. *Шнеер В.С., Коцеруба В.В.* Криптические виды растений и их выявление по генетической дифференциации популяций // Экол. генетика. 2014. Т. 12. № 3. С. 12–26.
26. *Soltis D.E., Soltis P.S., Schemske D.W. et al.* Autopolyploidy in angiosperms: have we grossly underestimated the number of species? // Taxon. 2007. V. 56. P. 13–30. https://doi.org/10.2307/25065732
27. *Шнеер В.С., Пунина Е.О., Родионов А.В.* Внутривидовые различия в плоидности у покрытосеменных и их таксономическая интерпретация // Ботан. журн. 2018. Т. 103. № 5. С. 555–585. https://doi.org/10.1134/S0006813618050010
28. *Цвелев Н.Н.* О геномном критерии родов у высших растений // Ботан. журн. 1991. Т. 76. № 5. С. 669–676.
29. *Ramsey J., Schemske D.W.* Neopolyploidy in flowering plants // Annu. Rev. Ecol. Syst. 2002. V. 33. P. 589–639.
30. *Li Z., McKibben M.T., Finch G.S. et al.* Patterns and processes of diploidization in land plants // Annu. Rev. Plant Biol. 2021. V. 72. P. 387–410. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100344
31. *Levin D.A.* Plant speciation in the age of climate change // Annals Botany. 2019. V. 124. P. 769–775. https://doi.org/10.1093/aob/mcz108
32. *Yu Z., Haberer G., Matthes M. et al.* Impact of natural genetic variation on the transcriptome of autotetraploid *Arabidopsis thaliana* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. P. 17809–17814. https://doi.org/10.1073/pnas.1000852107
33. *Liu B., Sun, G.* Transcriptome and miRNAs analyses enhance our understanding of the evolutionary advantages of polyploidy // Critical Rev. Biotechnology. 2019. V. 39. P. 173–180. https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1524824
34. *Soltis D.E., Misra B.B., Shan S. et al.* Polyploidy and the proteome // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics. 2016. V. 1864. P. 896–907. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.03.010
35. *Soltis D.E., Visger C.J., Marchant D.B., Soltis P.S.* Polyploidy: pitfalls and paths to a paradigm // Am. J. Botany. 2016. V. 103. P. 1146–1166. https://doi.org/10.3732/ajb.1500501
36. *Родионов А.В., Шнеер В.С., Гнутиков А.А. и др.* Диалектика видов: от исходного единообразия, через максимально возможное разнообразие к

конечному единообразию // Ботан. журн. 2020. Т. 105. № 9. С. 835–853. https://doi.org/10.31857/S0006813620070091

37. *Favarger C.* Sur l'emploi des nombres chromosomiques en géographie botanique historique // Ber. Geobot. Inst. Rübel. 1961. T. 32. S. 119–146.
38. *Mandáková T., Joly S., Krzywinski M. et al.* Fast diploidization in close mesopolyploid relatives of *Arabidopsis* // The Plant Cell. 2010. V. 22. P. 2277–2290.
39. *Родионов А.В., Носов Н.Н., Ким Е.С. и др.* Происхождение полиплоидных геномов мятликов (*Poa* L.) и феномен потока генов между Северной Пацификой и субантарктическими островами // Генетика. 2010. Т. 46. № 12. С. 1598–1608.
40. *Родионов А.В., Амосова А.В., Беляков Е.А. и др.* Генетические последствия межвидовой гибридизации, ее роль в видообразовании и фенотипическом разнообразии растений // Генетика. 2019. Т. 55. № 3. С. 255–272.
41. *Zhan S.H., Otto S.P., Barker M.S.* Broad variation in rates of polyploidy and dysploidy across flowering plants is correlated with lineage diversification // bioRxiv. 2021. this version posted March 31, 2021. https://doi.org/10.1101/2021.03.30.436382
42. *Навашин М.С.* Об изменении числа и морфологических признаков хромосом у межвидовых гибридов // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. 1927. Т. 17. Вып. 3. С. 121–150.
43. *Talbert P.B., Bryson T.D., Henikoff S.* Adaptive evolution of centromere proteins in plants and animals // J. Biology. 2004. V. 3(4). P. 1–17. https://doi.org/10.1186/jbiol11
44. *Melters D.P., Bradnam K.R., Young H.A. et al.* Comparative analysis of tandem repeats from hundreds of species reveals unique insights into centromere evolution // Genome Biol. 2013. V. 14(1). P. 1–20. https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-1-r10
45. *Maheshwari S., Tan E.H., West A. et al.* Naturally occurring differences in CENH3 affect chromosome segregation in zygotic mitosis of hybrids // PLoS Genetics. 2015. V. 11(1). P. e1004970. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004970
46. *Kotseruba V., Gernand D., Meister A., Houben, A.* Uniparental loss of ribosomal DNA in the allotetraploid grass *Zingeria trichopoda* (2*n* = 8) // Genome. 2003. V. 46. P. 156–163. https://doi.org/10.1139/g02-104
47. *Marimuthu M.P., Maruthachalam R., Bondada R. et al.* Epigenetically mismatched parental centromeres trigger genome elimination in hybrids // Sci. Advances. 2021. V. 7(47). eabk1151. https://doi.org/10.1126/sciadv.abk1151
48. *Mandáková T., Lysak M.A.* Post-polyploid diploidization and diversification through dysploid changes // Curr. Opinion Plant Biol. 2018. V. 42. P. 55–65. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.03.001
49. *Soares N.R., Mollinari M., Oliveira G.K. et al.* Meiosis in polyploids and implications for genetic mapping: A review // Genes. 2021. V. 12. P. 1517. https://doi.org/10.3390/genes12101517
50. *Wang M., Wang P., Lin M. et al.* Evolutionary dynamics of 3D genome architecture following polyploidization in cotton // Nat. Plants. 2018. V. 4. P. 90–97. https://doi.org/10.1038/s41477-017-0096-3
51. *Concia L., Veluchamy A., Ramirez-Prado J.S. et al.* Wheat chromatin architecture is organized in genome territories and transcription factories // Genome Biol. 2020. V. 21(1). https://doi.org/10.1186/s13059-020-01998-1
52. *Barea L., Redondo-Río Á., Lucena-Marín R. et al.* Homologous chromosome associations in domains before meiosis could facilitate chromosome recognition and pairing in wheat // Scientific Reports. 2022. V. 12(1). P. 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-022-14843-1
53. *International Wheat Genome Sequencing Consortium.* Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome // Science. 2018. V. 361. eaar7191.
54. *Stein J.C., Yu Y., Copetti D. et al.* Genomes of 13 domesticated and wild rice relatives highlight genetic conservation, turnover and innovation across the genus *Oryza* // Nat. Genetics. 2018. V. 50(2). P. 285–296. https://doi.org/10.1038/s41588-018-0040-0
55. *Nei M., Rooney A.P.* Concerted and Birth–and–Death evolution of multigene families // Annu. Rev. Genet. 2005. V. 39. P. 121–152. https://doi.org/0.1146/annurev.genet.39.073003.112240
56. *Gonzalo A.* All ways lead to Rome–Meiotic stabilization can take many routes in nascent polyploid plants // Genes. 2022. V. 13(1). P. 147. https://doi.org/10.3390/genes13010147
57. *Viegas W.S., Mello-Sampayo T., Feldman M., Avivi L.* Reduction of chromosome pairing by a spontaneous mutation on chromosomal arm 5DL of *Triticum aestivum* // Can. J. Genet. Cytol. 1980. V. 22. P. 569–575. https://doi.org/10.1139/g80-062
58. *Svačina R., Sourdille P., Kopecký D., Bartoš J.* Chromosome pairing in polyploid grasses // Front. Plant Sci. 2020. V. 11. P. 1056. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01056
59. *Jenczewski E., Alix K.* From diploids to allopolyploids: The emergence of efficient pairing control genes in plants // Crit. Rev. Plant Sci. 2004. V. 23. P. 21–45. https://doi.org/10.1080/07352680490273239
60. *Cuñado N., Blazquez S., Melchor L. et al.* Understanding the cytological diploidization mechanism of polyploid wild wheats // Cytogenet. Genome Res. 2005. V. 109. P. 205–209. https://doi.org/10.1159/000082401
61. *Tang Z.X., Fu S.L., Yan B.J. et al.* Unequal chromosome division and inter-genomic translocation occurred in somatic cells of wheat–rye allopolyploid // J. Plant. Res. 2012. V. 125. P. 283–290. https://doi.org/10.1007/s10265-011-0432-z
62. *Luo J., Zhao L., Zheng J. et al.* Karyotype mosaicism in early generation synthetic hexaploid wheats // Genome. 2020. V. 63. P. 329–336. https://doi.org/10.1139/gen-2019-0148
63. *Gill B.S., Chen P.D.* Role of cytoplasm-specific introgression in the evolution of the polyploid wheats // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. № 19. P. 6800–6804. https://doi.org/10.1073/pnas.84.19.6800

64. *Бадаева Е.Д., Шелухина О.Ю., Дедкова О.С. и др.* Сравнительное цитогенетическое исследование гексаплоидных видов *Avena* L. // Генетика. 2011. Т. 47. № 6. С. 783–795.

65. *Amosova A.V., Badaeva E.D., Muravenko O.V., Zelenin A.V.* An improved method of genomic in situ hybridization (GISH) for distinguishing closely related genomes of tetraploid and hexaploid wheat species // Rus. J. Developm. Biol. 2009. V. 40. № 2. P. 90–94.

66. *Liu Q., Lin L., Zhou X. et al.* Unraveling the evolutionary dynamics of ancient and recent polyploidization events in *Avena* (Poaceae) // Scientific Reports. 2017. V. 7(1). P. 1–13. https://doi.org/10.1038/srep41944

67. *Jellen E.N., Gill B.S., Cox T.S.* Genomic *in situ* hybridization differentiates between A/D- and C-genome chromatin and detects intergenomic translocations in polyploid oat species (genus *Avena*) // Genome. 1994. V. 37. P. 613–618.

68. *Lim K.Y., Kovarik A., Matyasek R. et al.* Sequence of events leading to near-complete genome turnover in allopolyploid *Nicotiana* within five million years // New Phytologist. 2007. V. 175. P. 756–763. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02121.x

69. *Winterfeld G., Schneider J., Perner K., Röser M.* Polyploidy and hybridization as main factors of speciation: complex reticulate evolution within the grass genus *Helictochloa* // Cytogen. Genome Res. 2014. V. 142. P. 204–225. https://doi.org/10.1159/000361002

70. *Suissa J.S., Kinosian S.P., Schafran P.W. et al.* Homoploid hybrids, allopolyploids, and high ploidy levels characterize the evolutionary history of a western North American quillwort (*Isoëtes*) complex // Mol. Phylogen. Evol. 2022. V. 166. P. 107332. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2021

71. *Sutherland B.L., Galloway L.F.* Postzygotic isolation varies by ploidy level within a polyploid complex // New Phytologist. 2017. V. 213. P. 404–412.

72. *Камелин Р.В.* Особенности видообразования у цветковых растений // Тр. Зоол. ин-та РАН. Приложение № 1. 2009. С. 141–149.

73. *Цвелев Н.Н., Пробатова Н.С.* Злаки России. М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2019. 646 с.

74. *Rice A., Šmarda P., Novosolov M. et al.* The global biogeography of polyploid plants // Nature Ecol. Evol. 2019. V. 3. P .265–273. https://doi.org/10.1038/s41559-018-0787-9

75. *Vaezi J., Brouillet L.* Origin of *Symphyotrichum anticostense* (Asteraceae: Astereae), an endemic, high polyploid species of the Gulf of St. Lawrence region, based on morphological and nrDNA evidence // Botany. 2022. https://doi.org/10.1139/cjb-2021-0145

76. *Pellicer J., Garcia S., Garnatje T. et al.* Chromosome counts in Asian *Artemisia* L. (Asteraceae) species: From diploids to the first report of the highest polyploid in the genus // Bot. J. Linn. Soc. 2007. V. 153. P. 301–310. https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2007.00611.x

77. *Guggisberg A., Mansion G., Kelso S., Conti E.* Evolution of biogeographic patterns, ploidy levels, and breeding systems in a diploid–polyploid species complex of *Primula* // New Phytologist. 2006. V. 171. P. 617–632. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01722.x

78. *Kaur H., Mubarik N., Kumari S., Gupta R.C.* Chromosome numbers and basic chromosome numbers in monocotyledonous genera of the Western Himalayas (India) // Acta Biologica Cracoviensia. Ser. Botanica. 2014. V. 56. № 2. P. 9–19. https://doi.org/10.2478/abcsb-2014-0016

79. *Winterfeld G., Schneider J., Perner K., Röser M.* Origin of highly polyploid species: Different pathways of auto and allopolyploidy in 12–18× species of *Avenula* (Poaceae) // Int. J. Plant Sci. 2012. V. 173. P. 399–411. https://doi.org/10.1086/664710

80. *Hardion L., Verlaque R., Rosato M. et al.* Impact of polyploidy on fertility variation of Mediterranean *Arundo* L. (Poaceae) // Comptes Rendus Biologies. 2015. V. 338. P. 298–306. https://doi.org/10.1016/j.crvi.2015.03.013

81. *Chumová Z., Krejčíková J., Mandáková T. et al.* Evolutionary and taxonomic implications of variation in nuclear genome size: Lesson from the grass genus *Anthoxanthum* (Poaceae) // PLoS One. 2015. V. 10(7). e0133748. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133748

82. *Gould F.W.* Pollen size as related to polyploidy and speciation in the *Andropogon saccharoides–A. barbinodis* complex // Brittonia. 1957. V. 9. № 2. P. 71–75.

83. *Hair J.B., Beuzenberg E.J.* High polyploidy in a New Zealand *Poa* // Nature. 1961. V. 189. P. 160.

84. *Li L.F., Zhang Z.B., Wang Z.H. et al.* Genome sequences of the five *Sitopsis* species of *Aegilops* and the origin of polyploid wheat B subgenome // Mol. Plant. 2022. V. 15. P. 488–503. https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.12.019

85. *Levy A.A., Feldman M.* Evolution and origin of bread wheat // The Plant Cell. 2022. koac130. https://doi.org/10.1093/plcell/koac130

86. *Eilam T., Anikster Y., Millet E. et al.* Nuclear DNA amount and genome downsizing in natural and synthetic allopolyploids of the genera *Aegilops* and *Triticum* // Genome. 2008. V. 51. P. 616–627. https://doi.org/10.1139/G08-043

87. *Kamal N., Tsardakas Renhuldt N., Bentzer J. et al.* The mosaic oat genome gives insights into a uniquely healthy cereal crop // Nature. 2022. V. 606. P. 113–119. https://doi.org/0.1038/s41586-022-04732-y

88. *Löve Á.* Generic evolution of the wheat grasses // BioI. Zentralbl. 1982. T. 101. S. 199–212.

89. *Löve Á.* Conspectus of the Triticeae // Feddes Repert. 1984. T. 95. S. 425–521.

90. *Dewey D.R.* The genomic system of classification as a guide to intergeneric hybridization with the perennial Triticeae // Gene Manipulation in Plant Improvement. Boston, MA: Springer, 1984. P. 209–279.

91. *Делоне Л.Н.* Сравнительное кариологическое исследование видов *Muscari* Mill. и *Bellevalia* Lapeyr. // Вестн. Тифлисского бот. сада. 1922. Т. 2. Вып. 1. С. 1–32.

92. *Wang R.R.-C., von Bothmer R., Dvorak J. et al.* Genome symbols in the Triticeae (Poaceae) // Herbarium Publications. Logan, Uta: Uta State Publ., 1994. Paper 20. P. 1–19. https://digitalcommons.usu.edu/herbarium_pubs/20
93. *Blattner F.R.* Taxonomy of the genus *Hordeum* and barley (*Hordeum vulgare*) // The Barley Genome. Cham.: Springer, 2018. P. 11–23.
94. *Baum B.R., Estes J.R., Gupta P.K.* Assessment of the genomic system of classification in the Triticeae // Am. J. Botany. 1987. V. 74. P. 1388–1395.
95. *Barkworth M.E.* Taxonomy of the Triticeae: A historical perspective // Hereditas. 1992. V. 116. P. 1–14.
96. *Камелин Р.В.* Лекции по систематике растений. Главы теоретической систематики растений. Барнаул: Азбука, 2004. 226 с.
97. *Yen C., Yang J.-L., Yen Y.* Hitoshi Kihara, Áskell Löve and the modern genetic concept of the genera in the tribe Triticeae (Poaceae) // J. Syst. Evol. 2005. V. 43. P. 82–93.
98. *Vavilov N.I.* The law of homologous series in variation // J. Genet. 1922. V. 12. P. 47–89.
99. *Вавилов Н.И.* Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости. М.; Л.: ОГИЗ-Сельхозгиз, 1935. 56 с.
100. *Цвелев Н.Н.* О возможности деспециализации путем гибридогенеза на примере эволюции трибы Triticeae семейства Злаков (Poaceae) // Журн. общей биологии. 1975. Т. 36. № 1. С. 90–99.
101. *Kihara H.* Genom analyse bei *Triticum* und *Aegilops* // Cytologia. 1930. V. 1. № 3. P. 263–284.
102. *Цвелев Н.Н.* Гибридизация как один из факторов увеличения биологического разнообразия и геномный критерий родов у высших растений // Биологическое разнообразие: подходы к изучению и сохранению. СПб., 1992. С. 193–201.
103. *Simpson G.G.* Tempo and Mode in Evolution. N.Y.: Columbia Univ. Press, 1944. 237 p.
104. *Saarela J.M., Bull R.D., Paradis M.J. et al.* Molecular phylogenetics of cool-season grasses in the subtribes Agrostidinae, Anthoxanthinae, Aveninae, Brizinae, Calothecinae, Koeleriinae and Phalaridinae (Poaceae, Pooideae, Poeae, Poeae chloroplast group 1) // PhytoKeys. 2017. V. 87. 1–139. https://doi.org/10.3897/phytokeys.87.12774
105. *Dauphin B., Grant J.R., Farrar D.R., Rothfels C.J.* Rapid allopolyploid radiation of moonwort ferns (*Botrychium*; Ophioglossaceae) revealed by PacBio sequencing of homologous and homeologous nuclear regions // Mol. Phylogenet. Evol. 2018. V. 120. P. 342–353. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.11.025
106. *Schinkel C.C., Kirchheimer B., Dellinger A.S. et al.* Correlations of polyploidy and apomixis with elevation and associated environmental gradients in an alpine plant // AoB Plants. 2016. V. 8. P. 1–16. https://doi.org/10.1093/aobpla/plw064
107. *Herben T., Suda J., Klimešová J.* Polyploid species rely on vegetative reproduction more than diploids: a re-examination of the old hypothesis // Annals Botany. 2017. V. 120. P. 341–349. https://doi.org/10.1093/aob/mcx009
108. *Meudt H.M., Albach D.C., Tanentzap A.J. et al.* Polyploidy on islands: its emergence and importance for diversification // Front. Plant Sci. 2021. V. 12:637214. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.637214
109. *Villa S., Montagna M., Pierce S.* Endemism in recently diverged angiosperms is associated with polyploidy // Plant Ecology. 2022. V. 223. P. 479–492. https://doi.org/10.1007/s11258-022-01223-y
110. *Pécrix Y., Rallo G., Folzer H. et al.* Polyploidization mechanisms: temperature environment can induce diploid gamete formation in *Rosa* sp. // J. Exp. Bot. 2011. V. 62. P. 3587–3597. https://doi.org/10.1093/jxb/err052
111. *Klatt S., Schinkel C.C., Kirchheimer B. et al.* Effects of cold treatments on fitness and mode of reproduction in the diploid and polyploid alpine plant *Ranunculus kuepferi* (Ranunculaceae) // Annals Botany. 2018. V. 121. P. 1287–1298.
112. *Fox D.T., Soltis D.E., Soltis, P.S. et al.* Polyploidy: A biological force from cells to ecosystems // Trends Cell Biol. 2020. V. 30. P. 688–694. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.06.006
113. *Prentis P.J., Wilson J.R., Dormontt E.E. et al.* Adaptive evolution in invasive species // Trends Plant Sci. 2008. V. 13. P. 288–294.
114. *Brochmann C., Brysting A.K., Alsos I.G. et al.* Polyploidy in arctic plants // Biol. J. Linn. Soc. 2004. V. 82. P. 521–536. https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2004.00337.x
115. *Пробатова Н.С.* Хромосомные числа в семействе Poaceae и их значение для систематики, филогении и фитогеографии (на примере злаков Дальнего Востока России) // Комаровские чтения. 2007. Вып. 55. С. 9–103.
116. *Clausen J.* Introgression facilitated by apomixis in polyploid Poas // Euphytica. 1961. V. 10. P. 87–94. https://doi.org/10.1007/BF00037208
117. *Soltis D.E., Visger C.J., Soltis P.S.* The polyploidy revolution then... and now: Stebbins revisited // Am. J. Botany. 2014. 101. P. 1057–1078. https://doi.org/10.3732/ajb.1400178
118. *Mayrose I., Zhan S.H., Rothfels C.J. et al.* Recently formed polyploid plants diversify at lower rates // Science. 2011. V. 333. P. 1257. https://doi.org/10.1126/science.1207205
119. *Schranz M.E., Mohammadin S., Edger P.P.* Ancient whole genome duplications, novelty and diversification: The WGD Radiation Lag-Time Model // Curr. Opinion Plant Biol. 2012. V. 15. P. 147–153. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.03.011
120. *Wang X., Morton J.A., Pellicer J. et al.* Genome downsizing after polyploidy: Mechanisms, rates and selection pressures // The Plant J. 2021. V. 107. P. 1003–1015. https://doi.org/10.1111/tpj.15363

Eupolyploidy as a Modeinplant Speciation

A. V. Rodionov*

Komarov Botanical Institute Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 197376 Russia
**e-mail: avrodionov@mail.ru*

When discussing phenomena of the whole genome duplication (WGD), the terms neopolyploid, mesopolyploid, and paleopolyploid are used in their modern "post-genomic" interpretation. In our opinion, in the flow of changing genome states between neopolyploids and paleopolyploids, it makes sense to single out the eupolyploid stage – a state of a polyploid, when its polyploid nature is beyond doubt, but the genome (karyotype) of the eupolyploid, unlike the neopolyploid, is already relatively stable. Most of so-called polyploid plant species are actually eupolyplids, the polyploid nature of the karyotype of which is beyond doubt among researchers – geneticists, karyologists, and florists. Optionally, eupolyploids can enter new rounds of interspecific hybridization with the hybrid maintaining the level of ploidy of the parents or with the emergence of an allopolyploid of a higher level of ploidy. Eupolyploidization of the genome is a radical and rapid method of speciation and genus formation in plants. In this way, tens of thousands of species of modern plants arose. Successful combinations of alleles of eupolyploid subgenomes, large sizes characteristic of high polyploids, frequent transition to asexual reproduction can contribute to the successful development of new areas by eupolyploids, adaptation to extreme conditions of existence at the edge of areas, but not to the acquisition of new aromorphoses – this is speciation, but speciation on already mastered level of evolutionary complexity, a step that does not in itself lead to progressive evolution.

Keywords: polyploidy, evolution of genomes and karyotypes, plant cytogenetics.

ГЕНЕТИКА, 2023, том 59, № 5, с. 507–516

ОБЩАЯ ГЕНЕТИКА

УДК 575.224

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНОТОКСИЧНОСТИ БЕТА-ПРОПИОЛАКТОНА С ПОМОЩЬЮ lux-БИОСЕНСОРОВ *E. coli* И НЕМАТОДЫ *Caenorhabditis elegans*

© 2023 г. Э. А. Мачигов[1], С. К. Абилев[1, 2, *], Е. В. Игонина[1], М. В. Марсова[2]

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

[2]*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия*

**e-mail: abilev@vigg.ru*

Поступила в редакцию 12.10.2022 г.
После доработки 01.11.2022 г.
Принята к публикации 02.11.2022 г.

Впервые применены lux-биосенсоры *E. coli* и нематоды *Caenorhabditis elegans* для исследования генотоксичности бета-пропиолактона (БПЛ), используемого в производстве инактивированных вирусных вакцин в качестве инактиватора. Показано, что ДНК-повреждающая активность БПЛ обусловлена не только его способностью связываться с ДНК бактерий, но и способностью генерировать в клетке такие активные формы кислорода как супероксид-анион и перекись водорода, обладающие генотоксической активностью. Обнаружено, что БПЛ доза-зависимым образом, начиная с концентрации 0.001 моль/л, снижает выживаемость бактерий. Однако при этом усиливалась интенсивность экспрессии гена антиоксидантной защиты супероксиддисмутазы *soxS* и гена репарации ДНК *colD*. БПЛ индуцировал в клетках нематоды разрывы ДНК, выявляемые методом электрофореза. Антиоксидант ацетилцистеин снижал генотоксические эффекты БПЛ как у бактерий, так и у нематод.

Ключевые слова: бета-пропиолактон, lux-биосенсоры, *E. coli*, нематода *Caenorhabditis elegans*, генотоксичность, супероксид-анион, разрывы ДНК, антиоксидант, ацетил цистеин.

DOI: 10.31857/S0016675823040070, **EDN:** AVYSFU

Бета-пропиолактон (**БПЛ**) является промышленно важным химическим соединением. С 1953 по 1973 гг. его использовали для производства акриловой кислоты [1–3], позже был предложен новый метод синтеза акриловой кислоты и объемы производства БПЛ в мире сократились. Кроме применения в химической промышленности БПЛ используется для стерилизации: хирургических инструментов, плазмы крови, тканевых трансплантатов, молока, воды, питательного бульона и ферментов [2–5]. В 1974 г. Международное агентство по исследованию рака (IARC) включило БПЛ в группу 2А возможных канцерогенов для человека по результатам изучения его способности индуцировать рак у мышей и крыс при различных способах воздействия [1–4].

БПЛ является высоко реакционноспособным соединением, для которого характерны реакции с раскрытием четырехчленного цикла, вследствие напряженности связей в нем. При раскрытии цикла БПЛ образуется электрофильное производное, обладающее сильными бактерицидными свойствами. В связи с этим, БПЛ широко применяют и в настоящее время для стерилизации крови, ферментов, а также в качестве инактиватора в производстве инактивированных вирусных вакцин [1, 2] наряду с формальдегидом [1, 3]. Способность БПЛ в первую очередь взаимодействовать с ДНК или РНК предполагает, что иммуногенные эпитопы белка вируса будут повреждены незначительно в отличие от инактивации формальдегидом [3–5].

Генотоксичность БПЛ как алкилирующего агента, изучается с 60-х годов XX в. Было показано, что БПЛ быстро вступает в реакцию с нуклеофильными центрами белков и нуклеиновых кислот. В белках БПЛ преимущественно связывается с серосодержащими аминокислотами [6]. В ДНК БПЛ реагирует с гуанином, образуя 7-(2-карбоксиэтил)гуанин, с аденином реагирует в меньшей степени, преимущественно в положении N3 его молекулы [7]. Алкилирование гуанина может привести либо к депуринизации, либо к образованию ионизированной формы молекулы, способной к неправильной водородной связи с тимином. Это может привести к мутациям замены пары оснований GC на AT.

Токсические и мутагенные эффекты БПЛ были изучены в лимфобластах человека и у бактерий *Salmonella typhimurium* методом определения количества модифицированного гуанина. Клетки *S. typhimurium* были в 25 раз более чувствительны к БПЛ, чем клетки человека [8]. У *Drosophila melanogaster* БПЛ индуцировал рецессивные летальные мутации, связанные с полом, аутосомные транслокации и разрывы хромосом [9]. В тесте Эймса БПЛ индуцировал мутации замены пар оснований у двух штаммов и сдвиг рамки считывания у пяти штаммов *S. typhimurium*. При этом антиоксиданты – витамин С, витамин Е, селен и бутилированный гидрокситолуол, заметно снижали мутагенез, происходящий по механизму сдвига рамки считывания [10]. БПЛ индуцировал микроядра в клетках селезенки мышей *in vivo* [11] и проявил мутагенную активность на клеточных линиях V79 и g12 (трансгенная клеточная линия) [12]. Основные итоги исследования генетических свойств приведены в обзорах [5, 13].

Было проведено исследование потенциальной генотоксичности БПЛ на предимплантационных эмбрионах мышей *in vivo*. Для этого самкам на разных стадиях мейоза путем инъекции вводили БПЛ в разное время после индукции суперовуляции. Анализ мужских и женских хромосомных комплементов перед сингамией, полученных от эмбрионов с первым расщеплением, не выявил цитогенетических нарушений [14].

Для определения потенциальной органной специфичности генотоксического воздействия БПЛ *in vivo* использовали трансгенную модель мыши Muta™ Mouse, которая содержит несколько копий репортерного гена *lacZ* в одном локусе на хромосоме 3. Авторы выделяли ДНК из интересующих тканей, затем вырезали репортерный ген и вставляли в фаговые частицы. Далее заражали этими фаговыми частицами бактерии *E. coli*, у которых отсутствует функциональный ген *lacZ*, далее проводили позитивную селекцию для определения частоты мутаций $lacZ^+$. Через семь дней после однократного перорального введения мышам БПЛ (150 мг/кг) частота мутаций в желудке мыши Muta увеличилась в 8.8 раз по отношению к контролю, однако в печени мыши этот показатель составил 1.8 [15].

В экспериментах на крысах *in vivo* способность БПЛ связываться с ДНК слизистой носа хорошо соответствовала его канцерогенному потенциалу в носу крыс [16]. Результаты экспериментов *in vivo* указывают на то, что БПЛ не проявляет системного генотоксического и канцерогенного эффектов, чаще всего эти эффекты проявляются по месту введения. Например отмечено отсутствие системной неоплазии в результате подкожного или перорального воздействия БПЛ на животных [4]. Период полураспада БПЛ *in vivo* вероятно слишком короток для того, чтобы значительное количество активной формы достигло любого целевого участка.

Цель данной работы – изучение генотоксичности БПЛ с помощью lux-биосенсоров *E. coli*, несущих плазмиду с промоторами индуцибельных генов SOS-ответа и генов окислительного стресса, слитыми с lux-опероном, у нематоды *Caenorhabditis elegans*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Химические препараты. Все использованные химические вещества были аналитической чистоты. β-Пропиолактон был приобретен у фирмы “Sigma Aldrich” (США), N-ацетилцистеин (**АЦЦ**) приобрели у компании “Serva” (Германия). Все необходимые разведения веществ готовились *ex tempore*.

Штаммы lux-биосенсоров. В работе использовали lux-биосенсоры на основе штамма *E. coli* K12: pColD-lux, pRecA-lux, pAlkA-lux, pSoxS-lux и pKatG-lux. Данные биосенсоры содержат рекомбинантную плазмиду, включающую промоторы генов репарации и SOS-ответа: *recA*, *alkA* и *colD*; промоторы генов супероксиддисмутазы *soxS* и каталазы *katG*, слитые с *lux*-опероном *Photorhabdus luminescens*. Генотип штамма *E. coli* K12 MG1655 и конструкции рекомбинантных плазмид описаны ранее [17–19]. Перечисленные биосенсоры предоставлены Г.Б. Завильгельским и И.В. Мануховым (ГосНИИгенетика, Москва).

Хранение и культивирование бактериальных культур осуществляли с помощью питательных сред LB (Луриа–Бертани), жидких и твердых, с добавлением агара. Среды содержали ампициллин в концентрации 100 мкг/мл. Для опытов использовали культуры биосенсоров pRecA-lux, pColD-lux, pAlkA-lux pKatG-lux и pSoxS-lux в жидкой питательной среде LB.

Регистрация люминесцентного ответа биосенсоров. Ночные культуры биосенсоров разбавляли в свежей жидкой среде LB, доводя содержание бактерий до концентрации 10^7 кл/мл, и инкубировали при 37°C в течение 120 мин с аэрацией до достижения ранней экспоненциальной фазы. Далее культуры переносили в 96-луночный планшет по 160 мкл в каждую лунку. Ряд контрольного образца заполняли дистиллированной водой по 40 мкл в лунку, следующие же ряды лунок заполняли по 20 мкл воды в каждую лунку и по 20 мкл различных разведений БПЛ. В экспериментах по изучению влияния антиоксидантов на действие БПЛ вместо дистиллированной воды в лунку добавляли по 20 мкл раствора АЦЦ. Далее, культуры в заполненных планшетах культивировали течение 1 ч при 37°C и определяли интенсивность люминесценции биосенсоров с помощью люминометра –

микропланшетного ридера StatFax 4400, Awareness Technology Inc. (США), где за единицу измерения для люминесцентного ответа принимали условные единицы светового потока (RLU). Вышеперечисленные опыты проводили не менее трех раз с восемью повторениями в каждом.

Тест на разрывы ДНК методом гель-электрофореза. Ночные культуры биосенсоров разбавляли в свежей жидкой среде LB, доводя содержание бактерий до концентрации 10^7 кл/мл. Затем инкубировали при 37°C в течение 120 мин с аэрацией до достижения ранней экспоненциальной фазы. Далее, по 1 мл различных разведений БПЛ и по 1 мл раствора АЦЦ добавляли в 10 мл бактериальной культуры и культивировали в течение 1.5 ч при 37°C, после этого бактерии отмывали изотоническим физиологическим раствором путем центрифугирования. После очередного центрифугирования и слива супернатанта растворяли осадок пипетированием в 350 мкл лизирующего раствора (0.1 ммоль/л ЭДТА, 0.5 М NaOH, 0.05% SDS). Далее выдерживали в лизирующем растворе в течение 1.5 ч при 37°C. Затем 35 мкл лизированной бактериальной культуры добавляли в лунки 1%-ной агарозной пластины, содержащей бромид этидия в концентрации 10 мкл/100 мл. Леддер помещали в первую лунку в объеме 5 мкл. Далее агарозная гелевая пластина устанавливалась в ванночке для электрофореза, наполненной TBE-буфером. Электрофорез проводился в течение 1.5 ч при 100 В. На последнем этапе с помощью трансиллюминатора Vilber Lourmat serial N 10 102939 (Франция) осуществляли визуализацию флуоресцирующих штрихов ДНК под действием УФ-излучения.

Культивирование нематод. В работе использовали нематод *Caenorhabditis elegans* Bristol N2, которых выращивали при 21°C на твердой агарозной NGM-среде. В качестве питания использовали *E. coli* OP50 в виде газона по описанному методу [20].

Для синхронизации поколения разросшуюся на чашке Петри популяцию нематод пипетировали стерильной водой до получения взвеси нематод и яиц. Переносили 3.5 мл взвеси в пробирку и добавляли 1.5 мл свежеприготовленной смеси (0.5 мл 5 М NaOH + 1 мл 5% $HClO_4$). Перемешивали и вортексировали 10 мин, а затем центрифугировали 30 с при 1300 g и удаляли супернатант. Затем промывали осадок, добавляя 5 мл воды, центрифугируя и удаляя супернатант. Промывку повторяли три раза. Затем 0.1 мл суспензии яиц нематод переносили на чашку с NGM-агаром и газоном *E. coli* OP50. Выращивание синхронизированных нематод проводили при 20°C в течение трех суток до достижения стадии L4 (“young adult”).

Проведение эксперимента и выделение ДНК нематод. Для проведения эксперимента червей смывали с чашек стерильной водой в 1.5-мл пробирки, осаждали на вортексе и сливали супернатант. К осадку добавляли БПЛ в разных концентрациях, пипетировали до образования взвеси и инкубировали 120 мин при 21°C. Затем взвесь нематод центрифугировали 5 мин при 2300 g и удаляли супернатант, добавляли 1 мл стерильной воды и пипетировали до получения взвеси. Далее нематод промывали с целью освобождения кишечника червей от бактерий. Для этого взвесь сливали в пробирки по 15 мл, добавляли воду до достижения 5 мл и центрифугировали 5 мин при 2300 g для образования гранул. Супернатант отбрасывали и заменяли свежей стерильной водой. Пробирки, содержащие нематоды, вортексировались 3 мин; после этого червей центрифугировали 5 мин при 2300 g для удаления бактерий. Промывку повторяли десять раз, чтобы вымыть бактерии из кишечника нематод. При последней промывке избыток воды удаляли, оставляя 1 мл смеси вода/нематоды, а затем переносили в 1.5-мл микроцентрифужные пробирки и центрифугировали при 12100 g в течение 10 мин. Супернатант сливали, а гранулу подвергали заморозке при –20°C, после чего механически измельчали палочкой с абразивной поверхностью наконечника.

Далее выделение ДНК проводили с использованием специального набора реагентов по протоколу Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) следующим образом. 1. Не дожидаясь оттаивания измельченной гранулы, добавляли к ней 200 мкл TE-буфера, 400 мкл лизирующего раствора, и инкубировали при 65°C в течение 10 мин. 2. Затем добавляли 600 мкл хлороформа, переворачивали пять раз и центрифугировали 2 мин при 10000 об./мин. 3. Верхнюю водную фазу, содержащую ДНК, переносили в новую пробирку и добавляли 800 мкл 1%-ного осаждающего раствора, перемешивали несколькими переворотами в течение 2 мин и центрифугировали 2 мин при 10000 об./мин. 4. Удаляли супернатант и растворяли гранулу в 100 мкл раствора хлорида натрия осторожным встряхиванием. 5. Добавляли 300 мкл холодного этанола, осаждали ДНК при –20°C в течение 10 мин, затем центрифугировали 4 мин при 10000 об./мин, удаляли этанол, обливали гранулу 70%-ным этанолом, добавляли к ней 200 мкл стерильной деионизированной воды и растворяли гранулу в воде аккуратным встряхиванием. Перечисленные процедуры проведения эксперимента и выделения ДНК нематод для электрофореза описаны в [21].

Для электрофореза 1%-ную агарозную гелевую пластину (0.01% бромида этидия) помещали в ванночку с 10%-ным TBE-буфером и переносили в лунки по 20 мкл лизированной ДНК нематод. Электрофорез проводили при 100 мА, 120 В, 80 Вт. Визуализацию результатов электрофореза ДНК нематод осуществляли с помощью трансиллюминатора.

Таблица 1. Зависимость интенсивности люминесценции биосенсоров от концентрации БПЛ

Вариант	Интенсивность люминесценции биосенсоров, отн. ед.				
БПЛ, моль/л	pSoxS-lux	pColD-lux	pRecA-lux	pKatG-lux	pAlkA-lux
0 (вода)	1536 ± 33	969 ± 50	20218 ± 57	2737 ± 77	95 ± 1.30
0.000015	1570 ± 20	840 ± 35	21559 ± 548	2771 ± 80	90 ± 1.32
0.00015	2202 ± 38 (3.3E-19)	974 ± 41	29798 ± 662 (1.6E-15)	2812 ± 95	96 ± 1.08
0.0003	2807 ± 55 (9.5E-28)	1028 ± 50	32771 ± 711 (8.2E-20)	2955 ± 98	91 ± 1.08
0.00075	4223 ± 111 (1.3E-31)	1422 ± 93 (9.5E-5)	39384 ± 679 (1.0E-29)	3014 ± 119	82 ± 1.42
0.0015	5244 ± 175 (5.8E-29)	1749 ± 143 (4.8E-6)	404087 ± 777 (5.4E-29)	3201 ± 122 (0.003)	71 ± 1.30
0.003	3804 ± 136 (2.9E-23)	1296 ± 96 (4.6E-3)	35727 ± 652 (2.3E-25)	3053 ± 113 (0.03)	46 ± 1.22
0.0075	972 ± 30	572 ± 23	17013 ± 504	1920 ± 35	11 ± 0.72
Положительный контроль	14927 ± 296 (диоксидин 0.001 М)	8185 ± 419 (диоксидин 0.001 М)	67673 ± 1386 (диоксидин 0.001 М)	38946 ± 932 (H_2O_2 0.001 М)	2998 ± 33.3 (ММС 0.005 М)

Примечание. В скобках приведены значимость различий между контрольными и опытными вариантами в случаях увеличения эффекта.

Статистическая обработка. Полученные в ходе опытов данные обработали стандартными статистическими методами. Вычисляли средние значения показателя и его ошибки. Значимость различий средних значений определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента. Для вывода о статистической значимости различий полученных данных, считали достаточной вероятность ошибки $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучение зависимости интенсивности люминесценции биосенсоров pSoxS-lux, pRecA-lux, pColD-lux, pKatG-lux и pAlkA-lux от концентраций БПЛ показало, что БПЛ в бактериальной клетке увеличивает концентрацию таких оксидантов, как супероксид-анион и пероксид водорода, регистрируемые биосенсорами pSoxS-lux и pKatG-lux, а также вызывает повреждения в ДНК, регистрируемые биосенсорами pRecA-lux и pColD-lux. Биосенсор pAlkA-lux, откликающийся на действие алкилирующих химических соединений, не показал увеличения интенсивности люминесценции при действии БПЛ, однако при действии монофункционального алкилирующего соединения ММС в концентрации 0.01 моль/л увеличил уровень своей люминесценции с 95 (в контроле) до 2998 усл. ед., то есть более, чем в 30 раз (табл. 1). Полученные результаты указывают на то, что БПЛ генерирует в бактериях *E. coli* такие оксидативные соединения, как супероксид-анион и (в гораздо меньшей степени) пероксид водорода, а также вызывает SOS-ответ.

На рис. 1 и 2 приведены амплитуды ответа биосенсоров на присутствие БПЛ, то есть отношение интенсивности индуцированной люминесценции к контрольному уровню. Из представленных диаграмм следует, что генотоксичность БПЛ, регистрируемая биосенсорами pRecA-lux и pColD-lux, является результатом не только его прямого действия на ДНК, но и повышения в клетках бактерий уровня генотоксичных супероксид-радикала и перекиси водорода. При этом максимальный генотоксический эффект и образование супероксида наблюдается в концентрации БПЛ 0.0015 моль/л. При более высоких концентрациях БПЛ происходит падение уровня люминесценции биосенсоров, что может быть связано с токсическим действием БПЛ на бактерии.

Для уточнения этого явления были проведены эксперименты по одновременному определению люминесценции и выживаемости биосенсоров pSoxS-lux и pColD-lux непосредственно в инкубационной смеси в лунках планшета в зависимости от концентрации БПЛ. Для этого по истечении времени инкубации экспериментальной смеси замеряли интенсивность биолюминесценции. Затем аликвоту бактерий объемом 0.1 мл из каждой лунки серийно разводили в физиологическом растворе до 10^{-6} для последующего высева в чашки Петри с агаризованной питательной средой LB. Через 19 ч

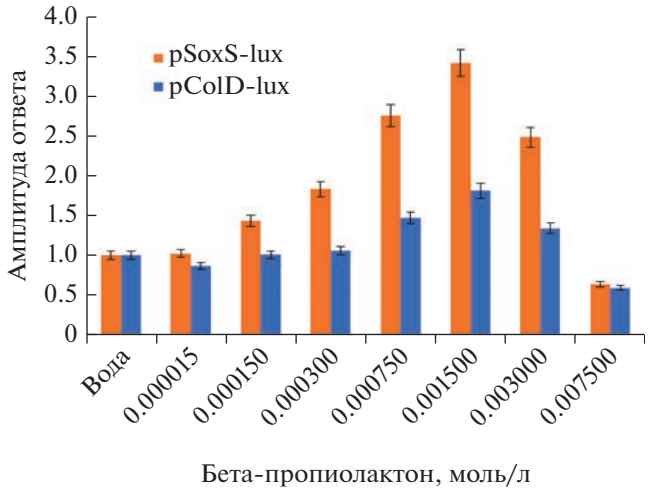


Рис. 1. Амплитуда ответа биосенсоров pSoxS-lux и pColD-lux на действие БПЛ.

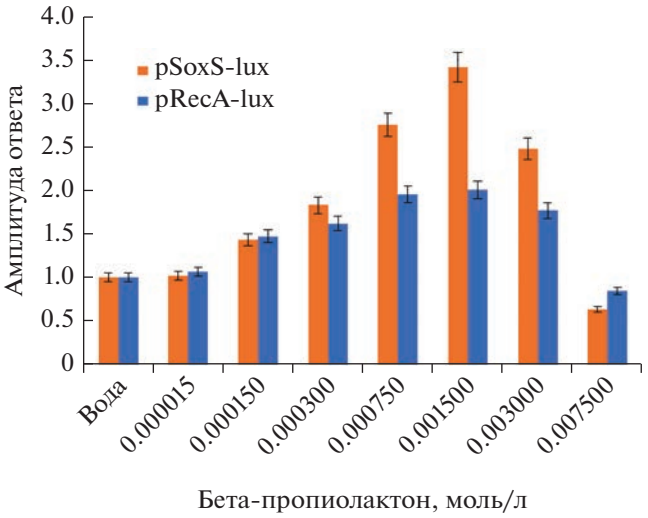


Рис. 2. Амплитуда ответа биосенсоров pSoxS-lux и pRecA-lux на действие БПЛ.

инкубации при 37°C учитывали число выросших колоний и пересчитывали на число колониеобразующих единиц в 0.1 мл суспензии бактерий.

В табл. 2 приведены количественные показатели интенсивности люминесценции биосенсоров pSoxS-lux и pColD-lux на 1000 колониеобразующих единиц (КОЕ), то есть на 1000 жизнеспособных бактерий. Было обнаружено, что БПЛ проявляет токсичность в исследованных концентрациях и снижает выживаемость бактерий по отношению к контрольному варианту на порядок в концентрации 0.0015 моль/л и на три порядка в концентрации 0.0075 моль/л. При этом интенсивность люминесценции биосенсоров возрастает в расчете на 1000 КОЕ. Так, интенсивность люминесценции биосенсоров pSoxS-lux и pColD-lux на 1000 КОЕ в концентрации БПЛ 0.0075 моль/л составила 21.8 и 13.3 в относительных единицах соответственно.

Для определения степени поврежденности ДНК бактерий при действии БПЛ и влияния на этот процесс антиоксиданта N-ацетилцистеина (АЦЦ) использовали метод электрофореза ДНК, выделенной из бактерий биосенсора pSoxS-lux. БПЛ использовали в концентрациях 0.035 и 0.15 моль/л, а АЦЦ – в концентрациях 0.01 и 0.001 моль/л. В качестве чистого контроля служили бактерии, не подвергшиеся воздействию БПЛ и АЦЦ, а в качестве позитивного контроля – бактерии, обработанные диоксидином и перекисью водорода в концентрациях 0.0045 и 0.1 моль/л соответственно.

Из рис. 3 следует, что БПЛ в концентрации 0.15 моль/л (дорожка *7*) вызывает разрывы ДНК более эффективно, чем в концентрации 0.035 моль/л (дорожка *4*). АЦЦ в концентрации 0.001 моль/л не оказывал заметного влияния на уровень повреждений ДНК, вызванных БПЛ (дорожки *3* и *6*). Однако АЦЦ в более высокой концентрации 0.01 моль/л заметно снижал степень фрагментации ДНК бактерий (дорожки *3* и *6*).

Для оценки генотоксичности БПЛ на эукариотах, использовали нематоду *Caenorhabditis elegans*, которая является хорошо изученным модельным объектом в различных генетических исследова-

Таблица 2. Зависимость выживаемости и интенсивности люминесценции бактерий биосенсоров pSox-lux и pColD-lux от концентрации БПЛ

Биосенсор	БПЛ, моль/л	Количество КОЕ	Люминесценция, отн. ед.	Люминесценция, на 1000 КОЕ, отн. ед.
pSoxS-lux	Контроль	1.1×10^8	11.78 ± 31	0.01
	0.0015	1.24×10^7	6047 ± 72	0.48
	0.0075	4.28×10^4	9.34 ± 37	21.8
pColD-lux	Контроль	9.66×10^7	905 ± 19	0.009
	0.0015	1.06×10^7	1935 ± 54	0.18
	0.0075	3.96×10^4	526 ± 13	13.3

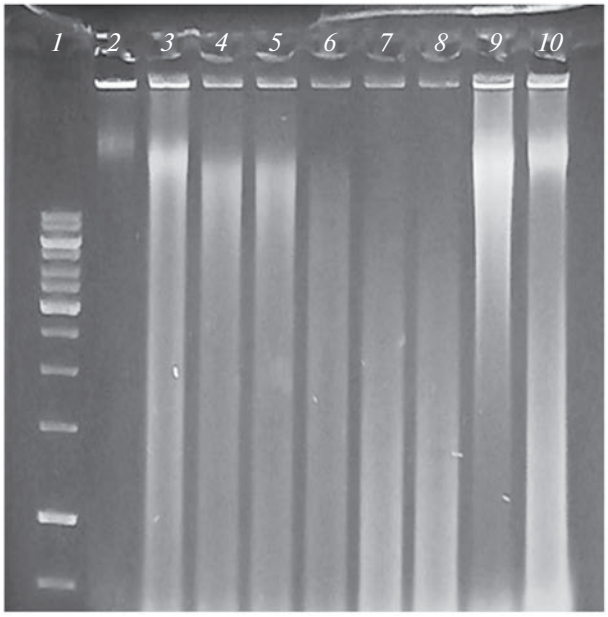


Рис. 3. Влияние N-ацетилцистеина на ДНК-повреждающую активность БПЛ в клетках биосенсора pSox-lux. *1* – маркер длин ДНК, *2* – негативный контроль (вода), *3* – БПЛ 0.035 + АЦЦ 0.01, *4* – БПЛ 0.035 + + АЦЦ 0.001, *5* – БПЛ 0.035, *6* – БПЛ 0.15 + АЦЦ 0.01, *7* – БПЛ 0.15 + АЦЦ 0.001, *8* – БПЛ 0.15, *9* – диоксидин, 0.0045, *10* – перекись водорода, 0.1. Концентрации БПЛ, АЦЦ, диоксидина и перекиси водорода приведены в моль/л.

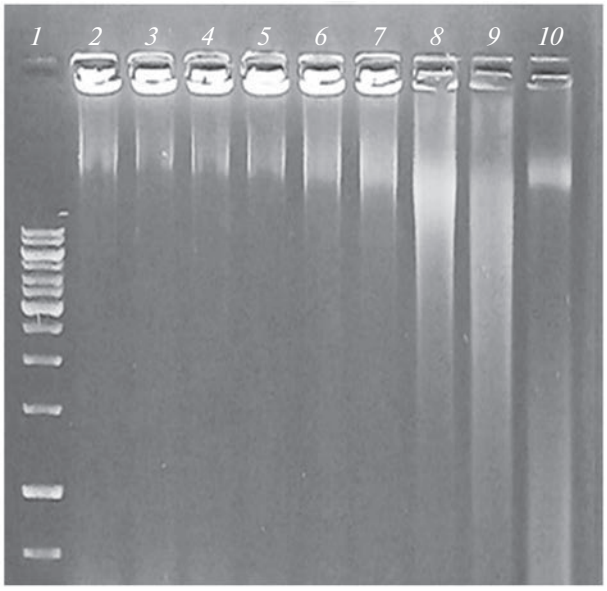


Рис. 4. Влияние БПЛ на целостность ДНК нематод *Caenorhabditis elegans*. *1* – маркер длин ДНК, *2* – контроль (вода), БПЛ в концентрациях (моль/л): *3* – 0.00015, *4* – 0.0003, *5* – 0.00075, *6* – 0.0015, *7* – 0.003, *8* – 0.0075, *9* – 0.015, *10* – перекись водорода, 0.1 моль/л.

ниях. Нематоду на стадии развития L4 (yong agult) подвергли воздействию БПЛ в различных концентрациях в течение 2 ч, после чего выделяли тотальную ДНК и определяли степень ее фрагментированности методом гель-электрофореза. На рис. 4 приведена электрофореграмма влияния БПЛ на целостность ДНК нематод. Видно, что БПЛ у нематод вызывает разрывы ДНК начиная с концентрации 0.0015 моль/л (дорожка *6*). Наиболее эффективно повреждал ДНК нематоды БПЛ в концентрациях 0.0075 и 0.015 моль/л (дорожки *8* и *9*). Следует отметить высокую генотоксичность перекиси водорода, использованной в качестве позитивного контроля в концентрации 0.1 моль/л. Антиоксидант АЦЦ в концентрациях 0.001 и 0.01 моль/л снижал ДНК-повреждающее действие БПЛ в клетках нематоды в наивысшей исследованной генотоксической концентрации 0.015 моль/л (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

БПЛ является высоко реакционноспособным агентом, молекула которого представляет собой четырехчленный цикл. После раскрытия цикла БПЛ приобретает электрофильные свойства и быстро вступает в реакцию с нуклеофильными центрами нуклеиновых кислот и белков.

Показательными в отношении генотоксичности БПЛ являются результаты, полученные на биосенсорах pRecA-lux и pColD-lux (табл. 1), демонстрирующие индукцию генов *rec*A и *col*D в ответ на повреждения в ДНК бактерий. Это является следствием активации SOS-ответа, в котором важную роль играют наличие однонитевых разрывов в ДНК (ssDNA) и продукты генов *rec*A и *lex*A, последний из которых кодирует белок LexA, являющимся репрессором генов SOS-регулона. Промоторы генов *rec*A *и col*D обеспечивают активацию начального и терминального этапов SOS-ответа соответственно. Ген *col*D активируется при наличии неудаленных на ранних этапах репарации повреждений ДНК. К ним относятся объемные аддукты, тиминовыедимеры и межнитевые сшивки, приводящие к остановке репликации ДНК [22–24].

В наших экспериментах биосенсор pAlkA-lux не показал увеличения интенсивности люминесценции при действии БПЛ, тогда, как при действии ММС в концентрации 0.005 моль/л увеличил уровень своей люминесценции с 95 в контроле до 2998 усл. ед., то есть более, чем в 30 раз (табл. 1). Это указывает на то, что продукты взаимодействия БПЛ с ДНК отличаются от таковых монофункционального алкилирующего соединения – метилметансульфоната (**ММС**). Возможно, что БПЛ при взаимодействии с ДНК образует аддукты и сшивки, в отличие от ММС, который метилирует ДНК.

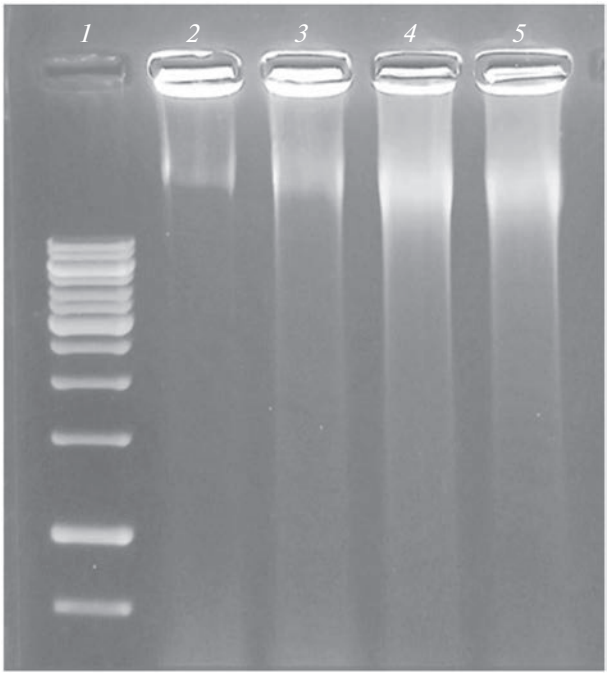


Рис. 5. Влияние антиоксиданта АЦЦ на ДНК-повреждающее действие БПЛ у нематод *Caenorhabditis elegans*: *1* – маркер, *2* – контроль (вода), *3* – БПЛ 0.015 + АЦЦ 0.01, *4* – БПЛ 0.015 + АЦЦ 0.001, *5* – БПЛ 0.015. Концентрации БПЛ и АЦЦ приведены в моль/л.

БПЛ, как и ММС, при воздействии на двунитевую ДНК в 70–80% случаев метилирует N7-позицию гуанина [5, 25]. N3-метиладенин, который является вторым по распространенности продуктом алкилирования ММС двунитевой ДНК, удаляется из нее 3-метиладенин-ДНК-гликозилазой – продуктом гена *adaA*, экспрессия которого контролируется сенсорным белком Ada, являющимся регулятором транскрипции. Метилирование белка Ada ММС приводит к повышению его аффинности к промоторным участкам Ada-регулона и превращает его в сильный транскрипционный активатор [25–27].

Отсутствие генотоксического эффекта БПЛ на биосенсоре pAlkA-lux можно объяснить тем, его химическая структура отличается от таковой ММС. Генотоксичность БПЛ обусловлена продуктами (фрагментами) раскрытия его четырехчленного цикла, которые могут образовать преимущественно аддуктыаддукты с белком Ada, приводящие к блокированию транскрипции Ada-регулона.

Ранее, при сравнительном изучении активности эпихлоргидрина (**ЭХГ**) и ММС на биосенсоре pAlkA-lux нами была обнаружена очень слабая индукция люминесценции ЭХГ, который представляет собой соединение, при раскрытии трехчленного цикла которого, образуется электрофильный продукт. Максимальная интенсивность люминесценции при действии ЭХГ в концентрации 0.3 моль/л, составила 285 отн. ед., что в 42 раза меньше люминесценции pAlkA-lux при действии ММС в концентрации 0.1 моль/л [28].

Самым неожиданным результатом оказалась индукция БПЛ экспрессии генов окислительного стресса *sox*S и *kat*G, кодирующих ферменты супероксиддисмутазу и каталазу соответственно. В настоящей работе были использованы биосенсоры pSoxS-lux и pKatG-lux, которые несут рекомбинантную плазмиду, содержащую промоторы гена супероксиддисмутазы *sox*S и гена каталазы *kat*G. В бактериальной клетке промоторы этих генов находятся в блокированном состоянии. При увеличении концентрации супероксида или пероксида выше физиологического уровня, они вступают в реакцию с соответствующими белками-активаторами и происходит разблокировка промоторов, в результате чего lux-оперон транскрибируется и биосенсоры люминесцируют. БПЛ в широком диапазоне концентраций от 0.000015 до 0.003 моль/л вызывал увеличение концентрации супероксид-аниона в бактериальных клетках. Увеличение концентрации перекиси водорода наблюдали только при высоких концентрациях БПЛ (0.0015 и 0.003 моль/л) (табл. 1). Полученные результаты однозначно указывают на способность БПЛ повреждать ДНК в клетках бактерий *E. coli* также и в результате индукции окислительного стресса.

Нами был проведен анализ сопряженности индукции БПЛ SOS-ответа у биосенсоров pRecA-lux и pColD-lux и индукции экспрессии гена супероксиддисмутазы у биосенсора pSoxS-lux. Для этого определяли амплитуду ответа для каждого из использованных нами биосенсоров, то есть отношения величины люминесценции в опытных вариантах к таковому в контрольных вариантах (рис. 1, 2).

В наших экспериментах БПЛ наиболее интенсивно индуцировал SOS-ответ у биосенсоров pRecA-lux и pColD-lux в концентрациях, характерных для наиболее эффективной индукции люминесценции у биосенсора pSoxS-lux (рис. 1, 2). Однако с увеличением концентрации БПЛ (более 0.001 моль/л) происходит снижение выживаемости бактериальных клеток, что, как выявил электрофоретический анализ, сопровождается деградацией ДНК бактерий (рис. 3). Интенсивность свечения биосенсора pColD-lux свидетельствует об уровне повреждений ДНК под действием свободных радикалов, инициированных супероксидом в клетках бактерий. Если нормировать количественные показатели интенсивности люминесценции pColD-lux на 1000 КОЕ, т.е. на 1000 жизнеспособных бактерий, то мы видим, что уровень ответа, характеризующий уровень SOS-репарации ДНК у жизнеспособных бактерий, от увеличения концентрации БПЛ не падает, а возрастает (табл. 2). Подобное повышение уровня SOS-ответа у жизнеспособных бактерий наблюдали после воздействия диоксидина и параквата [29, 30]. Падение выживаемости бактерий связано с увеличением степени поврежденности ДНК, о чем свидетельствуют результаты электрофоретического анализа целостности ДНК бактерий (рис. 3). Из электрофореграмм видно, что деградация ДНК усиливается с увеличением концентрации БПЛ и снижается при совместном использовании БПЛ и антиоксиданта АЦЦ. Последний в наших экспериментах снижал уровни индукции БПЛ как SOS-ответа, так и экспрессии супероксиддисмутазы, инактивирующей супероксидный радикал, в бактериальных клетках (рис. 1, 2).

Нематода *Caenorhabditis elegans* привлекает внимание исследователей в качестве объекта для изучения токсических и генотоксических свойств химических веществ. Это связано с тем, что она является многоклеточным эукариотическим организмом и обладает системой биотрансформации химических соединений, аналогичной у млекопитающих [31, 32]. В наших экспериментах БПЛ при воздействии на нематод в диапазоне концентраций 0.00015–0.015 моль/л в течение 2 ч вызывал разрывы ДНК начиная с концентрации 0.0015 моль/л (рис. 3). В свою очередь, антиоксидант АЦЦ снижал ДНК-повреждающую активность БПЛ в клетках нематоды (рис. 4, 5). Результаты, полученные на бактериальных биосенсорах, были подтверждены на нематодах.

Таким образом, впервые показано, что ДНК-повреждающая активность БПЛ связана не только с его способностью связываться с ДНК бактерий, но и со способностью генерировать в клетке такие генотоксичные формы кислорода как супероксид-анион и перекись водорода. Обнаружено, что БПЛ дозо-зависимым образом, начиная с концентрации более 0.001 моль/л, одновременно снижает выживаемость бактерий и увеличивает интенсивность экспрессии гена антиоксидантной защиты супероксиддисмутазы *soxS* и гена репарации ДНК *colD*. В клетках нематод БПЛ индуцировал разрывы ДНК, выявляемые методом электрофореза. Антиоксидант АЦЦ (ацетилцистеин) снижал генотоксические эффекты БПЛ как у бактерий, так и у нематод.

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

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sanders B., Koldijk M., Schuitemaker H.* Inactivated viral vaccines // Vaccine Analysis: Strategies, Principles, and Control. Berlin, Heidelberg: Springer, 2015. P. 45–80.
2. *Lawrence S.A.* Beta-Propiolactone: Viral inactivation in vaccines and plasma products. // PDA J. Pharm Sci. and Technol. 2000. V. 54. P. 209–214.
3. *Курашова С.С., Ишмухаметов А.А., Егорова М.С. и др.* Сравнительная характеристика инактивирующих агентов для создания вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2018. Т. 17. № 4. С. 26–29. https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-4-26-29
4. *Colburn N.H., Richardson R.G., Boutwell R.K.* Studies of the reaction of β-propiolactone with deoxyguanosine and related compounds // Biochem. Pharmacol. 1965. V. 14. P. 1113–1118.
5. β-Propiolactone // IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lion: 1999. V. 71. P. 1103–1118.
6. *Perrin P., Morgeaux S.* Inactivation of DNA by β-propiolactone // Biologicals. 1995. V. 23. P. 207–211.
7. *Taubman M.A., Atassi M.Z.* Reaction of beta-propiolactone with aminoacids and its specificity for methionine // Biochem J. 1968. V. 106. P. 829–834. https://doi.org/10.1042/bj1060829

8. *Lawley P.D., Brookes P.* Further studies on the alkylation nucleic acids and their constituent nucleotides // Biochem. J. 1963. V. 89. P. 127–138. https://doi.org/10.1042/bj0890127

9. *Penman B.W., Hoppe H., Thilly W.G.* Concentration-dependent mutation by alkylating agents in human lymphoblasts and *Salmonella typhimurium*: N-methyl-N-nitrosourethane and beta-propiolactone // J. Natl Cancer. Inst. 1979. V. 63. P. 903–907.

10. *Kortselius M.J.* Induction of sex-linked recessive lethals and autosomal translocations by beta-propiolactone in *Drosophila*: Influence of the route of administration on mutagenic activity // Mut. Res. 1979. V. 66. P. 55–63. https://doi.org/10.1016/0165-1218(79)90007-7

11. *Shamberger R.J., Corlett C.L., Beaman D., Kasten B.L.* Antioxidants reduce the mutagenic effect of malonaldehyde and beta-propiolactone. Part IX. Antioxidants and cancer // Mut. Res. 1979. V. 66. P. 349–355. https://doi.org/10.1016/0165-1218(79)90045-4

12. *Benning V., Brault D., Duvinage C. et al.* Validation of the *in vivo* CD1 mouse splenocyte micronucleus test // Mutagenesis. 1994. V. 9. P. 199–204. https://doi.org/10.1093/mutage/9.3.199

13. *Klein C.B., Rossman T.G.* Transgenic Chinese hamster V79 cell lines which exhibit variable levels of gpt mutagenesis // Envir. Mol. Mutagen. 1990. V. 16. P. 1–12. https://doi.org/10.1002/em.2850160102

14. *Brusick D.* The genetic properties of β-propiolactone // Mut. Res. 1976. V. 39. P. 241–255.

15. *Santaló J., Estop A.M., Egozcue J.* Genotoxic effect of beta-propiolactone on mammalian oocytes // Mut. Res. 1987. V. 189. P. 407–416. https://doi.org/10.1016/0165-1218(87)90050-4

16. *Brault D., Renault D., Tombolan F., Thybaud V.* Kinetics of induction of DNA damage and lacZ gene mutations in stomach mucosa of mice treated with beta-propiolactone and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, using single-cell gel electrophoresis and MutaMouse models // Envir. Mol. Mut. 1999. V. 34. P. 182–189.

17. *Snyder C.A., Garte S.J., Sellakumar A.R., Albert R.E.* Relationships between the levels of binding to DNA and the carcinogenic potencies in rat nasal mucosa for three alkylating agents // Cancer Lett. 1986. V. 33. P. 175–181. https://doi.org/10.1016/0304-3835(86)90022-4

18. *Котова В.Ю., Манухов И.В., Завильгельский Г.Б.* Lux-биосенсоры для детекции SOS-ответа, теплового шока и окислительного стресса // Биотехнология. 2009. № 6. С. 16–25. https://doi.org/10.1134/S0003683810080089

19. *Завильгельский Г.Б., Котова В.Ю., Манухов И.В.* Сенсорные биолюминесцентные системы на основе lux-оперонов для детекции токсичных веществ // Хим. физика. 2012. Т. 31. № 10. С. 15–20.

20. *Meneely P.M., Dahlberg C.L., Rose J.K.* Working with worms: *Caenorhabditis elegans* as a model organism // Curr. Protocols Essential Lab. Techniques. 2019. V. 19. P. e35. https://doi.org/10.1002/cpet.35

21. *Imanikia S., Galea F., Nagy E. et al.* The application of the comet assay to assess the genotoxicity of environmental pollutants in the nematode *Caenorhabditis elegans* // Envir. Toxicol. Pharmacol. 2016. V. 7(45). P. 356–361. Epub 2016 Jun 20. https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.06.020

22. *Завильгельский Г.Б.* SOS-репарации 60 лет // Мол. биология. 2013. Т. 47. № 5. С. 699–706. https://doi.org/10.7868/S0026898413050224

23. *Maslowska K.H., Makiela Dzbenska K., Fijalkowska I.J.* The SOS system: A complex and tightly regulated response to DNA damage // Envir. Mol. Mutagenesis. 2019. V. 60. № 4. P. 368–384. https://doi.org/10.1002/em.22267

24. *Baharoglu Z., Mazel D.* SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions // FEMS Microbiol. Rev. 2014. V. 38. № 6. P. 1126–1145. https://doi.org/10.1002/em.22267

25. *Sedgwick B., Batesb P.A., Paik J. et al.* Repair of alkylated DNA: Recent advances // DNA Repair. 2007. V. 6. № 4. P. 429–442. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.10.005B

26. *Mielecki D., Grzesiuk E.* Ada response – a strategy for repair of alkylated DNA in bacteria, FEMS // Microbiol. Lett. 2014. V. 355. № 1. P. 1–11. https://doi.org/10.1111/1574-6968

27. *Mielecki D., Wrzesiński M., Grzesiuk E.* Inducible repair of alkylated DNA in microorganisms // Mut. Res. 2015. V. 763. P. 294–305. https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2014.12.001

28. *Орджоникидзе К.Г., Игонина Е.В., Жошибекова Б.С., Абилев С.К.* Сравнительное изучение ДНК-повреждающей активности эпихлоргидрина с помощью биосенсоров *Escherichia coli* и методом ДНК-комет на мышах // Генетика. 2021. Т. 57. № 9. С. 1031–1038. https://doi.org/10.31857/S0016675821090083

29. *Мачигов Э.А., Игонина Е.В., Свиридова Д.А. и др.* Изучение токсичности и генотоксичности паракват для бактерий помощью lux-биосенсоров *Escherichia coli* // Рад. биология. Радиоэкология. 2022. Т. 62. № 3. С. 240–249. https://doi.org/10.31857/S0869803122030055

30. *Свиридова Э.А., Мачигов Е.В., Игонина и др.* Изучение механизма генотоксичности диоксидина с помощью lux-биосенсоров *Escherichia coli* // Рад. биология. Радиоэкология. 2020. Т. 60. № 6. С. 595–603. https://doi.org/10.31857/S0869803120060223

31. *Hartman J.H., Widmayer S.J., Christina M. et al.* Xenobiotic metabolism and transport in *Caenorhabditis elegans* // J. Toxicol. Envir. Health. 2021. Part B. V. 24(2). P. 51–94. https://doi.org/10.1080/10937404.2021.1884921

32. *Harlow P.H., Perry S.J., Alexander J. et al.* Comparative metabolism of xenobiotic chemicals by cytochrome P450s in the nematode *Caenorhabditis elegans* // Nat. Sci. Reports. 2018. V. 8. P. 13333. https://doi.org/10.1038/ s41598-018-31215-w

Study of the Genotoxicity of Beta-Propiolactone Using *E. coli* lux Biosensors and Nematode *Caenorhabditis elegans*

E. A. Machigov[a], S. K. Abilev[a, b, *], E. V. Igonina[a], and M. V. Marsova[b]

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

[b] *Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

**e-mail: abilev@vigg.ru*

For the first time, lux biosensors of *E. coli* and the nematode *Caenorhabditis elegans* were used to study the genotoxicity of beta-propiolactone (BPL) used in the production of inactivated viral vaccines as an inactivator. It has been shown that the DNA-damaging activity of BPL is due not only to its ability to bind to bacterial DNA, but also to the ability to generate in the cell such reactive oxygen species as superoxide anion and peroxide, which have genotoxic activity. It was found that BPL in a dose-dependent manner, starting from a concentration of 0.001 mol/L, reduces the survival of bacteria. However, the intensity of expression of the antioxidant defense gene of superoxide dismutase *soxS* and the DNA repair gene *colD* increased. BPL induced DNA breaks in nematode cells detected by electrophoresis. The antioxidant acetylcysteine (ACC) reduced the genotoxic effects of BPL on both bacteria and nematode.

Keywords: beta-propiolactone, lux-biosensors, *E. coli*, nematode *Caenorhabditis elegans*, genotoxicity, superoxide anion, DNA breaks, antioxidant, acetyl cysteine.

ГЕНЕТИКА, 2023, том 59, № 5, с. 517–529

ГЕНЕТИКА РАСТЕНИЙ

УДК 577.21:575.113.12

ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОВ АНТОЦИАНИДИН-3-*О*-ГЛЮКОЗИЛТРАНСФЕРАЗ ПЕРЦА (*Capsicum* spp.) И ИХ РОЛЬ В БИОСИНТЕЗЕ АНТОЦИАНОВ

© 2023 г. М. А. Филюшин[1], *, А. В. Щенникова[1], Е. З. Кочиева[1]

[1]Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

**e-mail: michel7753@mail.ru*

Поступила в редакцию 26.07.2022 г.
После доработки 22.08.2022 г.
Принята к публикации 31.08.2022 г.

В растении перца (*Capsicum* spp.) антоцианы важны не только для защиты фотолабильных соединений, но и для регуляции паттерна окраски плода. Ключевая роль в биосинтезе стабильных антоцианов принадлежит антоцианидин-3-*О*-глюкозилтрансферазам (UFGT). В данной работе охарактеризована структура и филогения трех генов-гомологов *UFGT* перца. Биохимический анализ сортов *C. annuum* (Сиреневый куб, Отелло и Сибиряк) и сорта *C. frutescens* (Самоцвет), различающихся паттерном пигментации плода в процессе созревания, показал наличие антоцианов в листьях и кожице плода всех образцов (кроме плода сорта Сибиряк). Наибольшее содержание обнаружено в фиолетовых листьях сорта Самоцвет. В кожице плода всех образцов содержание антоцианов падало по мере созревания. Экспрессионный анализ тех же тканей показал, что транскрипты генов *UFGT1* (*LOC107843659*) и *UFGT2* (*LOC107843660*) присутствуют в листьях всех сортов. В кожице плода транскрипты *UFGT1* детектированы на стадиях созревания 1 (Сиреневый куб и Отелло) и 1–3 (Самоцвет), тогда как транскрипты *UFGT2* – во всех образцах с наибольшим значением у сорта Сибиряк, где антоцианы отсутствовали. Транскрипты генов MBW-комплекса (*anthocyanin2*, *MYC* и *WD40*), регулирующего биосинтез антоцианов, присутствовали в листьях всех сортов с максимумом в фиолетовых листьях сорта Самоцвет. Сопоставление биохимических и экспрессионных данных выявило положительную корреляцию количества антоцианов в кожице плодов и в листьях с уровнем транскриптов гена *UFGT1*. Для гена *UFGT2* корреляции не выявлено. Секвенирование и анализ гена *UFGT1*, включая промоторную область, у 18 сортов перца, различающихся паттерном окраски плода, обнаружил инвариантность последовательности, независимо от окраски незрелого плода. Анализ промоторов генов *UFGT1* и *UFGT2* показал различия в составе *cis*-регуляторных элементов, вовлеченных в ответ на стрессы, гормоны и связывание с транскрипционными факторами семейств MYB и MYC.

Ключевые слова: Capsicum spp., сорта перца, биосинтез антоцианов, антоцианидин-3-*О*-глюкозилтрансфераза, *UFGT*, содержание антоцианов, экспрессия гена.

DOI: 10.31857/S0016675823050041, **EDN:** FNOPBO

Перец (род *Capsicum*) является важнейшей овощной культурой с ежегодным мировым производством более 36 млн т (https://www.fao.org/faostat). Плоды перца богаты питательными веществами и антиоксидантами (аскорбат, каротиноиды и флавоноиды) [1], что делает их важной составляющей диеты человека. К роду *Capsicum* относится, по разным оценкам, от 30 до 35 видов [2, 3], из которых широко культивируются только пять – *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* и *C. pubescens*.

Окраска плода перца определяется комбинацией хлорофиллов, каротиноидов и антоцианов и меняется по мере созревания. Исходно зеленая или фиолетовая у незрелого плода она становится красной, желтой или оранжевой у спелого плода, что происходит за счет снижения содержания хлорофиллов и антоцианов и накопления каротиноидов [4–6]. При этом, если каротиноиды могут накапливаться только в плодах, благодаря преобразованию хлоропластов в хромопласты, то антоцианы, аккумулируясь в вакуолях, могут влиять на пигментацию не только плодов, но также корней, листьев, стеблей и цветковых органов.

Антоцианы относятся к водорастворимым флавоноидам и представляют собой соединение антоцианидина с молекулой сахара и ацильной группой; сами антоцианидины состоят из двух ароматических бензольных колец и оксигениро-

ванного гетероцикла [7, 8]. У растений путь биосинтеза антоцианов высоко консервативен. Девять ферментативных реакций приводят к образованию из фенилаланина антоцианидинов (пеларгонидин, цианидин и дельфинидин), к которым затем присоединяются молекулы сахара для получения стабильных и водорастворимых пигментов [8, 9]. Перенос глюкозильной части UDP-глюкозы на 3-гидроксильную группу антоцианидинов катализируется антоцианидин-3-*O*-глюкозилтрансферазой (3GT или UFGT (UDP-глюкозо-флавоноид-глюкозилтрансфераза)) [10, 11]. В активации экспрессии структурных генов пути синтеза антоцианидинов задействован так называемый MBW-комплекс, состоящий из транскрипционных факторов anthocyanin2 (R2R3-MYB), MYC (bHLH) и WD40 (WD-repeat) [9, 11–14].

Антоцианидин-3-*O*-глюкозилтрансферазы имеют решающее значение для биосинтеза антоцианов в плодах растений. В геноме перца *C. annuum* сорта Zunla-1 (PRJNA186921) аннотированы три гена антоцианидин-3-*O*-глюкозилтрансфераз (*Capana10g001978*, *Capana10g001979* и *Capana10g001980*), тандемно расположенные на хромосоме 10 [15]. Первый из них (*CaUFGT*; FJ705848) считается наиболее важным для биосинтеза антоцианов в плоде [5]. Однако в референсном геноме перца *C. annuum* (сорт UCD-10X-F1, PRJNA376668) аннотировано только два гена антоцианидин-3-*O*-глюкозилтрансфераз – *LOC107843659* (*UFGT*) и *LOC107843660*, которые соответствуют последовательностям *Capana10g001978* и *Capana10g001980* [15].

Показана положительная корреляция между экспрессией кодирующих антоцианидин-3-*O*-глюкозилтрансферазы генов и содержанием антоцианов. Например, транскрипты гена *3GT* присутствуют в красных ягодах винограда (*Vitis vinifera* L.) и отсутствуют в белых ягодах [16]. У личи (*Litchi chinensis* Sonn.) содержание антоцианов в околоплоднике коррелирует с уровнем транскриптов *3GT*, причем взаимосвязи с транскрипцией других генов флавоноидного пути не обнаружено [10]. В плодах перца *C. annuum* также обнаружена прямая зависимость количества антоцианов от уровня экспрессии гена *CaUFGT* [5, 6].

В данной работе нами были определены профили экспрессии генов антоцианидин-3-*O*-глюкозилтрансфераз *UFGT1* (*Capana10g001978*; *LOC107843659*) и *UFGT2* (*Capana10g001980*; *LOC107843660*) в листьях и плодах сортов перца с различным паттерном пигментации плода в процессе созревания, а также генов MBW-комплекса в листьях данных сортов. Был проведен анализ корреляций между экспрессией генов *UFGT1* и *UFGT2* с содержанием антоцианов в плодах и листьях перца, а также поиск возможных полиморфных вариантов в регуляторных и кодирующих последовательностях гена *UFGT1*, ассоциированных с различиями в окраске плода.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. В работе были использованы образцы 18 сортов перца из коллекции Федерального научного центра овощеводства (Московская обл., поселок ВНИИССОК) (табл. 1). Сорта представляли два основных паттерна окраски плода: “незрелый плод/спелый плод” – “зеленый/красный (или желтый, оранжевый)” и “фиолетовый/красный (или желтый, оранжевый)”. Из листьев всех образцов выделяли геномную ДНК. Для анализа экспрессии генов и содержания антоцианов у сортов Сиреневый куб, Отелло, Самоцвет и Сибиряк отбирали листья и кожицу (экзокарп) плода на трех стадиях его развития. Стадия 1 (**MG**, mature green) соответствовала незрелому плоду, достигшему конечного размера; стадия 2 (**BR**, breaker) – бланжевому плоду (переход от незрелого к спелому плоду, сопровождающийся постепенным изменением окраски); стадия 3 (**FR**, fully ripe) – плоду биологической зрелости (финальная окраска; семена полностью сформированы) (рис. 1).

Определение содержания антоцианов. Содержание суммы антоцианов (в пересчете на дельфинидин-3-рутинозид) в листьях и кожице плодов, предварительно растертых в жидком азоте, определяли спектрофотометрически в хлороформ-метанольных экстрактах, в двух биологических и трех технических повторах, согласно методике [17].

Выделение ДНК, амплификация последовательностей. Из листьев образцов перца с помощью CTAB-буфера: 100 мМ Tris (pH = 8.0), 20 мМ ЭДТА (pH = 8.0), 2 М NaCl, 2% PVP, 5% меркаптоэтанола (w/v), 2% CTAB (w/v), 10 мМ ацетата аммония – выделяли геномную ДНК. 100 мг растительной ткани гомогенизировали в 500 мкл CTAB-буфера, затем добавляли один объем хлороформа и центрифугировали (13000 об.) в течение 10 мин, далее отбирали верхнюю фазу, добавляли к ней 250 мкл изопропанола и центрифугировали (13000 об.) в течение 10 мин; осадок ДНК промывали трижды в 100 мкл 70%-ного этанола, высушивали (70°C) и растворяли в 30 мкл деионизированной воды.

Амплификацию гена *Capana10g001978* (включая промоторную область, 1000 пн) проводили с использованием геномной ДНК в качестве матрицы и разработанных праймеров (табл. 2). Ампликоны секвенировали с помощью ABI Prism 3700 DNA Analyzer (ЦКП Биоинженерия, ФИЦ Биотехнологии РАН). Полученные последовательности депонировали в NCBI (OP066796–OP066813). Структурно-филогенетический анализ последовательностей проводили в программе MEGA 7.0 (https://www.megasoftware.net/). Консер-

Таблица 1. Образцы перца, использованные в работе

Образец: вид, сорт	Окраска плода в процессе созревания		
	стадия 1 (MG)	стадия 2 (BR)	стадия 3 (FR)
C. annuum, Антей	Зеленая	Зеленая	Красная
C. annuum, Ария	Темно-зеленая	Темно-зеленая	Оранжевая
C. annuum, Гогошары	Зеленая	Зеленая с красными сегментами	Красная
C. annuum, Гранат	Зеленая	Зеленая с красными сегментами	Темно-красная
C. annuum, Желтый букет	Зеленая	Зеленая с желтыми сегментами	Желтая
C. annuum, Кармин	Зеленая	Зеленая с красными сегментами	Красная
C. annuum, Королевский	Зеленая	Зеленая	Желтая
C. annuum, Медок	Зеленая	Зеленая	Желтая
C. annuum, Мечта хозяйки	Зеленая	Зеленая с красными сегментами	Красная
C. annuum, Мила	Зеленая	Зеленая	Красная
C. annuum, Мулат	Зеленая	Темно-зеленая	Коричнево-красная
C. annuum, Оранжевое наслаждение	Зеленая	Светло-зеленая	Оранжевая
C. annuum, Отелло	Фиолетовая	Красно-фиолетовая	Красная
C. annuum, Пурпурный	Фиолетовая	Фиолетово-зеленая	Красная
C. annuum, Сибиряк	Зеленая	Красная с зелеными сегментами	Красная
C. annuum, Сиреневый куб	Фиолетовая	Фиолетово-красная	Красная
C. annuum, Янтарь	Фиолетово-зеленая	Зеленая	Оранжевая
C. frutescens, Самоцвет	Фиолетовая	Светло-желтая	Красная

вативные домены и мотивы в белках определяли с помощью программ NCBI-CDD (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi) и MEME 5.4.1 (https://meme-suite.org/meme/tools/meme). Поиск cis-регуляторных элементов проводили с помощью программы PlantCare (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/).

Выделение РНК, синтез кДНК. Суммарную РНК из листьев и кожицы плодов, предварительно растертых в жидком азоте, выделяли и очищали от примесей ДНК с помощью наборов RNeasy Plant Mini Kit и RNase free DNasy set (QIAGEN, Германия). Полученные препараты использовали для синтеза кДНК (набор GoScript™ Reverse Transcription System; Promega, США).

Определение профиля экспрессии генов. Профиль экспрессии генов *Capana10g001978*, *Capana10g001979* и *Capana10g001980* (в листьях и кожице плодов), а также *anthocyanin2*, *MYC* и *WD40* (в листьях) определяли методом количественной ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР) с использованием разработанных праймеров (табл. 2). Относительный уровень экспрессии генов оценивали, нормализуя его по референсным генам *GAPDH* (LOC107862704, XM_016708343.2) и *Actin7* (LOC107850541, XM_016695142.2). Для РВ-ПЦР использовали 3 нг кДНК-матрицы, набор "Реакционная смесь для проведения РВ-ПЦР в присутствии SYBR GreenI и ROX" (ООО "Синтол", Россия) и амплификатор CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США). Реакции проводили в трех технических повторах в следующих условиях: 95°C – 5 мин; 40 циклов (95°C – 15 с, 62°C – 50 с). Относительную экспрессию генов рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Визуализацию данных и регрессионный анализ проводили с помощью программы GraphPad Prism v. 7.02 (https://www.graphpad.com). Корреляция между содержанием суммы антоцианов и уровнем экспрессии гена присутствовала, если квадрат коэффициента множественной корреляции $R^2 > 0.7$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика генов антоцианидин-3-О-глюкозилтрансфераз в геноме перца. Был проведен сравнительный анализ последовательностей генов трех антоцианидин-3-*О*-глюкозилтрансфераз *Capana10g001978*, *Capana10g001979* и *Capana10g001980*, идентифицированных ранее в геноме перца сорта Zunla-1 [15] в сравнении с гомологичными последовательностями, аннотированными позднее в референсном геноме *C. annuum* (сорт UCD-10X-F1, PRJNA376668). Было показано, что *Capana10g001978* и *Capana10g001980* (сорт Zunla-1) идентичны *LOC107843659* и *LOC107843660* (сорт UCD-10X-F1) соответственно. Ген *Capana10g001979* гомологичен *Capana10g001980* на 99% и содержит преждевременный стоп-кодон

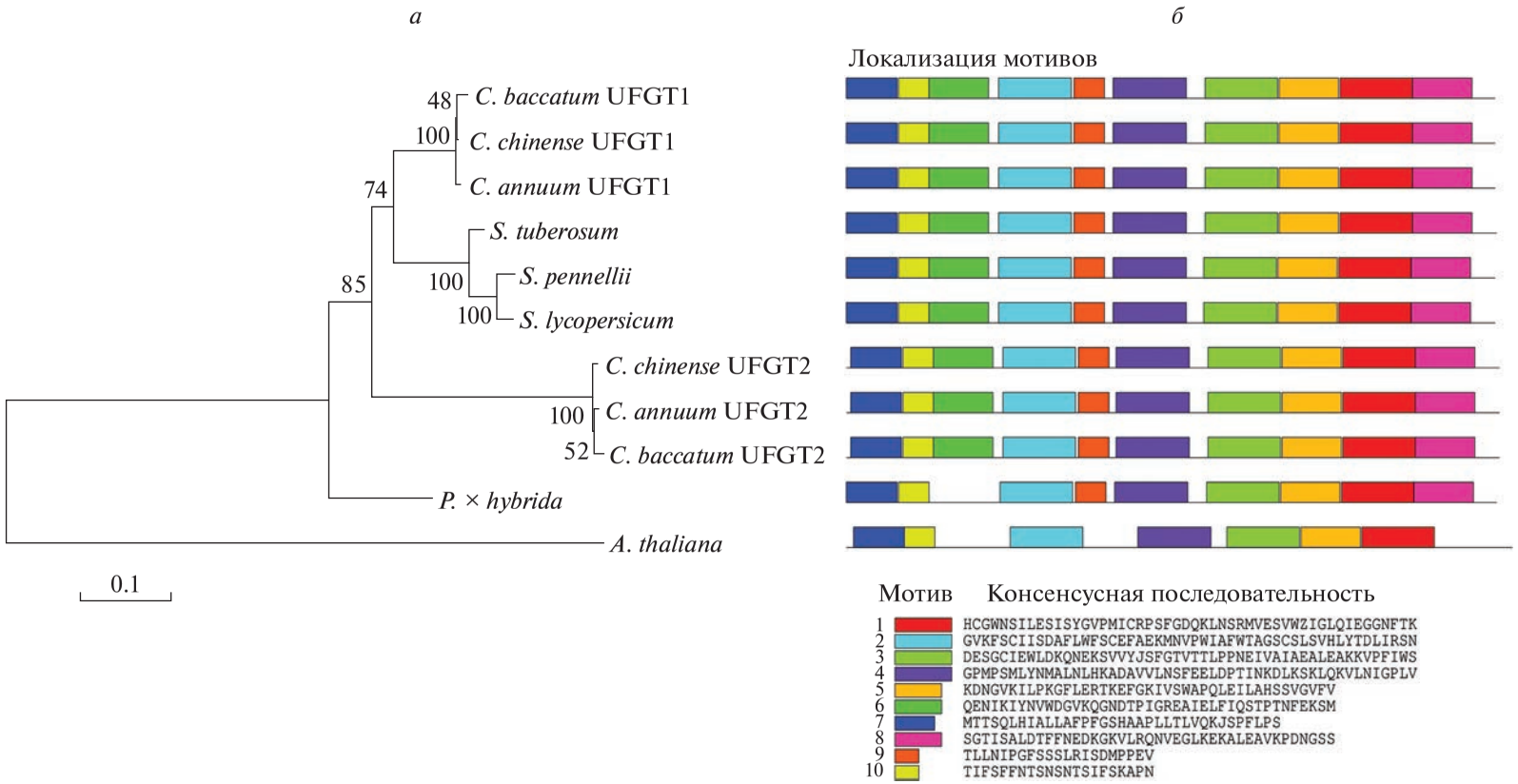


Рис. 1. Филогения (*а*) и схема консервативных мотивов (*б*) UFGT1 и UFGT2 на основе аминокислотных последовательностей антоцианидин-3-*O*-глюкозилтрансфераз *C. annuum* (NM 001324611.1 (UFGT1), XM 016688020.2 (UFGT2)), *C. baccatum* (CM008452.1:203206442-203207958 (UFGT1), MLFT02000010.1:203240476-203241828 (UFGT2)), *C. chinense* (CM008440.1:213246961-213248595 (UFGT1), MCIT02000010.1:213287855-213289207 (UFGT2)), *P.* × × *hybrida* (AB027454.1), *S. lycopersicum* (XM 004249399.4), *S. pennellii* (XM 015200918.2), *S. tuberosum* (NM 001288088.1)) и *Arabidopsis thaliana* (AT5G17050, NM 121711.5). Дендрограмма построена с помощью программы MEGA7.0.26 (метод Neighbor-Joining, 1000 бутстреп-реплик).

Таблица 2. Использованные в работе последовательности пар праймеров

Ген	Последовательность праймеров, 5' → 3'	Применение
Capana10g001978 (=*UFGT1*)	CACACAATCCCAAGTGAAC TTGCCTCCCTCAAATAGTC	Амплификация и секвенирование кодирующей последовательности гена
	TTTGACACCATCCCAAACAT GAATTAGTTTGATTCGATTTGAC	Амплификация и секвенирование регуляторной области гена
	CTTTTGGTAGCCATGCAGTTCC CACCATCCCAAACATTGTAAATC	РВ-ПЦР
Capana10g001979	GGAGGAGGAAAGAGGATTTCC TCACTACCACAGCAACAGCC	
Capana10g001980 (=*UFGT2*)	GAGTGTTTGGGAGATTGGTTTAC GCCTTAGAACCTTCCCTTTATCA	
anthocyanin2	GCAGAAAGAGCTGTAGATTGAG TCTCTTGTCGATGAGGAGCAG	
MYC	CAATGGGGCTATAAAGACTAGGAA GGAAAAGAGAAAGAAACACACATG	
WD40	TCAGCCAATAGAAGGTGGATTG TCACACCCTTAGAATCTGAAGC	
GAPDH	GTACGACAACGAATGGGGTTA GGTCCGAGAGAACACTTTATTC	
Actin7	CATTGTGCTCAGTGGTGGTTC TCTGCTGGAAGGTGCTAAGTG	

Таблица 3. Характеристика генов антоцианидин-3-*O*-глюкозилтрансфераз в геноме перца *C. annuum*

Название гена антоцианидин-3-*O*-глюкозилтрансфераз в данной статье	Ген ID*	Локализация в геноме*	Длина, пн	CDS, пн	Белок, а.о.	MW, кДа	pI	Домен
*UFGT1***	*LOC107843659*	chr10:208664164..208665507	1344	1344	447	49.5	6.13	GT1_Gtf-like (6–390 a.o.)
UFGT2	*LOC107843660*	chr10:208704889..208706241	1353	1353	450	49.7	5.82	GT1_Gtf-like (9–447 a.o.)

Примечание. * – в геноме *C. annuum* сорта UCD-10X-F1 (PRJNA376668), ** – синоним *UFGT* или *3GT*, pI – изоэлектрическая точка.

(из-за полиморфных вариантов C132G и T413A). В референсном геноме сорта UCD-10X-F1 он соответствует не аннотированной последовательности (208673888..208675240, хромосома 10).

Анализируемые последовательности функциональных генов антоцианидин-3-*O*-глюкозилтрансфераз *UFGT1* (*LOC107843659*) и *UFGT2* (*LOC107843660*) не содержали интронов и имели сходные характеристики (табл. 3). Оба кодируемых фермента антоцианидин-3-*O*-глюкозилтрансфераз включали консервативный UDP-гликозилтрансферазный домен GT1_Gtf-like (cd03784).

Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей белков UFGT1 и UFGT2 различных видов *Capsicum* был проведен в сравнении с доступными гомологичными последовательностями других представителей Solanaceae (*Petunia* × *hybrida* и *Solanum* spp.) и модельного вида *Arabidopsis thaliana* L. Было обнаружено, что геномы видов *Solanum*, петунии и *A. thaliana* содер-

жат только по одному гомологу гена антоцианидин-3-*O*-глюкозилтрансфераз. Построенная дендрограмма показала четкую кластеризацию белков на группы UFGT1 и UFGT2 (рис. 1,*а*). Несмотря на то, что UFGT *A. thaliana* обладает почти равным сходством с UFGT1 и UFGT2 перца (идентичность 47.6 и 45.7% соответственно), UFGT видов *Solanum* сгруппировались с UFGT1 перца, а генетическая дистанция белков перца группы UFGT2 значительно превышает расстояние для группы UFGT1 (рис. 1,*а*). Анализ консервативных мотивов в белковых последовательностях не выявил структурных различий между UFGT1 и UFGT2 видов *Capsicum* и *Solanum*, однако обнаружил их отличие от UFGT петунии и *A. thaliana* в области трех мотивов: двух – в функциональном домене GT1_Gtf-like, и одного – на С-конце (рис. 1,*б*).

Определение содержания антоцианов и профиля экспрессии генов антоцианидин-3-О-глюкозилтрансфераз у образцов перца. Для биохимического и экспрессионного анализа использовали образцы трех сортов *C. annuum* (Сиреневый куб, Отелло и Сибиряк) и сорт *C. frutescens* (Самоцвет), различающихся паттерном пигментации плода в процессе созревания (табл. 1, рис. 2). У сортов Сиреневый куб и Отелло незрелый плод (стадия 1, MG) имеет фиолетовую окраску, которая по мере созревания сменяется на ярко-красную; листья имеют зеленую окраску. У сорта Самоцвет незрелый плод имеет ярко-фиолетовую окраску, которая затем сменяется на светло-желтую и на стадии спелости становится красной; листья имеют темно-фиолетовую окраску. Сорт Сибиряк формирует зеленые листья, незрелые плоды темно-зеленой окраски и спелые плоды ярко-красной окраски (рис. 2).

Данные биохимического анализа показали, что содержание суммы антоцианов у сортов Сиреневый куб и Отелло максимально в кожице незрелого плода (стадия 1) и по мере созревания плода снижается (рис. 3,*а*). У сорта Самоцвет содержание антоцианов высокое на стадиях 1 и 2 и значительно падает к стадии 3. При этом в кожице плода на стадии 2, когда плод имеет светло-желтую окраску, количество антоцианов существенно выше, чем на стадии 1, в плоде фиолетовой окраски (рис. 2, 3,*а*). У сорта Сибиряк антоцианы в кожице плодов не обнаружены (рис. 3,*а*).

Экспрессионный анализ показал, что транскрипты *UFGT1* присутствуют в кожице незрелого плода стадии 1 у сортов Сиреневый куб и Отелло и на всех трех стадиях развития у сорта Самоцвет (рис. 3,*б*). В кожице плодов сорта Сибиряк транскриптов *UFGT1* обнаружено не было (рис. 3,*б*).

Экспрессия гена *UFGT2* была выявлена в кожице плодов всех четырех сортов перца. У сортов Сиреневый куб и Самоцвет уровень транскриптов гена был высоким на стадии 1 и значительно падал по мере созревания плода, к стадии 3 приближаясь к низкой экспрессии, характерной для всех стадий у сорта Отелло. В плодах сорта Сибиряк, не содержащих антоцианов, наблюдались самые высокие уровни транскрипции гена *UFGT2* с максимумом на стадии 2 и равной экспрессией на стадиях 1 и 3 (рис. 3,*в*).

В листьях наибольшее содержание суммы антоцианов было детектировано у сорта Самоцвет (~1100 мкг/г; фиолетовая окраска), тогда как у сортов Сиреневый куб, Отелло и Сибиряк оно было значительно ниже (~2–12 мкг/г; зеленая окраска) (рис. 4,*а*).

Транскрипты гена *UFGT1* были выявлены в листьях всех анализируемых сортов, однако их уровень у сорта Самоцвет значительно (в 30–150 раз) превышал таковой у сортов Сиреневый куб, Отелло и Сибиряк (рис. 4,*б*). Наибольший уровень экспрессии гена *UFGT2* наблюдался в листьях сорта Сиреневый куб – в 2.5 раза выше, чем у сортов Отелло, Самоцвет и Сибиряк (рис. 4,*в*).

Экспрессии гена *Capana10g001979* (третий гомолог антоцианидин-3-*O*-глюкозилтрансферазы в геноме перца) детектировано не было ни в плодах, ни в листьях анализируемых образцов.

Дополнительно в листьях сортов перца были определены профили экспрессии генов транскрипционных факторов *anthocyanin2*, *MYC* и *WD40*. Было показано, что транскрипты всех трех генов присутствуют в листьях всех анализируемых сортов, при этом наибольшие уровни экспрессии наблюдались в фиолетовых листьях сорта Самоцвет (рис. 4,*г–е*).

На основе данных биохимического и экспрессионного анализа методом линейной регрессии была определена взаимосвязь уровней транскрипции генов антоцианидин-3-*O*-глюкозилтрансфераз и содержания суммы антоцианов (рис. 5). Было выявлено, что количество антоцианов положительно коррелирует с уровнями транскриптов гена *UFGT1* как в кожице плодов, так и в листьях (R^2 = 0.72 и 0.99 соответственно, *p-value* < 0.01) (рис. 5,*а*, *б*). Для гена *UFGT2* такой корреляции выявлено не было (R^2 = 0.15 и 0.13) (рис. 5,*в*, *г*).

Определение кодирующей последовательности и промоторной области гена UFGT1 у сортов перца. Для анализа вариабельности кодирующей последовательности и промоторной области гена *UFGT1* у образцов перца, различающихся паттерном окраски плода в процессе созревания, данные последовательности были амплифицированы и секвенированы. Для анализа были использованы 17 сортов перца *C. annuum*, четыре из которых (Сиреневый куб, Пурпурный, Отелло и Янтарь) формируют фиолетовый незрелый плод, а остальные 13 – зеленый, а также сорт *C. frutescens* (Самоцвет), у которого фиолетовую окраску имеет не только незрелый плод, но и листья (табл.

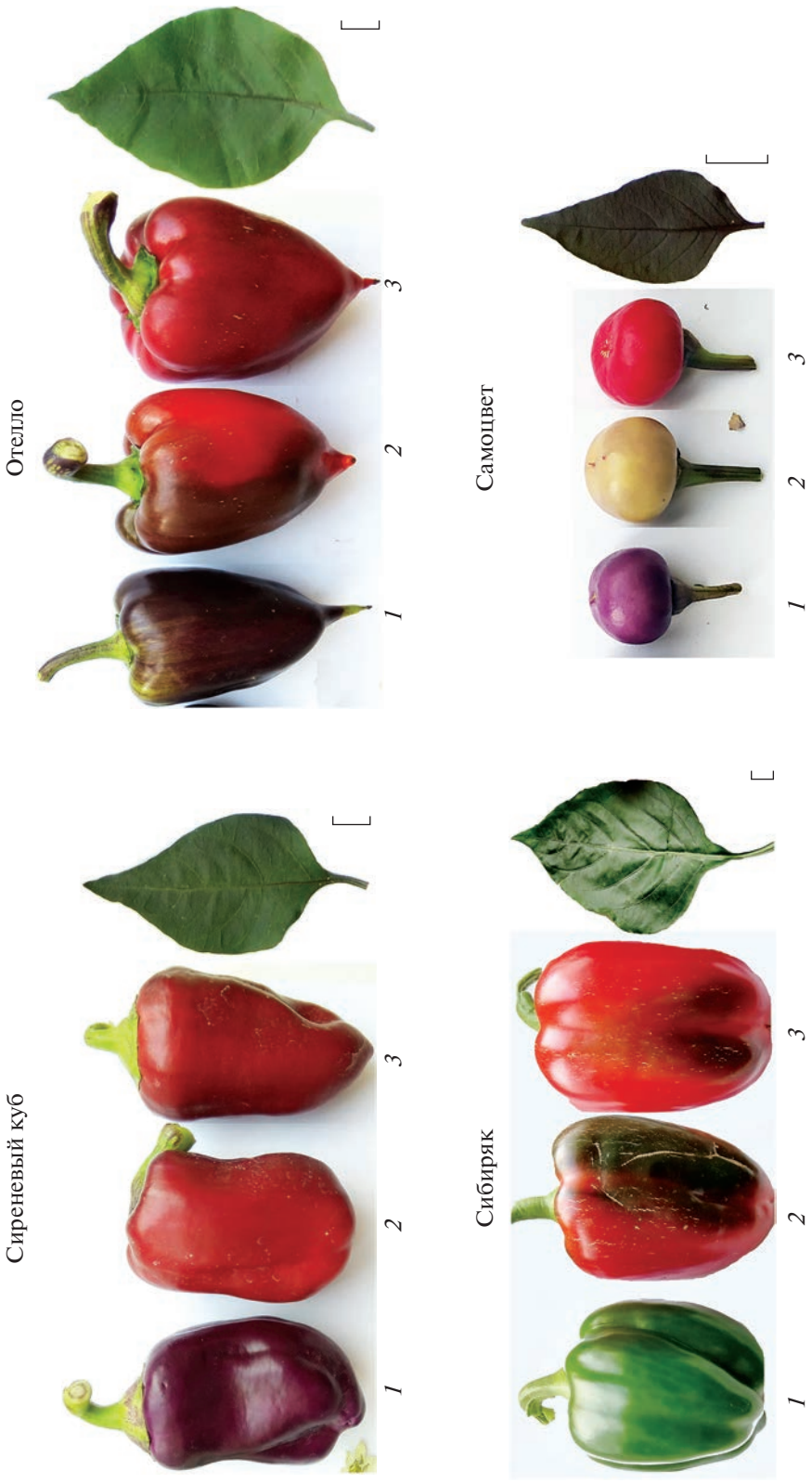


Рис. 2. Плоды сортов перца *C. annuum* (Сиреневый куб, Отелло и Сибиряк) и *C. frutescens* (Самоцвет) на разных стадиях созревания: *1* и *2* соответствуют незрелому плоду (MG и BR), а *3* – плоду биологической спелости (FR). Масштабная линия (вертикальная черта справа) соответствует 1 см.

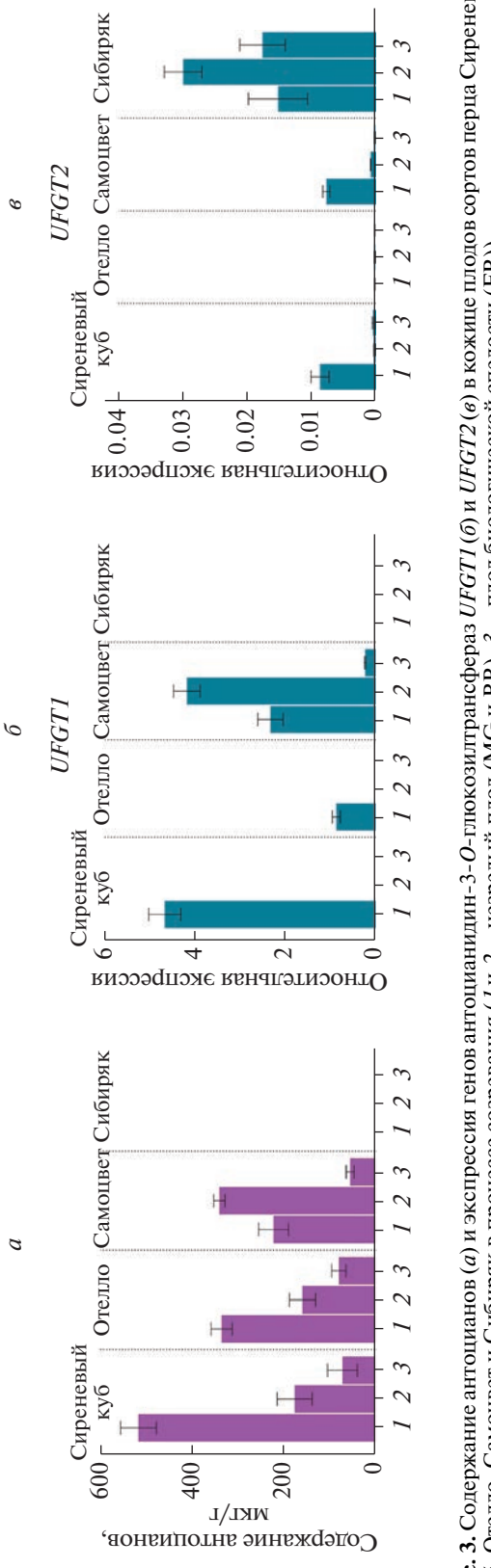


Рис. 3. Содержание антоцианов (*а*) и экспрессия генов антоцианидин-3-*O*-глюкозилтрансфераз *UFGT1* (*б*) и *UFGT2* (*в*) в кожице плодов сортов перца Сиреневый куб, Отелло, Самоцвет и Сибиряк в процессе созревания (*1* и *2* – незрелый плод (MG и BR), *3* – плод биологической спелости (FR)).

1). Структурный анализ полученных последовательностей выявил их инвариантность между образцами (независимо от окраски незрелого плода) и идентичность референсным последовательностям кДНК *UFGT1* (*LOC107843659*) и промоторной области (по геному сорта UCD-10X-F1). Регуляторная последовательность не содержала ни одного из полиморфизмов, обнаруженных ранее другими авторами и, по их предположениям, сцепленных с окраской плода перца, опосредованной антоцианами [15].

Cis-регуляторные элементы в промоторах генов UFGT1 и UFGT2. В промоторной области (~1000 пн) генов *UFGT1* и *UFGT2* был проведен поиск *cis*-регуляторных элементов, вовлеченных в ответ на стрессы и гормоны, а также являющихся сайтами связывания с транскрипционными факторами (рис. 6). В результате в промоторе гена *UFGT1* было выявлено шесть *cis*-регуляторных элементов, вовлеченных в ответ на стрессы (элементы ARE, W-box и WRE3) и свет (элемент box 4), а также отвечающих за связывание с транскрипционными факторами семейств MYB и MYC (элементы MYB и MYC) (рис. 6,*а*). В промоторе области гена *UFGT2* было найдено девять *cis*-регуляторных элементов, вовлеченных в ответ на стрессы (STRE, TC-rich repeats, W-box и WUN-motif), свет (ATCT-motif, box4 и GT1-motif) и салициловую кислоту (SARE), а также участвующих в связывании с транскрипционными факторами семейства MYB (MYB-like) (рис. 6,*б*).

ОБСУЖДЕНИЕ

Окраска плодов растений в красно-сине-фиолетовой гамме, привлекающая опылителей и распространителей семян, обусловлена синтезом и накоплением антоцианов в вакуолях клеток [18]. Помимо аттрактивной функции, антоцианы являются антиоксидантами и участвуют в ответных реакциях на абиотические и биотические стрессы [18, 19]. Критическую роль в определении антоциановой окраски плодов играют антоцианидин-3-*O*-глюкозилтрансферазы [10, 11, 16]. Под действием этих ферментов к молекулам антоцианидинов в 3-*O*-положении присоединяются молекулы сахара, в результате чего образуются стабильные водорастворимые пигменты, которые затем транспортируются в вакуоли [8, 9].

Ранее в геноме перца *C. annuum* (сорта Zunla-1) были аннотированы три гена антоцианидин-3-*O*-глюкозилтрансфераз (*Capana10g001978*, *Capana10g001979* и *Capana10g001980*), тандемно расположенные на хромосоме 10. Проведенный нами анализ референсного генома перца *C. annuum* (сорт UCD-10X-F1B) выявил два гена антоцианидин-3-*O*-глюкозилтрансфераз, соответствующие *Capana10g001978* и *Capana10g001980* и названные в данной работе *UFGT1* и *UFGT2* (табл. 3), а также

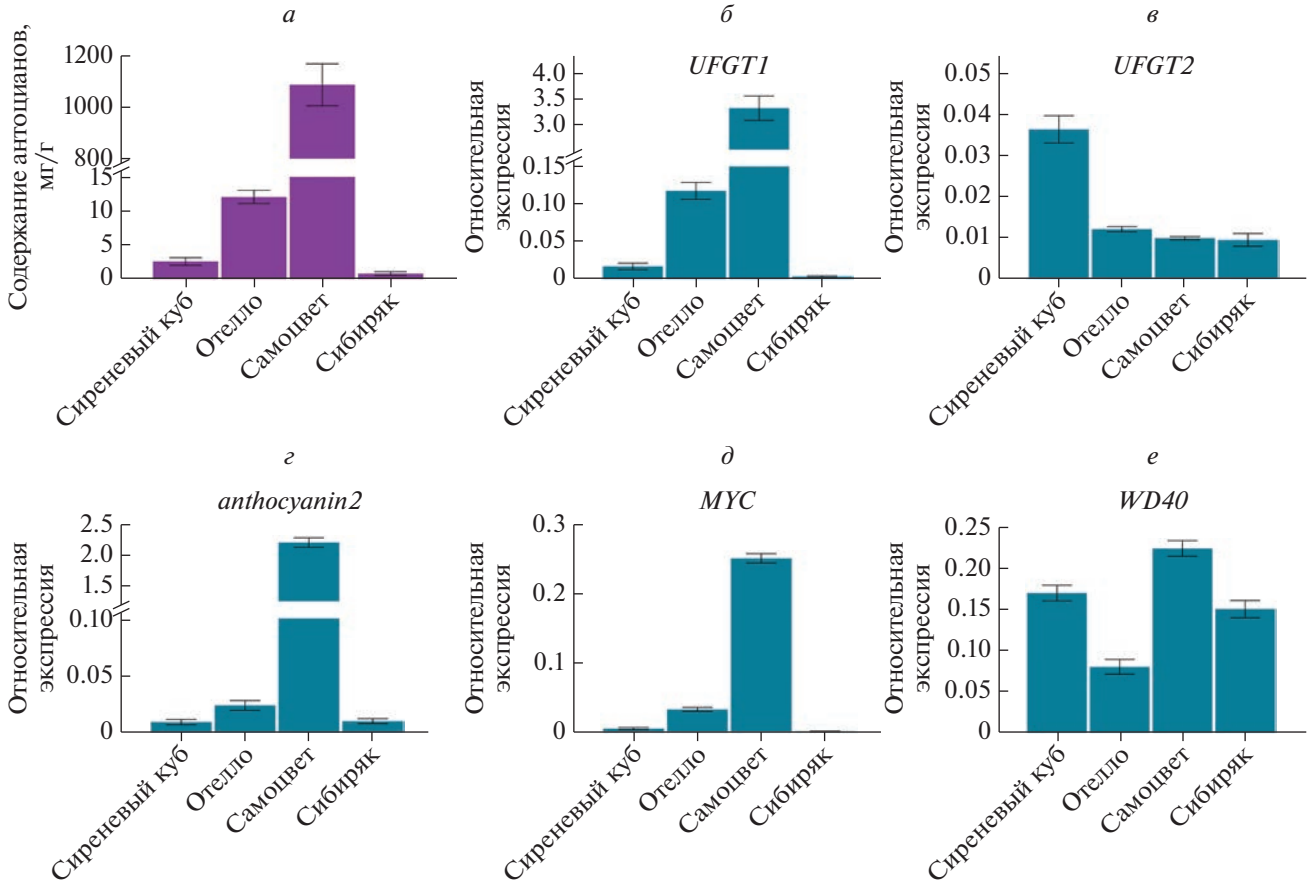


Рис. 4. Содержание антоцианов (*а*) и экспрессия генов антоцианидин-3-*О*-глюкозилтрансфераз *UFGT1* (*б*) и *UFGT2* (*в*) и генов транскрипционных факторов *anthocyanin2* (*г*), *MYC* (*д*) и *WD40* (*е*) в листьях сортов перца Сиреневый куб, Отелло, Самоцвет и Сибиряк.

третью последовательность (*Capana10g001979*), которая не аннотирована, видимо, из-за присутствия преждевременного стоп-кодона.

Ранее было выдвинуто предположение, что *Capana10g001979*, в отличие от своих безинтронных паралогов, содержит интрон, куда попадает преждевременный стоп-кодон, и эта область вырезается в процессе сплайсинга. Однако праймеры, использованные авторами этой работы для экспрессионного анализа *Capana10g001979* и *Capana10g001980* [15], не позволяют дифференцировать данные транскрипты. Более того, РВ-ПЦР с праймерами (табл. 2), разработанными нами с учетом предсказаний J. Liu с соавт. (2020), не детектировала транскриптов *Capana10g001979* ни в листьях, ни в плодах образцов перца, независимо от окраски тканей. С учетом 99% идентичности *Capana10g001979* и *Capana10g001980*, экспрессионные данные позволяют считать *Capana10g001979* псевдогеном, появившимся в результате недавней дупликации *Capana10g001980*.

В отличие от перца, другие представители пасленовых содержат в геноме только один паралог *UFGT1* (рис. 1), который является ближайшим гомологом *Capana10g001978* [15] и соответствует ранее описанному гену *CaUFGT* (FJ705848) [5]. Можно предположить, что именно данный ген является основным из трех паралогичных генов в биосинтезе антоцианов в тканях перца. Чтобы оценить данную гипотезу, нами был проведен сравнительный анализ экспрессии генов *UFGT1* и *UFGT2* в листьях и кожице плодов образцов перца с разным паттерном окраски тканей (рис. 2, табл. 1) в сочетании с биохимическим определением содержания суммы антоцианов (рис. 3, 4). Анализ возможных корреляций показал, что количество суммы антоцианов прямо зависит от уровня экспрессии гена *UFGT1* как в кожице плода, так и в листьях перца, и не связано с экспрессией *UFGT2* (рис. 5).

Ранее сообщалось, что в кодирующей последовательности гена *UFGT1* (*Capana10g001978*) содержатся приводящие к аминокислотным замещениям нуклеотидные замены C528A и A708G, коррелирующие с наличием антоцианов в кожице незрелого плода у образцов перца *C. annuum*

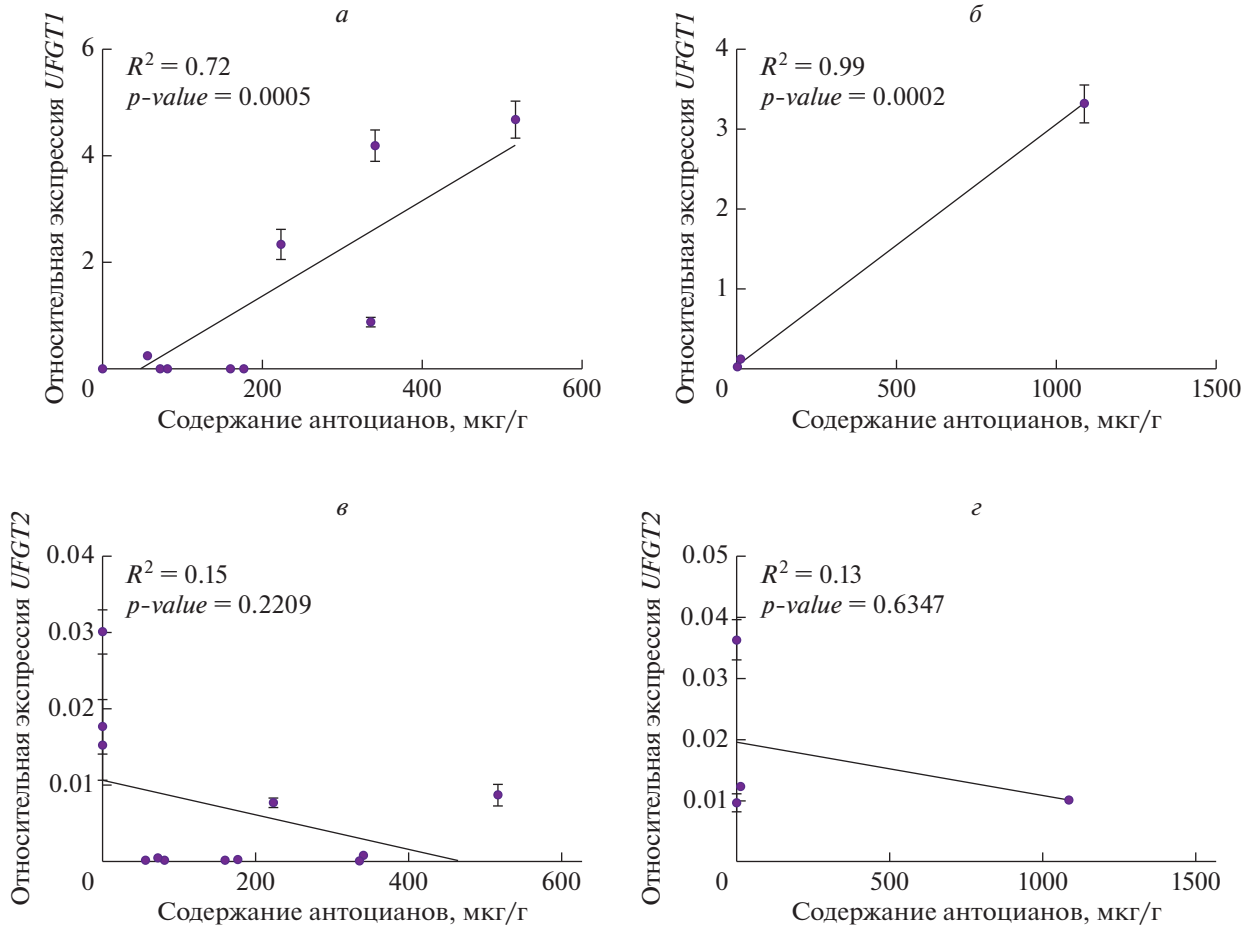


Рис. 5. Линейная регрессия экспрессии генов *UFGT1* и *UFGT2* и содержания антоцианов в кожице плодов (*а*, *в*) и листьях (*б*, *г*).

[15]. Поэтому, представлялось интересным изучить полиморфизм гена *UFGT1* у российских сортов перца. Анализ кДНК *UFGT1* в геноме 18 сортов перца с различной окраской листьев и плода в процессе созревания (табл. 1) выявил полную идентичность последовательности между образцами. В положениях 528 и 708 последовательности гена *UFGT1* у всех анализируемых сортов перца находились аденин (A) и гуанин (G), характерные, по данным [15], только для фиолетовой окраски незрелого плода.

В промоторной области гена *UFGT1* в работе J. Liu с соавт. (2020) также были выявлены SNPs и индели, ассоциированные с наличием антоциановой окраски незрелого плода. Проведенный нами анализ промоторов *UFGT1* (1000 пн) у 18 российских сортов перца с различной окраской незрелого плода показал инвариантность последовательности среди образцов и ее идентичность последовательности в референсном геноме (сорт UCD-10X-F1). При этом индель AAATACTAT-CATAAGTGACATATT (в положении –437), характерная для образцов перца с фиолетовой окраской плода [15], присутствовала в промоторных областях гена *UFGT1* всех анализируемых нами сортов перца. Другие индели в положениях –738, –146 и –33 [15] у анализируемых нами сортов перца обнаружены не были.

Таким образом, заключение о присутствии полиморфных вариантов, ассоциированных с антоциановой окраской плода, выдвинутое J. Liu с соавт. (2020), можно считать необоснованными. Отсутствие таких вариантов позволяет предположить наличие других факторов, определяющих уровень экспрессии гена. Обнаруженные в промоторной области генов *UFGT1* и *UFGT2* *cis*-регуляторные элементы, вовлеченные в ответ на различные стрессы, в том числе свет (рис. 6,*б*), подтверждают известные данные об участии антоцианов в регуляции стрессоустойчивости. Например в ответ на заражение *Penicillium digitatum* в плодах апельсина (*Citrus sinensis*) наблюдается активация биосинтеза антоцианов, а экспрессия структурных генов флавоноидного пути, в том числе *UFGT*, возрастает в 2–10 раз [20]. В листьях винограда (*Vitis vinifera*) засуха и вирусная инфекция приводят

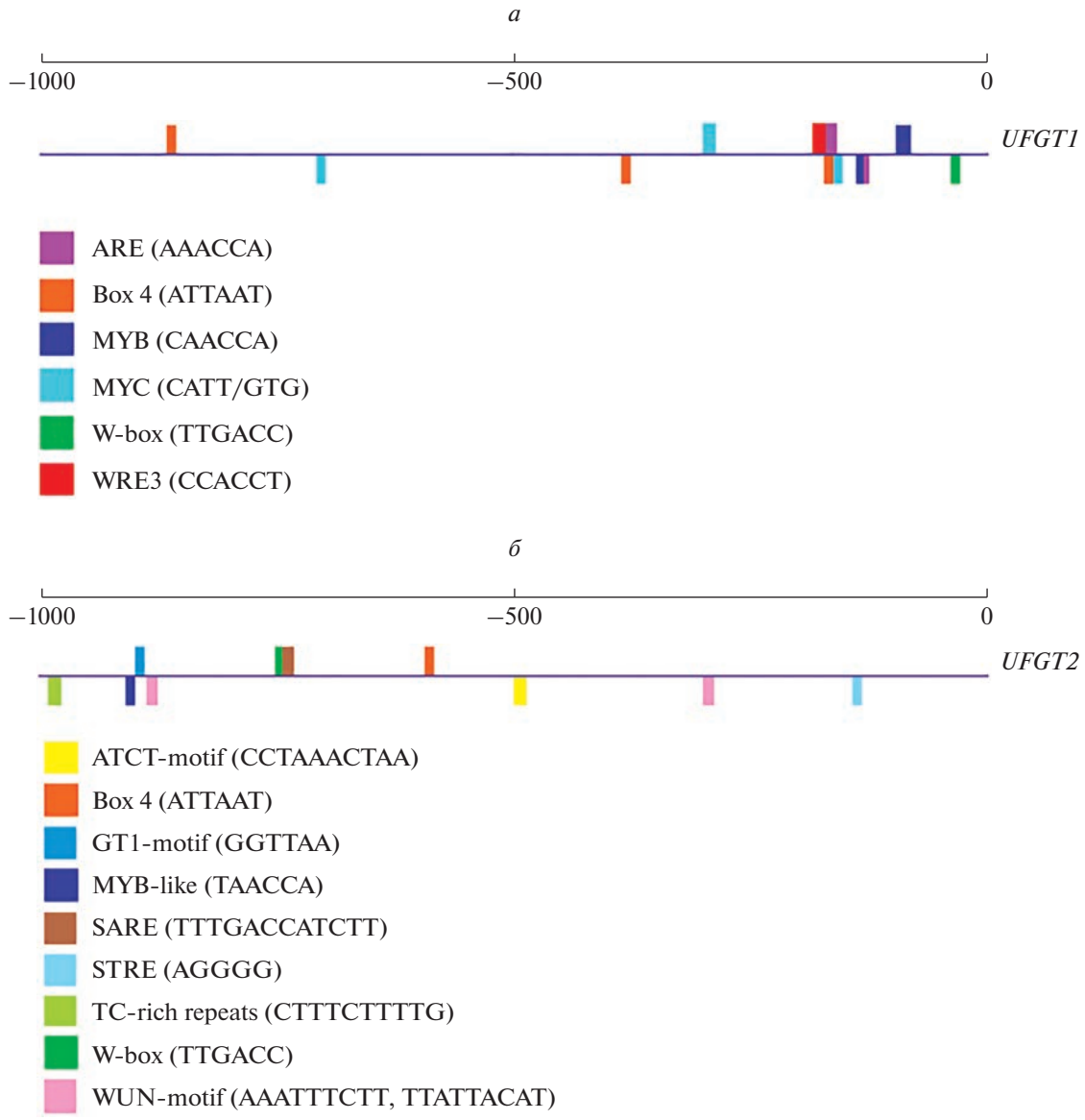


Рис. 6. Предсказанные *cis*-регуляторные элементы в промоторной области (1000 пн) генов *UFGT1* (*а*) и *UFGT2* (*б*).

к активации транскрипции структурных генов флавоноидного пути, а также фактора транскрипции семейства R2R3-MYB *VvMYBA1* [19, 21].

При отсутствии различий в промоторе *UFGT1* между образцами уровень экспрессии гена, скорее всего, регулируется комплексом MBW [9, 11, 12, 14]. Действительно, анализ *cis*-регуляторных элементов идентифицировал сайты связывания с транскрипционными факторами семейства MYB в промоторе как *UFGT1*, так и *UFGT2* (рис. 6). При этом анализ экспрессии генов *anthocyanin2* (R2R3-MYB), *MYC* (bHLH) и *WD40* (WD-repeat), продукты которых составляют комплекс MBW, показал, что уровень экспрессии двух из них прямо коррелирует с экспрессией *UFGT1*, но не *UFGT2* (рис. 4).

Интересно, что уровень транскрипции гена *UFGT2* не имел никакой ассоциации с содержанием антоцианов (рис. 3–5). Так, самые высокие уровни транскрипции среди образцов наблюдались в кожице плодов сорта Сибиряк, не содержащей антоцианов (рис. 3,*а*, *в*), а также в листьях сорта Сиреневый куб, которые имеют зеленую окраску и накапливают низкое количество антоцианов (рис. 4,*а*, *в*). При этом промоторная область гена *UFGT2* в сравнении с *UFGT1* была более обогащена стресс- и гормон-чувствительными *cis*-регуляторными элементами (STRE, TC-rich repeats, W-box, WUN-motif, SARE) (рис. 6,*б*). Можно предположить, что функция гена связана скорее с ответом растения перца на различные абиотические и

биотические стрессы, чем с биосинтезом антоцианов.

Таким образом, можно предположить, что в растениях перца уровень синтеза антоцианов и в листьях, и в плоде находится в прямой зависимости от активности одного из трех генов антоцианидин-3-*O*-глюкозилтрансферазы – гена *UFGT1*, регуляция которой зависит от активности членов комплекса MBW. При этом не имеется никаких полиморфных вариантов в самом гене, ассоциированных с различиями в уровне биосинтеза антоцианов и, как следствие, окраской плода. Гены *UFGT2* и *Capana10g001979* появились, вероятно, в результате тандемной трипликации гена *UFGT1* в геноме перца при возникновении и диверсификации видов *Capsicum*. Ген *Capana10g001979* является псевдогеном, тогда как ген *UFGT2* может проявлять тенденцию к неофункционализации, вероятно, связанной с ответом растения на стрессы, но не с биосинтезом антоцианов (исходя из данных его высокой экспрессии в кожице плода сорта Сибиряк в сочетании с полным отсутствием там антоцианов).

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (№ 19-16-00016) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

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. *Mateos R.M., Jiménez A., Román P. et al.* Antioxidant systems from pepper (*Capsicum annuum* L.): Involvement in the response to temperature changes in ripe fruits // Int. J. Mol. Sci. 2013. V.14. P. 9556–9580 https://doi.org/10.3390/ijms14059556
2. *Moscone E.A., Scaldaferro M.A., Grabiele M. et al.* The evolution of chili peppers (*Capsicum* – Solanaceae): A cytogenetic perspective // Acta Hortic. 2007. V. 745. P. 137–170. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2007.745.5
3. *García C.C., Barfuss M.H., Sehr E.M. et al.* Phylogenetic relationships, diversification and expansion of chili peppers (*Capsicum*, Solanaceae) // Ann. Bot. 2016. V. 118. № 1. P. 35–51. https://doi.org/10.1093/aob/mcw079
4. *Borovsky Y., Oren-Shamir M., Ovadia R. et al.* The A locus that controls anthocyanin accumulation in pepper encodes a MYB transcription factor homologous to *Anthocyanin2* of *Petunia* // Theor. Appl. Genet. 2004. V. 109. P. 23–29. https://doi.org/10.1007/s00122-004-1625-9
5. *Aza-González C., Herrera-Isidrón L., Núñez-Palenius H.G. et al.* Anthocyanin accumulation and expression analysis of biosynthesis-related genes during chili pepper fruit development // Biol. Plant. 2013. V. 57. P. 49–55. https://doi.org/10.1007/s10535-012-0265-1
6. *Филюшин М.А., Джос Е.А., Щенникова А.В., Кочиева Е.З.* Зависимость окраски плодов перца от соотношения основных пигментов и профиля экспрессии генов биосинтеза каротиноидов и антоцианов // Физиол. растений. 2020. Т. 67. С. 644–653. https://doi.org/10.31857/S0015330320050048
7. *Tanaka Y., Sasaki N., Ohmiya A.* Biosynthesis of plant pigments: Anthocyanins, betalains and carotenoids // Plant J. 2008. V. 54. P. 733–749. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03447.x
8. *Ma Y., Ma X., Gao X. et al.* Light induced regulation pathway of anthocyanin biosynthesis in plants // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. https://doi.org/10.3390/ijms222011116
9. *Naing A.H., Kim C.K.* Roles of R2R3-MYB transcription factors in transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in horticultural plants // Plant Mol. Biol. 2018. V. 98. P. 1–18. https://doi.org/10.1007/s11103-018-0771-4
10. *Zhao Z.C., Hu G.B., Hu F.C. et al.* The UDP glucose: Flavonoid-3-O-glucosyltransferase (UFGT) gene regulates anthocyanin biosynthesis in litchi (*Litchi chinesis* Sonn.) during fruit coloration // Mol. Biol. Rep. 2012. V. 6. P. 6409–6415.
11. *Liu Y., Tikunov Y., Schouten R.E. et al.* Anthocyanin biosynthesis and degradation mechanisms in Solanaceous vegetables: A review // Front. Chem. 2018. V. 6. https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00052
12. *Villa-Rivera M.G., Ochoa-Alejo N.* Transcriptional regulation of ripening in chili pepper fruits (*Capsicum* spp.) // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. https://doi.org/10.3390/ijms222212151
13. *Филюшин М.А., Джос Е.А., Щенникова А.В., Кочиева Е.З.* Особенности экспрессии гена фактора транскрипции *anthocyanin2* и его влияния на содержание антоцианов у образцов *Capsicum chinense* Jacq. с различной окраской плода // Генетика. 2020. Т. 56. С. 1161–1170. https://doi.org/10.31857/S0016675820090064
14. *Wang Y., Liu S., Wang H. et al.* Identification of the regulatory genes of UV-B-induced anthocyanin biosynthesis in pepper fruit // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. https://doi.org/10.3390/ijms23041960
15. *Liu J., Ai X., Wang Y. et al.* Fine mapping of the *Ca3GT* gene controlling anthocyanin biosynthesis in mature unripe fruit of *Capsicum annuum* L. // Theor. Appl. Genet. 2020. V. 133(9). P. 2729–2742. https://doi.org/10.1007/s00122-020-03628-7
16. *Kobayashi S., Yamamoto N.G., Hirochika H.* Association of *VvmybA1* gene expression with anthocyanin production in grape (*Vitis vinifera*) skin – color mutants // J. Jpn. Soc. Hortic. Sci. 2005. V. 74. P. 196–203.
17. *Solovchenko A.E., Chivkunova O.B., Merzlyak M.N., Reshetnikova I.V.* A spectrophotometric analysis of pigments in apples // Rus. J. Plant Phys. 2001. V. 48. № 5. P. 693–700.

18. *Cappellini F., Marinelli A., Toccaceli M. et al.* Anthocyanins: From mechanisms of regulation in plants to health benefits in foods // Front. Plant Sci. 2021. V. 12. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.748049

19. *Cui Z.H., Bi W.L., Hao X.Y. et al.* Drought stress enhances up-regulation of anthocyanin biosynthesis in grapevine leafroll-associated virus 3-infected *in vitro* grapevine (*Vitis vinifera*) leaves // Plant Dis. 2017. V. 101(9). P. 1606–1615. https://doi.org/10.1094/PDIS-01-17-0104-RE

20. *Sicilia A., Catara V., Scialò E., Lo Piero A.R.* Fungal infection induces anthocyanin biosynthesis and changes in DNA methylation configuration of blood orange [*Citrus sinensis* L. (Osbeck)] // Plants (Basel). 2021. V. 10(2). https://doi.org/10.3390/plants10020244

21. *Gutha L.R., Casassa L.F., Harbertson J.F., Naidu R.A.* Modulation of flavonoid biosynthetic pathway genes and anthocyanins due to virus infection in grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves // BMC Plant Biol. 2010. V. 10. https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-187

Antocyanidin-3-*O*-Glucosyltransferase Genes in Pepper (*Capsicum* spp.) and Their Role in Anthocyanine Biosynthesis

M. A. Filyushin[a], *, A. V. Shchennikova[a], and E. Z. Kochieva[a]

[a] *Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

**e-mail: michel7753@mail.ru*

In pepper (*Capsicum* spp.), anthocyanins are important not only for the photolabile compounds protection, but also for the regulation of fruit color pattern. Anthocyanidin-3-*O*-glucosyltransferases (UFGTs) play a key role in the biosynthesis of stable anthocyanins. In this work, the structure and phylogeny of three pepper *UFGT* homologue genes are characterized. Biochemical analysis of *C. annuum* cultivars (cv. Syrenevii cube, Othello and Sibiryak) and *C. frutescens* (cv. Samotsvet), which differ in the pattern of fruit pigmentation during ripening, showed the presence of anthocyanins in leaves and fruit peel of all accessions (except for the cv. Sibiryak fruit). The highest anthocyanins content was found in the purple leaves of the cv. Samotsvet. In the fruit peel of all accessions, the anthocyanins content decreased with ripening. Expression analysis of the same tissues showed that *UFGT1* (LOC107843659) and *UFGT2* (LOC107843660) transcripts are present in the leaves of all cultivars. In the fruit peel, *UFGT1* transcripts were detected at maturation stages 1 (cv. Syrenevii cube and Othello) and 1–3 (cv. Samotsvet), while *UFGT2* transcripts were found in all accessions with the maximum in the cv. Sibiryak, where anthocyanins were absent. Transcripts of the MBW complex (*anthocyanin2*, *MYC*, and *WD40*), which regulates the biosynthesis of anthocyanins, were present in the leaves of all cultivars with a maximum in the purple leaves of the cv. Samotsvet. Comparison of biochemical and expression data revealed a positive correlation between the amount of anthocyanins in fruit peel and leaves and *UFGT1* expression level. For *UFGT2* such correlation was no found. Analysis of *UFGT1* sequence, including the promoter region, in 18 pepper cultivars that differ in fruit color pattern, revealed sequence invariance, regardless of the color of the immature fruit. Analysis of the *UFGT1* and *UFGT2* promoter sequences of the showed differences in the composition of *cis*-regulatory elements involved in response to stress and hormones, and in MYB and MYC transcription factors binding sites.

Keywords: *Capsicum* spp., pepper cultivars, anthocyanins biosynthesis, anthocyanidin-3-*O*-glucosyltransferase, UFGT, the content of anthocyanins, gene expression.

ГЕНЕТИКА, 2023, том 59, № 5, с. 530–543

ГЕНЕТИКА РАСТЕНИЙ

УДК 575.133.2/116:633.854

ОБЛАСТЬ ПОНИЖЕННОЙ РЕКОМБИНАЦИИ ГРУППЫ СЦЕПЛЕНИЯ 13 ПОДСОЛНЕЧНИКА (*Helianthus annuus* L.) ВКЛЮЧАЕТ КЛАСТЕРЫ ГЕНОВ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ФЕРТИЛЬНОСТИ (*Rf1*) И УСТОЙЧИВОСТИ (*Pl*) К ЛОЖНОЙ МУЧНИСТОЙ РОСЕ

© 2023 г. И. Н. Анисимова[1, *], Н. В. Алпатьева[1], О. Н. Воронова[2], В. А. Гаврилова[1], Ю. И. Карабицина[1], Е. Б. Кузнецова[1], Е. Е. Радченко[1]

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

[2]*Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук, Санкт-Петербург, 197376 Россия*

**e-mail: irina_anisimova@inbox.ru*

Поступила в редакцию 11.09.2022 г.
После доработки 15.12.2022 г.
Принята к публикации 26.12.2022 г.

В группе сцепления 13 генома культурного подсолнечника *Helianthus annuus* L. картирован ряд генов, контролирующих ценные для селекции признаки: восстановление фертильности пыльцы при цитоплазматической мужской стерильности, устойчивость к грибным болезням (ложной мучнистой росе, ржавчине), которые были интрогрессированы от диких видов. Известно, что у подсолнечника и других растений частота рекомбинации в районах хромосом, содержащих интрогрессированные гены устойчивости, может быть подавлена, что благоприятно для проведения отбора с помощью сцепленных с ними молекулярных маркеров. В F_2 гибридов от скрещиваний стерильной линии подсолнечника ВИР 116А (ЦМС PET1) с линиями – восстановителями фертильности пыльцы из коллекции ВИР изучили характер совместного наследования локуса *Rf1* (фенотипический маркер – признак восстановления фертильности) и Pl_5/Pl_8, контролирующего устойчивость к большому числу рас *Plasmopara halstedii* (Farl) Berl. & De Toni (STS-маркер Ha-P1). В скрещивании ВИР 116А × ВИР 740 частота рекомбинации между локусами Pl_5/Pl_8 и *Rf1* составила 8.61, а в скрещиваниях ВИР 116А × ВИР 195 и ВИР 116А × RIL 80 оказалась почти вдвое выше. Во всех изученных популяциях F_2 отмечено отсутствие рекомбинантного фенотипического класса стерильных растений с отцовским вариантом маркера Ha-P1. При цитологическом анализе установлено, что показатели фертильности пыльцы растений с разными аллелями маркера, скорее всего, определяются генотипом растения, а не аллельным составом мужского гаметофита. Предположили, что нехватка одного из рекомбинантных классов F_2 может быть связана с эмбриональной летальностью, т.е. гибелью зигот, несущих рецессивный аллель гена восстановления фертильности пыльцы *rf1* и аллельный вариант STS-маркера Ha-P1 гена устойчивости (чувствительности) в локусе Pl_5Pl_8, полученный от отцовского родителя.

Ключевые слова: гибриды, наследование, локусы, аллели, молекулярные маркеры, фенотипические классы, фертильность пыльцы, зиготическая летальность.

DOI: 10.31857/S0016675823050028, **EDN:** FNMMXS

Подсолнечник *Helianthus annuus* L. – одна из ведущих масличных культур в мире и основная – в Российской Федерации. В настоящее время для получения семян подсолнечника наряду с сортами возделывают высокопродуктивные гетерозисные гибриды, характеризующиеся устойчивостью к болезням и вредителям. При создании гибридов используется цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) PET1-типа, полученная на основе однолетнего дикого вида *H. petiolaris* Nutt. [1]; для восстановления фертильности гибридов F_1 необходимо присутствие в генотипе ядерного гена *Rf1*, источником которого послужила линия T66006-2-1-B *H. annuus* [2]. Ген *Rf1* картирован в группе сцепления 13. В этой же группе сцепления *H. annuus* находятся гены, детерминирующие устойчивость к большому числу рас фитопатогенного гриба *Plasmopara halstedii* (Farl) Berl. & De Toni, вызывающего опасное заболевание – ложную мучнистую росу (локус Pl_5/Pl_8), а также гены устойчивости к возбудителю ржавчины *Puccinia helianthii* Schw. (локусы R_4, R_{HAR6}, R_{adv}, R_{13b}, R_{13b}) [3]. Установлено, что белки, кодируемые генами устойчивости к возбудителю ложной мучнистой росы, принадлежат к суперсемейству NBS-LRR. Они содержат сайт связывания нуклеотидов (Nu-

cleotide Binding Site – NBS) и обогащенные лейцином повторы (Leucine-Rich Repeat – LRR), т.е. имеют структуру, характерную для продуктов большинства *R*-генов [4]. Результаты недавних исследований показали, что гены-кандидаты в локусе *Rf1*, контролирующем признак восстановления фертильности пыльцы, кодируют PPR-белки, содержащие повторяющиеся элементы из 35 аминокислотных остатков (PentatricoPeptide Repeats), т.е. сходны по структуре с продуктами большинства идентифицированных к настоящему времени генов *Rf* растений [5–7].

Ряд авторов отмечают, что гены растений, вовлеченные в контроль восстановления фертильности пыльцы (*Rf*), и гены устойчивости к фитопатогенам (*R*) характеризуются сходством структуры (наличием повторяющихся мотивов), имеют кластерную организацию и часто находятся в смежных районах хромосом [8–10]. Обнаружено, что частоты рекомбинации между молекулярными маркерами и локусами генов устойчивости могут значительно отличаться от значений, предсказанных на основании физической карты [11]. Это явление получило название подавления (супрессии) рекомбинации. Так, эффект пониженной рекомбинации наблюдался в группе сцепления 1 *H. annuus*, в районе локуса Pl_{arg}, определяющего устойчивость к большинству известных рас *P. halstedii* [12]. Снижение частоты рекомбинации отмечали и в районе группы сцепления 13, несущем гены устойчивости к ржавчине [13]. При анализе расщепляющихся популяций от скрещиваний генетически разнородных линий у подсолнечника [14] и других растений [15] были получены различные оценки величины рекомбинации в гомологичных районах хромосом, содержащих гены устойчивости.

Сложный локус Pl_5/Pl_8 первоначально был картирован в группе сцепления 6 [16, 17], а позднее был отнесен к группе сцепления 13 [18]. Известно, что гены локуса Pl_5 интрогрессированы из многолетнего гексаплоидного вида *H. tuberosus* L., а Pl_8 – из однолетнего диплоидного вида *H. argophyllus* L. [19]. Кластер Pl_5/Pl_8 содержит ряд гомологичных генов, отвечающих за устойчивость к большому числу рас *P. halstedii* [20, 21]. O. Radwan et al. [21] определили полные нуклеотидные последовательности двух аналогов генов устойчивости (RGA) кластера Pl_5/Pl_8 и показали, что кодируемые ими белки относятся к подсемейству CC-NBS-LRR и содержат на N-конце скрученный спиральный домен (Coiled Coil). Авторы разработали серию специфичных внутрилокусных STS-маркеров для идентификации генотипов, несущих аллели устойчивости/чувствительности. Профили маркеров, полученных с каждой из шести пар праймеров, четко различались у устойчивых и неустойчивых генотипов. При использовании праймеров Ha-P1 диагностическими фрагментами для идентификации аллелей устойчивости в разных частях сложного локуса Pl_5/Pl_8 могут служить ампликоны длиной около 2000 пн, тогда как маркеры аллелей чувствительности характеризуются другим профилем с фрагментами в интервале 1150–1600 пн. В ряде работ маркеры апробированы для поиска аллелей устойчивости среди селекционного материала [22, 23] и линий генетической коллекции ВИР [24].

Локусы *Rf1* и Pl_5/Pl_8 находятся в одном плече хромосомы 13. Точных данных о генетическом расстоянии между данными локусами в литературе нет. Опубликованные генетические карты группы сцепления 13 в основном фрагментарны, показывают расстояния только между молекулярными маркерами внутри группы, либо определяют расстояние между каждым из локусов *Rf1* или Pl_5/Pl_8 и сцепленными с ними молекулярными маркерами [21]. На первой генетической карте сцепления “CARTISOL”, построенной на основе RFLP-маркеров, локус Pl_5 был картирован на расстоянии 15 сМ от *Rf1* [16]. Источниками разработанных к настоящему времени карт служили расщепляющиеся популяции, полученные от скрещиваний различных родительских линий. Возможно, этим объясняются различия в оценках генетических расстояний между молекулярными маркерами в пределах карты (либо между геном интереса – *Rf1*, Pl_5/Pl_8 и маркерным локусом), которые были опубликованы в разных источниках. Более точные данные по оценке величины сцепления может дать анализ расщепления гибридов, полученных с участием одной и той же материнской формы и генетически различных отцовских линий. В настоящей работе мы изучили характер совместного наследования признака восстановления фертильности пыльцы (фенотипический маркер локуса *Rf1*) и молекулярных маркеров локуса Pl_5/Pl_8 в потомствах от скрещиваний стерильной линии ЦМС ВИР 116А с линиями – восстановителями фертильности пыльцы, оценили величину рекомбинации между локусами Pl_5/Pl_8 и *Rf1* в каждом из скрещиваний и показали, что относительно низкие значения рекомбинации в исследованном районе обусловлены нехваткой одного из рекомбинантных классов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исходным материалом для исследования служили 35 линий коллекции подсолнечника ВИР, среди которых – пять стерильных линий с ЦМС PET1-типа (НА89, ВИР 114А, ВИР 215А, ВИР 434А, ВИР 471А), линия ВИР 151А на основе ЦМС RIG0, а также 29 фертильных линий, различавшихся по способности к восстановлению фертильности пыльцы [25]. По результатам молекулярного скрининга четыре линии были отобраны

Таблица 1. Характеристика родительских линий

Линия	Номер по каталогу ВИР	Происхождение	Тип цитоплазмы (по [25])	Наличие диагностических маркеров гена *Rf1* (по [25])
ВИР 116А	к-3455	Из сорта Вымпел, Россия	S	Отсутствуют
ВИР 740	к-3528	Из скрещивания ВИР 113 × источник *Rf*, Россия	F	HRG01, HRG02, ORS511
ВИР 195	к-3285	Отбор из линии SL 3336, Болгария	S	ORS511
RIL 80	к-3598	Из скрещивания I1083HR4 × RHA 345, Франция	S	HRG01, HRG02, ORS511

Примечание. S – стерильный, F – фертильный.

для скрещиваний. Использованные в скрещиваниях родительские формы – линии коллекции подсолнечника ВИР – были высокогомозиготными и насчитывали не менее 10 поколений инбридинга. В качестве материнского родителя для скрещиваний была взята линия ВИР 116А (к-3455, выделена из сорта Вымпел). Отцовскими линиями служили линии: ВИР 740 (к-3528, выделена из скрещивания ВИР 113 × источник *Rf*, Россия), ВИР 195 (к-3285, отбор из линии SL 3336, Болгария) и RIL 80 (к-3598, выделена из скрещивания I1083HR4 × × RHA 345, Франция). Отцовские линии различались по типу цитоплазмы (фертильный тип у ВИР 740, стерильный PET1 – у ВИР 195 и RIL 80), а также наличию–отсутствию диагностических маркеров гена *Rf1* (табл. 1) [25].

Гибридологический анализ

Скрещивания были выполнены на Кубанской опытной станции ВИР (Краснодарский край, Гулькевичский район) в 2011 г. От самоопыления гибридных растений F_1 получены семена гибридов F_2. Гибриды F_1 выращены на полях научно-производственной базы “Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР” (С.-Петербург, Пушкин) в 2013 г., популяции F_2 – в 2015, 2019 и 2020 г. Посев проводили в одни и те же сроки (конец мая), схема расположения растений – 40 × 40 см. Каждая из изученных семей F_2 (по одной гибридов от скрещивания ВИР 116А с ВИР 740 и RIL 80 и две – от скрещивания ВИР 116А × ВИР 195) – являлась потомством одного гибридного растения F_1.

Оценивали расщепление гибридов F_2 по признакам фертильности/стерильности, а также по вариантам STS-маркера Ha-P1, специфичного для гена Pl_8 в кластере Pl_5/Pl_8 [21]. Для определения частоты рекомбинации по данным анализа F_2 использовали формулы П.Ф. Рокицкого [26].

Молекулярно-генетический анализ

Фракции тотальной ДНК были выделены из листьев молодых растений с использованием модифицированного протокола [27]. Для амплификации внутригенного STS-маркера Ha-P1 использовали пару праймеров (F-GCCCAAAATTGAAAGAAAG-GTGTG, R-GGCGAAATTGGTTCCCGTGAGTCG) [21]. При проведении ПЦР пользовались протоколом, рекомендованным разработчиками праймеров. Продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле.

Для определения нуклеотидных последовательностей фрагментов, амплифицированных с помощью пары праймеров Ha-P1, продукты очищали от посторонних примесей с помощью набора Cleanup Standard фирмы “Евроген” (Москва). Для лигирования ампликонов в вектор pAL2-T использовали набор Quick-TA kit (Евроген), а для трансформации – компетентные клетки, приготовленные на основе штамма DH5α *E. coli*, по протоколу, предложенному [28], с модификациями [29]. По пять белых колоний каждого образца проверяли на наличие вставки методом ПЦР с праймерами M13. По два ампликона нужного размера анализировали на секвенаторе ABI 3500xL (Applied Biosystems) в ЦКП “Геномные технологии, протеомика и клеточная биология” ФГБНУ ВНИИСХМ. Полученные сиквенсы сравнивали с гомологичными последовательностями с использованием алгоритма BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

Цитологический анализ пыльцы

Для оценки фертильности пыльцы использовался модифицированный ацетокарминовый метод окрашивания в сочетании с методом анализа данных путем построения вариационных кривых [30]. В каждой из двух проанализированных семей F_2 (ВИР 116А × ВИР 195) было выделено по шесть фертильных растений, характеризующихся разными профилями маркера Ha-P1. Таким обра-

Таблица 2. Расщепление в семьях F_2 гибридов от межлинейных скрещиваний по фертильности/стерильности и вариантам маркера Ha-P1

Комбинация скрещивания	Число растений с фенотипом			χ^2 для теоретического соотношения 3 : 1*	*P*	Число растений с вариантами маркера Ha-P1				χ^2 для теоретического соотношения 1 : 2 : 1**	*P*
	F	S	всего			m	m/p	p	всего		
ВИР 116A × ВИР 740	91	30	121	0.002	0.975–0.99	29	65	27	121	0.74	0.10–0.90
ВИР 116A × ВИР 195, семья 1	74	24	98	0.01	0.90–0.95	31	51	16	98	4.81	0.05–0.10
ВИР 116A × ВИР 195, семья 2	77	18	95	1.86	0.10–0.90	27	50	18	95	1.97	0.10–0.90
ВИР 116A × RIL 80	106	35	141	0.002	0.975–0.99	25	77	39	141	3.98	0.10–0.90

Примечание. F – фертильные растения, S – стерильные растения; m, p и m/p – растения соответственно с материнским, отцовским и гибридным профилем маркера Ha-P1. * *d.f.* = 1, $\chi^2_{05} = 3.84$; ** *d.f.* = 2, $\chi^2_{05} = 6.0$.

зом, из каждой семьи была собрана пыльца у 18 растений, а всего обследовано 36 растений.

На постоянных препаратах пыльцы, окрашенной ацетокармином, анализировали по 10–15 полей зрения для каждого образца. Фертильными мы считали пыльцевые зерна нормального и увеличенного размера с равномерно окрашенной цитоплазмой, к стерильным были отнесены неокрашенные и неоднородно окрашенные пыльцевые зерна всех размеров, а также окрашенные зерна значительно меньшего размера (микропыльца). Оценивали отношение фертильных пыльцевых зерен к общему числу учтенных пыльцевых зерен данного препарата (в %), измеряли диаметр пыльцевых зерен. Математическая обработка полученных данных заключалась в построении вариационных кривых по встречаемости пыльцевых зерен определенного диаметра.

Пыльцевые зерна у подсолнечника слегка эллипсоидные, однако максимальный и минимальный диаметры различаются незначительно и на уровне светового микроскопа их форма близка к шарообразной. Для расчетов мы использовали диаметр в наиболее широкой части пыльцевого зерна. Ранжирование в группы проводили с шагом 2 мкм. Подробное цитологическое исследование, фотографирование и измерение пыльцы осуществляли с помощью микроскопа Axio Imager Z1, входящего в ЦКП “Клеточные и молекулярные технологии изучения растений и грибов” Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН (Санкт-Петербург), оснащенного цифровой фотокамерой, в программе ZEN 3.5 (blue edition). Расчеты, построение вариационных кривых и представление этих результатов в виде графиков осуществляли с помощью пакета программ MS Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Расщепление по фертильности/стерильности во втором поколении каждой из трех изученных гибридных комбинаций было близко к соотношению 3 (фертильные) : 1 (стерильные) (табл. 2), что свидетельствует о моногенном характере наследования признака. Такой же характер наследования признака восстановления фертильности пыльцы наблюдали у F_2 гибридов от скрещивания линии ВИР 116A с другими линиями – восстановителями фертильности пыльцы из коллекции ВИР: ВИР 210, ВИР 365, ВИР 558, RIL 130 (данные не показаны). Использованные в скрещиваниях отцовские линии ВИР 195 и RIL 80 имеют стерильный тип цитоплазмы и диагностические молекулярные маркеры гена *Rf1* (ORS511 – у ВИР 195; ORS511, HRG01, HRG02 – у RIL 80). Линия ВИР 740 характеризуется фертильным типом цитоплазмы и также имеет три диагностических маркера гена *Rf1* – ORS511, HRG01, HRG02 (табл. 1) [25]. Эти данные и сходный характер наследования признака восстановления фертильности пыльцы позволили предположить, что использованные в качестве отцовских родителей линии являются носителями доминантного аллеля одного и того же гена восстановления фертильности *Rf1*.

Родительские линии характеризовались различными профилями STS-маркера Ha-P1, специфичного для локуса Pl_5/Pl_8. У стерильной линии ВИР 116A амплифицировался только один фрагмент длиной около 1250 пн. Такой же профиль продуктов амплификации наблюдался и у других стерильных линий с цитоплазмой PET1: HA89, ВИР 114A, ВИР 215A, ВИР 434A, ВИР 471A, а также у линии ВИР 151A с цитоплазмой RIG0. У линии ВИР 740 продукты амплификации были представ-

лены двумя четко различающимися по длине фрагментами 1100 и 1450 пн, у линии ВИР 195 – двумя фрагментами длиной около 1450 и 1650 пн, у линии RIL 80 – тремя фрагментами длиной 1500, 1750 и 2000 пн (рис. 1). У других линий генетической коллекции подсолнечника ВИР профили амплифицированных фрагментов также были гетерогенными и полиморфными (данные не показаны).

Для того чтобы подтвердить локализацию изучаемых фрагментов в районе кластера *Pl*$_5$/*Pl*$_8$, мы клонировали и секвенировали продукты амплификации, полученные у линий ВИР 740 и ВИР 116А. Нуклеотидные последовательности ампликонов оказались сходными с нуклеотидной последовательностью клона Ha-NTIR11g, депонированной в базу NCBI в качестве идентифицированного у устойчивой линии QIR8 *H. annuus* аналога гена устойчивости. Последовательность Ha-NTIR11g, кодирующая белок CC-NBS-LRR, находится в локусе *Pl*$_5$/*Pl*$_8$ (образец AY490793.2) [21, 31]. В последовательности хромосомы 13 из аннотированного генома инбредной линии XRQ (MNCJ02000328.1) сайт отжига прямого праймера находится в положении 165737987, а в последовательности AY490793.2 – в позиции 4298. Сайт отжига обратного праймера локализован в межгенном участке. Ампликоны, полученные у образцов ВИР 116А и RIL 80, высокополиморфны, они включают небольшой фрагмент кодирующей последовательности гена длиной 125 и 89 пн соответственно (рис. 2) и протяженную фланкирующую, некодирующую последовательность. У линии ВИР 740 обнаружены различающиеся по длине фрагменты, содержащие сайты отжига праймеров. У линии ВИР 116А клонирован один фрагмент, длина которого (1246 пн) соответствовала оценке размера ампликона, полученной при электрофорезе в агарозном геле. Таким образом, подтверждено предположение о локализации изученных STS-фрагментов в последовательности одного из генов устойчивости в сложном локусе *Pl*$_5$/*Pl*$_8$.

В каждой из изученных семей F_2 от трех комбинаций скрещиваний наблюдали три варианта профилей STS-маркера Ha-P1: материнский (как у линии ВИР 116А, обозначен m), отцовский (обозначен p) и гибридный (m/p), включавший фрагменты обеих родительских форм (рис. 1). Наблюдаемое расщепление было близко к теоретически ожидаемому 1(m) : 2(m/p) : 1(p) при кодоминантном наследовании признака (табл. 2).

В скрещивании ВИР 116А × ВИР 740 частота рекомбинации между локусами Ha-P1 и *Rf1* составила 8.61, что указывает на довольно тесное сцепление. В скрещиваниях ВИР 116А × ВИР 195 и ВИР 116А × RIL 80 частота рекомбинации между двумя локусами была немного выше – от 14.66 до 20.4% (табл. 3). Теоретически, при данных значениях генетического расстояния в F_2 ожидали появление шести фенотипических классов (табл. 3), однако ни в одной из проанализированных комбинаций (всего было оценено 455 растений F_2) стерильные растения с отцовским вариантом маркера, т.е. относящиеся к рекомбинантному гомозиготному классу, не обнаружены, и наблюдали по пять фенотипических классов. Нехватка рекомбинантного фенотипического класса могла быть вызвана либо очень тесным сцеплением варианта “m” маркера Ha-P1 с рецессивным аллелем *rf1*, либо их расположением в одном и том же локусе. Однако в случае отсутствия рекомбинации при полном сцеплении двух локусов должна быть нехватка и другого фенотипического класса – стерильных растений с гетерозиготным профилем маркера. Тем не менее гетерозиготные рекомбинантные генотипы с высокой частотой наблюдались во всех проанализированных популяциях.

Другой возможной причиной элиминации рекомбинантного фенотипического класса могла быть нежизнеспособность гамет, несущих аллели *rf1* и *p*, которые продуцировали растения F_1. Для проверки этого предположения изучили показатели фертильности пыльцы у растений популяции F_2 (ВИР 116А × ВИР 195) с различными вариантами маркера. В анализ были включены только фертильные растения, поскольку пыльники стерильных (генотип *rf1rf1*) лишены пыльцы. Предполагали, что большая часть фертильных растений могла быть представлена гетерозиготами по локусу *Rf1*, т.е. имела генотипы *Rf1rf1pp, Rf1rf1mm* либо *Rf1rf1mp* и, следовательно, гаметы, одновременно несущие аллели *rf1* и *p*, могли продуцироваться растениями F_2 как с отцовским (p), так и с гибридным (m/p) вариантами маркера.

В целом анализ пыльцы ацетокарминовым методом позволил выявить среди фертильных по фенотипу гибридных растений F_2 (ВИР 116А × ВИР 195) значительное разнообразие по качеству пыльцы, а именно по степени окрашиваемости и диаметру пыльцевых зерен. Диапазон вариаций проявления этих параметров укладывается в три класса: от высокофертильных растений с показателем фертильности более 80% (84–97%), через группу растений со средней фертильностью 53–76%, до низкофертильных растений с показателем фертильности менее 50% (8–48%) (рис. 3, 4).

Среди исследованных растений оказалось 19 (52.7% от общего числа) высокофертильных (ВФ), среднефертильных (СФ) было 11 (30.5%), низкофертильных (НФ) – 6 (16.6%). Таким образом, примерно половина растений имела пыльцу хорошего качества, а половина – пыльцу пониженного качества. Группа высокофертильных растений и группа растений с пониженным качеством пыльцы (средне и низкофертильных растений) по количеству растений распределились как 19 : 17, что соответствует соотношению 1 : 1 (показатель χ^2 =

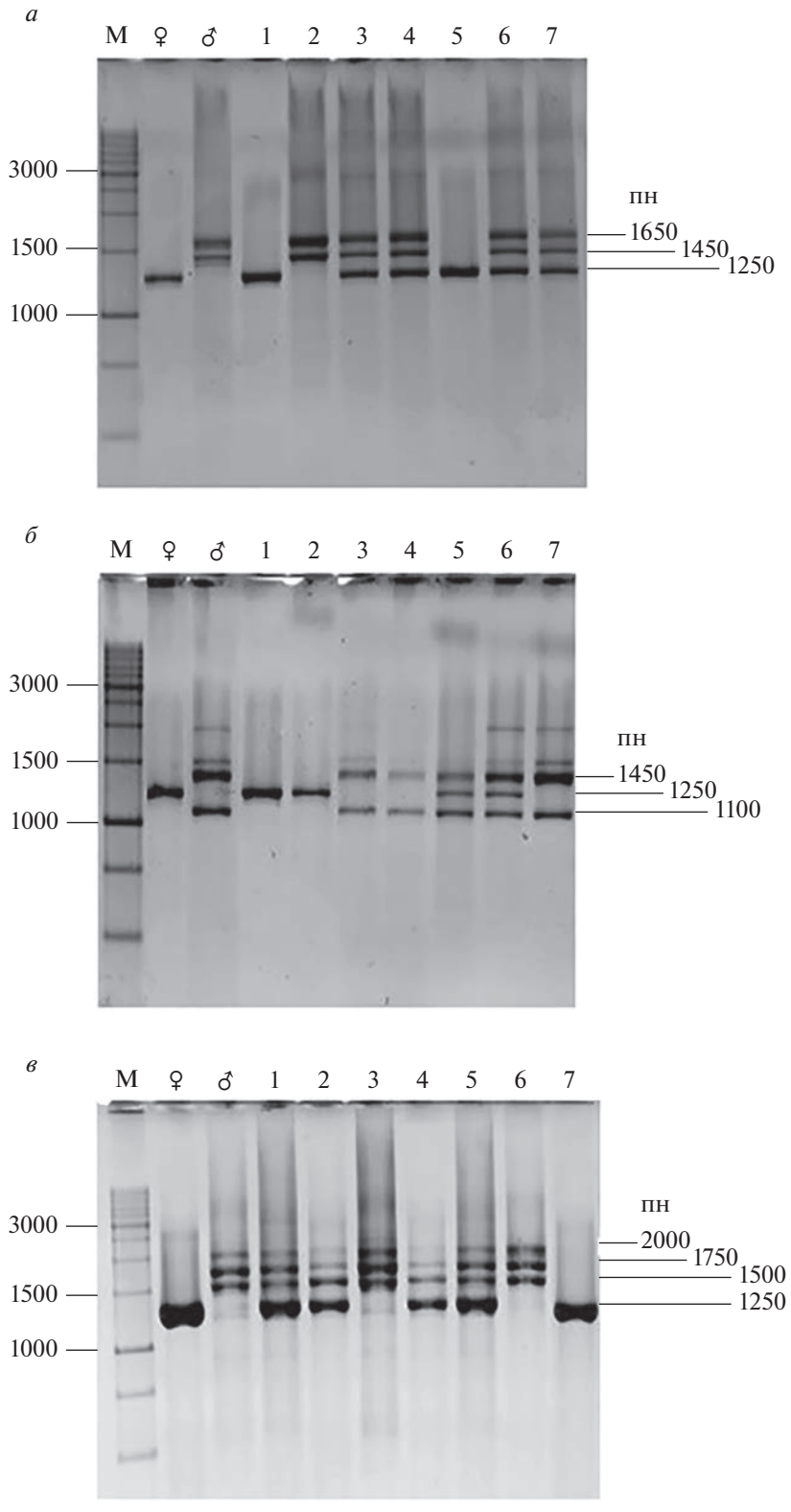
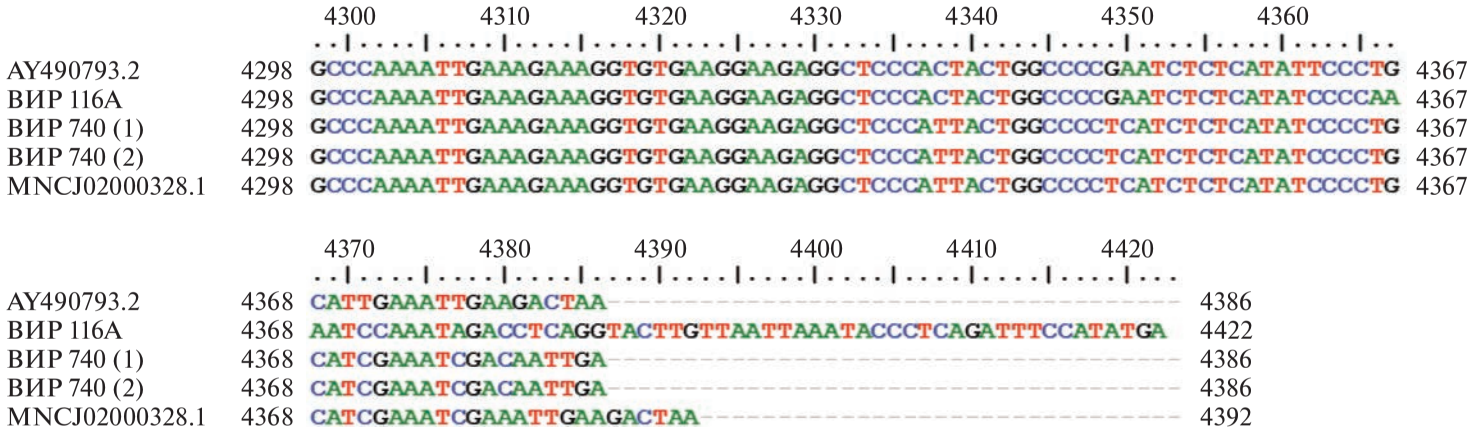


Рис. 1. Расщепление по вариантам маркера Na-P1 в F_2 гибридов ВИР 116А × ВИР 195 (*а*), ВИР 116А × ВИР 740 (*б*) и ВИР 116А × RIL 80 (*в*). Значками ♀ и ♂ обозначены продукты амплификации маркера материнской (ВИР 116А) и отцовских форм: ВИР 195 (*а*), ВИР 740 (*б*) и RIL 80 (*в*). Цифрами 1–7 обозначены варианты маркера гибридных растений: материнский у растений 1, 5 (*а*), 1, 2 (*б*), 7 (*в*); отцовский у растений 2 (*а*) 3, 4, 7 (*б*), 3, 6 (*в*); гибридный у растений 3, 4, 6, 7 (*а*), 5, 6 (*б*), 1, 2, 4, 5 (*в*). М – маркер молекулярной массы GeneRuler 1kb DNA Ladder, Thermo Scientific.

а



б

Рис. 2. Выравнивание фрагмента нуклеотидных (*а*) и предполагаемых белковых (*б*) последовательностей Na-P1, прилегающих к стоп-кодону, у образцов ВИР 116А и ВИР 740. В качестве референсных использованы последовательности из базы NCBI: GenBank MNCJ02000328.1 (предположительно кодирует белок суперсемейства нуклеозидтрифосфатгидролаз, содержащих Р-петлю и обогащенные лейциновыми повторами домены) и GenBank AY490793.2 (кодирует белок семейства CC-NBS-LRR). Нумерация нуклеотидов соответствует последовательности GenBank: AY490793.2. Для трансляции использовали стандартный генетический код (программа MEGA 7).

Таблица 3. Анализ совместного наследования признака фертильности/стерильности и аллельных вариантов маркера Ha-P1 в семьях F_2 гибридов от межлинейных скрещиваний

Комбинация скрещивания	Число растений с фенотипом и предполагаемый генотип каждого фенотипического класса							χ^2 для теоретического соотношения 6 : 3 : 3 : 2 : 1 : 1*	*P*	*r*
	F, m/p *Rf1Rf1mp*, *Rf1rf1mp* (A-Bb)	F, p *Rf1Rf1pp*, *Rf1rf1pp* (A-BB)	**F, m *Rf1Rf1mm*, *Rf1rf1mm* (A-bb)**	**S, m/p *rf1rf1mp* (aaBb)**	S, m *rf1rf1mm* (aabb)	**S, p *rf1rf1pp* (aaBB)**	всего			
ВИР 116A × ВИР 740	58	27	6	7	23	0	121	58.849	<0.01	8.61
ВИР 116A × ВИР 195, семья 1	48	16	10	3	21	0	98	56.803	<0.01	13.56
ВИР 116A × ВИР 195, семья 2	46	18	13	4	14	0	95	26.432	<0.01	20.4
ВИР 116A × RIL 80	63	39	4	14	21	0	141	53.364	<0.01	14.66

Примечание. Идентифицируемые по фенотипу рекомбинантные классы выделены полужирным шрифтом, в скобках указан предполагаемый фенотипический радикал. F – фертильные растения, S – стерильные растения; m, p и m/p – растения соответственно с материнским, отцовским и гибридным профилем маркера Ha-P1. Приведены предполагаемые генотипы растений, относящиеся к конкретному фенотипическому классу. *Rf1* и *rf1* – соответственно доминантный и рецессивный аллели локуса восстановления фертильности, *m* и *p* – аллели STS-маркера локуса Pl_5/Pl_8. Ампликон материнской линии ВИР 116A имел длину 1250 пн. Профили маркера отцовских линий различались размерами ампликонов: у линии ВИР 740 ампликоны имели длину 1100 и 1450 пн, ВИР 195 – 1450 и 1650 пн, RIL 80 – 1500, 1750 и 2000 пн. *r* – коэффициент рекомбинации, %. * *d.f.* = 5, $\chi^2_{0.05} = 11.1$.

= 0.74). В зависимости от профилей маркера эти показатели распределились следующим образом: материнский вариант маркера (m) – 6 ВФ/3 СФ/3 НФ, отцовский вариант маркера (p) – 7 ВФ/3 СФ/2 НФ, гибридный вариант маркера (m/p) – 6 ВФ/5 СФ/1 НФ (рис. 3). Таким образом, наличие маркера p не ведет к летальности пыльцы; кроме того, среди растений, продуцирующих гаметы с маркером p, доля стерильной пыльцы не выше, чем у пыльцы, несущей маркер m.

Распределение по уровню фертильности среди растений, относящихся к семье 1, было следующим: 12 ВФ, 5 СФ и 1 НФ. Среди растений из семьи 2 было 7 ВФ, 6 СФ и 5 НФ. В целом в выборке из семьи 1 было отмечено больше растений с высокой фертильностью, чем в выборке из семьи 2. Как видно из диаграммы (рис. 4), разброс значений показателя фертильности пыльцы среди растений из семьи 2 оказался более заметным, чем в семье 1.

Высокофертильные растения характеризуются выровненной по размеру пыльцой, вариационная кривая по диаметру у них имеет нормальный вид, с хорошо выраженным единичным пиком (рис. 5*а*, *б*). У пыльцы растений с пониженной фертильностью наблюдается значимо большая гетерогенность по диаметру в сравнении с высокофертильными формами. У среднефертильных растений на графике виден выступ слева, который является показателем того, что увеличивается число более мелких пыльцевых зерен (рис. 5,*в*, *г*). При большом количестве стерильной пыльцы этот выступ может принимать вид второго пика. Появление на графике дополнительного выступа справа свидетельствует о наличии заметного количества более крупных пыльцевых зерен и, как правило, одновременно формируются и совсем мелкие пыльцевые зерна, что отображается в виде подъема в левой части (рис. 5*д*, *е*).

ОБСУЖДЕНИЕ

Расщепление в F_2 гибридов от скрещивания одной и той же стерильной линии *H. annuus* с тремя восстановителями фертильности пыльцы, различающимися по происхождению, было близко к теоретически ожидаемому при моногенном контроле признака. Согласно литературным данным за восстановление мужской фертильности при ЦМС PET1-типа отвечает ген *Rf1*, находящийся в хромосоме 13 [2, 18]. Поэтому в качестве рабочей гипотезы было принято предположение о том, что в изучаемых комбинациях скрещивания признак восстановления фертильности пыльцы контролировался одним и тем же локусом (*Rf1*). В пользу этой гипотезы свидетельствуют сходное расщепление в F_2 и сцепленный характер наследования признака с маркерами локуса Pl_5/Pl_8, также картированного в группе сцепления 13. В литературе сообщалось еще об одном не сцепленном с *Rf1* локусе, отвечающем за признак восстановления фертильности пыльцы [32]. Считается, что этот ген присутствует в генотипах как стерильных линий, так и восстановителей, и поэтому не влияет

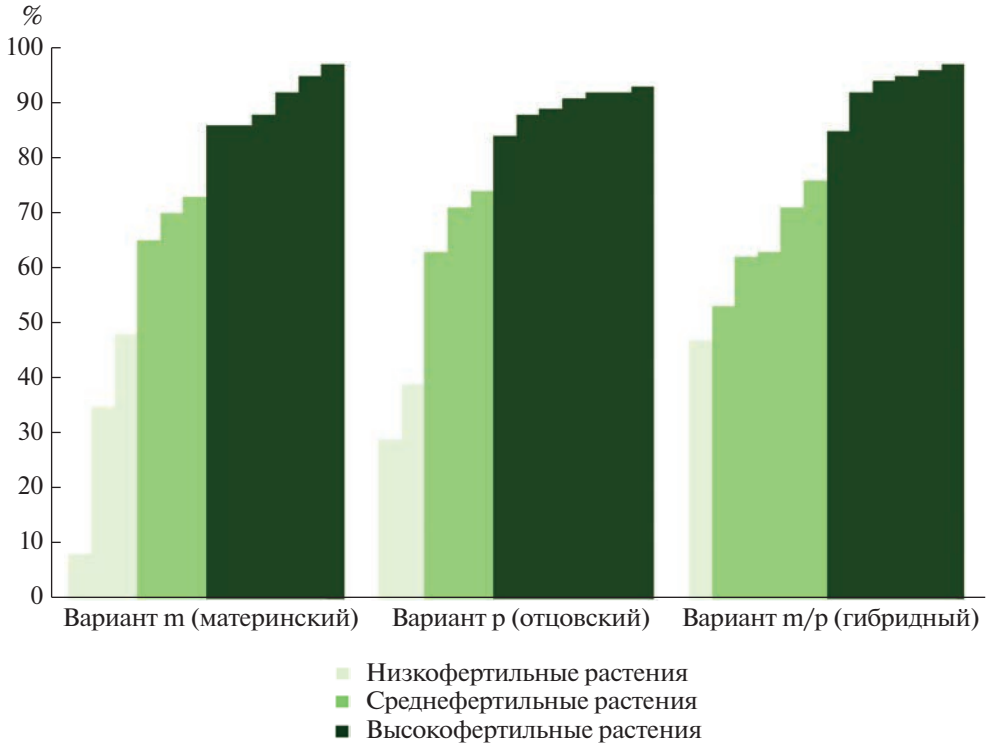


Рис. 3. Фертильность пыльцы (%) у растений F_2 (ВИР 116А × ВИР 195) с разными вариантами маркера Ha-P1 (локус Pl_5/Pl_8).

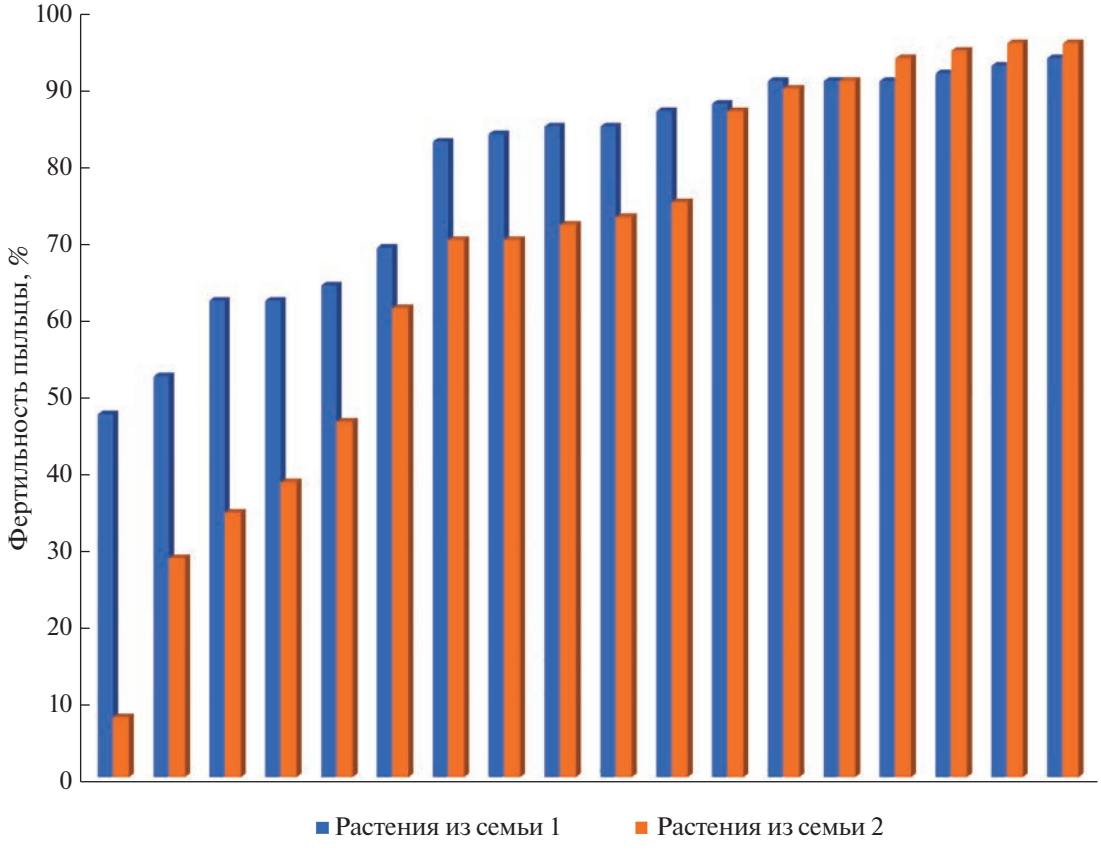


Рис. 4. Вариабельность по признаку фертильности пыльцы выборок растений из двух семей гибридов F_2 (ВИР 116А × × ВИР 195).

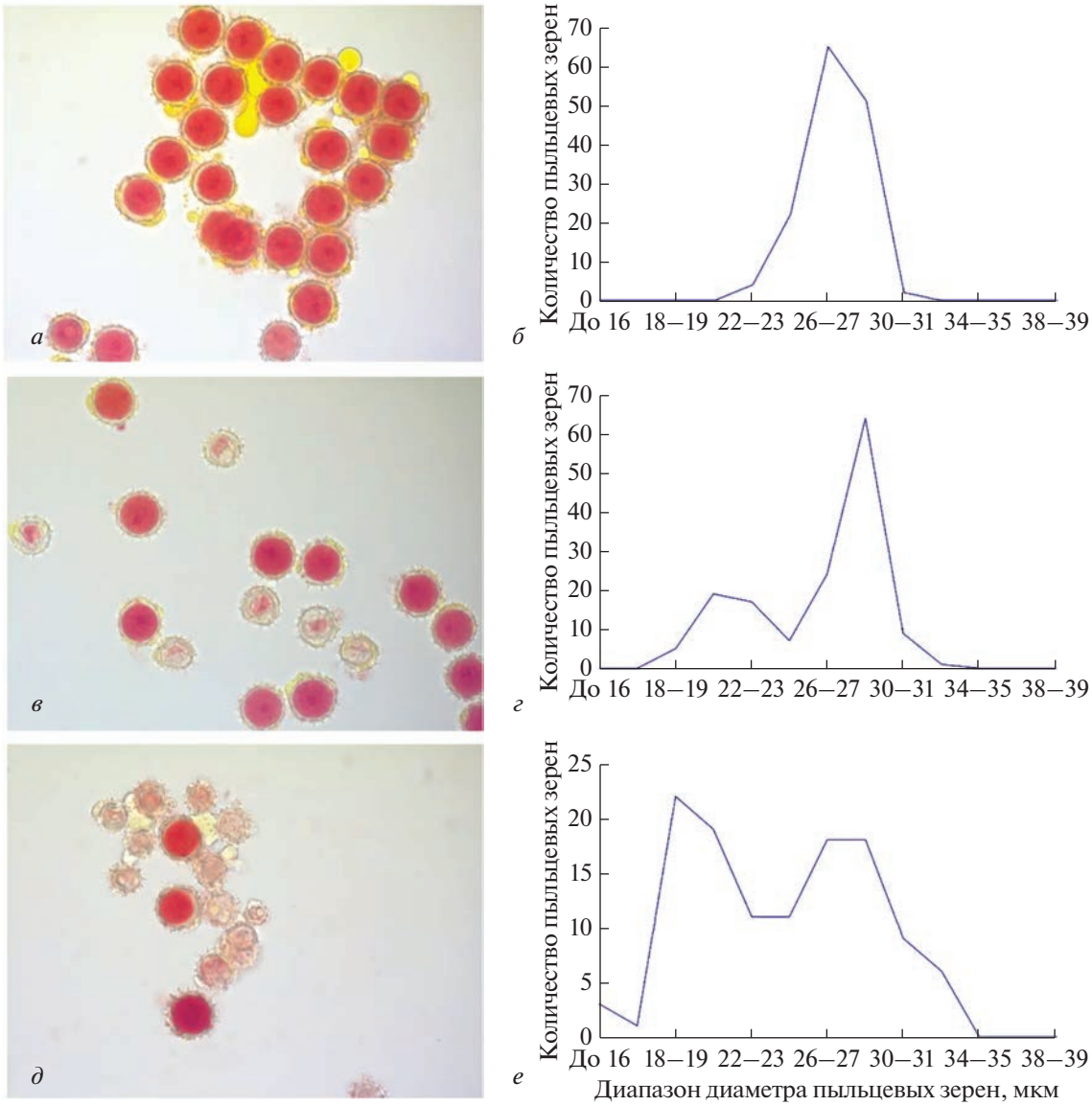


Рис. 5. Микрофотографии пыльцы растений F_2 гибридов (ВИР 116А × ВИР 195) и вариационные кривые по диаметру пыльцевых зерен: *а*, *б* – высокофертильное растение (фертильность 97%); *в*, *г* – среднефертильное растение (фертильность 74%); *д*, *е* – низкофертильное растение (фертильность 39%).

на характер расщепления. Генетическое расстояние между локусами *Rf1* и Pl_5, впервые установленное в работах L. Gentzbittel et al. [16] и P. Bert et al. [17], составило около 15%. В наших экспериментах значения силы сцепления между двумя локусами, полученные в разных комбинациях скрещивания, колебались от 8.6% (ВИР 116А × ВИР 740) до 20.4% (ВИР 116А × ВИР 195, семья 2). Поскольку во всех трех скрещиваниях материнской формой служила одна и та же линия, а гибриды F_1 были выращены в одинаковых условиях, различия величины рекомбинации могли быть обусловлены влиянием генотипа отцовской формы.

Частота рекомбинации зависит от многих факторов, среди которых основным является степень дивергенции гомологичных районов хромосом. В районах хромосом с относительно низким уровнем гомологии (например, интрогрессированных из геномов других видов) степень рекомбинации при конъюгации может быть снижена. Сравнительные исследования транскриптома четырех однолетних видов подсолнечника (*H. annuus*, *H. argophyllus*, *H. debilis* Nutt., *H. petiolaris*) показали, что в эволюции геномов видов решающим фактором является не столько обмен генами (речь идет о видах, способных скрещиваться), сколько подавление рекомбинации в определенных районах, что при-

водит к образованию так называемых “островков дивергенции” [33]. Так, например, частота рекомбинации между молекулярными маркерами и локусом Pl_{arg}, интрогрессированным от однолетнего дикого вида *H. argophyllus*, невелика, тогда как на физической карте маркеры и локус находятся на значительном расстоянии. В результате подавления рекомбинации в данном районе наблюдается “кластеризация” молекулярных маркеров вблизи локуса гена устойчивости, что весьма благоприятно для проведения маркер-опосредованного отбора в селекции устойчивых форм [12] и пирамидирования генов [13].

Наиболее вероятные кандидаты в локусе *Rf1* хромосомы 13 находятся между позициями 170494693–178217103 [5] или 169655088–173581392 референсного генома [6]. В нашей работе установлено, что сайт отжига праймера для маркера Ha-P1 локализован в позиции 165737987. Следовательно, физическое расстояние между маркером Ha-P1 и локусом *Rf1* составляет 4–5 млн пн (длина хромосомы 13 по данным сайта NCBI – примерно 173 млн пн).

В настоящей работе при анализе рекомбинации между геном *Rf1* (фенотипический маркер – признак восстановления фертильности) и внутрилокусным STS-маркером Ha-P1 впервые выявлена нехватка одного из рекомбинантных классов. Это может служить одним из факторов наблюдаемого снижения показателя рекомбинации на данном участке хромосомы 13 в отдельных комбинациях скрещиваний.

Результаты цитологического анализа свидетельствуют о значительной гетерогенности популяции F_2 (ВИР 116А × ВИР 195) по признаку фертильности пыльцы. Среди растений, фенотипированных как фертильные, выявлена группа высокофертильных, имеющих пыльцу хорошего качества, и группа растений с пониженным качеством пыльцы (средне- и низкофертильных растений), с соотношением 1 : 1. Также выявлена тенденция к снижению уровня фертильности у рекомбинантов с материнским типом маркера Ha-P1, специфичного для локуса Pl_5/Pl_8, т.е. у генотипов, гомозиготных по аллелю *m*, полученному от материнской формы. Однако эти факты не могут объяснить отсутствие фенотипического класса “стерильный с отцовским (p) вариантом маркера” в расщепляющихся популяциях гибридов F_2. Нехватка фенотипического класса стерильных растений с отцовским вариантом маркера среди 455 проанализированных сегрегантов F_2 может быть связана с эмбриональной летальностью генотипов, гомозиготных по рецессивному аллелю гена восстановления фертильности *Rf1* и аллелю гена устойчивости в локусе Pl_5/Pl_8, полученному от отцовского родителя (*rf1rf1pp*). У растений идентифицирован ряд генов, вызывающих летальность либо пониженную жизнеспособность гибридов от межвидовых скрещиваний. Многие из них обусловливают устойчивость к патогенам и кодируют рецепторы внутриклеточного ответа – белки семейства NBS-LRR [34]. В частности, недавно показано, что ген, обусловливающий гибридную летальность при скрещивании видов хлопчатника *Gossypium barbadense* L. и *G. hirsutum* L., кодирует белок семейства CC-NBS-LRR [35]. Установлено также, что нарушения эмбриогенеза и развития зародыша у кукурузы и арабидопсиса часто связаны с дефектами генов, кодирующих PPR-белки, принимающих участие в редактировании транскриптов митохондриальных и хлоропластных генов [36].

В настоящей работе выявлены различные аномалии пыльцы растений F_2, в частности так называемые микро- и макропыльцевые зерна. Они образуются в результате неравномерного расхождения хромосом в мейозе при образовании микроспор: одному ядру достается излишек генетического материала, а в другом получается недостаток, что приводит к несимметричному заложению клеточных перегородок в тетраде и в итоге к образованию неравных микроспор. А это, в свою очередь, случается при нестабильном геноме (у гибридов, у полиплоидов) или же может быть ответом на неблагоприятные условия среды. Так, исследование пыльцы у F_1 между *H. annuus* и *H. resinosus* Small выявило гетерогенность пыльцевых зерен по размеру, а на графиках распределения пыльцы по диаметру были обнаружены два четко различимых пика: в районе 19 и 24 мкм, что было связано с нарушениями в мейозе, которые приводят к формированию диплоидной пыльцы [37]. Значимая разница между диаметром фертильных (окрашенных) и стерильных пыльцевых зерен отмечается не только у подсолнечника, но и у других видов. Например, у *Mimulus guttatus* DC это разница составляет около 13 мкм, что позволяет использовать диаметр пыльцевого зерна для автоматического подсчета соотношения фертильных и стерильных пыльцевых зерен [38].

Довольно большое число генов растений незаменимы для функционирования гаметофита и раннего развития семян. У подсолнечника фертильность пыльцы гибридов F_1 высока (90–100%), тогда как в F_2 она может значительно снижаться [39]. Теоретически растения F_1 изученных комбинаций скрещиваний продуцировали четыре типа гамет – несущих доминантный или рецессивный аллель гена восстановления фертильности, а также разные аллели маркерного фрагмента. Существует вероятность того, что гаметы с разным сочетанием аллелей гена *Rf1* и вариантов маркерного фрагмента Ha-P1 различаются по жизнеспособности. Однако, как было показано ранее на других комбинациях скрещивания с участием линии ВИР 116А, вся пыльца выглядит качественно в F_1 и неодно-

родность по показателям фертильности более четко проявляется в F_2 [39]. Это позволяет предположить, что контроль показателей фертильности пыльцы осуществляется на уровне спорофита.

Фертильность пыльцы – важный селекционный признак, определяющий продуктивность гибридов. Снижение уровня фертильности приводит к снижению урожайности гибридов подсолнечника, появлению "череззерницы". Как следует из полученных данных, гибель части зародышей при самоопылении гибридов F_1 может быть генетически детерминирована. Это может приводить к снижению завязываемости семян и снижению продуктивности гибридов. Другим фактором, влияющим на завязываемость семян при самоопылении, является автофертильность, показателями которой служит отношение числа завязавшихся семян к общему числу семянок в корзинке при самоопылении и при открытом цветении. Завязываемость семянок, особенно при самоопылении, является сложным признаком полигенной природы [40]. Автофертильность гибридов подсолнечника составляет 43%, самоопыленных линий – 37% и сортов-популяций – 7% [41]. Доказан существенный вклад генотипа в завязываемость семянок [42]. Результаты настоящего исследования позволяют предположить, что на завязываемость семян у гибридов F_1 на основе ЦМС PET1 может оказывать влияние и такой фактор, как гибель одного из рекомбинантных классов, включающего полученный от материнского родителя рецессивный аллель гена *rf1* и аллель находящегося в том же плече хромосомы 13 локуса устойчивости от отцовского родителя.

В настоящей работе изучены особенности совместного наследования двух картированных в группе сцепления 13 *H. annuus* локусов: *Rf1* (фенотипический маркер – признак восстановления фертильности пыльцы) и Pl_5/Pl_8 (STS-маркер HaP1). Частота рекомбинации между двумя локусами в популяциях F_2 от скрещиваний одной и той же стерильной линии-тестера с тремя линиями – восстановителями фертильности пыльцы варьирует от 8.7 до 20%. Среди фенотипических классов во всех изученных популяциях F_2 не выявлены рекомбинантные гомозиготы по рецессивному аллелю *rf1*, полученному от материнского родителя, и отцовскому варианту внутрилокусного маркера Pl_5/Pl_8 от отцовского родителя. Возможно, их отсутствие обусловлено гибелью зигот, содержащих аллель *rf1* и аллель гена устойчивости в локусе Pl_5/Pl_8, продуктами которого являются белки подсемейства CC-NBS-LRR.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта Минобрнауки России "Национальная сетевая коллекция генетических ресурсов растений для эффективного развития РФ в сфере генетических технологий" по соглашению № 075-15-2021-1050 от 28.09.2021 г.

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. *Leclercq P.* Une stérilité male cytoplasmic chez le tournesol // Ann. Amélior. Plant. 1969. V. 19. № 2. P. 99–106.
2. *Kinman M.L.* New developments in the USDA and state experiment station sunflower breeding programs // Proc. 4th Intern. Sunflower Conference. Memphis, TN, USA, 23 June 1970. P. 181–183.
3. *Dimitrijevic A., Horn R.* Sunflower hybrid breeding: from markers to genomic selection // Front. Plant Sci. 2018. V. 17. № 8. Article 2238. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02238
4. *Radwan O., Gandhi S., Heesacker A. et al.* Genetic diversity and genomic distribution of homologs encoding NBS-LRR disease resistance proteins in sunflower // Mol. Genet. Genomics. 2008. V. 280. P. 111–125. https://doi.org/10.1007/s00438-008-0346-1
5. *Goryunov D.V., Anisimova I.N., Gavrilova V.A. et al.* Association mapping of fertility restorer gene for CMS PET1 in sunflower // Agronomy. 2019. V. 9. № 2. Article 49. https://doi.org/10.3390/agronomy9020049
6. *Horn R., Radanovic A., Fuhrmann L. et al.* Development and validation of markers for the fertility restorer gene *Rf1* in sunflower // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. № 6. Article 1260. https://doi.org/10.3390/ijms20061260
7. *Radanović A., Sprycha Y., Jocković M. et al.* KASP markers specific for the fertility restorer locus *Rf1* and application for genetic purity testing in sunflowers (*Helianthus annuus* L.) // Genes. 2022. V. 13. Article 465. https://doi.org/10.3390/genes13030465
8. *Qi L.L., Seiler G.J., Vick B.A., Gulya T.J.* Genetics and mapping of the *R11* gene conferring resistance to recently emerged rust races, tightly linked to male fertility restoration, in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // Publ. from USDA-ARS / UNL Faculty. 2012. 1318. https://doi.org/digitalcommons.unl.edu/usdaarsfacpub/1318
9. *Dahan J., Mireau H.* The *Rf* and *Rf*-like PPR in higher plants, a fast-evolving subclass of PPR genes // RNA Biol. 2013. V. 10. № 9. P. 1469–1476. https://doi.org/10.4161/rna.25568
10. *Ma G., Long Y., Song Q. et al.* Map and sequence-based chromosome walking towards cloning of the male fertility restoration gene *Rf5* linked to *R11* in sunflower // Sci. Reports. 2021. № 11. Article 777. https://doi.org/10.1038/s41598-020-80659-6
11. *Wei F.S., Gobelman-Werner K., Morroll S.M. et al.* The *Mla* (powdery mildew) resistance cluster is associated

with three NBS-LRR gene families and suppressed recombination within a 240-kb DNA interval on chromosome 5S (1HS) of barley // Genetics. 1999. V. 153. № 4. P. 1929–1948. https://doi.org/10.1093/genetics/153.4.1929

12. *Wieckhorst S., Bachlava E., Duβle C.M. et al.* Fine mapping of the sunflower resistance locus *Plarg* introduced from the wild species *Helianthus argophyllus* // Theor. Appl. Genet. 2010. V. 121. № 8. P. 1633–1644. https://doi.org/10.1007/s00122-010-1416-4
13. *Qi L., Ma G.* Marker-assisted gene pyramiding and the reliability of using SNP markers located in the recombination suppressed regions of sunflower (*Helianthus annuus* L.) // Genes. 2020. V. 11. № 1. Article 10. https://doi.org/10.3390/genes11010010
14. *Bowers J.E., Bachlava E., Brunick R.L. et al.* Development of a 10,000 locus genetic map of the sunflower genome based on multiple crosses // G3: Genes, Genomes, Genetics. 2012. V. 2. № 1. P. 721–729. https://doi.org/10.1534/g3.112.002659
15. *McMullen M.D., Kresovich S., Villeda H.S. et al.* Genetic properties of the maize nested association mapping population // Science. 2009. V. 325. P. 737–740. https://doi.org/10.1126/science.1174320
16. *Gentzbittel L., Vear F., Zhang Y.X. et al.* Development of a consensus linkage RFLP map of cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.) // Theor. Appl. Genet. 1995. V. 90. P. 1079–1086. https://doi.org/10.1007/BF00222925
17. *Bert P., Tourvieille de Labrouhe D., Phillippon J. et al.* Identification of a second linkage group carrying genes controlling resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // Theor. Appl. Genet. 2001. V. 103. P. 992–997. https://doi.org/10.1007/s001220100660
18. *Yu J.K., Tang S., Slabaugh M.B. et al.* Towards a saturated molecular genetic linkage map for cultivated sunflower // Crop. Sci. 2003. V. 42. P. 367–387. https://doi.org/10.2135/cropsci2003.3670
19. *Vear V.* Classic genetics and breeding // Genetics, Genomics and Breeding of Sunflower / Eds Hu J., Seiler G., Kole Ch. USA: Clemson Univ., Clemson, SC, 2010. P. 50–77.
20. *Vear F., Serieys H., Petit A. et al.* Origins of major genes for downy mildew resistance in sunflower // Proc. 17th Intern. Sunflower Conference. Spain: Córdoba, 2008. P. 125–130.
21. *Radwan O., Bouzidi M.F., Nicolas P., Mouzeyar S.* Development of PCR markers for the *Pl5/Pl8* locus for resistance to *Plasmopara halstedii* in sunflower, *Helianthus annuus* L. from complete CC-NBS-LRR sequences // Theor. Appl. Genet. 2004. V. 109. № 1. P. 176–185. https://doi.org/10.1007/s00122-004-1613-0
22. *Маркин Н.В., Тихобаева В.Е., Усатенко Т.В. и др.* Генотипирование линий подсолнечника с различной устойчивостью к ложной мучнистой росе с помощью STS-маркеров // Научно-техн. бюл. Всерос. научно-исслед. института масличных культур. 2012. Вып. 2. С. 151–152.
23. *Рамазанова С.А., Антонова Т.С.* Маркирование локусов *Pl6, Pl13* and Pl_{arg}, контролирующих устойчивость к *Plasmopara halstedii* у линий подсолнечника селекции ВНИИМК // Масличные культуры. Науч-техн. бюл. Всерос. научно-исслед. института масличных культур. 2020. Вып. 3 (1831). С. 20–26. https://doi.org/10.25230/2412-608X-2020-3-183-20-26
24. *Гаврилова В.А., Ступникова Т.Г., Макарова Л.Г. и др.* Линии генетической коллекции подсолнечника ВИР, устойчивые к ложной мучнистой росе // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2021. Т. 182. № 3. С. 101–110. https://doi.org/10.30901/2227-8834-2021-3-101-110
25. *Анисимова И.Н., Карабицина Ю.И., Алпатьева Н.В. и др.* Диагностическая ценность молекулярных маркеров гена *Rf1* подсолнечника // Биотехнология и селекция растений. 2021. Т. 4. № 2. С. 28–37. https://doi.org/10.30901/2658-6266-2021-2-o3
26. *Рокицкий П.Ф.* Введение в статистическую генетику. Минск: Выш. шк., 1974. 448 с.
27. *Li J.T., Yang J., Chen D.C. et al.* An optimized mini-preparation method to obtain high-quality genomic DNA from mature leaves of sunflower // Genet. Mol. Res. 2007. V. 6. № 4. P. 1064–1071. https://doi.org/gmr341
28. *Chung C.T., Niemela S.L., Miller R.H.* One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. № 7. P. 2172–2175. https://doi.org/10.1073/pnas.86.7.2172
29. *Алпатьева Н.В., Антонова О.Ю., Радченко Е.Е. и др.* ПЦР-диагностика вредных организмов гуара: методические указания / Под ред. Потокиной Е.К. СПб.: ВИР, 2019. https://doi.org/10.30901/978-5-907145-44-3
30. *Воронова О.Н., Гаврилова В.А.* Количественный и качественный анализ пыльцы подсолнечника (*Helianthus* L.) и его использование в селекционной работе // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2019. Т. 180. № 1. С. 95–104. https://doi.org/10.30901/2227-8834-2019-1-95-104
31. *Radwan O., Bouzidi M.F., Vear F. et al.* Identification of non-TIR-NBSLRR markers linked to the *Pl5/Pl8* locus for resistance to downy mildew in sunflower // Theor. Appl. Genet. 2003. V. 106. P. 1438–1444. https://doi.org/10.1007/s00122-003-1196-1
32. *Horn R., Kusterer B., Lazarescu E. et al.* Molecular mapping of the *Rf1* gene restoring fertility in PET1-based F1 hybrids in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // Theor. Appl. Genet. 2003. V. 106. P. 599–606. https://doi.org/10.1007/s00122-002-1078-y
33. *Renaut S., Grassa C.J., Yeaman S. et al.* Genomic islands of divergence are not affected by geography of speciation in sunflowers // Nat. Commun. 2013. V. 4. Article 1827. https://doi.org/10.1038/ncomms2833
34. *Swiadek M., Proost S., Sieh D. et al.* Novel allelic variants in ACD6 cause hybrid necrosis in local collection of *Arabidopsis thaliana* // New Phytologist. 2017. V. 213. P. 900–915. https://doi.org/10.1111/nph.14155
35. *Deng J., Fang L., Zhu X. et al.* A CC-NBS-LRR gene induces hybrid lethality in cotton // J. Exp. Bot. 2019. V. 70. № 19. P. 5145–5156. https://doi.org/10.1093/jxb/erz312525

36. *Li X., Sun M., Liu S. et al.* Functions of PPR proteins in plant growth and development // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. Article 11274. https://doi.org/10.3390/ijms222011274
37. *Kelly J.K., Rasch A., Kalisz S.* A method to estimate pollen viability from pollen size variation // Amer. J. Bot. 2002. V. 89. № 6. P. 1021–1023. https://doi.org/10.3732/ajb.89.6.1021
38. *Zanetti J.M., Greizerstein E., Camadro E. et al.* Genomic relationship between hexaploidy *Helianthus resinosus* and diploid *Helianthus annuus* (Asteraceae) // Plant Syst. Evol. 2014. V. 300. P. 1071–1078. https://doi.org/10.1007/s00606-013-0945-0
39. *Karabitsina Yu.I., Gavrilova V.A., Alpatieva N.V. et al.* Peculiarities of inheritance of pollen fertility restoration trait in sunflower with cytoplasmic male sterility // Rus. J. Genet. 2019. V. 55. № 11. P. 1375–1382. https://doi.org/10.1134/S0016675819110079
40. *Sun Y., Godwin I.D., Arief V.N. et al.* Factors controlling self-fertility in sunflower: the role of GCA/SCA effects, S alleles, and floret characteristics // Crop Sci. 2012. V. 52. P. 128–135. https://doi.org/10.2135/cropsci2011.04.0188
41. *Бочковой А.Д., Камардин В.А., Назаров Д.А.* О перспективах отбора самофертильных биотипов в первичных звеньях семеноводства подсолнечника // Масличные культуры. Научно-техн. бюл. Всерос. научно-исслед. института масличных культур. 2020. Вып. 1 (181). С. 3–11. https://doi.org/10.25230/2412-608X-2020-1-181-3-11
42. *Демурин Я.Н., Рубанова О.А.* Завязываемость семян у гибридов подсолнечника в конкурсном сортоиспытании // Тр. Кубанского гос. аграрного университета. Краснодар, 2019. № 5(80). С. 109–113. https://doi.org/10.21515/1999-1703-80-109-113

A Recombination Suppressed Region of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Linkage Group 13 Covers Restoration of Fertility (*Rf1*) and Downy Mildew Resistance (*Pl*) Gene Clusters

I. N. Anisimova[a], *, N. V. Alpatieva[a], O. N. Voronova[b], V. A. Gavrilova[a], Yu. I. Karabitsina[a], E. B. Kuznetsova[a], and E. E. Radchenko[a]

[a] *Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, 190000 Russia*
[b] *Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 197022 Russia*
**e-mail: irina_anisimova@inbox.ru*

A number of genes that control valuable for breeding traits introgressed from wild relatives, i.e. pollen fertility restoration, resistance to fungal diseases (downy mildew and rust), are mapped on linkage group 13 of the cultivated sunflower *Helianthus annuus* L. genome. In sunflower and other plants, the recombination in the chromosome regions containing resistance genes can be suppressed that is favourable for marker assisted selection with applying molecular markers linked to these loci. The joint inheritance of the loci *Rf1* (the phenotypic marker is fertility restoration trait) and Pl_5/Pl_8 conferring resistance to many races of *Plasmopara halstedii* (Farl) Berl. & De Toni (the STS marker Ha-P1) was studied in the F_2 generation of hybrids between a sterile line VIR 116A lines and pollen fertility restorers from sunflower VIR collection. In the crossing VIR 116A × VIR 740, the frequency of recombination between the loci Pl_5Pl_8 and *Rf1* constituted 8.61 whereas in the crosses VIR 116A × VIR 195 and VIR 116A × VIR 80 turned out to be twice as high. In all examined F_2 populations the absence of phenotypic class of sterile plants possessing paternal Ha-P1 marker variant was mentioned. It has been shown by the cytological analysis that pollen fertility indices are most probably determined by the plant genotype rather than the male gametophyte allelic constitution. A deficiency of a recombinant F_2 class was proposed to be associated with embryonic lethality, i.e. the collapse of zygotes carrying the recessive allele of fertility restoration gene and a specific allele of the resistance (susceptibility) gene obtained from the male parent.

Keywords: hybrids, inheritance, loci, alleles, molecular markers, phenotypic classes, pollen fertility, zygotic lethality.

ГЕНЕТИКА, 2023, том 59, № 5, с. 544–561

ГЕНЕТИКА ЖИВОТНЫХ

УДК 599.742.1:631.524.5

ПРЕДПОЛАГАЕМЫЙ ЛОКУС, ВОВЛЕЧЕННЫЙ В ИЗМЕНЧИВОСТЬ РАЗМЕРОВ ЧЕРЕПА ЛИСИЦ (*Vulpes vulpes*)

© 2023 г. А. В. Харламова[1, *], С. Г. Шихевич[1], А. В. Владимирова[1], А. В. Кукекова[2], В. М. Ефимов[1, 3, 4]

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

[2]*Университет штата Иллинойс в Урбана-Шампейн, Иллинойс, 61801 США*

[3]*Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия*

[4]*Томский государственный университет, Томск, 634050 Россия*

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

Поступила в редакцию 21.11.2022 г.
После доработки 24.11.2022 г.
Принята к публикации 29.11.2022 г.

Представлены результаты анализа промеров черепа лисиц (*Vulpes vulpes*) из популяций, прошедших длительный отбор на дружелюбное (ручное, или доместикационное) и агрессивное поведение по отношению к человеку, а также не подвергавшихся направленному отбору по свойствам поведения. Краниометрические показатели сняты с двух выборок лисиц: 1) со 140 лисиц, потомков возвратного скрещивания гибридов первого поколения между представителями дружелюбной и агрессивной линий (F1), с представителями дружелюбной линии, 2) с объединенной выборки из 50 дружелюбных, 50 агрессивных и 50 неселекционированных по поведению (контрольных) особей. Потомки возвратного скрещивания ранее были генотипированы по 350 микросателлитным маркерам. Эти микросателлиты были использованы в настоящей работе для проведения совместного статистического анализа методом 2B-PLS генетических и краниометрических данных лисиц из первой выборки. Выявлен регион на 10-й хромосоме лисицы, маркированный тремя микросателлитами (FH2535, RVC1, REN193M22), контролирующий изменчивость размеров черепа. Вторая выборка была генотипирована только по трем маркерам, которые показали ассоциацию с размерами черепа у потомков возвратного скрещивания. Аналогичный анализ методом 2B-PLS этой выборки подтвердил участие региона на 10-й хромосоме лисицы в контроле размеров черепа, причем эта связь оказалась более выраженной у самцов, чем у самок. В идентифицированном геномном участке расположен ген *IGF1*, который обусловливает 15% изменчивости размеров тела у собак. Полученные в настоящей работе результаты дают основание предполагать участие гена *IGF1* в контроле размеров черепа лисиц.

Ключевые слова: лисица, отбор по поведению, размеры черепа, локусы количественных признаков.

DOI: 10.31857/S0016675823050089, **EDN:** FNUESY

Процесс доместикации характеризуется комплексными генетическими преобразованиями животных [1–3]. Одомашненные животные, как правило, отличаются от диких видов-предшественников пониженной агрессивностью по отношению к человеку и устойчивостью к стрессирующим факторам [4]. Хотя изменения в поведении являются ключевыми характеристиками доместикации, одомашненные животные также отличаются от диких предков и по другим признакам, в частности морфологическим параметрам [5]. Видом с наиболее ярким морфологическим разнообразием является домашняя собака (*Canis familiaris*). Доместикация собаки от волка началась не менее 15 тыс. лет назад [6–9]. Первые признаки использования собак, в соответствии с их морфологическими характеристиками, были обнаружены при анализе черепов собак, живших около 9 тыс. лет назад [10]. В популяции собак на о-ве Жохов прослеживается четкое разделение между особями среднего размера, которых использовали как ездовых собак, и крупными собаками, которых использовали для охоты. Хотя основные морфологические типы уже обнаруживаются у собак, живших несколько тысяч лет назад [11–16], наиболее интенсивная селекция собак по морфологическим признакам началась с образованием пород. Регистрация стандартов пород собак в XIX в. и последующее их разведение как изолированных генетических линий способствовали увеличению

морфологических различий. Например, чихуахуа и дог различаются по весу более чем в 20 раз. Породное разведение также привело к значительным различиям в пропорциях черепа: брахицефальные породы собак характеризуются большой черепной коробкой и короткой мордой, а долихоцефальные породы – узким и удлиненным черепом. В настоящее время зарегистрировано около 400 пород собак, стандарт каждой из которых описывает породные характеристики поведения и морфологии.

Многообразие пород создало беспрецедентную возможность для изучения генетики морфологических признаков собак [17, 18]. В отличие от генетики человека, где такие количественные признаки, как рост, регулируются малыми вкладами большого числа генов [19], исследования морфологических признаков собак и сельскохозяйственных животных показывают, что количественные признаки у одомашненных животных могут контролироваться небольшим числом генов, имеющих значительный эффект [20–23]. Так, у собак около 65% вариации в размере тела контролируются шестью генами: *GHR*, *HMGA2*, *IGF1*, *IGF1R*, *SMAD2* и *STC2* [24]. Генетический анализ размеров и формы черепа собак также обнаружил небольшое число локусов, вносящих значительный вклад в формирование межпородных различий [25–28]. Относительно простая генетическая архитектура морфологических признаков собак объясняется историей породного разведения. Хотя исследования на исторически одомашненных видах внесли фундаментальный вклад в изучение генетического регулирования признаков поведения и морфологии [29, 30], длительный искусственный отбор, который прошли все современные домашние животные, создает трудности в поиске генов, вклад которых был важен на ранних этапах одомашнивания. Гены, влияющие на генетическое преобразование животных на начальных этапах одомашнивания, можно попытаться найти в анализе экспериментально одомашненных животных.

Эксперимент по одомашниванию лисицы, проводимый более 60 лет в новосибирском Институте цитологии и генетики (ИЦиГ СО РАН), привел к созданию популяции ручных лисиц, напоминающих по поведению домашнюю собаку [3]. В отличие от исторически одомашненных животных, история которых включает в себя селекцию по самым разнообразным признакам, экспериментальная доместикация лисиц велась путем интенсивного отбора по единственному признаку – на дружелюбное отношение к человеку. Кроме того, в ИЦиГ СО РАН более сорока лет ведется отбор совхозных лисиц на агрессивное поведение по отношению к человеку [3, 31]. Агрессивная популяция характеризуется более негативным отношением к человеку, чем совхозные лисицы, разводимые в клеточных условиях, но не подвергающиеся прямому отбору по поведению. Экспериментальная популяция дружелюбных лисиц может быть использована как аналог ранних этапов одомашнивания при сравнении ее с совхозными лисицами. Как и исторически одомашненные виды, лисицы ИЦиГ СО РАН демонстрируют многие признаки, связанные с изменением поведения [3, 31]. Интересным представляется исследование связи отбора с изменением пропорций черепа, поскольку показано, что краниальные признаки в процессе доместикации млекопитающих претерпевают значительные изменения [32, 33]. Ранее у дружелюбных лисиц были показаны изменения пропорций черепа [34, 35], а также увеличение объема серого вещества по сравнению с совхозными неселекционируемыми по поведению лисицами [36].

В настоящей работе мы провели генетический анализ краниометрических данных дружелюбных, агрессивных и неселекционированных по поведению (контрольных) лисиц. Первый этап анализа был проведен с использованием беккроссов, являющихся потомками возвратного скрещивания гибридов первого поколения между представителями дружелюбной и агрессивной линий (F1), с представителями дружелюбной линии. Поскольку ранее эти животные были генотипированы по 350 микросателлитным маркерам равномерно распределенными по геному лисицы, а также протестированы по их реакции на человека [37], мы поставили задачу провести поиск участков генома лисицы, вовлеченных в вариацию краниологических признаков, и попытаться выявить локусы, общие для вариации этих признаков и поведения. В результате генетического анализа были обнаружены участки в геноме лисицы, показавшие связь с краниометрическими признаками независимо от поведения. Один из обнаруженных локусов содержит ген *IGF1*, который отвечает за ~15% вариации в размере собак [26]. Анализ данного локуса в независимых выборках из ручной, агрессивной и совхозной популяций подтвердил связь выявленного участка генома с краниометрическими признаками лисиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные животные

В исследовании использованы лисицы из экспериментальных популяций новосибирского ИЦиГ СО РАН, прошедшие многолетний отбор по свойствам поведения – на доместикационное (доместицируемые, или ручные лисицы) и агрессивное поведение по отношению к человеку, а также лисицы ИЦиГ СО РАН, не подвергающиеся специальному отбору по свойствам поведения. На первом этапе в анализ были включены 140 потомков

возвратного скрещивания гибридов первого поколения (F1) между доместицируемыми и агрессивными особями с представителями исходной популяции доместицируемых лисиц. Возраст животных на момент исследования составлял 12 мес.

На втором этапе использована вторая выборка – из ручных, агрессивных и не подвергавшихся отбору лисиц ИЦиГ СО РАН (по 50 животных из каждой популяции, в равном количестве самцов и самок, всего 150 животных). На данном этапе исследования животные из трех указанных популяций были объединены вместе. В анализ включали объединенную группу, состоящую из ручных, агрессивных и неселекционируемых по поведению лисиц. Возраст животных на момент исследования – 8 мес. В этом возрасте молодые лисицы близки по размеру и пропорциям тела к взрослым особям.

Правила работы с животными в ИЦиГ СО РАН соответствуют международным нормам охраны животных, используемых в научных целях (Директива 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза). Условия содержания и ухода идентичны для всех лисиц, содержащихся на экспериментальной ферме ИЦиГ СО РАН.

Фенотипирование по краниометрическим признакам

Измерение краниальных признаков лисиц-потомков возвратного скрещивания (n = 140) проводили на цифровых рентгенограммах с использованием программы Looker (разработчик – Институт прикладной физики СО РАН, Новосибирск). Для этого животных рентгеноскопировали в трех проекциях (фронтальной, левой и правой) в возрасте одного года. Каждое животное было охарактеризовано по 21 метрическому признаку (список промеров приведен в табл. 1). Схема измерений была опубликована ранее [38]. Для минимизации возможных ошибок все измерения были проведены дважды одним исследователем. Для каждого из промеров были вычислены среднегрупповые значения и среднеквадратическое отклонение (сигма). После этого искали значения, уклоняющиеся от среднегруппового за пределы трех сигм. Такие измерения считались выполненными некорректно, или “выбросами”, и были исключены. Такие промеры были повторены третий раз. В анализ всегда включали среднее значение из двух корректных измерений.

Краниометрические признаки животных из второй выборки (исходных родительских популяций ручных, агрессивных и неселекционированных лисиц) были измерены на очищенных черепах, полученных путем вываривания после планового забоя. Измерения сделаны с использованием электронного цифрового штангенциркуля (цена деления 0.01 мм). Каждое животное охарактеризовано 23 краниометрическими признаками. Один и тот же исследователь проводил измерения дважды. Как и в первой выборке, значения, уклоняющиеся от среднегруппового за пределы трех сигм, считались некорректными, исключались и измерялись заново, как описано выше для беккроссов. В анализ всегда включали среднее значение из двух корректных измерений. Перечень промеров и схема измерения из второй выборки приведены на рис. 1. Средние значения промеров для самцов и самок приведены в табл. 2.

Анализ исходных признаков второй выборки проводили методом главных компонент [39] в пакете Statistica10. По значению первой из главных компонент (определяющей общий размер) были выделены особи, характеризующиеся наиболее крупным и наиболее мелким черепом, которые затем анализировались с помощью программы 2B-PLS, как и потомки возвратного скрещивания. Две выборки (потомков возвратного скрещивания и исходных родительских линий) никогда не смешивались и всегда анализировались раздельно. Для того чтобы исключить влияние пола на размерные признаки, исходные данные были выровнены по полу (для этого из исходных значений у самок было вычтено среднее значение по самкам, у самцов – среднее значение по самцам). После этой процедуры проводили анализ главных компонент. Анализ морфологической изменчивости лисиц и собак, проведенный нами ранее, показал высокую степень их гомологии по главным компонентам – интегральным показателям, выявленным для скелетных признаков, а также высокую наследуемость компонент [40, 41].

Генотипирование по микросателлитным маркерам

Потомки от возвратного скрещивания были ранее генотипированы по 350 микросателлитным маркерам (SSR, simple sequence repeat) для поиска локусов, отвечающих за доместикационное и агрессивное поведение, процедура генотипирования и подсчета аллелей для маркеров описана ранее [37]. Список маркеров см. [Supplementary, Table 3, 37].

Выделение ДНК и генотипирование животных из второй выборки (представителей ручных, агрессивных и неселекционированных лисиц) проводили в ходе настоящей работы в ИЦиГ СО РАН. Образцы крови были собраны из *vena safena*. ДНК выделяли из образцов крови методом фенольной экстракции [42]. Животные из второй выборки были генотипированы по трем микросателитным маркерам (RVC1, REN193M22 и FH2535) – тем, которые показали ассоциацию с размером черепа беккроссов.

Таблица 1. Корреляции морфологических признаков с первой парой бикомпонент (генетической и морфологической). 2B-PLS-анализ потомков лисиц от возвратного скрещивания гибридов первого поколения между представителями дружелюбной и агрессивной линий (F1) с представителями дружелюбной линии

Признак	Генетическая ось_01	Морфологическая ось_01	Генетическая ось_02	Морфологическая ось_02
Длина черепа (фронт.)	0.663	0.927	–0.149	–0.236
Длина черепа (лев.)	0.591	0.910	–0.156	–0.252
Длина черепа (прав.)	0.655	0.909	–0.168	–0.275
Скуловая ширина	0.685	0.879	0.063	0.097
Ширина атланта	0.619	0.865	–0.016	–0.125
Длина нижней челюсти (прав.)	0.560	0.847	–0.192	–0.311
Ширина моляр	0.560	0.813	–0.025	0.004
Ширина нижней челюсти (лев.)	0.613	0.805	0.087	0.059
Длина носовой кости	0.480	0.790	–0.275	–0.391
Ширина сосцевидного отростка	0.559	0.775	0.158	0.131
Ширина мозговой капсулы	0.521	0.675	0.033	0.129
Длина шеи	0.460	0.640	0.068	0.012
Высота носовой кости (прав.)	0.402	0.549	0.06	0.095
Высота мозговой капсулы	0.330	0.465	0.454	0.629
Высота носовой кости (лев.)	0.319	0.464	0.024	0.072
Ширина между клыками	0.215	0.402	0.112	0.168
Длина нижней челюсти (лев.)	0.236	0.321	–0.204	–0.331
Высота нижней челюсти (прав.)	0.232	0.300	0.331	0.379
Высота мозговой капсулы без слуховых барабанов	0.151	0.219	0.415	0.59
Ширина плеч	0.138	0.184	0.311	0.356
Высота нижней челюсти (лев.)	–0.015	0.005	0.188	0.362

Генотипы ручных, агрессивных и неселекционированных лисиц по микросателлитам RVC1, REN193M22 и FH2535 определяли с помощью ПЦР. Праймеры и условия амплификации описаны ранее [43, 44]. Прямой праймер каждого маркера был помечен флуоресцентным красителем FAM. Последующий фрагментный анализ проводили в ЦКП “Геномика” ИЦиГ СО РАН на приборе Applied Biosystems 3130xl в присутствии GeneScan-500 LIZ Size Standard. Для анализа результатов использовали программное обеспечение “Peak Scanner” (Appleid Biosystem, США). Результаты ПЦР анализировали индивидуально для каждого маркера, аллели идентифицировали исходя из длины фрагментов микросателлитной последовательности. Информация о генотипах животных из второй выборки по каждому из аллелей микросателлитных маркеров лисицы для включения ее в анализ была записана в следующем виде: название маркера_длина микросателлитной последовательности_количество копий конкретного аллеля у конкретного животного, т.е. “0” – отсутствие данного аллеля, “1” – гетерозигота и “2” – гомозигота по данному аллелю.

2B-PLS-анализ

Первая и вторая выборки анализировались раздельно с помощью метода 2B-PLS (two-block partial least-squares analysis) [45] в пакетах программ PAST и Jacobi4 [46]. Данные для анализа каждого животного из первой выборки (поколение беккроссов) включали информацию о генотипах по 350 микросателлитным маркерам, записанную в виде длин двух аллелей (далее они определяются как “генетические” признаки), и 21 промере черепа (далее – “морфологические” признаки). Данные для анализа второй выборки (ручные, агрессивные и неселекционированные лисицы) включали информацию о генотипах по трем маркерам (RVC1, REN193M22 и FH2535), локализованным на 10-й хромосоме, и 23 краниометрическим признакам. Метод 2B-PLS базируется на возможности геометрического представления объектов в виде точек евклидова пространства невысокой размерности для любых типов описаний. Для каждого типа данных строится своя матрица расстояний между объектами. По всем матрицам расстояний между объектами вычисляются представляющие их евклидовы пространства. Систе-

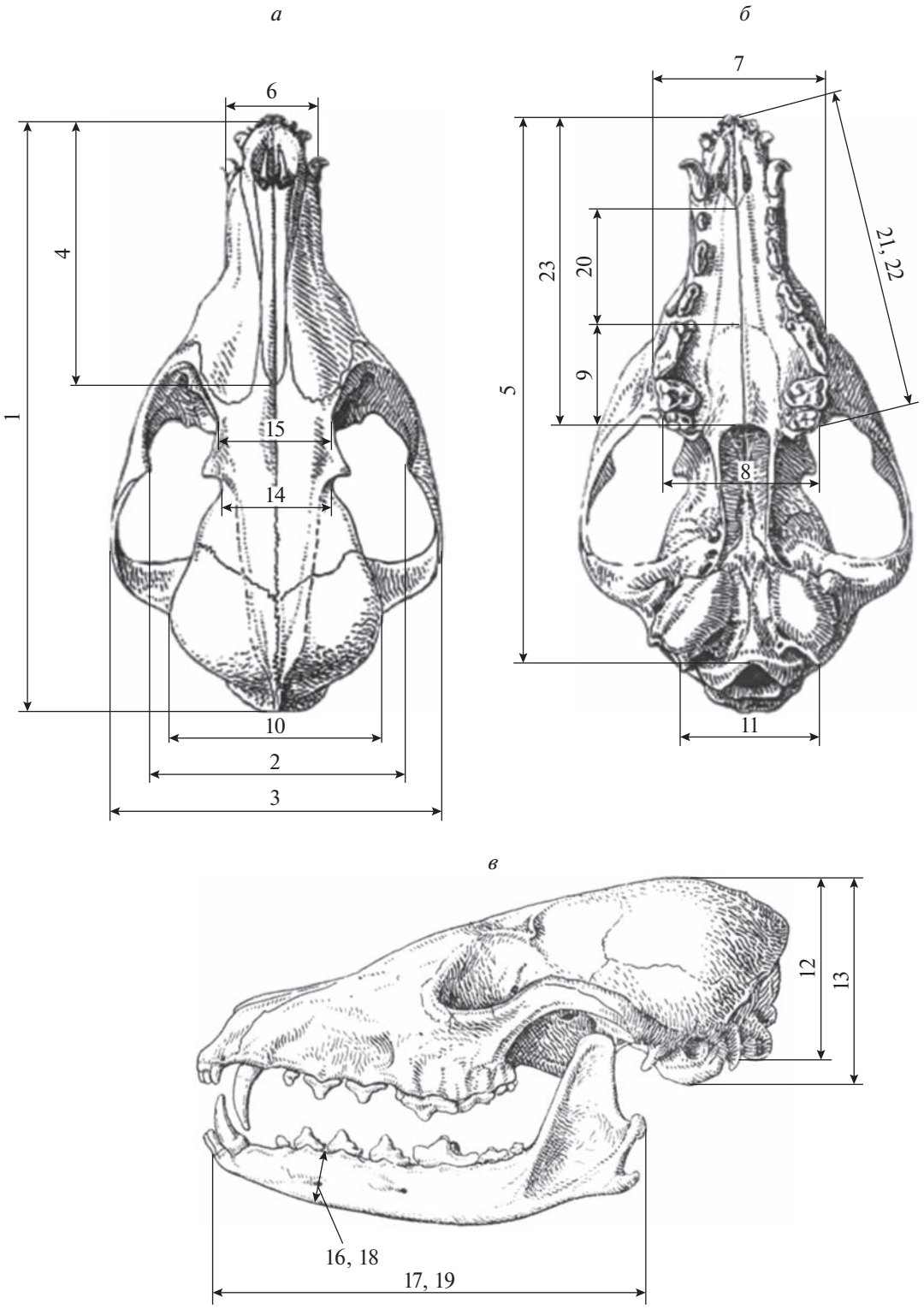


Рис. 1. Схема промеров черепа лисиц из выборки ручных, агрессивных и неселекционированных по поведению. *а* – фронтальная проекция, вид сверху; *б* – фронтальная проекция, вид снизу; *в* – боковая проекция. 1 – общая длина черепа; 2 – ширина на уровне орбит; 3 – скуловая ширина; 4 – длина лицевой части черепа; 5 – базальная длина черепа; 6 – ширина на уровне клыков; 7 – ширина на уровне премоляр; 8 – ширина на уровне моляр; 9 – длина нёбной кости; 10 – ширина мозгового черепа; 11 – ширина на уровне сосцевидного отростка (мастоида); 12 – высота мозговой капсулы без слуховых барабанов; 13 – максимальная высота мозговой капсулы; 14 – заглазничная ширина; 15 – межглазничная ширина; 16 – высота нижней челюсти (лев.); 17 – длина нижней челюсти (лев.); 18 – высота нижней челюсти (прав.); 19 – длина нижней челюсти (прав.); 20 – нёбный отросток преднёбной верхней челюсти; 21 – длина верхнего зубного ряда (прав.); 22 – длина верхнего зубного ряда (лев.); 23 – длина твердого нёба.

Таблица 2. Средние значения (мм) промеров ручных, агрессивных и неселекционируемых по поведению самцов и самок лисиц

Номер промера	Ручные самцы ($n = 25$)	Ручные самки ($n = 23$)	Агрессивные самцы ($n = 25$)	Агрессивные самки ($n = 25$)	Контрольные самцы ($n = 25$)	Контрольные самки ($n = 26$)
1	148.0 ± 0.88	139.7 ± 0.44	147.4 ± 0.62	140.6 ± 0.57	146.2 ± 0.68	141.1 ± 0.80
2	63.9 ± 0.54	61.0 ± 0.30	64.7 ± 0.33	62.5 ± 0.31	63.4 ± 0.38	62.1 ± 0.54
3	75.0 ± 0.40	71.1 ± 0.30	76.0 ± 0.34	72.5 ± 0.30	73.4 ± 0.35	72.3 ± 0.45
4	55.2 ± 0.62	51.8 ± 0.35	54.7 ± 0.35	51.7 ± 0.46	55.4 ± 0.49	52.3 ± 0.39
5	134.9 ± 0.74	127.5 ± 0.44	133.3 ± 0.61	127.7 ± 0.64	132.4 ± 0.69	128.4 ± 0.68
6	24.3 ± 0.18	22.6 ± 0.16	25.1 ± 0.39	23.7 ± 0.19	24.8 ± 0.22	23.6 ± 0.22
7	41.6 ± 0.24	39.5 ± 0.22	41.5 ± 0.23	40.1 ± 0.21	41.1 ± 0.25	40.2 ± 0.26
8	37.4 ± 0.22	35.6 ± 0.20	37.6 ± 0.18	36.3 ± 0.20	37.2 ± 0.28	36.3 ± 0.25
9	21.7 ± 0.24	20.7 ± 0.19	21.5 ± 0.26	20.8 ± 0.26	20.9 ± 0.23	20.7 ± 0.19
10	48.3 ± 0.18	47.0 ± 0.23	48.3 ± 0.21	47.2 ± 0.26	48.1 ± 0.26	47.6 ± 0.26
11	35.9 ± 0.20	34.4 ± 0.19	35.5 ± 0.15	34.3 ± 0.19	35.3 ± 0.15	34.4 ± 0.1
12	41.8 ± 0.18	40.5 ± 0.15	41.5 ± 0.15	40.7 ± 0.23	41.9 ± 0.23	41.1 ± 0.24
13	49.6 ± 0.24	48.2 ± 0.15	49.4 ± 0.18	48.5 ± 0.27	50.1 ± 0.22	49.2 ± 0.30
14	24.6 ± 0.17	24.9 ± 0.30	25.1 ± 0.21	25.2 ± 0.25	24.5 ± 0.26	24.3 ± 0.31
15	26.4 ± 0.23	24.8 ± 0.21	28.1 ± 0.20	27.0 ± 0.19	26.9 ± 0.24	25.9 ± 0.21
16	10.3 ± 0.11	9.4 ± 0.11	10.0 ± 0.09	9.6 ± 0.09	10.4 ± 0.10	9.9 ± 0.11
17	109.4 ± 0.49	102.3 ± 0.38	108.3 ± 0.45	103.5 ± 0.41	107.6 ± 0.56	102.9 ± 0.56
18	10.5 ± 0.10	9.6 ± 0.10	10.2 ± 0.09	9.9 ± 0.10	10.6 ± 0.10	10.1 ± 0.14
19	109.1 ± 0.47	101.8 ± 0.42	108.4 ± 0.47	103.3 ± 0.40	107.3 ± 0.57	102.5 ± 0.54
20	33.5 ± 0.37	31.9 ± 0.32	32.5 ± 0.33	31.4 ± 0.28	32.6 ± 0.34	31.4 ± 0.37
21	77.9 ± 0.47	74.0 ± 0.34	77.3 ± 0.39	74.0 ± 0.44	77.4 ± 0.47	74.7 ± 0.47
22	77.9 ± 0.48	74.0 ± 0.32	77.2 ± 0.39	73.9 ± 0.44	77.2 ± 0.45	74.9 ± 0.48
23	77.0 ± 0.54	73.2 ± 0.35	75.9 ± 0.41	72.8 ± 0.44	75.1 ± 0.46	72.6 ± 0.50

Примечание. Обозначения и схема промеров приведены на рис. 1. Значения приведены в формате M ± SEM.

мы координат в этих пространствах вращаются до получения максимального соответствия между конфигурациями объектов. Далее конфигурации объектов исследуются средствами многомерного анализа. В методе 2B-PLS вычисляются линейные комбинации (латентные векторы, или компоненты) между переменными двух блоков, которые максимально учитывают ковариацию между двумя исходными наборами данных, хотя существуют расширения PLS для моделирования отношений между большим количеством наборов [45, 47, 48]. Метод 2B-PLS успешно используется в мировой практике для анализа сложных количественных признаков [49–56], в том числе при анализе соответствия морфологических и молекулярно-генетических данных [29, 57–63]. В обоих рассматриваемых нами случаях для морфологических и генетических признаков лисиц были вычислены конгруэнтные друг другу компоненты краниометрической и генетической изменчивости (бикомпоненты – "морфологические" и "генетические"). Набор корреляций исходных морфологических признаков с "морфологическими" компонентами позволяет дать им фенотипическую интерпретацию. Корреляции микросателлитных маркеров с генетическими компонентами могут дать информацию о локализации в геноме лисицы участков, вовлеченных в контроль изучаемых признаков [57, 58].

Пороговые значения уровня значимости для корреляции фенотипических и генетических признаков с бикомпонентами были рассчитаны с использованием критерия false discovery rate (FDR) [64]. Модуль порогового значения корреляции признаков с генетической и морфологической компонентами для уровня статистической значимости $P < 0.01$ составил 0.348, для уровня $P < 0.05$–0.280.

Для обработки данных использовались пакеты программ PAST (Paleontological statistics software package) [65], а также Jacobi4, разрабатываемый в ИЦиГ СО РАН [46]. Jacobi4 специально разработан для анализа и комбинирования данных раз-

Таблица 3. Доля ковариации генетической и морфологической изменчивости, описываемой бикомпонентами, рассчитанная для потомков лисиц от возвратного скрещивания (беккроссов) на ручного родителя

Бикомпоненты (пары осей)	Собственное значение	Процент общей ковариации	Кумулятивный % общей ковариации
Оси_01	0.646	66.431	66.431
Оси_02	0.068	7.034	73.465
Оси_03	0.044	4.569	78.034
Оси_04	0.038	3.953	81.988
Оси_05	0.032	3.249	85.237
Оси_06	0.027	2.745	87.981
Оси_07	0.022	2.283	90.265
Оси_08	0.016	1.685	91.950
Оси_09	0.014	1.458	93.408
Оси_10	0.012	1.253	94.662
Оси_11	0.011	1.145	95.807
Оси_12	0.009	0.894	96.701
Оси_13	0.008	0.801	97.501
Оси_14	0.006	0.662	98.163
Оси_15	0.006	0.572	98.734
Оси_16	0.004	0.438	99.172
Оси_17	0.003	0.330	99.502
Оси_18	0.002	0.188	99.690
Оси_19	0.001	0.148	99.838
Оси_20	0.001	0.117	99.956
Оси_21	0.000	0.044	100.000

личных типов, в том числе количественных и качественных признаков.

РЕЗУЛЬТАТЫ

2B-PLS анализ первой выборки (поколение бекроссов)

На основе данных о морфологии (краниометрических промерах) и генотипах (данные по 350 микросателлитным маркерам для каждой особи) лисиц поколения беккроссов были вычислены пары бикомпонент с помощью метода 2B-PLS. Первая из них описывает максимальную долю общей ковариации морфологических и генетических признаков (в данном анализе – 66%) (табл. 3). Биологическая интерпретация компонент определяется величиной и знаком корреляции исходных признаков с каждой из компонент. По значениям корреляции краниометрических признаков с первой “морфологической” компонентой (табл. 1) ее следует интерпретировать как размерную, так как все признаки показывают с ней высокую положительную корреляцию. Следовательно, более крупные особи будут иметь большие значения первой компоненты. Последующие компоненты вносят меньший вклад в изменчивость изучаемых признаков (табл. 3). Они имеют различный знак и разный уровень корреляции с признаками, по которым эти компоненты могут быть интерпретированы как определяющие пропорции краниальных признаков. Для примера в табл. 1 представлены корреляции признаков со второй парой генетической и морфологической бикомпонент. В настоящей работе мы рассматриваем первую пару бикомпонент. Далее мы будем называть первую морфологическую компоненту “размерной”.

Корреляции же генетического признака с обеими бикомпонентами могут являться показателем участия данного локуса в формировании изучаемых фенотипических признаков. Так, статистически значимая корреляция с первой парой бикомпонент была обнаружена для 55 аллелей 48 микросателлитных маркеров, локализованных почти на каждой из хромосом (за исключением 3-й и 13-й) у лисиц-потомков возвратного скрещивания (Дополнительный материал, табл. 1). Выявленные локусы были сопоставлены нами с известными из литературы данными по генетическому контролю скелетных признаков у собак. Одним из наиболее интересных локусов является участок на 10-й хромосоме лисицы протяженностью менее 10 сМ. Три полиморфных маркера, локализован-

Таблица 4. Корреляции генетических признаков (микросателлитных маркеров) с первой парой бикомпонент (генетической и морфологической осями) на 10-й хромосоме лисицы. 2B-PLS-анализ, беккроссы

Генотип	Генетическая ось_01	Морфологическая ось_01	Частота носителей генотипа, %
Ch10_RVC1_151_0	0.333	0.333	60.0
Ch10_RVC1_151_1	–0.313	–0.321	32.3
Ch10_REN193M22_188_2	0.407	0.310	67.1
Ch10_REN193M22_191_0	0.407	0.310	67.1
Ch10_FH2535_186_0	0.154	0.289	65.0
Ch10_FH2535_186_1	–0.141	–0.282	26.0

Примечание. Генотипы записаны в следующем виде: номер хромосомы_название маркера_длина аллеля_число копий этого аллеля. Например, Ch10_RVC1_151_1 означает: гетерозигота по аллелю длиной 151 пн маркера RVC1 на 10-й хромосоме лисицы.

Таблица 5. Генетические варианты, выявленные у лисиц для каждого из маркеров Ch10_RVC1, Ch10_REN193M22, Ch10_FH2535

Название маркера	Хромосома лисицы	Хромосома собаки	Число аллелей маркера у лисицы	Перечень аллелей (длина в пн)
FH2535	10	15	5	174, 182, 186, 178, 196
RVC1	10	15	4	149, 151, 153, 155
REN193M22	10	15	2	188, 191

ных в данном участке, – RVC1, REN193M22 и FH2535 показали в настоящей работе статистически значимую связь с размерной осью (табл. 4, 5). Выявленный регион синтенен одному из ключевых регионов в геноме собак, вовлеченному в контроль изменчивости размеров тела [17, 26, 66]. Взаимное расположение этих микросателлитов на 10-й хромосоме лисицы, а также соответствующие им синтенные участки 15-й хромосомы собаки показаны на рис. 2. На 15-й хромосоме собаки в районе 43.5 тпн, т.е. в участке между двумя микросателлитами, использованными в настоящей работе (RVC1_151 и REN193M22), локализован ген *IGF-1*, являющийся одним из ключевых в контроле размеров тела собак [21].

Распределение особей по генотипам одного из трех использованных в работе микросателлитов представлено графически на плоскости первых бикомпонент (рис. 3). Как было сказано выше, отрицательные значения оси соответствуют наиболее мелким, положительные – более крупным особям. Ось генотипов показывает количество копий соответствующего аллеля у каждой из особей (0, 1 или 2). Как следует из рис. 3, особи, несущие по крайней мере одну копию аллеля RVC1_151, по размеру черепа мельче особей, не имеющих данного аллеля. Неслучайное распределение особей разного генотипа в пространстве бикомпонент указывает на влияние аллеля RVC1_151 на размер черепа лисиц (значение корреляций микросателлитных маркеров с первой морфологической осью приведены в табл. 4).

Анализ "размерного" локуса на десятой хромосоме лисиц из второй выборки (ручные, агрессивные и неселекционированные лисицы)

На втором этапе был проведен отдельный независимый анализ промеров черепа лисиц из второй выборки (по 25 самцов и 25 самок из ручной, агрессивной и неселекционируемой популяций – всего 150 особей). Эти животные представляют собой репрезентативную выборку из экспериментальных популяций, содержащихся на данном этапе на лисьей ферме ИЦиГ СО РАН. Очищенные черепа были измерены, полученные промеры проанализированы методом главных компонент. Как ранее было показано на собаках, главные компоненты (ГК) представляют собой интегральные признаки, которые могут охарактеризовать особь как по размерам, так и по пропорциям скелетных признаков [17]. Первая из компонент как у собак, так и в нашем исследовании объясняет наибольший процент изменчивости и описывает вариации размеров. Корреляции исходных признаков с ГК1 имеют очень высокие значения (например, с длиной черепа 0.94, со скуловой шириной 0.78). С учетом результатов анализа главных компонент для последующего генотипирования были отобраны 34 особи с мелкими размерами черепов (из области отрицательных значений ГК1), а также с

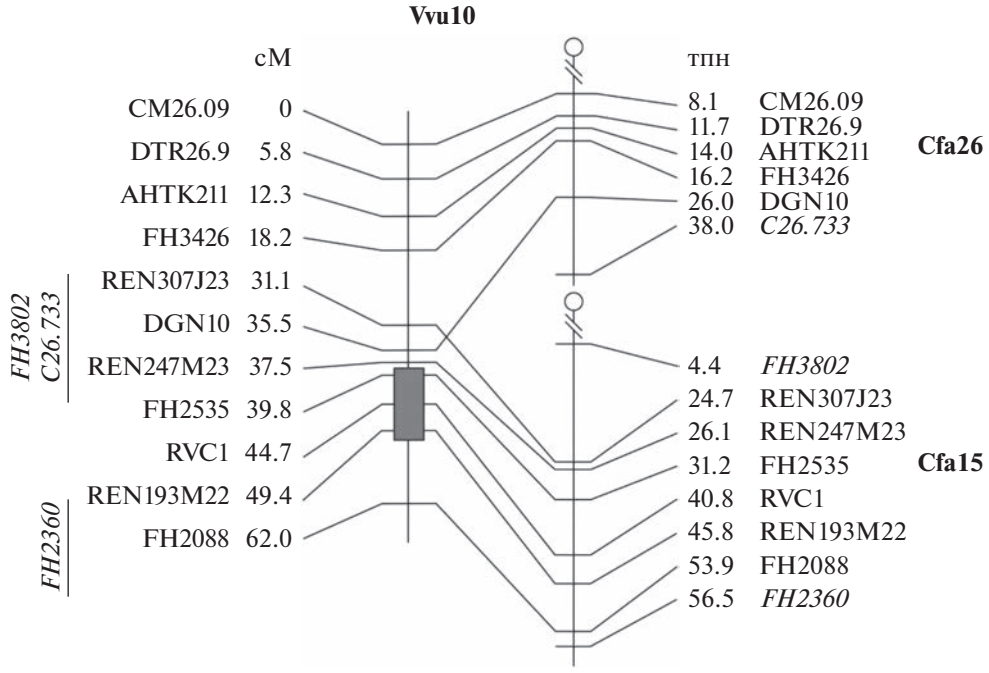


Рис. 2. Сравнительная карта 10-й хромосомы лисицы (Vvu10) с гомологичными участками генома собаки (Cfa15 и Cfa26 – 15-я и 26-я хромосомы собаки) (из: Kukekova et al., 2007, Genome Research [44]).

крупными черепами (из области положительных значений ГК1), наиболее контрастные как по абсолютным размерам черепа, так и по первой главной компоненте.

Генотипы определяли по трем описанным выше микросателлитным маркерам (RVC1, REN193M22 и FH2535) для подтверждения вклада этих маркеров в вариацию размеров черепа лисиц. Перечень контрастных животных, их принадлежность к той или иной популяции, краниометрические данные и генотипы представлены в табл. 6. Информация о генотипе каждого животного, как и ранее для беккроссов, была записана в виде дозы (числа копий 0, 1 или 2) каждого аллеля каждого из трех маркеров и проанализирована в пакете программ PAST для оценки степени их совместного влияния на краниологический фенотип – были вычислены PLS-оси (бикомпоненты) совместной генетической и морфологической изменчивости. В результате была выявлена статистически значимая связь между генетической и морфологической осями (коэффициент корреляции между осями $r = -0.4137$, $P = 0.015$; $n = 34$, самцы и самки вместе, рис. 4).

После этого мы определили генотипы по тем же трем микросателлитам у оставшихся животных из второй выборки, добавили их данные к контрастным по размерам животным и провели аналогичный анализ. Компонентный анализ показал, что на долю первой компоненты (ГК1), описывающей вариацию размеров черепа этой выборки, приходится 49.9% общей изменчивости. Далее значение ГК1 было взято в качестве размерного фенотипа, и в пакете PAST был вычислен коэффициент корреляции ГК1 с генотипом по трем перечисленным выше микросателлитам, локализованным на 10-й хромосоме лисицы, для объединенной выборки измеренных лисиц (также без учета их поведения): $r = 0.240$, $P = 0.007$ ($n = 127$). Анализ, проведенный отдельно для самцов и самок, показал статистически достоверную корреляцию у самцов ($r = 0.282$, $P = 0.026$, $n = 62$; рис. 5). У самок не обнаружено статистически значимой корреляции ($r = 0.202$, $P = 0.106$, $n = 65$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на то что размер тела является одним из классических примеров полигенных признаков, в последние годы у разных видов животных выявляется ключевое влияние отдельных генов на этот признак. В особенности это касается исследований на одомашненных видах, претерпевших сильное давление искусственного отбора по различным признакам, в том числе по размеру тела. Например, показано влияние на размер тела генов из семейства *Insulin growth factor* у собак [21, 66]. Одним из генов-кандидатов у свиней является *IGFBP-6* – ген *insulin-like growth factor binding protein-6* (IGF-связывающий белок) [67]. Описаны четыре ключевых гена, участвующих в регуляции размеров тела лошадей [68]. Влияние гена

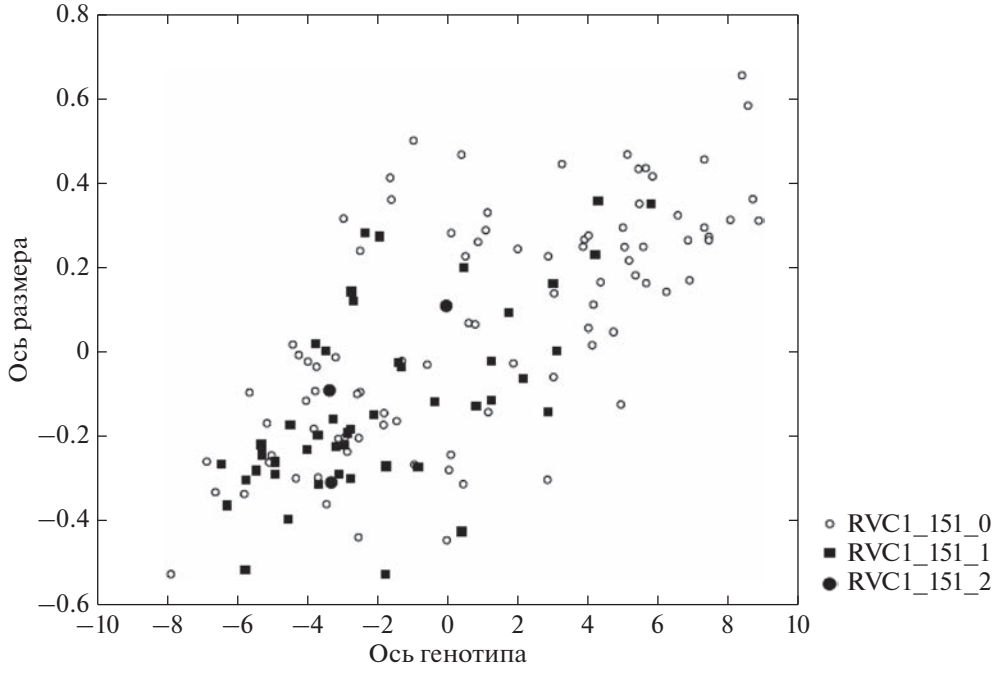


Рис. 3. Распределение генотипов маркера RVC1 на плоскости бикомпонент у потомков возвратного скрещивания. Оси размера и генотипа – первые, т.е. максимальные по вкладу в изменчивость морфологическая ("размерная") и генетическая оси, рассчитанные методом 2B-PLS для оценки ковариации генетических и морфологических признаков лисиц. RVC1_151 – один из аллелей маркера RVC1 длиной 151 пн. Полые кружки RVC1_151_0 – особи, не имеющие данного аллеля; закрашенные кружки RVC1_151_2 – особи, гомозиготные по RVC1_151; закрашенные квадраты RVC1_151_1 – особи, гетерозиготные по данному аллелю.

IGF-1 на размерные признаки показано также для мыши [69, 70] и человека [70].

Анализ промеров черепа потомков возвратного скрещивания методом 2B-PLS

Анализ обнаружил значимую ковариацию морфологических признаков с многочисленными микросателлитами, локализованными на различных хромосомах лисицы (см. Дополнительные материалы, табл. 1). В настоящей работе более детальному анализу был подвергнут один из локусов, маркированный тремя микросателлитами, локализованными на участке протяженностью менее 10 сМ на 10-й хромосоме лисицы. Каждый из этих микросателлитов показал статистически значимую связь с наиболее значимой по вкладу в изменчивость, описывающей вариации размеров компонентой. Этот участок генома лисицы синтенен участку 15-й хромосомы собаки, в котором ранее был обнаружен локус, сцепленный с размером тела у самок португальской водной собаки [71]. В нем локализован ген *IGF1*, обусловливающий 15% вариабельности размеров у собак [26, 66]. Ранее показано, что один из трех наиболее часто встречающихся аллельных вариантов *IGF1* является главным фактором, определяющим мелкий размер у собак [21]. Как было сказано выше, участие гена *IGF1* в контроле размеров тела показано для разных видов млекопитающих [21, 26, 67–71], причем у псовых размер контролируется наличием разных мутаций [72]. В недавней работе у собак и волков выявлена новая однонуклеотидная замена (SNP) в локусе *IGF1*, связанная с крупным размером тела [72]. Авторами собран большой материал в поддержку того, что за крупный размер у собак и волков отвечает аллель *T* этого SNP. Однако у других псовых, в том числе и у лисиц, аллеля *T* обнаружено не было. Как мы показали в настоящей работе, различия по размеру черепа у лисиц также картируются в геномный участок, содержащий ген *IGF1*. Можно предположить, что если у лисиц размер тоже регулируется действием *IGF1*, то за это у них отвечает не та же, что у собак и волков, а другая мутация в этом гене. Это предполагает, что механизм вариации размера у псовых (возможно, и в целом у млекопитающих) довольно консервативен, в него вовлечен *IGF1*, но даже у таких относительно близкородственных видов как лиса и собака мутации, влияющие на размер, могут быть разные. Нельзя исключить, однако, что за различия в размере у лисиц может отвечать и другой ген в этом локусе.

Таблица 6. Генотипы (пн) по трем маркерам и значение “размерной” компоненты (ГК1) для 34 лисиц, наиболее контрастных по размеру черепа

Номер	ГК1	Популяция	Возраст	REN193M22	REN193M22	FH2535	FH2535	RVC1	RVC1
7424-1м	–7.64	А	243	188	188	178	196	149	151
Кафе-1м	–7.32	Р	231	188	191	178	196	153	151
466-1м	–6.59	Н	243	188	188	178	186	155	155
7456-1м	–5.84	А	246	188	191	174	178	153	155
7824-1м	–5.74	А	246	188	188	178	182	153	155
292-1м	–5.50	Н	231	188	191	174	186	153	155
Джей-1м	–4.89	Р	227	191	191	178	178	149	151
254-1м	–4.74	Н	248	188	188	182	186	155	155
232-1м	–4.65	Н	231	188	188	182	186	153	155
Мура-1м	–4.55	Р	235	188	191	182	186	149	151
508-1ж	–3.96	Н	232	188	188	174	186	153	155
7936-1м	–2.72	А	243	188	188	174	178		
256-1ж	–2.45	Н	232	188	188	182	190	153	151
314-1ж	–2.29	Н	239	188	188	174	178	153	155
Аспи-1м	–1.72	Р	204	188	188	182	182	153	151
7972-1ж	–0.84	А	255	188	188	196	186	155	155
7838-1ж	–0.66	А	254	188	188	182	196	153	155
7848-1ж	–0.53	А	247	188	188	178	186	155	151
7768-1ж	–0.24	А	238	188	188	178	196	153	155
618-1м	0.01	Н	235	188	188	174	178	153	155
612-1ж	0.20	Н	259	188	188	182	182	153	151
230-1м	0.34	Н		188	191	182	196	153	155
264-1м	2.45	Н	231	188	188	182	182	153	
Дева-1м	3.10	Р	250	188	188	182	182	153	153
452-1м	3.96	Н	232	188	188	174	182	153	153
612-2ж	4.06	Н	259	188	188	174	182	153	151
602-1ж	4.62	Н	247	188	188	178	182	149	153
Адап-1м	4.65	Р	247	188	191	182	186	151	151
7244-1ж	5.00	А	248	188	188		196	153	155
7528-1ж	5.19	А	252	188	188	196	196	153	155
960-1ж	5.42	Н	248	188	188	178	196		
Экст-1ж	5.55	Р	244	188	188	182	178	153	151
7972-2ж	5.87	А	255	188	188	196	186	155	155
7754-1ж	6.27	А	250	188	188	178	178	153	155

Примечание. Номер – уникальный идентификационный номер (имя) животного (ж – самка, м – самец); А – агрессивные, Р – ручные, Н – неселекционированные по поведению; возраст указан в днях на момент измерения; ГК1 – значение первой главной компоненты, описывающей вариацию размеров черепа.

Анализ “размерного” локуса на десятой хромосоме у потомков ручных, агрессивных и неселекционированных лисиц

Анализ подтвердил показанную на беккроссах связь размерной компоненты с участком на 10-й хромосоме лисицы. Такая связь была значимой для наиболее контрастных по абсолютным размерам тела лисиц ($n = 34$, $P = 0.015$). При анализе же выборки, в которую были включены как селекционированные по поведению, так и контрольные животные, данная связь оказалась более выраженной у самцов лисиц. У самок не обнаружено достоверной корреляции между размерной и генетической осями. Ранее при анализе ручной и

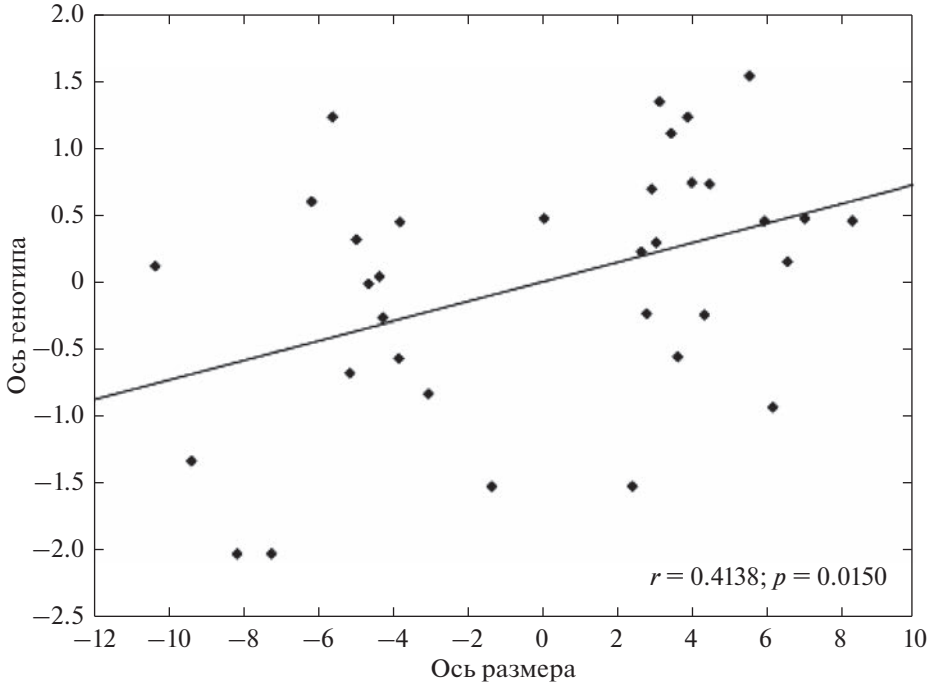


Рис. 4. Распределение в пространстве первой пары (размерной и генетической) осей особей ручных, агрессивных и неселекционированных лисиц. Ось генотипа рассчитана на основе информации по микросателлитным маркерам Ch10_RVC1, Ch10_REN193M22 и Ch10_FH2535 для $n = 34$ контрастных по размеру черепа лисиц (в том числе 18 самцов и 16 самок). Линия показывает регрессию генотипической оси на размерную ось.

агрессивной популяций лисиц влияние отбора по поведению выявлялось для отдельных скелетных признаков [34, 41]. Отбор на ручное поведение изменяет пропорции черепа лисиц в том же направлении, в каком они изменяются у исторически одомашненных видов, и этот эффект был также более выражен у самцов [34, 35]. Мы видим возможное объяснение в том, что искусственный отбор по любым признакам среди самцов является более интенсивным, поскольку в промышленных популяциях лисиц, как и в нашей экспериментальной, соотношение самцов и самок поддерживается на уровне 1 : 3. То есть количество самцов, отбираемых для размножения, как правило в 3 раза меньше количества отбираемых на племя самок. Поэтому можно ожидать, что любые коррелированные изменения в процессе отбора в первую очередь коснутся самцов. На собаках, однако, было показано, что синтенный выявленному нами локус, маркированный микросателлитом FH2295 на 15-й хромосоме португальских водных собак, сцеплен с размерными признаками самок [71].

На современном этапе отбора было выявлено увеличение объема серого вещества мозга у ручных лисиц по сравнению с неселекционируемыми по поведению, причем одни и те же области увеличены в объеме при отборе как на ручное, так и на агрессивное поведение [36]. Этот факт хотя и противоречит общепринятым представлениям об уменьшении объема мозга при доместикации [73], он свидетельствует, что отбор по поведению в противоположных направлениях (на дружелюбие и агрессивность) может аналогичным образом влиять на морфологию мозга и расширяет наши представления о возможных эффектах такого отбора [36]. Кроме того, интересным является то, что аллельный вариант *IGF1*, показывающий связь с мелким размером собак, в то же время демонстрирует связь с признаками поведения [74]. В настоящей работе также показано, что некоторые из микросателлитных маркеров (на 8-й, 12-й, 14-й и 15-й хромосомах лисицы – см. Дополнительные материалы, табл. 1), обнаруживших значимую ассоциацию с размерами черепа лисиц, расположены в геномных районах, отвечающих за различия в поведении между ручными и агрессивными лисицами [3, 75]. Мы предполагаем провести дальнейший детальный анализ этих районов, чтобы оценить их потенциальную связь с морфологией и поведением лисиц.

Выражаем искреннюю благодарность Л.Н. Трут, Ю.Э. Гербеку и Р.Г. Гулевич за участие в обсуждении результатов, ЦКП Геномных исследований ИЦиГ СО РАН и Г.В. Васильеву за проведенный фрагментный анализ ДНК лисиц, а также Marshfield Laboratories Mammalian Genotyping Service и сотруднице Корнелльского университета (Итака, США) Светлане Темных за генотипирование об-

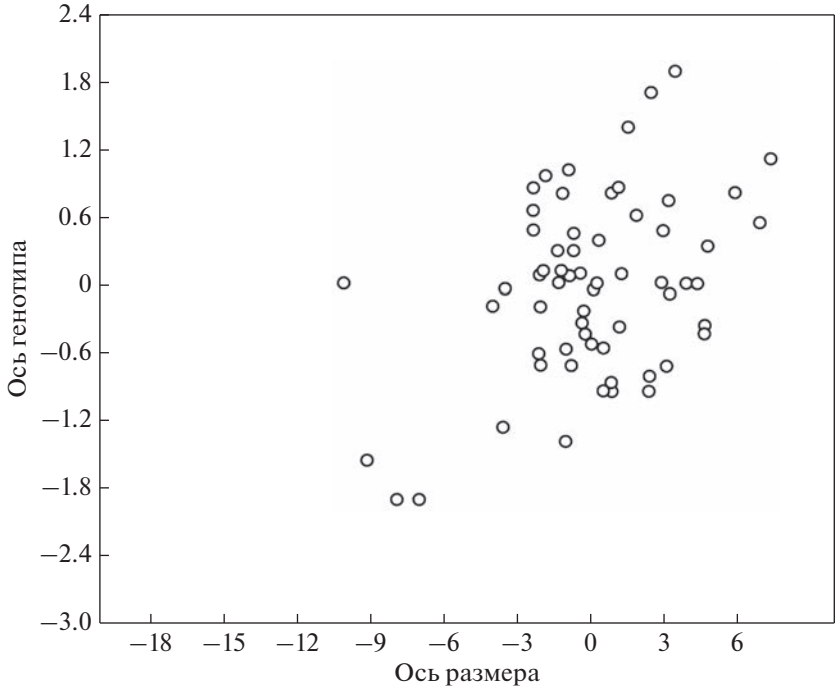


Рис. 5. Распределение в пространстве первой пары (размерной и генетической) осей самцов ручных, агрессивных и неселекционированных лисиц (корреляция размерной оси с осью генотипа: $r = 0.282$, $P = 0.026$; $n = 62$). Ось генотипа рассчитана на основе информации по трем микросателлитным маркерам: Ch10_RVC1, Ch10_REN193M22 и Ch10_FH2535.

разцов лисиц-потомков возвратного скрещивания с помощью набора микросателлитных маркеров собак.

Содержание и разведение экспериментальных животных в ЦКП “Генофонды пушных и сельскохозяйственных животных” ИЦиГ СО РАН поддерживались бюджетным проектом № FWNR-2022-0019. Экспериментальная работа частично поддержана проектом РНФ № 21-44-04405.

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. *Belyaev D.K.* Destabilizing selection as a factor of domestication // J. Hered. 1979. V. 70. P. 301–308.
2. *Coppinger R., Coppinger L.* Dogs: A Startling New Understanding of Canine Origin, Behavior & Evolution. N.Y.: Scribner, 2001. 356 p.
3. *Trut L., Oskina I., Kharlamova A.* Animal evolution during domestication: the domesticated fox as a model // BioEssays. 2009. V. 31. № 3. P. 349–360. https://doi.org/10.1002/bies.200800070
4. *Price E.O.* Animal Domestication and Behavior. Wallingford, United Kingdom: CABI Publ., 2002. 297 p.
5. *Clutton-Brock J.* Origins of the dog: the archaeological evidence // The Domestic Dog: Its Evolution, Behavior and Interactions with People. Second ed. Cambridge: Cambr. Univ. Press, 2017. P. 7–22.
6. *Lindblad-Toh K., Wade C.M., Mikkelsen T.S. et al.* Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog // Nature. 2005 V. 8. № 438(7069). P. 803–819. https://doi.org/10.1038/nature04338
7. *Frantz L.A., Mullin V.E., Pionnier-Capitan M. et al.* Genomic and archaeological evidence suggest a dual origin of domestic dogs // Science. 2016. V. 3. № 352(6290). P. 1228–1231. https://doi.org/10.1126/science.aaf3161
8. *Germonpré M., Lázničková-Galetová M., Sablin M.V., Bocherens H.* Self-domestication or human control? The Upper Palaeolithic domestication of the wolf // Hybrid Communities. London: Routledge, 2018. 324 p.
9. *Bergström A., Frantz L., Schmidt R. et al.* Origins and genetic legacy of prehistoric dogs // Science. 2020. V. 30. № 370(6516). P. 557–564. https://doi.org/10.1126/science.aba9572
10. *Pitulko V.V., Kasparov A.K.* Archaeological dogs from the Early Holocene Zhokhov site in the Eastern Siberian Arctic // J. Archaeol. Sci.: Reports 13. 2017. P. 491–515. https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2017.04.003
11. *Zeuner F.E.* A History of Domesticated Animals. London: Hutchinson & Co. (Publishers) Ltd., 1963. 560 p.
12. *Harcourt R.A.* The dog in prehistoric and early historic Britain // J. Archaeol. Sci. 1974. V. 1. P. 151–175.

13. *Clutton-Brock J.* Domesticated Animals from Early Times. London: British Museum (Natural History) and William Heinemann Ltd., 1981. 208 p.
14. *Clutton-Brock J.* Origins of the dog: domestication and early history // The Domestic Dog: Its Evolution, Behaviour, and Interactions with People. Cambridge: Cambr. Univ. Press, 1995. P. 7–20.
15. *Zedda M., Manca P., Chisu V. et al.* Ancient pompeian dogs – morphological and morphometric evidence for different canine populations // Anat. Histol. Embryol. 2006. V. 35. № 5. P. 319–324. https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.2006.00687.x
16. *Pionnier-Capitan M., Bemilli C., Bodu P. et al.* New evidence for Upper Palaeolithic small domestic dogs in South-Western Europe // J. Archaeol. Sci. 2011. V. 38. № 9. P. 2123–2140. https://doi.org/10.1016/j.jas.2011.02.028
17. *Chase K., Carrier D.R., Adler F.R. et al.* Genetic basis for systems of skeletal quantitative traits: Principal component analysis of the canid skeleton // PNAS 2002. V. 99. № 15. P. 9930–9935. https://doi.org/10.1073/pnas.152333099
18. *Parker H.G., Shearin A.L., Ostrander E.A.* Man's best friend becomes biology's best in show: genome analyses in the domestic dog // Annu. Rev. Genet. 2010. V. 44. P. 309–336. https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102808-115200
19. *Yengo L., Sidorenko J., Kemper K.E. et al.* GIANT Consortium. Meta-analysis of genome-wide association studies for height and body mass index in ~700000 individuals of European ancestry // Hum. Mol. Genet. 2018. V. 27. № 20. P. 3641–3649. https://doi.org/10.1093/hmg/ddy271
20. *Rimbault M., Beale H.C., Schoenebeck J.J. et al.* Derived variants at six genes explain nearly half of size reduction in dog breeds // Genome Research. 2013. № 23. P. 1985–1995. https://doi.org/10.1101/gr.157339.113
21. *Sutter N.B., Bustamante C.B., Chase K. et al.* A single IGF1 allele is a major determinant of small size in dogs // Science. 2007. № 316. P. 112–115. https://doi.org/10.1126/science.1137045
22. *Fang X.B., Liu S.C., Wu Q.Y. et al.* Linkage analysis of SNPs in IGFBP-6 and its relation with the body sizes of pig // Genet. Mol. Res. 2015. V. 14. № 4. P. 17273–17280. https://doi.org/10.4238/2015
23. *Makvandi-Nejad S., Hoffman G.E., Allen J.J. et al.* Four loci explain 83% of size variation in the horse // PLoS One. 2012. V. 7. № 7. P. e39929. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039929
24. *Plassais J., Kim J., Davis B.W. et al.* Whole genome sequencing of canids reveals genomic regions under selection and variants influencing morphology // Nat. Commun. 2019. V. 10. № 1. P. 1489. https://doi.org/10.1038/s41467-019-09373-w
25. *Bannasch D., Young A., Myers J. et al.* Localization of canine brachycephaly using an across breed mapping approach // PLoS One. 2010. V. 5. № 3. P. e9632. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009632
26. *Boyko A.R., Quignon P., Li L., Schoenebeck J.J. et al.* A simple genetic architecture underlies morphological variation in dogs // PLoS Biol. 2010. № 8. P. e1000451. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000451
27. *Schoenebeck J.J., Hutchinson S.A., Byers A. et al.* Variation of BMP3 contributes to dog breed skull diversity // PLoS Genet. 2012. V. 8. № 8. P. e1002849. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002849
28. *Schoenebeck J.J., Ostrander E.A.* Insights into morphology and disease from the dog genome project // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2014. V. 30. P. 535–560. https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-012927
29. *Wilson L.A.B., Balcarcel A., Geiger M. et al.* Modularity patterns in mammalian domestication: Assessing developmental hypotheses for diversification // Evol. Lett. 2021. https://doi.org/10.1002/evl3.231
30. *Wright D., Henriksen R., Johnsson M.* Defining the Domestication Syndrome: Comment on Lord et al. 2020 // Trends Ecol. Evol. 2020. V. 35. № 12. P. 1059–1060. https://doi.org/10.1016/j.tree.2020.08.009
31. *Trut L.N.* Early Canid Domestication: The Farm-Fox Experiment: Foxes bred for tamability in a 40-year experiment exhibit remarkable transformations that suggest an interplay between behavioral genetics and development // Am. Sci. 1999. V. 87. № 2. P. 160–169.
32. *Wayne R.K.* Consequences of domestication: Morphological diversity of the dog // The Genetics of the Dog. N.Y.: CABI Publ., 2001. P. 43–60.
33. *Evin A., Dobney K., Schafberg R. et al.* Phenotype and animal domestication: A study of dental variation between domestic, wild, captive, hybrid and insular *Sus scrofa* // BMC Evol Biol. 2015. V. 15. P. 6. https://doi.org/10.1186/s12862-014-0269-x
34. *Трут Л.Н., Дзержинский Ф.Я., Никольский В.С.* Компонентный анализ краниологических признаков серебристо-черных лисиц (*Vulpes vulpes* Desm) и их изменений, возникающих при доместикации // Генетика. 1991. Т. 27. № 8. С. 1440–1449.
35. *Трут Л.Н., Дзержинский Ф.Я., Никольский В.С.* Внутричерепная аллометрия и краниологические изменения при доместикации серебристо-черных лисиц // Генетика. 1991. Т. 27. № 9. С. 1605–1612.
36. *Hecht E.E., Kukekova A.V., Gutman D.A. et al.* Neuromorphological changes following selection for tameness and aggression in the Russian farm-fox experiment // J. Neurosci. 2021. V. 41. № 28. P. 6144–6156. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3114-20.2021
37. *Kukekova A.V., Trut L.N., Chase K. et al.* Mapping loci for fox domestication: deconstruction/reconstruction of a behavioral phenotype // J. Behav. Genet. 2011. V.41. № 4. P. 593–606. https://doi.org/10.1007/s10519-010-9418-1
38. *Trut L.N., Kharlamova A.V., Kukekova A.V. et al.* Morphology and behavior: Are they coupled at the genome level? // The Dog and Its Genome. Woodbury N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2006. P. 515–538.
39. *Jackson J.E.* A User's Guide to Principal Components. N.Y.: A Wiley Interscience Publ., 1991. 563 p.
40. *Kharlamova A.V., Trut L.N., Carrier D.R. et al.* Genetic regulation of canine skeletal traits: Trade-offs between the hind limbs and forelimbs in the fox and dog // Integr. Comp. Biol. 2007. V. 47. P. 373–381. https://doi.org/10.1093/icb/icm023

41. *Харламова А.В., Чейз К., Ларк К.Г. и др.* Сопоставление вариации параметров скелетной системы лисиц (*Vulpes vulpes*), отбираемых по поведению, и собак (*Canis familiaris*) // Вестник ВОГиС. 2008. Т. 12. № 1/2. С. 32–38.
42. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 545 с.
43. *Kukekova A.V., Trut L.N., Oskina I.N. et al.* A marker set for construction of a genetic map of the silver fox (*Vulpes vulpes*) // J. Hered. 2004. V. 95. № 3. P. 185–194. https://doi.org/10.1093/jhered/esh033
44. *Kukekova A.V., Trut L.N., Oskina I.N. et al.* A meiotic linkage map of the silver fox, aligned and compared to the canine genome // Genome Res. 2007. V. 17. P. 387–399. https://doi.org/10.1101/gr.5893307
45. *Rohlf F.J., Corti M.* Use of two-block partial least squares to study covariation in shape // System. Biology. 2000. V. 49. P. 740–753. https://doi.org/10.1080/106351500750049806
46. *Polunin D., Shtaiger I., Efimov V.* JACOBI4 software for multivariate analysis of biological data // bioRxiv. 2019. P. 803684. https://doi.org/10.1101/803684
47. *Wold H.* Path models with latent variables: The NIPALS approach // Quantitative Sociology: International Perspectives on Mathematical and Statistical Model Building. N.Y.: Acad. Press, 1975. P. 307–357.
48. *Rosipal R., Krämer N.* Overview and recent advances in partial least squares // International Statistical and Optimization Perspectives Workshop “Subspace, Latent Structure and Feature Selection”. Berlin; Heidelberg: Springer, 2005. P. 34–51.
49. *Baab K.L., Freidline S.E., Wang S.L., Hanson T.* Relationship of cranial robusticity to cranial form, geography and climate in *Homo sapiens* // Am. J. Phys. Anthropol. 2010. V. 141. № 1. P. 97–115. https://doi.org/10.1002/ajpa.21120
50. *Goswami A., Polly P.D.* Methods for studying morphological integration, modularity and covariance evolution // Quantitative Methods in Paleobiology. Ithaca; N.Y.: Paleontol. Society Papers Series, 2010. V. 16. P. 213–243. https://doi.org/10.1017/S1089332600001881
51. *Goswami A., Polly P.D.* The influence of modularity on cranial morphological disparity in carnivora and primates (Mammalia) // PLoS One. 2010. V. 5. № 3. P. e9517. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009517
52. *Goswami A., Smaers J.B., Soligo C., Polly P.D.* The macroevolutionary consequences of phenotypic integration: From development to deep time // Phil. Trans. R. Soc. B. 2014. V. 369. № 1649. P. 20130254. https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0254
53. *Álvarez A., Perez S.I., Verzi D.H.* The role of evolutionary integration in the morphological evolution of the skull of caviomorph rodents (Rodentia: Hystricomorpha) // Evol. Biol. 2015. V. 42. № 3. P. 312–327. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2011.02395.x
54. *Goswami A., Watanabe A., Felice R.N. et al.* High-density morphometric analysis of shape and integration: the good, the bad, and the not-really-a-problem // Integr. Comp. Biol. 2019. V. 59. № 3. P. 669–683. https://doi.org/10.1093/icb/icz120
55. *Alhajeri B.H.* Cranial variation in geographically widespread dwarf gerbil *Gerbillus nanus* (Gerbillinae, Rodentia) populations: Isolation by distance versus adaptation to local environments // J. Zool. Systematics and Evol. Res. 2019. V. 57. № 1. P. 191–203. https://doi.org/10.1111/jzs.12247
56. *Brassard C., Merlin M., Guintard C. et al.* Interrelations between the cranium, the mandible and muscle architecture in modern domestic dogs // Evol. Biol. 2020. V. 47. № 4. P. 308–324. https://doi.org/10.1007/s11692-020-09515-9
57. *Ковалева В.Ю., Абрамов С.А., Дупал Т.А., Ефимов В.М.* Анализ соответствия и комбинирование молекулярно-генетических и морфологических данных в зоологической систематике // Изв. РАН. Серия биол. наук. 2012. № 4. С. 404–414.
58. *Ковалева В.Ю., Литвинов Ю.Н., Ефимов В.М.* Землеройки (Soricidae, Eulipotyphla) Сибири и Дальнего Востока: комбинирование и поиск конгруэнтности молекулярно-генетических и морфологических данных // Зоол. журн. 2013. Т. 92. № 11. С. 1383–1398. https://doi.org/10.7868/S0044513413110081
59. *Klingenberg C.P., Spence J.R., Mirth C.K.* Introgressive hybridization between two species of waterstriders (Hemiptera: Gerridae: *Limnoporus*): Geographical structure and temporal change of a hybrid zone // J. Evol. Biol. 2000. V. 13. № 5. P. 756–765.
60. *Myers E.M., Janzen F.J., Adams D.C., Tucker J.K.* Quantitative genetics of plastron shape in slider turtles (*Trachemys scripta*) // Evolution. 2006. V. 60. № 3. P. 563–572. https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2006.tb01137.x
61. *Claverie T., Patek S.N.* Modularity and rates of evolutionary change in a power-amplified prey capture system // Evolution. 2013. V. 67. № 11. P. 3191–3207. https://doi.org/10.1111/evo.12185
62. *Hanot P., Herrel A., Guintard C., Cornette R.* Unravelling the hybrid vigor in domestic equids: the effect of hybridization on bone shape variation and covariation // BMC Evol. Biol. 2019. V. 19. № 1. P. 1–13. https://doi.org/10.1186/s12862-019-1520-2
63. *Hanot P., Bayarsaikhan J., Guintard C. et al.* Cranial shape diversification in horses: Variation and covariation patterns under the impact of artificial selection // BMC Ecol. Evol. 2021. V. 21. № 1. P. 1–19. https://doi.org/10.1186/s12862-021-01907-5
64. *Benjamini Y., Hochberg Y.* Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing // J. Royal Stat. Society. Series B. 1995. № 57. P. 289–300. https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x
65. *Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D.* PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis // Palaeontol. Electronica. 2001. V. 4. № 1. P. 9.
66. *Rimbault M., Beale H.C., Schoenebeck J.J. et al.* Derived variants at six genes explain nearly half of size reduction in dog breeds // Gen. Res. 2013. № 23. P. 1985–1995. 113 https://doi.org/10.1101/gr.15733

67. *Fang X.B., Liu S.C., Wu Q.Y. et al.* Linkage analysis of SNPs in IGFBP-6 and its relation with the body sizes of pig // Genet. Mol. Res. 2015. V. 14. № 4. P. 17273–17280. https://doi.org/10.4238/2015
68. *Makvandi-Nejad S., Hoffman G.E., Allen J.J. et al.* Four loci explain 83% of size variation in the horse // PLoS One. 2012. V. 7. № 7. P. e39929. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039929
69. *Baker J., Liu J.P., Robertson E.J., Efstratiadis A.* Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth // Cell. 1993. V. 75. P. 73–82. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(05)80085-6
70. *Kawai M., Rosen C.J.* Insulin-like growth factor-I and bone: lessons from mice and men // Pediatr. Nephrol. 2009. V. 24. P. 1277–1285. https://doi.org/10.1007/s00467-008-1040-6
71. *Bérubé S.C., Johnsson P.R., Bunimov N. et al.* Two length variants of the microsatellite FH2295 as markers for body size of female Portuguese water dogs // J. Appl. Genetics. 2012. V. 53. P. 121–123. https://doi.org/10.1007/s13353-011-0076-7
72. *Plassais J., vonHoldt B.M., Parker H.G. et al.* Natural and human-driven selection of a single noncoding body size variant in ancient and modern canids // Current Biol. 2022. V. 32. P. 1–9. https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.12.036
73. *Sánchez-Villagra M.R., Geiger M., Schneider R.A.* The taming of the neural crest: A developmental perspective on the origins of morphological covariation in domesticated mammals // Royal Soc. Open Sci. 2016. V. 3. № 6. P. 160107. https://doi.org/10.1098/rsos.160107
74. *Zapata I., Lilly M.L., Herron M.E. et al.* Genetic testing of dogs predicts problem behaviors in clinical and non-clinical samples // BMC Genomics. 2022. V. 23. P. 1–19. https://doi.org/10.1186/s12864-022-08351-9
75. *Nelson R.M., Temnykh S.V., Johnson J.L. et al.* Genetics of interactive behavior in silver foxes (*Vulpes vulpes*) // Behavior Genet. 2017. V. 47. № 1. P. 88–101.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Дополнительные материалы, Таблица 1. Корреляции генетических признаков (микросателлитных маркеров) с первой парой бикомпонент (генетической и морфологической осями). Совместный 2B-PLS-анализ промеров черепа и генотипов по SSR-маркерам лисиц – потомков возвратного скрещивания гибридов первого поколения между представителями дружелюбной и агрессивной линий (F1), с представителями дружелюбной линии

SSR-маркеры*	Генетическая ось_01	Морфологическая ось_01
Ch1_FH2598_382_0	0.5088750124	0.4256672561
Ch1_FH2294_218_0	0.5009753704	0.4120003283
Ch14_C03.629_198_1	0.5734645128	0.4118264616
Ch14_C03.629_196_1	0.5734645128	0.4118264616
Ch14_C03.629_198_0	–0.5947184563	–0.3993136883
Ch5_FH3603_375_1	0.3812309206	0.3852052987
Ch14_C03.629_196_2	–0.5750371814	–0.3829647005
Ch9_FH2528_281_0	–0.6281602383	–0.3704173565
Ch14_FH2137_164_2	–0.5661104918	–0.3690257967
Ch5_FH3603_375_2	–0.3131198585	–0.3649965227
Ch14_REN157C08_237_0	0.5950171947	0.3544715047
Ch2_REN278L10_254_1	0.5012012124	0.3536485732
Ch2_REN278L10_254_0	–0.5012012124	–0.3536485434
Ch14_REN157C08_241_0	–0.5223002434	–0.3491254747
Ch14_FH3377_162_2	–0.5177600980	–0.3476556838
Ch5_FH3746_323_0	–0.3997269273	–0.3451761603
Ch5_FH3746_323_1	0.3997269273	0.3451761603
Ch14_REN157C08_241_1	0.4729447663	0.3439171314
Ch9_FH2528_281_1	0.5723578930	0.3348945677
Ch10_RVC1_151_0	0.3319693804	0.3304607868
Ch12_REN01G01_238_0	0.7113391757	0.3301526308
Ch9_REN93E07_172_0	–0.5634263754	–0.3297780454
Ch9_REN93E07_172_1	0.5634263158	0.3297780156
Ch15_DTRCN14_449_0	0.4528990388	0.3270610571
Ch2_REN278L10_250_1	–0.3135467172	–0.3243272305
Ch7_REN292N24_146_2	–0.4042654037	–0.3237753808
Ch12_CM5.63_324_0	–0.2345804572	–0.3207023144

SSR-маркеры*	Генетическая ось_01	Морфологическая ось_01
Ch8_CM27.22d_158_0	0.2836382687	0.3193939030
Ch10_RVC1_151_1	–0.3122069538	–0.3190278411
Ch10_REN193M22_188_2	0.4091495574	0.3175673187
Ch10_REN193M22_191_0	0.4091495574	0.3175673187
Ch1_C02509_195_1	0.5183656812	0.3162743747
Ch4_DTR19.31_163_0	–0.4382106364	–0.3151617348
Ch4_DTR19.31_163_1	0.4382106364	0.3151617050
Ch1_D01505_169_0	0.3052595556	0.3139682114
Ch14_FH2137_164_1	0.4966157675	0.3119449019
Ch12_CM11.33_279_0	–0.4668546319	–0.3089730144
Ch8_CM27.22d_158_1	–0.2737227082	–0.3077421784
Ch6_CM8.63_155_0	–0.4145818651	–0.3071575761
Ch1_FH2598_363_0	–0.6573292017	–0.3059901893
Ch1_FH2294_218_1	–0.3344947398	–0.3037176728
Ch7_FH2258_314_0	–0.3061069250	–0.3036116064
Ch7_REN292N24_146_1	0.2336719334	0.3030025363
Ch7_REN292N24_140_1	0.2336719334	0.3030025363
Ch16_C04107_140_0	–0.2194583714	–0.3024165630
Ch15_CM30.20_199_1	0.3300955296	0.3016671240
Ch15_CM30.20_199_0	–0.3300955296	–0.3016670942
Ch8_CM27.16_293_2	0.3791619837	0.3003662229
Ch11_REN118B15_223_0	–0.3092670739	–0.3003400266
Ch11_REN118B15_223_1	0.3092670739	0.3003400266
Ch12_CM5.63_324_1	0.2149613649	0.2995644212
Ch12_CM5.41_200_0.	–0.3931669295	–0.2988489270
Ch12_CM5.41_200_1.	0.3931669593	0.2988488972
Ch8_CM27.22e_200_0	–0.4428538084	–0.2985331714
Ch8_CM27.22e_200_1	0.4428538084	0.2985331416
Ch8_CM27.22_244_0	–0.3017807007	–0.2974354029
Ch8_CM27.22_244_1	0.3017807305	0.2974354029
Ch14_FH3377_160_0	–0.5228435993	–0.2967728078
Ch14_FH3377_160_1	0.5228435993	0.2967728078
Ch14_FH3377_162_1	0.5228435993	0.2967728078
Ch12_REN245N06_185_0	–0.4902884364	–0.2966138721
Ch12_REN245N06_185_1	0.4902884364	0.2966138422
Ch7_REN292N24_140_0	–0.4059456885	–0.2943195403
Ch7_FH2175_205_0	–0.3457841575	–0.2919130027
Ch3_26749b_372_0	0.1377184987	0.2916675806
Ch1_D01505_169_1	–0.2841742337	–0.2912140191
Ch4_FH3834_271_1	0.3003900051	0.2908516824
Ch12_CM11.33_279_1	0.4354266226	0.2895141542
XX_FH2584_378_2	0.3655744791	0.2887584269
Ch1_D01505_151_2	0.4256709516	0.2881330848
Ch11_FH2312_188_1	0.3937124610	0.2868360579
Ch10_FH2535_186_0	0.1462546885	0.2856175900
Ch14_AHTH138_223_1	0.4600208402	0.2853651345
Ch5_AHTH91_214_1	–0.1349556893	–0.2816416025
Ch5_AHTH91_214_0	0.1349556893	0.2816416025

SSR-маркеры*	Генетическая ось_01	Морфологическая ось_01
Ch1_C02509_195_0	–0.4775922298	–0.2816212773
Ch7_FH2670_216_0	–0.4681460559	–0.2809127271
Ch7_FH2670_216_1	0.4681460559	0.2809127271
Ch11_FH2312_188_0	–0.3515757322	–0.2805899680
Ch8_CM27.12b_169_0	0.3093428016	0.2800920904
Ch10_FH2535_186_1	–0.1336975396	–0.2798022926
Ch14_AHTH138_223_0	–0.4644137919	–0.2795152664
Ch9_PEZ19_203_0	0.3321470022	0.2782078385
Ch15_DTRCN14_449_1	–0.3463239670	–0.2765797079
Ch5_REN183B03_139_0	–0.4823150933	–0.2765341401
Ch12_CM11.15_195_0	0.5695562959	0.2765189111
Ch16_FH2532_258_0	–0.3306177557	–0.2761352062
Ch16_FH2532_258_1	0.3306177258	0.2761351764
Ch5_FH3815_165_2	–0.4665594399	–0.2759817243
Ch5_FH3868_231_2	–0.3336104155	–0.2751336694

* – представлены все микросателлитные маркеры, показавшие статистически значимую связь с морфологической осью.

Putative Locus for Cranial Size Variability of the Fox (*Vulpes vulpes*)

A. V. Kharlamova[a, *], S. G. Shikhevich[a], A. V. Vladimirova[a], A. V. Kukekova[b], and V. M. Efimov[a, c, d]

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

[b] *University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, 61801 USA*

[c] *Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia*

[d] *Tomsk State University, Tomsk, 634050 Russia*

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

Skull morphology was studied in three populations of red foxes (*Vulpes vulpes*): tame, which was produced by long-term selection for friendly behavior to humans; aggressive, which was produced by long-term selection for aggressive behavior to humans; and conventional farm-bred, which was not deliberately selected for behavior. We have collected skulls measurements from two sets of foxes: (1) 140 backcross foxes produced by breeding of tame and aggressive foxes to each other and then crossing F1 foxes to tame strain, and (2) 150 foxes from original populations (50 tame, 50 aggressive and 50 conventional farm-bred). The backcross foxes have been genotyped with 350 microsatellite markers and analyzed using 2B-PLS analysis. A significant correlation between microsatellite genotypes and skull shape was identified for three microsatellite markers on 10-th fox chromosome: FH2535, RVC1, REN193M22. The second set of foxes (tame, aggressive and conventional) was genotyped for these three markers and also analysed with 2B_PLS. Significant correlation was identified between genotypes and skull size for males, but not for females. The genomic region identified in this study contains *IGF-1* gene, which is responsible for 15% of body size variation in dogs. Our findings suggest that *IGF-1* gene is also involved in skull size regulation in red foxes.

Keywords: fox, selection for behavior, cranial size, quantitative trait loci.

ГЕНЕТИКА, 2023, том 59, № 5, с. 562–572

ГЕНЕТИКА ЖИВОТНЫХ

УДК 591.151:636.32/.38

ПОЛНОГЕНОМНЫЙ ПОИСК НОВЫХ ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ МЯСНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ У ОВЕЦ СЕВЕРОКАВКАЗСКОЙ МЯСО-ШЕРСТНОЙ ПОРОДЫ

© 2023 г. А. Ю. Криворучко[1, 2, *], Р. В. Зуев[2], А. И. Суров[1], А. В. Скокова[1], А. А. Каниболоцкая[1], А. А. Лиховид[2], О. А. Яцык[1]

[1]*Северо-Кавказский Федеральный научный аграрный центр, Ставропольский край, Михайловск, 356241 Россия*

[2]*Северо-Кавказский Федеральный университет, Ставрополь, 355017 Россия*

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

Поступила в редакцию 10.08.2022 г.
После доработки 29.09.2022 г.
Принята к публикации 25.10.2022 г.

Поиск новых генов, влияющих на рост и развитие мышечной ткани, ассоциированных с признаками мясной продуктивности овец, является актуальной задачей, выполнение которой неразрывно связано с перспективами развития маркер-ориентированной и геномной селекции. В статье приведены данные по использованию нового подхода к обнаружению генов-кандидатов мясной продуктивности овец. Генотипирование животных выполняли с использованием ДНК-биочипов Ovine Infinium HD BeadChip 600K, поиск ассоциаций проводили с использованием программного обеспечения PLINK V.1.07. В ходе проделанной работы выявлены SNP, достоверно ассоциированные с фенотипическими признаками, характеризующими мясную продуктивность у овец северокавказской мясо-шерстной породы: высотой в холке, живой массой при рождении, толщиной жировой ткани, шириной “мышечного глаза”. Для поиска генов-кандидатов было отобрано 19 однонуклеотидных замен с наибольшей достоверностью ассоциаций. Определение местоположения анализируемых SNP позволило установить 16 новых генов-кандидатов, ассоциированных с прижизненными показателями мясной продуктивности овец северокавказской мясо-шерстной породы: *CILK1*, *ENO4*, *CTPS2*, *GABRB2*, *SLC44A1*, *C12ORF45*, *SLC41A2*, *CASD1*, *SINE2*, *SLC35F1*, *RP*, *SH3KBP1*, *LRRIQ1*, *SWAP70*, *THBS1* и *FSIP*. Генотипирование животных по этим генам следует использовать в маркер-ассоциированной селекции для улучшения показателей мясной продуктивности овец и изучения их влияния на фенотип.

Ключевые слова: овца, SNP, полногеномный поиск ассоциаций, ПГАА, ген-кандидат, северокавказская мясо-шерстная порода.

DOI: 10.31857/S0016675823050090, **EDN:** FNVKYA

Интенсивное развитие мясного овцеводства, связанное с возрастающим спросом на высококачественную баранину, обусловливает необходимость совершенствования существующих пород с целью повышения их продуктивных качеств. Одним из наиболее перспективных подходов для решения этой задачи является использование методов маркер-ассоциированной селекции по аллелям генов, влияющих на мясную продуктивность [1, 2].

В результате ранее проведенных научных исследований выявлен ряд генов, связанных с количественными и качественными показателями мясной продуктивности овец. Одним из наиболее изученных маркерных генов является ген *MSTN* (*myostatin*). Белковый продукт этого гена ограничивает рост мышечной ткани у млекопитающих. Присутствие аллелей гена, ассоциированных со снижением функциональной активности миостатина, приводит к развитию фенотипа двойной мускулатуры [3, 4]. В качестве маркерных также были предложены гены, тем или иным образом влияющие на работу миостатина. Так, ген *MYOD1* (*myogenic differentiation 1*) влияет на параметры мясной продуктивности овец путем регуляции экспрессии MSTN [5]. Ген *FST* (*follistatin*) рассматривается как перспективный маркер мясной продуктивности в связи с тем, что мышечные изоформы белка фоллистатина обладают ингибирующей способностью в отношении миостатина [6]. Гормон роста обладает мощным анаболическим и антикатаболическим действием в различных типах клеток. В наибольшей степени эффект гормона проявляется в мышечной и хрящевой тканях [7]. Выявлена связь полиморфизма гена *GH* (*growth hormone*) с живой массой и показателя-

ми роста овец [8, 9]. Возникновение мутации каллипиги в межгенной области *DLK1* (*Delta Like Non-Canonical Notch Ligand 1*) – *GTL2* (*WAS/WASL-interacting protein family member*) вызывает эктопическую экспрессию кластера импринтированных генов в скелетных мышцах, что приводит к гипертрофии отдельных групп мышц бедер овец и снижению количество жира [10]. Также ранее было показано, что полиморфизм генов *REM1* (*RRAD* and *GEM like GTPase 1*), *MEF2B* (*myocyte enhancer factor 2B*) и *FABP4* (*fatty acid binding protein 4*) связан с рядом прижизненных и убойных показателей продуктивности у овец [11–13].

Несмотря на наличие достаточно большого количества информации о генах, влияющих на показатели мясной продуктивности у овец, их список далеко не полон. Это связано с участием множества белков и ферментов в формировании мышечных волокон, каждый из которых зависит от структуры и функций различного числа генов [14]. Также сложности при поиске новых генов мясной продуктивности возникают в связи с тем, что их эффект может быть скрыт наличием совокупности аллельных вариантов уже известных генов с доказанным влиянием на развитие мышц. Вместе с тем поиск новых генов, влияющих на рост и развитие мышечной ткани, связанных с фенотипическими признаками овец, актуален для дальнейшего развития селекционной работы. В связи с этим целесообразно, по нашему мнению, проводить поиск новых генов-кандидатов мясной продуктивности в группе животных, имеющих сходный генотип по набору полиморфизма известных маркерных генов. Вероятно, разнообразие параметров мясной продуктивности в такой группе будет обусловлено не полиморфизмом уже изученных маркерных генов, а аллельными вариантами ранее не рассмотренных генов.

Стабилизацию влияния одних генов и проявление функции других генов можно наблюдать среди пород, подвергающихся селекции для получения максимальной продуктивности в определенных экологических нишах, различающихся по климату, составу кормов и воды. К таким породам овец относится северокавказская мясошерстная, хорошо адаптированная для разведения в условиях засушливых степей Юга России. Она отличается достаточно высокой мясной продуктивностью для своего класса, бараны-производители имеют среднюю массу более 100 кг, а ярки – 60 кг. При этом дисперсия фенотипа мясных форм в породе указывает на определенное разнообразие генетического потенциала и возможность дальнейшего ее совершенствования [15, 16].

Цель нашего исследования – поиск новых генов-кандидатов мясной продуктивности у овец северокавказской мясо-шерстной породы в группе животных с учетом генотипов по полиморфизму известных генов, влияющих на развитие мышечной ткани.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на базе лабораторий Всероссийского научно-исследовательского института овцеводства и козоводства (ВНИИОК) – филиала ФГБНУ “Северо-Кавказский Федеральный научный аграрный центр”, Сколковского института науки и технологий “Сколтех”.

Объект исследования – бараны северокавказской мясо-шерстной породы в возрасте 12 мес., принадлежащие к племенному ядру. На первом этапе было генотипировано 275 баранов. Среди них были отобраны 50 баранов с наиболее близкими генотипами по полиморфизму известных генов мясной продуктивности: *MSTN* (oar3_OAR2_118149265; oar3_OAR2_118150665), *MEF2B* (oar3_OAR5_3860373; oar3_OAR5_3867887), *FABP4* (oar3_OAR9_57537070), *GH* (oar3_OAR11_47529756; oar3_OAR11_47545769), *REM1* (oar3_OAR13_60384593; oar3_ OAR13_60385591), *MYOD1* (oar3_OAR15_3434222; oar3_OAR15_3441596), *FST* (OAR16_27849538.1; oar3_OAR16_25632659; oar3_OAR16_25632701; oar3_OAR16_25633632$; oar3_OAR16_25638968), *DLK1* (oar3_OAR18_64313560; oar3_OAR18_64314938; oar3_OAR18_64341672). Выбранные бараны принадлежали к трем неродственным селекционным линиям, внутри линий степень родства не превышала 50% по отцу. Животные содержались в одинаковых оптимальных условиях в племзаводе “Восток” Ставропольского края. Так как мясная продуктивность породы оценивается по баранам, ярки в группу исследованных животных не входили. У отобранных баранов определяли 15 прижизненных показателей мясной продуктивности. Живую массу при рождении и в 12 мес. измеряли с помощью весов МП 300 ВЕДА Ф-1 (МИДЛиК, Россия), по этим параметрам рассчитывали ежедневный суточный прирост. С использованием линейки и измерительной ленты измеряли высоту в холке и крестце, ширину груди и спины, глубину груди, обхват плеча, предплечья и бедра. С помощью переносного УЗИ-сканера DUS 60 VET (EDAN, Китай), используя линейный датчик с частотой 5.0 МГц, определяли параметры толщины и ширины “мышечного глазка”, толщину бедренной мышцы и жировой ткани в поясничной области. Все животные были клинически здоровы и получали полноценный смешанный рацион.

Генотипирование

Геномную ДНК выделяли из образцов цельной крови, взятой в асептических условиях из яремной вены, с помощью набора Pure Link Genomic DNA MiniKit (Invitrogen Life Technologies,

США) в соответствии с протоколом производителя. Генотипирование животных проводили с использованием Ovine Infinium HD BeadChip 600K (Illumina Inc. CA, США) в соответствии с протоколом производителя. Первичную обработку результатов генотипирования проводили с помощью программы Genome Studio 2.0 (Illumina Inc. CA, США).

Контроль качества генотипирования

Контроль качества генотипирования проводили с использованием программного обеспечения PLINK v.1.07 [17]. В обработку данных были включены образцы с показателем количества выявленных однонуклеотидных замен больше 0.95 (Call Rate). Из анализа были исключены SNP (single nucleotide polymorphism), не имеющие хромосомной или физической локализации, с частотой минорных аллелей (MAF – Minor Allele Frequency) меньше 0.01, частотой потерянных генотипов (missing genotype) больше 0.1. В качестве порогового значения по критерию Харди–Вайнберга (Hardy–Weinberg equilibrium) использовалось значение $p = 0.0001$. С положительным результатом контроль качества генотипирования прошли 50 образцов. Из 606006 SNP для дальнейшего анализа были использованы 562549.

Генетический и статистический анализ

Полногеномный анализ ассоциаций (ПГАА) выполняли с использованием программного обеспечения PLINK v1.07 [17] на основе оценки значимости влияния SNP на количественные прижизненные признаки мясной продуктивности овец. Для множественных сравнений вводили поправку Бонферрони, устанавливающую показатель уровня значимости $p = 0.8 \times 10^{-6}$. Визуализацию и построение графиков проводили с применением пакета “QQman” на языке программирования R. Поиск генов-кандидатов осуществляли среди ближайших генов, расположенных на расстоянии, не превышающем 250000 пн (половина сантиморганиды) от SNP, показавших достоверную ассоциацию с признаками мясной продуктивности. Анализируемые полиморфизмы представлены биаллельными SNP, аллелям присвоены обозначения A и B, в соответствии с наименованием на чипе Ovine Infinium HD BeadChip 600K (Illumina Inc. CA, США). Для картирования SNP использовали сборку генома Ovis_Aries_3.1. Аннотирование генов выполняли с использованием геномных браузеров UCSC (www.genome.ucsc.edu) и Ensembl (www.ensembl.org).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведенный поиск ассоциаций полиморфизма известных маркерных генов с некоторыми прижизненными параметрами продуктивности показал отсутствие достоверных ассоциаций у обследуемой группы овец северокавказской мясо-шерстной породы (табл. 1). Достоверность ассоциаций для четырех SNP, расположенных в генах *MSTN*, *MEF2B* и *FABP4*, не была рассчитана, так как у изучаемых животных они присутствовали только в виде мономорфных гомозиготных вариантов. Для остальных генетических вариантов показатель достоверности был значительно выше порогового значения p с учетом поправки Бонферрони.

Тепловая карта распределения аллелей SNP маркерных генов (рис. 1) мясной продуктивности демонстрирует отсутствие выраженной кластеризации исследуемых животных по выявленным генотипам. Не сформировано каких-либо достаточно крупных кластеров до 3–4 порядка, распределение генотипов носит случайный характер. Несколько SNP присутствовали в виде мономорфных аллелей (в генах *MSTN*, *MEF2B* и *FABP4*), часть замен в генах *FST* и *DKL1* имела единичные гетерозиготные варианты. Таким образом, в подобранной группе животных полиморфизм известных генов продуктивности, вероятно, не оказывал достоверного влияния на параметры фенотипа овец северокавказской мясо-шерстной породы.

В результате полногеномного поиска ассоциаций выявлено около 20 SNP, достоверно связанных с прижизненными показателями мясной продуктивности у овец северокавказской мясо-шерстной породы (рис. 2).

Для высоты в холке максимальный показатель достоверности был у двух SNP, расположенных на хромосомах 20 и 22 (рис. 2,*а*). Одна из них находилась в интроне гена, другая – в межгенном пространстве. При оценке ассоциаций с живой массой при рождении (рис. 2,*б*) три замены с высокой достоверностью ассоциаций располагались на хромосоме X. Все они находились очень близко друг от друга рядом с геном *CTPS2*, что позволяет предположить их совместное наследование.

Для параметра “толщина жировой ткани” было выявлено три SNP, преодолевших порог достоверности с учетом поправки Бонферрони (рис. 2,*в*). Наибольшую достоверность связи имели замены на хромосомах 2, 3 и 5. Две из них находились в межгенном пространстве, а одна – в интроне гена.

Достоверные связи с параметром “ширина мышечного глазка” были выявлены для нескольких SNP, при этом наибольшую достоверность имели ассоциации SNP, расположенные на хромосоме 4 (рис. 2,*г*). Они находились в разных интронах одного и того же гена.

В результате ПГАА выявлено несколько SNP, ассоциированных с обхватом предплечья (рис. 2,*д*), для дальнейшего анализа было отобрано девять замен. Замены с достоверным уровнем ассоциа-

Таблица 1. Связь полиморфизма маркерных генов с прижизненными показателями мясной продуктивности овец северокавказской мясо-шерстной породы

Ген	SNP	Хромосома	Позиция	ЖМ, *p*	ТМГ, *p*
MSTN	oar3_OAR2_118149265	2	118149265	N/A	N/A
MSTN	oar3_OAR2_118150665	2	118150665	N/A	N/A
MEF2B	oar3_OAR5_3860373	5	3860373	0.93	0.98
MEF2B	oar3_OAR5_3867887	5	3867887	N/A	N/A
FABP4	oar3_OAR9_57537070	9	57537070	N/A	N/A
GH	oar3_OAR11_47529756	11	47529756	0.40	0.23
GH	oar3_OAR11_47545769	11	47545769	0.04	0.78
REM1	oar3_OAR13_60384593	13	60384593	0.15	0.87
REM1	oar3_OAR13_60385591	13	60385591	0.15	0.87
MYOD1	oar3_OAR15_3434222	15	3434222	0.49	0.53
MYOD1	oar3_OAR15_3441596	15	3441596	0.61	0.19
FST	OAR16_27849538.1	16	25631318	0.11	0.34
FST	oar3_OAR16_25632659	16	25632659	0.56	0.83
FST	oar3_OAR16_25632701	16	25632701	0.86	0.66
FST	oar3_OAR16_25633632	16	25633632	0.56	0.83
FST	oar3_OAR16_25638968	16	25638968	0.03	0.54
DLK1	oar3_OAR18_64313560	18	64313560	0.77	0.67
DLK1	oar3_OAR18_64314938	18	64314938	0.14	0.79
DLK1	oar3_OAR18_64341672	18	64341672	0.99	0.55

Примечание. N/A – полиморфизм не обнаружен; ЖМ – живая масса; ТМГ – толщина “мышечного глазка”.

ции на хромосомах 8 и 17 расположены в межгенном пространстве, замены на хромосомах 3, 7, 15 и X обнаружены в интронах генов. При этом одна из замен на хромосоме 7 картировалась в интроны сразу двух генов.

Для ряда других прижизненных показателей мясной продуктивности овец северокавказской мясо-шерстной породы, включающего в себя живую массу в годовалом возрасте, среднесуточный прирост, высоту в крестце, ширину и глубину груди, ширину спины, обхваты плеча и бедра, толщину “мышечного глазка” и толщину бедренной мышцы, достоверных ассоциаций с SNP обнаружено не было.

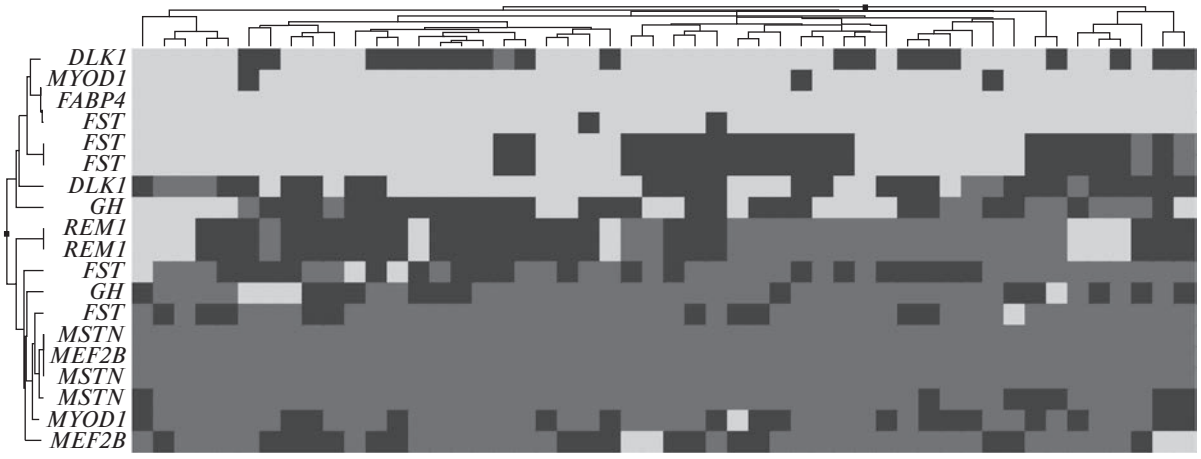


Рис. 1. Тепловая карта распределения аллелей SNP маркерных генов, достоверно не связанных с мясной продуктивностью, у овец северокавказской мясо-шерстной породы. Кластеризация по генотипам. Светло-серый цвет – гомозигота A, серый цвет – гетерозигота AB, темно-серый цвет – гомозигота B.

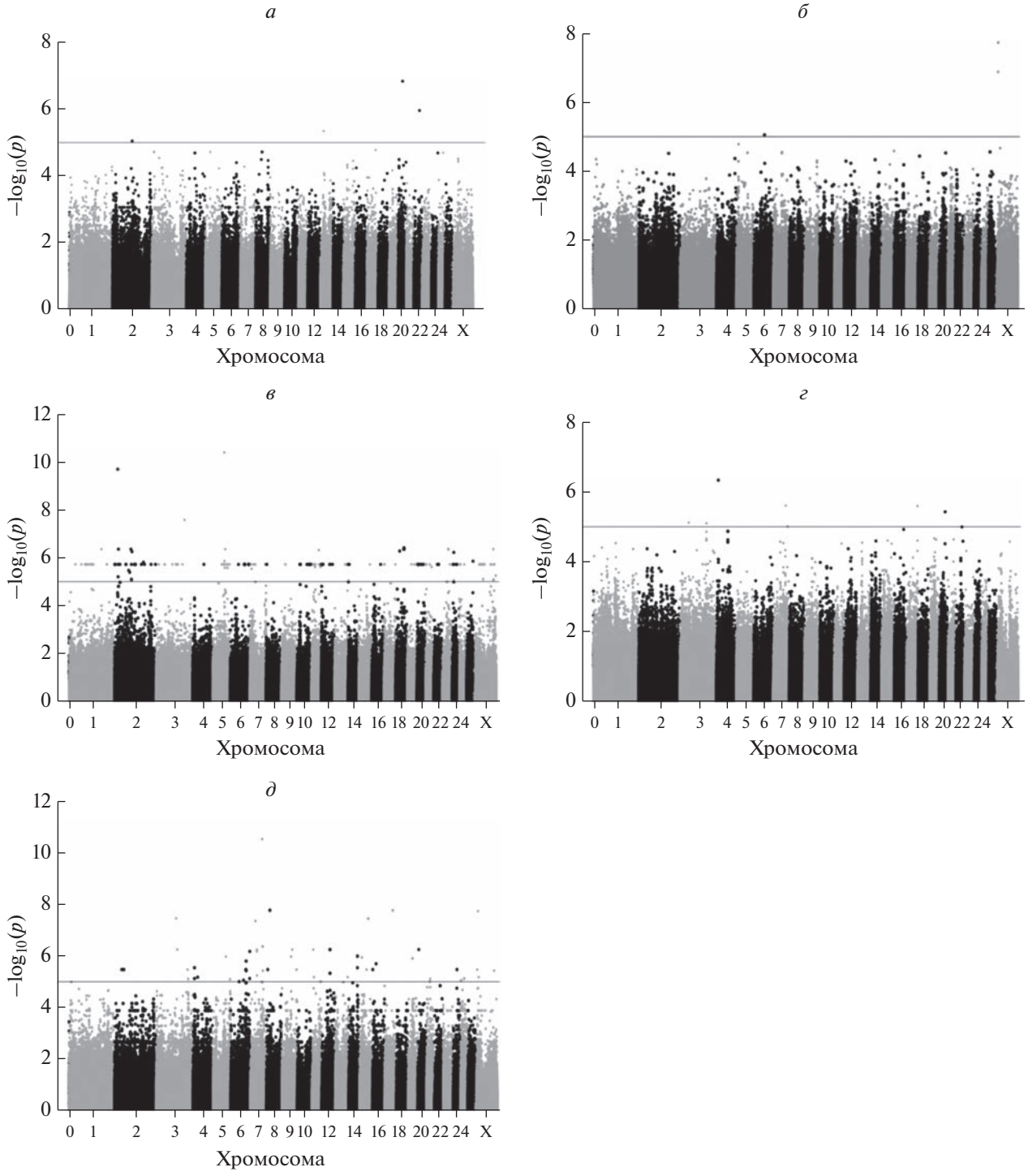


Рис. 2. Манхэттенский график результатов ПГАА с набором значений $-\log_{10}(p)$ для исследуемых SNP по прижизненным показателям мясной продуктивности: высота в холке (*а*), живая масса при рождении (*б*), толщина жировой ткани (*в*), ширина "мышечного глазка" (*г*), обхват предплечья (*д*). Синяя линия обозначает порог ожидаемой достоверности различий при значении $-\log_{10}(p) = 5$.

Для дальнейшего изучения и аннотирования близлежащих генов-кандидатов было отобрано 19 SNP, имеющих наибольший уровень достоверности ассоциаций (табл. 2). Из них девять были расположены в интронах генов, остальные 10 – на разном удалении от генов. Ближе всех находилась замена rs411918327 на хромосоме 17 – 17782 пн. Наиболее отдаленное расположение относитель-

Таблица 2. Связь SNP с прижизненными показателями мясной продуктивности и новые гены-кандидаты овец северокавказской мясо-шерстной породы

Признак	Хромосома	SNP	Позиция	*p*	Ген/расстояние до гена, пн
ВВХ	20	rs405580662	25023121	1.01e-07	*CILK1*/intron 11-12
	22	rs404887224	36141759	1.07e-06	*ENO4*/61224
ЖМР	X	rs410901922	14048240	1.83e-08	*CTPS2*/29384
	X	rs410836916	14054083	1.83e-08	*CTPS2*/23541
	X	rs416819309	14045890	1.30e-07	*CTPS2*/31734
ТЖТ	5	rs410336272	70279825	4.07e-11	*GABRB2*/intron 9-10
	2	rs411177492	17793666	2.06e-10	*SLC44A1*/112524
	3	rs406382505	173590152	2.74e-08	*C12ORF45*/26001; *SLC41A2*/30547
ШМГ	4	rs420242290	11782536	4.64e-07	*CASD1*/intron 3-4
	4	rs427172181	11801072	4.64e-07	*CASD1*/intron 10-11
ОПП	7	rs422152157	73053165	2.84e-11	*SINE2*/intron 2-3
	8	rs398907349	19601156	1.66e-08	*SLC35F1*/62507
	17	rs399242667	49481697	1.66e-08	*RP*/34798
	17	rs430083361	49493261	1.66e-08	*RP*/23234
	17	rs411918327	49498713	1.66e-08	*RP*/17782
	X	rs428366450	17003427	1.79e-08	*SH3KBP1*/intron 13-14
	3	rs429375653	121233501	3.43e-08	*LRRIQ1*/intron 13-14
	15	rs413432564	42537319	3.43e-08	*SWAP70*/intron 1-2
	7	rs422549589	32364039	4.36e-08	*THBS1*/intron 22-23; *FSIP1*/intron 9-10

Примечание. ВВХ – высота в холке; ЖМР – живая масса при рождении, ТЖТ – толщина жировой ткани; ШМГ – ширина “мышечного глазка”; ОПП – обхват предплечья.

но ближайшего гена-кандидата имела замена rs411177492 на хромосоме 2. Она составила 112524 пн. Для большинства других замен дистанция не превышала 40 тпн. Это указывает на очень высокую вероятность сцепленного наследования обнаруженных SNP с приведенными в табл. 2 генами-кандидатами продуктивности.

Ассоциированная с высотой в холке замена rs405580662 располагается в интроне гена *CILK1*. Ген *ENO4* (*enolase 4*) расположен в 60 тпн от замены rs404887224. Три обнаруженные нами на хромосоме X замены находятся в непосредственной близости (от 23 до 32 тпн) от гена *CTPS2* (*Cytidine 5'-Triphosphate Synthetase 2*). В интроне гена *GABRB2* (*gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit beta2*), расположенного на хромосоме 5, находится замена с очень высокими показателями достоверности ассоциаций с толщиной жира в поясничной области. Еще один ассоциированный с толщиной жира SNP расположен в области гена *SLC44A1* (*solute carrier family 44 member 1*). Между геном *SLC41A2* (*solute carrier family 41 member 2*) и геном *C12ORF45* (*chromosome 12 open reading frame 45*) (30 и 26 тпн соответственно) также находится SNP, связанный с толщиной жира. Две замены на хромосоме 4, ассоциированные с шириной “мышечного глазка”, располагаются в интронах гена *CASD1* (*CAS1 domain containing 1*). Ген *SINE2* (*spectrin repeat containing nuclear envelope protein 2*) содержит в своем интроне SNP с очень высокими показателями ассоциации с обхватом предплечья. Еще одна замена, связанная с обхватом предплечья, находится в 60 тпн от гена *SLC35F1* (*solute carrier family 35 member F1*). Сразу три SNP, ассоциированных с обхватом предплечья, находятся в области гена *RP* (*Ribosomal protein*) на хромосоме 17, имея расстояние от 17 до 35 тпн до гена. На хромосоме X находится ген *SH3KBP1* (*SH3 domain containing kinase binding protein 1*), содержащий в интроне SNP с высокой ассоциацией с обхватом предплечья. Также связанная с обхватом предплечья SNP локализуется в интроне гена *LRRIQ1* (*leucine rich repeats and IQ motif containing 1*). Замена rs413432564 обнаружена в интроне гена *SWAP70* (*switching B cell complex subunit*). Замена rs422549589 располагается в локусе, попадающем в интроны сразу двух генов – *THBS1* (*thrombospondin 1*) и *FSIP1* (*fibrous sheath interacting protein 1*).

Тепловая карта генотипов животных по обнаруженным нами SNP (рис. 3) показывает совершенно другое распределение гомо- и гетерозиготных вариантов по сравнению с тепловой картой для известных генов мясной продуктивности (рис. 1). Ни одна из замен, формирующих генотипы, не

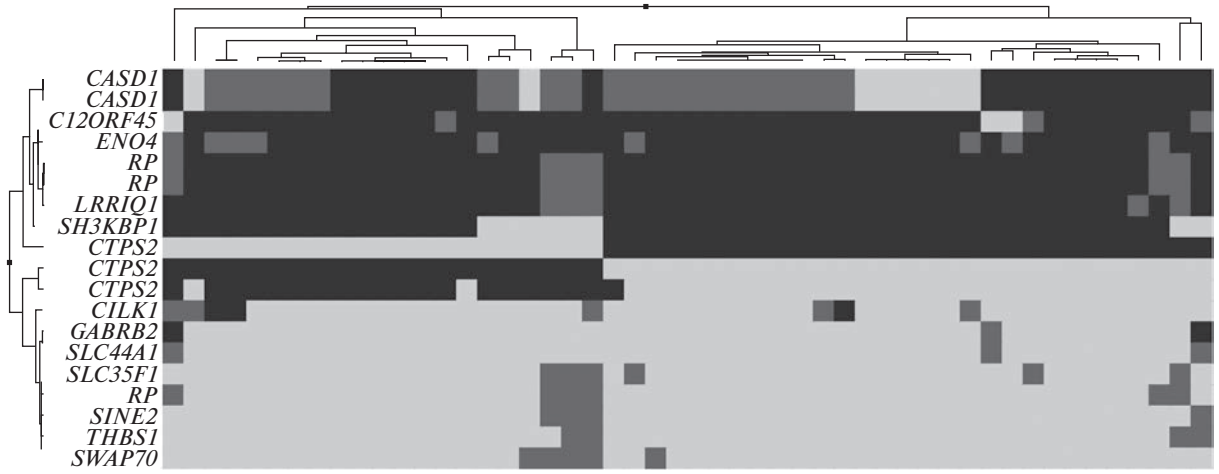


Рис. 3. Тепловая карта распределения аллелей SNP, достоверно ассоциированных с прижизненными показателями мясной продуктивностью у овец северокавказской мясо-шерстной породы. Кластеризация по генотипам. Светло-серый цвет – гомозигота А, серый цвет – гетерозигота АВ, темно-серый цвет – гомозигота В.

представлена у исследуемых животных в мономорфном варианте, при этом преобладают гомозиготные варианты. Гетерозиготные варианты представлены у достаточно малого числа животных. Кластеризация генотипов позволила выделить две большие группы, существенно различающиеся по аллелям SNP, расположенных преимущественно в двух генах – *CTPS2* (*CTP synthase 2*) и *CASD1* (*ciliogenesis associated kinase 1*).

Таким образом, использованный нами способ выбора животных с минимальным влиянием известных генов продуктивности на фенотип позволил обнаружить новые локусы генома, имеющие достоверную связь с прижизненными показателями мясной продуктивности, и предложить ряд новых генов-кандидатов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенный анализ связи полиморфизма известных генов продуктивности с параметрами роста и развития овец показал, что у некоторых представителей овец северокавказской мясо-шерстной породы в результате проводимой селекционной работы эти гены утратили свою роль в обеспечении дисперсии фенотипа. Это связано с тем, что ген миостатина, наиболее сильного регулятора развития мышечной ткани, у обследуемых животных имеет только один аллельный вариант. У них встречается тот же вариант SNP, что и у австралийских мериносовых овец, которые являются одними из предков северокавказской мясо-шерстной породы [18]. На этом фоне влияние остальных известных генов на разнообразие фенотипа существенно снижено еще и по той причине, что замены в них сгруппированы в достаточно случайном порядке, варианты генотипов плохо кластеризуются. Все это указывает на то, что выбранные нами овцы северокавказской мясо-шерстной породы хорошо подходят для поиска новых генов-кандидатов мясной продуктивности, так как животные имеют достаточную вариабельность в параметрах экстерьера и ультразвуковых измерениях. Соответственно обнаруженная дисперсия фенотипа должна иметь под собой основу в виде особенностей генотипа.

Полногеномный поиск ассоциаций SNP с прижизненными параметрами мясной продуктивности выявил несколько замен с достаточно высокими показателями достоверности связи. Для некоторых из них уровень значимости был меньше 0.8×10^{-6}. Это указывает на необходимость пристального изучения особенностей строения обнаруженных локусов генома.

Кластеризация и построение тепловой карты для генотипов по SNP, ассоциированным с показателями продуктивности, показали четкое разделение обследованных животных как минимум на две группы. И связано оно в основном с полиморфизмом в области генов *CTPS2* и *CASD1*, влияние которого на параметры фенотипа ранее вообще не рассматривалось. По нашему мнению, именно на них стоит обратить особое внимание при дальнейшем изучении механизма влияния генов продуктивности на параметры роста и развития животных.

Для большинства предлагаемых нами новых генов-кандидатов исследований связи с продуктивными качествами животных ранее не проводилось. Ген *CILK1* (*Ciliogenesis Associated Kinase 1*)

кодирует киназу 1, связанную с цилиогенезом, и экспрессируется во многих тканях организма. Мутации в гене *CILK1* приводят у человека к наследственным заболеваниям с нарушением развития костно-мышечной системы, легких, головного мозга и других органов. У мышей мутации сопровождаются замедлением роста и патологиями позвоночника [19]. Исходя из этого, ген *CILK1* может быть связан с изменениями размера тела у овец и требует дальнейшего изучения.

Продуктом гена *ENO4* (*enolase 4*) является фермент, участвующий в одном из этапов синтеза пирувата в процессе гликолиза. Высокая активность гена выявлена в спермиях человека, барана и мыши. Полиморфизм гена *ENO4* у мышей связывают с нарушениями подвижности сперматозоидов и развитием бесплодия [20]. Важность гена *ENO4* для энергетического обмена позволяет предположить его влияние на рост и развитие животных.

Ген *CTPS2* (*Cytidine 5'-Triphosphate Synthetase 2*) кодирует одну из изоформ фермента, катализирующего последнюю стадию синтеза пиримидина, входящего в состав молекул урацила, тимина и цитозина. Фермент крайне важен во все периоды развития организма, гомозиготы с нокаутированным геном *CTPS2* погибают еще на этапе эмбрионального развития [21]. Учитывая функции гена и особенности распределения генотипов, выявленных в нашем исследовании, следует считать его возможным кандидатом, связанным с продуктивностью изучаемых животных.

Влияние гена *GABRB2* (*gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit beta2*) на фенотип животных не изучалось, у человека его полиморфизм связывают с развитием наследственных форм эпилепсии и эпилептической энцефалопатии [22]. Это указывает на его важность для передачи импульсов нейронами и позволяет считать косвенно связанным с регуляцией роста и развития организма.

Кодируемый геном *SLC44A1* (*solute carrier family 44 member 1*) митохондриальный белок отвечает за трансмембранный транспорт холина и регулирует его метаболизм. У мышей высокая активность гена была выявлена в гепатоцитах и мышечной ткани [23]. В связи с этим ген *SLC44A1* может рассматриваться в качества кандидата, связанного с продуктивностью у овец.

Ген *C12ORF45* (*chromosome 12 open reading frame 45*) имеет открытую рамку считывания. Несмотря на то что обнаружено достаточно много участков генома, представляющих собой открытые рамки считывания без стоп-кодонов, их функция не ясна. Существует мнение, что они кодируют регуляторные аминокислотные последовательности для различных биологических процессов [24]. Ген *SLC41A2* относится к группе, кодирующей белки Mg^{2+}-каналов у бактерий и у высших животных [25]. Оба описанных гена могут влиять на обменные процессы в организме и рассматриваются нами как кандидаты, связанные с мясной продуктивностью.

Ген *CASD1* (*CAS1 domain containing 1*) содержит домен белка, катализирующего превращение сиаловой кислоты. Сиаловая кислота участвует в регуляции межклеточных взаимоотношений, передаче сигналов, распознавании клеток [26]. Мы считаем необходимым дальнейшее изучение роли гена *CASD1* в реализации продуктивных качеств у овец.

Есть сообщения о связи мутаций в гене *SINE2* (*spectrin repeat containing nuclear envelope protein 2*) с развитием нейро-мышечной дистрофии и поражением миокарда у человека [27]. Это указывает на возможность связи полиморфизма гена *SINE2* с развитием мышечной ткани у животных.

Ген *SLC35F1* (*solute carrier family 35 member F1*) кодирует белок из семейства трансмембранных транспортеров, особенно активно функционирующих в нервной системе при реализации функций гемато-энцефалического барьера [28]. По нашему мнению, ген *RP* (*Ribosomal protein*) заслуживает внимания для дальнейшего изучения связи с мясной продуктивностью. Было показано, что рибосомальные протеины не только связаны с функцией рибосом, но и участвуют в процессах канцерогенеза, передаче сигналов в иммунной системе, а также отвечают за нормальное развитие организма [29].

Ген *SH3KBP1* (*SH3 domain containing kinase binding protein 1*) отличается способностью к продукции ряда изоформ белкового продукта за счет альтернативного сплайсинга и принимает участие в перестройке цитоскелета, клеточной адгезии, процессах апоптоза, миграции и инвазии клеток [30]. Такое многообразие функций делает его перспективным геном-кандидатом продуктивных свойств овец.

Функцию генов семейства, к которому относится *LRRIQ1* (*leucine rich repeats* and *IQ motif containing 1*), связывают с реализацией неспецифического иммунного ответа [31]. Ген *SWAP70* (*switching B cell complex subunit*) участвует в миграции клеток, фагоцитозе, процессах деструкции костной ткани [32]. Оба этих гена представляют интерес для изучения связи их полиморфизма с фенотипическими параметрами овец.

Ген *THBS1* (*thrombospondin 1*) принимает участие в большом количестве обменных процессов, включая межклеточные взаимодействия, регуля-

цию утилизации глюкозы, метаболизм адипоцитов [33]. Функция гена *FSIP1* (*fibrous sheath interacting protein 1*) до конца не изучена. Имеются сведения об участии гена *FSIP1* во взаимодействии ряда белковых молекул, а также о связи его полиморфизма с развитием слизистой меланомы [34] и рака мочевого пузыря [35]. Исходя из структурно-функциональных особенностей локуса, ассоциированного с показателем продуктивности, мы считаем необходимым дальнейшее изучение обоих этих генов на предмет участия в реализации фенотипа животных.

Таким образом, использован новый подход к обнаружению генов-кандидатов продуктивности, основанный на проведении ПГАА в группе животных с учетом генотипа по полиморфизму известных генов, влияющему на развитие мышечной ткани. В результате проведенного ПГАА у овец северокавказской мясо-шерстной породы было выявлено 19 SNP, связанных с прижизненными показателями мясной продуктивности. Определение местоположения анализируемых SNP позволило установить 16 новых генов-кандидатов, ассоциированных с показателями мясной продуктивности овец северокавказской мясо-шерстной породы. Обнаруженные замены располагались в интронах или фланкирующих областях генов: *CILK1*, *ENO4*, *CTPS2*, *GABRB2, SLC44A1*, *C12ORF45*, *SLC41A2*, *CASD1*, *SINE2*, *SLC35F1*, *RP*, *SH3KBP1*, *LRRIQ1*, *SWAP70*, *THBS1* и *FSIP1*. Предложенные гены-кандидаты участвуют в метаболизме белков и нуклеиновых кислот, обеспечении межклеточных взаимодействий и передачи нервного импульса, в регуляции развития мышечной ткани. Дальнейшие исследования должны быть направлены на подтверждение влияния предложенных генов-кандидатов на фенотип овец, а также на изучение структуры этих генов для выявления конкретных полиморфизмов, вызывающих изменения фенотипа.

Финансирование работы проводилось за счет средств Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, грант № 075-15-2021-1037 (внутр. № 15.БРК.21.0001).

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. *Sahu A.R., Nayak N., Panigrahi M., Kumar S.* Advances in genomic strategies to improve growth and meat production traits in sheep: An overview // Ind. J. Small Ruminants. 2017. V. 23. № 2. P. 139. https://doi.org/10.5958/0973-9718.2017.00052.6
2. *Trukhachev V.I., Selionova M.I., Krivoruchko A.Y., Aibasov A.M.M.* Genetic markers of meat productivity of sheep (*Ovis aries* L.). I. Myostatin, calpain, calpastatin // Sel'skokhozyaĭstvennaya Biologiya. 2018. V. 53. № 6. P. 1107–1119. https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.6.1107eng
3. *Aiello D., Patel K., Lasagna E.* The myostatin gene: An overview of mechanisms of action and its relevance to livestock animals // Animal Genet. 2018. V. 49. № 6. P. 505–519. https://doi.org/10.1111/age.12696
4. *Osman N.M., Shafey H.I., Abdelhafez M.A. et al.* Genetic variations in the Myostatin gene affecting growth traits in sheep // Veterinary World. 2021. V. 14. № 2. P. 475. https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.475-482
5. *Sousa-Junior L.P.B., Meira A.N., Azevedo H.C. et al.* Variants in myostatin and MyoD family genes are associated with meat quality traits in Santa Inês sheep // Animal Biotechnol. 2022. V. 33. № 2. P. 201–213. https://doi.org/10.1080/10495398.2020.1781651
6. *Nissinen T.A., Hentilä J., Fachada V. et al.* Muscle follistatin gene delivery increases muscle protein synthesis independent of periodical physical inactivity and fasting // The FASEB J. 2021. V. 35. № 3. P. e21387. https://doi.org/10.1096/fj.202002008R
7. *Sharma R., Kopchick J.J., Puri V., Sharma V.M.* Effect of growth hormone on insulin signaling // Mol. Cell. Endocrinol. 2020. V. 518. P. 111038. https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.111038
8. *Abdelmoneim T.S., Brooks P.H., Afifi M., Swelum A.A.A.* Sequencing of growth hormone gene for detection of polymorphisms and their relationship with body weight in Harri sheep // Ind. J. Animal Res. 2017. V. 51. № 2. P. 205–211. https://doi.org/10.18805/ijar.11457
9. *Gorlov I.F., Kolosov Y.A., Shirokova N.V. et al.* Association of the growth hormone gene polymorphism with growth traits in Salsk sheep breed // Small Ruminant Res. 2017. V. 150. P. 11–14. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.02.019
10. *Takeda H., Caiment F., Smit M. et al.* The callipyge mutation enhances bidirectional long-range DLK1-GTL2 intergenic transcription in cis // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. № 21. P. 8119–8124. https://doi.org/10.1073/pnas.0602844103
11. *Cheng J., Zhang X., Li F. et al.* Detecting single nucleotide polymorphisms in MEF2B and UCP3 and elucidating their association with sheep growth traits // DNA Cell Biol. 2021. V. 40. № 12. P. 1554–1562. https://doi.org/10.1089/dna.2021.0782
12. *Gavran M., Antunović Z., Gantner V.* Candidate genes associated with economically important traits of sheep-a review // Agriculturae Conspectus Scientificus. 2021. V. 86. № 3. P. 195–201.

13. *Trukhachev V.I., Skripkin V.S., Yatsyk O. et al.* The polymorphism of REM-1 gene in sheep genome and its influence on some parameters of meat productivity // Research J. Pharmaceutical, Biol. Chem. Sciences. 2016. V. 7. № 3. P. 2351–2357.

14. *Nesvadbova M., Borilova G.* Molecular regulation of skeletal muscle tissue formation and development // Veterinarni Med. (Praha). 2018. V. 63. № 11. P. 500–512. https://doi.org/10.17221/7/2018-VETMED

15. *Омаров А.А., Гайдашов С.И.* Продуктивные показатели овец северокавказской мясо-шерстной породы и их взаимосвязь с основными селекционируемыми признаками // Вестн. Алтайского гос. аграрного ун-та. 2021. № 2(196). С. 66–72.

16. *Селькин И.И.* Породе 50 лет // Сб. науч. трудов Ставропольского научно-исслед. института животноводства и кормопроизводства. 2010. № 13. С. 258–283.

17. *Purcell S., Neale B., Todd-Brown K. et al.* PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses // The Am. J. Human Genet. 2007. V. 81. № 3. P. 559–575. https://doi.org/10.1086/519795

18. *Kijas J.W., McCulloch R., Edwards J. et al.* Evidence for multiple alleles effecting muscling and fatness at the Ovine GDF8 locus // J. Animal Breed. Genet. 2013. V. 130. № 6. P. 468–475. https://doi.org/10.1186/1471-2156-8-80

19. *Fu Z., Gailey C.D., Wang E.J., Brautigan D.L.* Ciliogenesis associated kinase 1: Targets and functions in various organ systems // FEBS Letters. 2019. V. 593. № 21. P. 2990–3002. https://doi.org/10.1002/1873-3468.13600

20. *Nakamura N., Dai Q., Williams J. et al.* Disruption of a spermatogenic cell-specific mouse enolase 4 (eno4) gene causes sperm structural defects and male infertility // Biol. Reproduction. 2013. V. 88. № 4. P. 90. https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.107128

21. *Hickl D., Scheuring D., Möhlmann T.* CTP Synthase 2 From *Arabidopsis thaliana* is required for complete embryo development // Frontiers Plant Sci. 2021. V. 12. P. 652434. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.652434

22. *El Achkar C.M., Harrer M., Smith L. et al.* Characterization of the GABRB2-Associated Neurodevelopmental Disorders // Annals Neurology. 2021. V. 89. № 3. P. 573–586. https://doi.org/10.1002/ana.25985

23. *Michel V., Bakovic M.* The solute carrier 44A1 is a mitochondrial protein and mediates choline transport // The FASEB J. 2009. V. 23. № 8. P. 2749–2758. https://doi.org/10.1096/fj.08-121491

24. *Ladoukakis E., Pereira V., Magny E.G. et al.* Hundreds of putatively functional small open reading frames in *Drosophila* // Genome Biol. 2011. V. 12. № 11. P. 1–17. https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-11-r118

25. *Fleig A., Schweigel-Röntgen M., Kolisek M.* Solute carrier family SLC41: what do we really know about it? // Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling. 2013. V. 2. № 6. P. 227–239. https://doi.org/10.1002/wmts.95

26. *Baumann A.-M.T., Bakkers M.J.G., Buettner F.F.R. et al.* 9-O-Acetylation of sialic acids is catalysed by CASD1 via a covalent acetyl-enzyme intermediate // Nat. Communications. 2015. V. 6. P. 7673. https://doi.org/10.1038/ncomms8673

27. *Bamaga A., Vajsar J.* Spectrin repeat-containing nuclear envelope protein 2: SYNE2 presenting as a congenital myopathy: A case report // Neuromuscul Disord. 2016. V. 26. P. 139. https://doi.org/10.1016/j.nmd.2016.06.195

28. *Mochizuki T., Mizuno T., Kurosawa T. et al.* Functional investigation of solute carrier family 35, member F2, in three cellular models of the primate blood-brain barrier // Drug Metabolism Disposition. 2021. V. 49(1). P. 3–11. https://doi.org/10.1124/dmd.120.000115

29. *Zhou X., Liao W.-J., Liao J.-M. et al.* Ribosomal proteins: Functions beyond the ribosome // J. Mol. Cell Biol. 2015. V. 7. № 2. P. 92–104. https://doi.org/10.1093/jmcb/mjv014

30. *Hua X.-Y., Bie X.-X., Cheng X., Zhang S.-G.* High expression of CIN85 promotes proliferation and invasion of human esophageal squamous cell carcinoma // Mol. Med. Reports. 2021. V. 23. № 1. P. 12. https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11650

31. *Ng A., Xavier R.J.* Leucine-rich repeat (LRR) proteins: Integrators of pattern recognition and signaling in immunity // Autophagy. 2011. V. 7. № 9. P. 1082–1084. https://doi.org/10.4161/auto.7.9.16464

32. *Kriplani N., Duncan R.R., Leslie N.R.* SWAP70 undergoes dynamic conformational regulation at the leading edge of migrating cells // FEBS Letters. 2019. V. 593. № 4. P. 395–405. https://doi.org/10.1002/1873-3468.13326

33. *Gutierrez L.S., Gutierrez J.* Thrombospondin 1 in metabolic diseases // Frontiers Endocrinol. 2021. V. 12. P. 638536. https://doi.org/10.3389/fendo.2021.638536

34. *Chen M., Wu Y., Li W. et al.* Loss-of-function variants in FSIP1 identified by targeted sequencing are associated with one particular subtype of mucosal melanoma // Gene. 2020. V. 759. P. 144964. https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144964

35. *Sun M., Zhao W., Zeng Y. et al.* Fibrous sheath interacting protein 1 overexpression is associated with unfavorable prognosis in bladder cancer: A potential therapeutic target // OncoTargets Therapy. 2017. V. 10. P. 3949. https://doi.org/10.2147/OTT.S143491

A Genome-Wide Search of New Meat Productivity Candidate Genes in North Caucasian Meat and Wool Sheep Breed

A. Yu. Krivoruchko[a, b, *], R. V. Zuev[b], A. I. Surov[a], A. V. Skokova[a], A. A. Kanibolotskaya[a], A. A. Likhovid[b], and O. A. Yatsyk[a]

[a] *North Caucasian Federal Scientific Agrarian Center, Stavropol Krai, Mikhailovsk, 356241 Russia*

[b] *North Caucasian Federal University, Stavropol, 355017 Russia*

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

The search for new genes that affect the growth and development of muscle tissue and associated with meat productivity traits in sheep is an actual task. The implementation of this is inextricably linked with the prospects for the development of marker-assisted and genomic selection. Research presents data of new approach in the detection of candidate genes for sheep meat productivity. Animal genotyping was performed using Ovine Infinium HD BeadChip 600K DNA, association search was performed using PLINK v1.07 software. As a result of the work, identified SNPs that were significantly associated with phenotypic traits directly related to the level of meat productivity in the North-Caucasian meat and wool sheep: height at the withers, live weight at birth, thickness of adipose tissue, width of the muscle "eye". To search for candidate genes, 19 polymorphisms with the highest association reliability were selected. Determining the location of the analyzed SNPs made it possible to identify 16 new candidate genes associated with lifetime meat productivity traits in North-Caucasian meat and wool sheep: *CILK1*, *ENO4*, *CTPS2*, *GABRB2*, *SLC44A1*, *C12ORF45*, *SLC41A2*, *CASD1*, *SINE2*, *SLC35F1*, *RP*, *SH3KBP1*, *LRRIQ1*, *SWAP70*, *THBS1* and *FSIP*. Animal genotyping for these genes should be used in marker-associated breeding to improve sheep meat productivity and study their effect on the phenotype.

Keywords: sheep, SNP, genome-wide association search, GWAS, candidate gene, North Caucasian meat and wool breed.

ГЕНЕТИКА, 2023, том 59, № 5, с. 573–583

МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ И МЕТОДЫ

УДК 616.895.8-092(043.3)

РАЗРАБОТКА МАТЕМАТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РИСКА ШИЗОФРЕНИИ НА ОСНОВЕ ОЦЕНКИ НОСИТЕЛЬСТВА ПОЛИМОРФНЫХ АЛЛЕЛЕЙ В 13 ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛОКУСАХ, ВЛИЯЮЩИХ НА ОБМЕН ПТЕРИНОВ

© 2023 г. Т. В. Жиляева[1, 2, *], А. П. Баврина[1], Е. Д. Касьянов[2], А. С. Благонравова[1], Г. Э. Мазо[2]

[1]Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, 603005 Россия

[2]Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и неврологии им. В.М. Бехтерева, Санкт-Петербург, 192019 Россия

**e-mail: bizet@inbox.ru*

Поступила в редакцию 22.06.2022 г.
После доработки 09.09.2022 г.
Принята к публикации 28.10.2022 г.

Методом ПЦР в режиме реального времени проведен анализ носительства аллелей в 13 генетических локусах, влияющих на обмен птеринов, у 116 пациентов с шизофренией и 62 здоровых добровольцев. Для анализа точности прогнозирования риска шизофрении использовался метод бинарной логистической регрессии с оценкой вклада всех изученных локусов. Разработана математическая модель, которая позволяет спрогнозировать риск развития шизофрении у носителя комбинации генотипов *MTHFD1* 1958*CC*/*MTRR* 66*GG* с вероятностью 90.6%, *MTHFD1* 1958*CC*/*MTRR* 66*AG* – с вероятностью 81.9%. Применение данной модели целесообразно в рутинной психиатрической практике среди лиц высокого риска развития шизофрении, однако для внедрения полученных данных в практическое здравоохранение необходима репликация в других выборках с большим объемом наблюдений.

Ключевые слова: однонуклеотидный полиморфизм, шизофрения, птерины, фолаты, метилирование.

DOI: 10.31857/S0016675823040112, **EDN:** AYENHP

К настоящему времени имеются убедительные данные о том, что нарушения обмена птеринов – дефицит фолатов, тетрагидробиоптерина (BH4), кобаламина, гипергомоцистеинемия – играют этиопатогенетическую роль в развитии шизофрении [1–6]. Закономерным в связи с этим является поиск генетических предпосылок, обусловливающих эти биохимические нарушения. Существуют метаанализы, подтверждающие вклад однонуклеотидного полиморфизма (SNP) *MTHFR* 677C>T в риск развития шизофрении [7], ряд публикаций по генетическим локусам кобаламин-зависимых ферментов фолатного обмена [8, 9], противоречивые сведения по SNP фермента синтеза BH4 ГТФ-циклогидролазы-1 [10], а также отдельные единичные публикации по ряду других генетических локусов, влияющих на фолатный обмен [11].

Согласно имеющимся данным литературы, вклад каждого из изученных генетических локусов в развитие шизофрении слабый, он был доказан на больших выборках [7]. При этом распределение генотипов полиморфизма ферментов фолатного обмена в разных популяциях, занимающих различные географические территории, зачастую различается [12, 13].

Кроме того, за пределами внимания большинства исследователей остаются другие генетические факторы, влияющие на фолатный обмен, которые стали известны только недавно благодаря GWAS [11, 14]. Оценка вклада ряда SNP в фолатный обмен изучалась либо у здоровых (в общей популяции), либо при других (не психических) расстройствах, и были получены значимые результаты [15]. Их эффект на риск развития шизофрении только начинает изучаться, причем результаты разных авторов противоречат друг другу [8, 16].

Кумулятивный эффект носительства полиморфных аллелей в нескольких локусах, влияющих на обмен фолатов, может оказаться более выраженным, чем влияние одного SNP. К настоящему времени работ, которые бы учитывали влияние нескольких генетических локусов ферментов фолатного обмена на риск развития шизофрении, в доступной нам научной литературе не найдено, хотя есть отдельные работы о кумулятивном влиянии полиморфизма ферментов фолатного обме-

на на выраженность негативных симптомов шизофрении [17].

Кроме проблемы полигенного влияния на обмен фолатов затрудняет изучение вклада полиморфных генетических локусов ферментов фолатного цикла на риск развития шизофрении также то, что не до конца изучена роль молекулярных механизмов влияния отдельных генетических факторов на риск шизофрении. Кроме того, весьма большую роль в развитии нарушений обмена фолатов играют средовые факторы (питание и образ жизни), влияющие на уровень фолатов, кобаламина и пиридоксина сыворотки крови, – все эти витамины являются непосредственными участниками фолатного обмена (субстратами и кофакторами ферментов фолатного обмена).

Цель данной работы – оценка влияния на риск развития шизофрении носительства комплекса генетических маркеров, участвующих в обмене фолатов и тетрагидробиоптерина, и разработка на основе этого математической модели прогнозирования риска шизофрении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Протокол исследования и информированное согласие для участников были одобрены Локальным этическим комитетом № 1 Приволжского исследовательского медицинского университета (протокол № 4 заседания от 13.03.2019). Критерием включения пациентов в исследование было подтверждение диагноза шизофрении на основании интервью с применением опросника Mini International Neuropsychiatric Interview for Diagnostic and Statistical Manual, Version 5 (M.I.N.I. for DSM-5). Критериями включения для контрольной группы были: отсутствие анамнеза психического заболевания и консультаций у специалистов-психиатров в течение жизни, отсутствие социальной дезадаптации (добровольцы имели трудовую или учебную занятость, социализацию) и отсутствие зависимости от психоактивных веществ (ПАВ). Общие критерии включения для обеих групп: добровольное согласие на участие в исследовании; отсутствие хронических заболеваний, связанных с воспалением, выраженными изменениями показателей оксидативного стресса, гипергомоцистеинемией, нарушениями метаболизма фолатов и фенилаланина; отсутствие приема синтетических витаминов, противовоспалительных препаратов и антиоксидантов в течение месяца до включения в исследование. Все участники исследования (116 пациентов с шизофренией и 62 здоровых добровольца) были жителями Нижнего Новгорода или Нижегородской области. Забор венозной крови осуществлялся строго натощак в утренние часы из локтевой вены. Молекулярная диагностика SNP проводилась у всех участников методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с аллель-специфическими праймерами и последующей детекцией в режиме реального времени. Использовали тест-системы для выделения ДНК из лейкоцитов “ДНК-Экспресс кровь” (производство НПП “Литех” Россия) и наборы для определения аллелей производства ООО “ТестГен” (Россия) и НПП “Литех”.

Изученные генетические факторы представлены в табл. 1. У носителей полиморфных аллелей изученных SNP снижается соответствующая функция фермента/белка, что определяет его влияние на различные звенья метаболизма птеринов. На основе обзора литературы [11] были выбраны генетические факторы, которые ранее изучались в контексте нарушений обмена птеринов: влияющие на усвоение фолатов из пищи, их внутриклеточный транспорт, метаболизм в клетке, синтез тетрагидробиоптерина, а также смежные процессы одноуглеродного метаболизма – метилирование и транссульфурацию.

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью пакета прикладных программ SPSS Statistics v. 27. Сравнение частот распределения генотипов у пациентов и здоровых добровольцев (табл. 2) проводили с помощью анализа таблиц сопряженности методом Chi^2 (χ^2) с поправкой Йетса на непрерывность. Для анализа точности прогнозирования риска шизофрении использовали метод бинарной логистической регрессии с оценкой вклада 13 генетических локусов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Распределение генотипов изученных SNP среди пациентов и здоровых добровольцев и соответствие распределения по каждому локусу закону Харди–Вайнберга представлено в табл. 2.

Критический уровень значимости ($p \le 0.05$) для переменных (13 SNP) в регрессионных уравнениях был преодолен только для двух локусов – rs2236225 (далее *MTHFD1*) и rs1801394 (далее *MTRR*), поэтому в дальнейшем анализе участвовали только SNP *MTHFD1* и *MTRR*. Нормальный (“дикий”) генотип *MTHFD1 CC* и полиморфный генотип *MTRR GG* у пациентов встречались чаще, поэтому эти генотипы были обозначены в математической модели как факторы риска шизофрении кодом “2”, соответственно гомозиготные генотипы с альтернативным аллелем – кодом “0”, гетерозиготы – кодом “1”.

При разработке математической модели бинарным событием являлось разделение изученной выборки на две группы: пациенты с установленным диагнозом шизофрения и здоровые добровольцы (болен/здоров). Вероятность наступления события для определенного случая рассчитывается по общей формуле (в данном случае событие –

Таблица 1. Генетические факторы, изученные в рамках данной работы

Номер SNP, другие обозначения при наличии	Название фермента/белка	Функция фермента/белка, роль полиморфизма
rs10137071 (C>T или G>A, далее *GCH1-1*)	ГТФ-циклогидролаза-1 (GCH1)	Синтез BH4 (снижение уровня тетрагидробиоптерина – BH4 – в сыворотке крови у носителей полиморфных аллелей)
rs8007267 (далее *GCH1-2*)		
rs202676 (484T>C, далее *FOLH1*)	Фолатгидролаза-1 (FOLH1), или глутамат карбоксипептидаза-II (GCP-II)	Абсорбция фолатов из кишечника
rs1051266 (Arg27Cys, 80G>A, далее *RFC1*)	Восстановленный переносчик фолатов (reduced folate carrier-1, RFC1), SLC19A1	Синтез клеточных рецепторов фолатов (трансмембранный перенос фолатов внутрь клетки)
rs2618372 (далее *DHFR*)	Дигидрофолатредуктаза (DHFR)	Внутриклеточный метаболизм фолатов: превращение дигидрофолата (пищи) в метаболически активную форму тетрагидрофолат
rs2236225 (1958G>A, далее *MTHFD1*)	Метилентетрагидрофолатдегидрогеназа (MTHFD1)	Цитоплазматический метаболизм фолатов: взаимные превращения тетрагидрофолата (ТГФ), 10-формил-ТГФ, 5,10-метенил-ТГФ и 5,10-метилен-ТГФ
rs1801133 (677C>T, Ala222Val, далее *MTHFR1*)	Метилентетрагидрофолатредуктаза (MTHFR)	Восстановление 5,10-метилен-ТГФ в 5-метил-ТГФ, необходимый для метилирования, в том числе гомоцистеина в метионин
rs1801131 (1298A>C, Glu429Ala, далее *MTHFR2*)		
rs1805087 (2756A>G, Asp919Gly, далее *MTR*)	Метионинсинтаза (MTR)	Восстановление гомоцистеина в метионин, кобаламин-зависимая реакция
rs1801394 (66A>G, Ile22Met, далее *MTRR*)	Редуктаза метионинсинтазы (MTRR)	Восстановление метионинсинтазы для осуществления метилирования гомоцистеина в метионин
rs5742905 (T833C/844ins68, далее *CBS*)	Цистатионин-β-синтаза (CBS)	Первая стадия транссульфурации (превращение гомоцистеина в цистатионин), кофактор — пиридоксальфосфат (витамин B6)
rs4654748 (далее *NBPF3*)	Neuroblastoma breakpoint family member 3 (NBPF3, русскоязычного перевода не найдено)	Влияет на уровень пиридоксина (B6) в плазме, как следствие — может определять активность CBS
rs4680 (158Val>Met, далее *COMT*)	Катехол-О-метилтрансфераза (COMT)	Метаболизм (распад) катехоламинов при участии метильной группы из цикла обмена фолатов

это установление факта, что участник исследования болен шизофренией):

$$p = \frac{1}{1 + e^{-z}},$$

где $z = bX + a$.

X – значение независимой переменной, b – коэффициент, расчет которого является задачей бинарной логистической регрессии, a – константа.

Если для p установлено значение меньше 0.5, то можно предположить, что событие не наступит (участник исследования здоров); в противном случае предполагается наступление события (участник исследования болен).

Таблица 2. Распределение генотипов изученных SNP среди пациентов и здоровых добровольцев

Ген, генотипы	Пациенты, *N* (частота); соответствие распределения закону Харди–Вайнберга	Здоровые, *N* (частота); соответствие распределения закону Харди–Вайнберга	Различия частот между пациентами и здоровыми
GCH1-1			
CC	41 (0.36)	28 (0.45)	$Chi^2 = 1.68$; $p = 0.43$
CT	17 (0.15)	9 (0.15)	
TT	57 (0.49)	25 (0.40)	
	$Chi^2 = 56.11$; $p = 0.000$	$Chi^2 = 31.16$; $p = 0.000$	
GCH1-2			
CC	82 (0.71)	44 (0.71)	$Chi^2 = 0.18$; $p = 0.92$
CT	31 (0.27)	17 (0.27)	
TT	3 (0.026)	1 (0.016)	
	$Chi^2 = 0.0012$; $p = 0.99$	$Chi^2 = 0.19$; $p = 0.91$	
FOLH1			
TT	40 (0.34)	29 (0.47)	$Chi^2 = 2.80$; $p = 0.25$
TC	64 (0.55)	29 (0.47)	
CC	12 (0.10)	4 (0.065)	
	$Chi^2 = 3.42$; $p = 0.18$	$Chi^2 = 0.85$; $p = 0.65$	
RFC1			
GG	40 (0.34)	21 (0.34)	$Chi^2 = 0.087$; $p = 0.96$
GA	52 (0.45)	27 (0.44)	
AA	24 (0.21)	14 (0.23)	
	$Chi^2 = 0.86$; $p = 0.65$	$Chi^2 = 0.86$; $p = 0.65$	
DHFR			
CC	80 (0.69)	35 (0.56)	$Chi^2 = 2.91$; $p = 0.23$
CA	28 (0.24)	22 (0.35)	
AA	8 (0.069)	5 (0.08)	
	$Chi^2 = 5.35$; $p = 0.069$	$Chi^2 = 0.33$; $p = 0.85$	
MTHFD1			
CC (*GG*)	44 (0.38)	13 (0.21)	$Chi^2 = 8.08$; $p = 0.018$
CT (*GA*)	43 (0.37)	22 (0.35)	
TT (*AA*)	29 (0.25)	27 (0.44)	
	$Chi^2 = 7.02$; $p = 0.030$	$Chi^2 = 3.94$; $p = 0.14$	
MTHFR1			
CC	68 (0.58)	32 (0.52)	$Chi^2 = 0.70$; $p = 0.71$
CT	41 (0.35)	25 (0.40)	
TT	8 (0.068)	5 (0.081)	
	$Chi^2 = 0.28$; $p = 0.87$	$Chi^2 = 0.0014$; $p = 0.99$	
MTHFR2			
AA	54 (0.47)	24 (0.39)	$Chi^2 = 1.73$; $p = 0.42$
AC	39 (0.34)	27 (0.44)	
CC	23 (0.20)	11 (0.18)	
	$Chi^2 = 8.83$; $p = 0.012$	$Chi^2 = 0.49$; $p = 0.78$	
MTR			
AA	44 (0.38)	24 (0.39)	$Chi^2 = 1.85$; $p = 0.40$
AG	30 (0.26)	21 (0.34)	
GG	42 (0.36)	17 (0.27)	
	$Chi^2 = 27.0$; $p = 0.000$	$Chi^2 = 6.11$; $p = 0.047$	

Таблица 2. Окончание

Ген, генотипы	Пациенты, *N* (частота); соответствие распределения закону Харди–Вайнберга	Здоровые, *N* (частота); соответствие распределения закону Харди–Вайнберга	Различия частот между пациентами и здоровыми
MTRR			
AA	26 (0.23)	10 (0.16)	$Chi^2 = 4.58$; $p = 0.10$
AG	53 (0.46)	39 (0.63)	
GG	36 (0.31)	13 (0.21)	
	$Chi^2 = 0.58$; $p = 0.75$	*$Chi^2 = 4.22$; $p = 0.12$*	
CBS			
TT	65 (0.57)	38 (0.63)	$Chi^2 = 1.33$; $p = 0.52$
TC	15 (0.13)	9 (0.15)	
CC	34 (0.30)	13 (0.22)	
	$Chi^2 = 58.41$; $p = 0.000$	*$Chi^2 = 24.34$; $p = 0.000$*	
NBPF			
TT	89 (0.77)	44 (0.71)	$Chi^2 = 0.87$; $p = 0.65$
TC	9 (0.078)	5 (0.08)	
CC	18 (0.16)	13 (0.21)	
	$Chi^2 = 65.58$; $p = 0.000$	*$Chi^2 = 38.20$; $p = 0.000$*	
COMT			
GG	75 (0.65)	46 (0.74)	$Chi^2 = 1.69$; $p = 0.43$
GA	5 (0.043)	2 (0.032)	
AA	36 (0.31)	14 (0.23)	
	$Chi^2 = 94.55$; $p = 0.000$	*$Chi^2 = 51.57$; $p = 0.000$*	

Примечание. $Chi^2 - \chi^2$.

Таблица 3. Классификация модели 1 (*MTHFD1*)

Наблюдаемые		Предсказанные		
		группа		процент корректных
		пациенты	здоровые	
Группа	Пациенты	116	0	100.0
	Здоровые	62	0	0.0
Общий процент				65.2

Таблица 4. Переменные в уравнении модели 1 (*MTHFD1*)

Переменная	Значение	Стандартная ошибка	Уровень значимости
b	1.148	0.414	0.006
a	–1.219	0.316	0.00012

Модель 1 "MTHFD1"

Из табл. 3 следует, что общий процент верно отнесенных к группам "пациент" и "здоровый" с помощью переменной "MTHFD1" составляет 65.2%. Однако обращает на себя внимание факт, что присутствуют 62 ложноположительных прогноза – все здоровые добровольцы были отнесены к группе "пациент". В то же время в модели отсутствуют ложноотрицательные прогнозы – все лица с диагнозом шизофрения верно отнесены к группе "пациент".

Несмотря на присутствие довольно большого количества ложноположительных случаев, все переменные в уравнении регрессии оказались статистически значимыми (табл. 4): $a = -1.219$ ($p = 0.00012$) и $b = 1.148$ ($p = 0.006$).

$z = 1.148X_{\text{MTHFD1}} - 1.219$ (модель 1 "MTHFD1").

Таблица 5. Переменные в уравнении модели 2 (*MTRR*)

Переменная	Значение	Стандартная ошибка	Уровень значимости
b	0.739	0.385	0.05
a	–1.046	0.322	0.002

Проверка модели 1 “MTHFD1”

1. Генотип *TT* (полиморфный гомозиготный) SNP *MTHFD1* (код “0”).

$z = 1.148 \times 0 - 1.219 = -1.219,$

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(-1.219)}} = 0.228.$$

Модель 1 показала, что участник изученной выборки с генотипом *TT* SNP *MTHFD1* окажется болен с малой вероятностью, равной 22.8%, соответственно здоровым – с вероятностью 77.2%.

2. Гетерозигота *CT* SNP *MTHFD1* (код “1”).

$z = 1.148 \times 1 - 1.219 = -0.071,$

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(-0.071)}} = 0.482.$$

Гетерозигота гена *MTHFD1* не дает точных указаний на отнесение испытуемого в группу “пациент” или “здоровый”, так как вероятности обоих исходов практически равны.

3. Генотип *CC* SNP *MTHFD1* (код “2”).

$z = 1.148 \times 2 - 1.219 = 1.077,$

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(1.077)}} = 0.746.$$

Носительство генотипа *CC* SNP *MTHFD1* свидетельствует о вероятности заболевания шизофренией 74.6%.

Таким образом, исходя из результатов бинарной логистической регрессии (модель 1 “MTHFD1”), наличие у испытуемого генотипа *CC* SNP *MTHFD1* свидетельствует о большой вероятности предрасположенности к шизофрении и, напротив, наличие у испытуемого генотипа *TT* SNP *MTHFD1* – об отсутствии риска заболевания.

Модель 2 “MTRR”

Таблица классификации модели 2 “MTRR” не отличается от таблицы классификации предыдущей модели. Для модели 2 также обе переменные в уравнении регрессии оказались статистически значимыми (табл. 5): $a = -1.046$ ($p = 0.002$) и $b = 0.739$ ($p = 0.05$).

$z = 0.739X_{\text{MTRR}} - 1.046$ (модель 2 “MTRR”).

Проверка модели 2 “MTRR”

1. Генотип *AA* SNP *MTRR* (код “0”).

$z = 0.739 \times 0 - 1.046 = -1.046,$

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(-1.046)}} = 0.26.$$

Модель 2 показала, что участник выборки с генотипом *AA* SNP *MTRR* окажется больным шизофренией с малой вероятностью, равной 26%, соответственно здоровым – с вероятностью 74%.

2. Гетерозигота *AG* SNP *MTRR* (код “1”).

$z = 0.739 \times 1 - 1.046 = -0.307,$

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(-0.307)}} = 0.424.$$

Гетерозигота SNP MTRR также не дает точных указаний на отнесение испытуемого в группу “пациент” или “здоровый”, так как вероятности обоих исходов практически равны.

3. Генотип *GG* SNP *MTRR* (код “2”).

$z = 0.739 \times 2 - 1.046 = 0.432,$

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(0.432)}} = 0.606.$$

Носительство генотипа *GG* SNP *MTRR* свидетельствует, что участник выборки окажется болен с вероятностью 60.6%, величина которой не является основанием для отнесения испытуемого в ту или иную группу.

Таким образом, исходя их результатов бинарной логистической регрессии (модель 2 “MTRR”), наличие у испытуемого генотипа *AA* SNP *MTRR* свидетельствует о большой вероятности отсутствия предрасположенности к шизофрении. Однако наличие гетерозиготы и генотипа *GG* не позволяет сделать точный прогноз.

Модель 3 “MTHFD1 + MTRR”

На основании ранее построенных моделей было принято решение использовать в модели 3 сразу две переменные: *MTHFD1* и *MTRR* (табл. 6).

Совместное использование переменных MTHFD1 и MTRR в регрессионном анализе несколько повышает общий процент корректных предсказаний за счет увеличения вероятности отнесения пациентов в группу “здоровых”.

В данной части исследования все переменные также оказались статистически значимыми: $a = -1.661$ ($p = 0.00014$), $b1 = 1.204$ ($p = 0.004$) и $b2 = 0.762$ ($p = 0.05$) (табл. 7).

$z = 1.204X_{\text{MTHFD1}} + 0.395X_{\text{MTRR}} - 1.661$ (модель 3 “MTHFD1 + MTRR”).

Таблица 6. Классификация *MTHFD1* + *MTRR*

Наблюдаемые		Предсказанные		
		группа		процент корректных
		пациенты	здоровые	
Группа	Пациенты	102	13	88.7
	Здоровые	47	15	24.2
Общий процент				66.1

Таблица 7. Переменные в уравнении модели 3 (“MTHFD1 + MTRR”)

Переменная	Значение	Стандартная ошибка	Уровень значимости
b1 (для MTHFD1)	1.204	0.422	0.004
b2 (для MTRR)	0.762	0.395	0.05
a	–1.661	0.436	0.00014

Проверка модели 3 “MTHFD1 + MTRR”

1. Генотип *TT* SNP *MTHFD1* (код “0”) + генотип *AA* SNP *MTRR* (код “0”).

$z = 1.204 \times 0 + 0.762 \times 0 - 1.661 = -1.661,$

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(-1.661)}} = 0.16.$$

Модель 3 показала более высокую точность отнесения испытуемого с кодом “0” по обоим генам к группе “здоровых” – 84% (сочетанное носительство генотипов *MTHFD1 TT* и *MTRR AA*).

2. Гетерозигота *CT* SNP *MTHFD1* (код “1”) и гетерозигота *AG* SNP *MTRR* (код “1”).

$z = 1.204 \times 1 + 0.762 \times 1 - 1.661 = -0.305,$

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(-0.305)}} = 0.575.$$

Как и в предыдущих моделях, гетерозиготы *MTHFD1* и *MTRR* не дают точных указаний на отнесение испытуемого в группу “пациент” или “здоровый”, так как вероятности обоих исходов практически равны.

3. Генотип *CC* SNP *MTHFD1* (код “2”) + генотип *GG* SNP *MTRR* (код “2”).

$z = 1.204 \times 2 + 0.762 \times 2 - 1.661 = 2.271,$

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(2.271)}} = 0.906.$$

Совместное определение генотипов с кодом “2” SNP *MTHFD1* и *MTRR* (сочетанное носительство генотипов *MTHFD1 CC* и *MTRR GG*) свидетельствует, что испытуемый окажется болен с вероятностью 90.6% и соответственно здоров – с вероятностью 9.4%.

Однако интерес представляет и оценка вклада в прогноз других комбинаций аллелей генов *MTHFD1* и *MTRR* в генотипе пациента.

4. Генотип *TT* SNP *MTHFD1* (код “0”) + гетерозигота *AG MTRR* (код “1”).

$z = 1.204 \times 0 + 0.762 \times 1 - 1.661 = -0.899,$

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(-0.899)}} = 0.289.$$

Комбинация генотипа *TT* SNP *MTHFD1* и гетерозиготы *AG* SNP *MTRR* свидетельствует о вероятности 71.1% отсутствия шизофрении у испытуемого.

5. Генотип *CC* SNP *MTHFD1* (код “2”) + гетерозигота *AG MTRR* (код “1”).

$z = 1.204 \times 2 + 0.762 \times 1 - 1.661 = 1.509,$

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(1.509)}} = 0.819.$$

Комбинация генотипа *CC* SNP *MTHFD1* и гетерозиготы *MTRR* свидетельствует о вероятности шизофрении у испытуемого 81.9%.

6. Генотип *TT* SNP *MTHFD1* (код “0”) + генотип *GG* SNP *MTRR* (код “2”).

$z = 1.204 \times 0 + 0.762 \times 2 - 1.661 = -0.137,$

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(-0.137)}} = 0.465.$$

Комбинация генотипа *TT* SNP *MTHFD1* и генотипа *GG* SNP *MTRR* также не дает точных указаний на отнесение испытуемого в группу “пациент” или “здоровый”.

Таким образом, исходя их результатов бинарной логистической регрессии (модель 3 “MTHFD1 + + MTRR”), совместное наличие у испытуемого генотипов *TT MTHFD1* и *AA MTRR*, а также генотипа *TT MTHFD1* и гетерозиготы *MTRR* свидетельствует о большой вероятности отсутствия предрасположенности к шизофрении. Напротив, совместное

определение генотипов *CC MTHFD1* и *GG MTRR*, а также генотипа *CC MTHFD1* и гетерозиготы *MTRR* может свидетельствовать о предрасположенности к шизофрении с высокой вероятностью.

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно полученным результатам, на основании оценки вклада 13 генетических локусов, влияющих на обмен птеринов, с помощью метода бинарной логистической регрессии было выделено два локуса, оказывающих статистически значимый вклад в риск развития шизофрении, – *MTHFD1* и *MTRR*. При этом наиболее изученный в плане риска развития шизофрении SNP фолатного цикла MTHFR 677C>T, исходя из проведенного анализа, не оказывает статистически значимого вклада в риск развития заболевания. На наш взгляд, это обусловлено относительно малым объемом выборки. Тем не менее два из изученных локусов в значительной степени ассоциированы с риском развития изучаемого заболевания в данной выборке, что позволило построить математическую модель для оценки риска шизофрении у носителей различных аллелей данных SNP.

В соответствии с распределением частот генотипов у пациентов и здоровых добровольцев и разработанной математической моделью SNP *MTHFD1* оказывает вклад в риск развития шизофрении, на первый взгляд, парадоксальным образом: у носителей полиморфных (низкофункциональных) аллелей риск шизофрении ниже, чем у носителей нормальных (“диких”) аллелей. Данный парадокс был проанализирован ранее в опубликованной нами статье [16], наиболее вероятным объяснением является то, что у носителей полиморфных аллелей данного SNP уровень 5-метилфолата повышается за счет снижения расхода фолатов в смежном цикле синтеза пуринов, который осуществляется при участии фермента MTHFD1. Таким образом снижение функции MTHFD1 приводит к сниженному расходу фолатов на синтез нуклеиновых оснований, повышается уровень 5-метилфолата, необходимого для процессов метилирования. Гипометилирование, в том числе превращение гомоцистеина в метионин, в настоящее время рассматривается как один из наиболее вероятных этиопатогенетических молекулярных механизмов шизофрении при нарушении обмена фолатов [18]. Напротив, повышенный синтез нуклеиновых кислот и снижение уровня 5-MTHF рассматривается как фактор, повышающий риск психоза [18].

Второй из 13 локусов, который включен в разработанную нами математическую модель в связи с наличием статистически значимого вклада в вероятный риск шизофрении, – SNP фермента MTRR. Последний принимает непосредственное участие в метилировании гомоцистеина в метионин, и именно носительство полиморфного аллеля в гомозиготной форме, при котором снижена функция этого фермента, повышает риск шизофрении.

Учитывая, что оба генетических фактора, влияние которых на риск шизофрении оказалось значимым в разработанной модели, гипотетически влияют на один и тот же молекулярный механизм, а именно метилирование, в том числе гомоцистеина в метионин, актуальным представляется дальнейшее изучение роли этого биохимического процесса в этиопатогенезе шизофрении. Роль метилирования в этиопатогенезе шизофрении может быть связана с синтезом и утилизацией моноаминов при участии S-аденозилметионина, с гипометилированием ДНК и эпигенетическими нарушениями, с посттрансляционной модификацией белков и ферментов, что приводит к изменениям их функции. При этом важным с практической точки зрения моментом является возможность восполнения дефицита метильных групп при дефиците метилирования, в том числе генетически обусловленном, с помощью применения метилфолата и/или метилкобаламина.

Разработанная модель построена на относительно малой выборке пациентов и здоровых добровольцев из одного региона России, что ограничивает возможность ее широкого применения. На наш взгляд, модель, построенная только на двух полиморфных локусах, не может применяться для прогнозирования риска шизофрении у субъектов из общей популяции, и тем более не может применяться для диагностики шизофрении – полигенного расстройства со сложными механизмами патогенеза, единственно верным способом диагностики которого на данный момент времени является клинический психопатологический метод. Однако разработанная модель может иметь ценность при применении в клинике первого психотического эпизода, а также у пациентов с состояниями высокого риска по развитию шизофрении. Значимость данной модели заключается не только в оценке риска развития шизофрении при наличии аллелей/генотипов риска, а в возможности следующим этапом провести оценку биохимических показателей фолатного обмена (уровня фолатов, гомоцистеина плазмы) и провести персонифицированную коррекцию биохимических нарушений фолатного обмена. Подходы с применением фолатов уже изучались ранее при шизофрении: продемонстрирован их эффект в коррекции негативных симптомов и когнитивных нарушений при шизофрении [19, 20]. Преимущества оценки генетических маркеров методом ПЦР заключаются, во-первых, в дешевизне метода по сравнению с био-

химическим скринингом, а во-вторых, в стабильности изучаемых показателей. Уровни фолатов/гомоцистеина плазмы/сыворотки крови являются нестабильными биохимическими показателями, которые в значительной степени колеблются под влиянием диеты, приема витаминов, антиоксидантов, сезона года, курения, употребления алкоголя, кофеина и множества других факторов образа жизни. Генетические маркеры являются надежными переменными, которые не меняются у носителя под влиянием внешних обстоятельств. Возможность снижения риска развития шизофрении у субъектов высокого риска путем персонифицированной коррекции биохимических нарушений на основе генетического скрининга до настоящего времени не изучалась, в связи с чем является актуальной задачей следующего этапа данного исследования.

Ограничения исследования

Данная математическая модель построена на анализе статистики распределения аллелей изученных локусов среди пациентов с шизофренией и здоровых добровольцев, что является весьма механистическим подходом, не учитывающим возможный компенсирующий/декомпенсирующий эффект ряда сочетаний полиморфизма ферментов фолатного обмена на функциональном уровне (комплементарности, эпистаза, полимерии), что требует дополнительного анализа [21]. Оценка взаимодействия генетических факторов фолатного обмена требует дополнительного анализа их суммарного влияния на биохимические показатели, что позволит выявить эффекты взаимодействия генов, что будет выполнено на дальнейших этапах исследования.

Ограничением данного исследования является также то, что изучены только 13 локусов, при том что к настоящему времени по результатам GWAS число SNP, влияющих на фолатный обмен, гораздо больше [11]. По отдельным из изученных локусов распределение аллелей и генотипов не соответствует закону Харди–Вайнберга, что может рассматриваться как признак нарушений генотипирования. Однако закон Харди–Вайнберга действует в идеальной бесконечно большой популяции, не подвергающейся отбору, что не применимо к изученной малой выборке [22]. Наконец, малый объем изученной выборки возможно не позволил выявить статистически значимые различия в частотах аллелей/генотипов между пациентами и здоровыми по другим локусам, кроме двух, включенных в модель. Тем не менее это не отменяет возможность использования разработанной модели, которую можно дополнять генотипированием локуса *MTHFR* 677C>T, по обширным данным литературы также влияющего на риск шизофрении за счет снижения метилирования, что может являться дополнительным аргументом в пользу применения метилфолата среди субъектов высокого риска по развитию шизофрении.

Перспективы дальнейших исследований

Дальнейшим этапом данного исследования могло бы стать тестирование разработанной модели в популяции высокого риска по развитию шизофрении, однако из-за этических соображений это не представляется возможным (субъектам высокого риска по данной модели назначение фолатов, особенно метилфолата, может дать протективный эффект в отношении заболевания шизофренией, поэтому оставлять их без коррекции нарушений фолатного обмена неэтично). Целесообразной представляется дальнейшая апробация разработанной модели в популяции лиц высокого риска по развитию шизофрении совместно с биохимическим скринингом и коррекцией биохимических нарушений для снижения риска развития у участников исследования манифестной формы шизофрении.

В рамках проведенного исследования разработана математическая модель прогнозирования риска развития шизофрении на основе оценки носительства аллелей двух генетических локусов, влияющих на фолатный обмен. Применение данной модели целесообразно в рутинной психиатрической практике среди лиц высокого риска по развитию шизофрении. Для подтверждения возможности снижения риска развития шизофрении с помощью биохимической коррекции нарушений обмена фолатов у носителей генотипов высокого риска по изученным локусам требуются дальнейшие исследования.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-015-00301_А.

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. *Wang D., Zhai J.X., Liu D.W.* Serum folate levels in schizophrenia: a meta-analysis // Psych. Res. 2016. V. 235. P. 83–89. https://doi.org/10.1016/j.psychres.2015.11.045
2. *Ayesa-Arriola R., Pérez-Iglesias R., Rodríguez-Sánchez J.M. et al.* Homocysteine and cognition in first-episode psychosis patients // Eur. Arch. Psych. Clin. Neurosci. 2012. V. 262. № 7. P. 557–564. https://doi.org/10.1007/s00406-012-0302-2
3. *Numata S., Kinoshita M., Tajima A. et al.* Evaluation of an association between plasma total homocysteine and schizophrenia by a Mendelian randomization analysis // BMC Med. Genet. 2015. V. 16. № 1. P. 54. https://doi.org/10.1186/s12881-015-0197-7
4. *Nishi A., Numata S., Tajima A. et al.* Meta-analyses of blood homocysteine levels for gender and genetic association studies of the MTHFR C677T polymorphism in schizophrenia // Schizophrenia Bull. 2014. V. 40. № 5. P. 1154–1163. https://doi.org/10.1093/schbul/sbt154
5. *Zhang Y., Hodgson N.W., Trivedi M.S. et al.* Decreased brain levels of vitamin B12 in aging, autism and schizophrenia // PLoS One. 2016. V. 11. № 1. P. E0146797. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146797
6. *Klaus F., Guetter K., Schlegel R. et al.* Peripheral biopterin and neopterin in schizophrenia and depression // Psych. Res. 2021. V. 297. P. 113745. https://doi.org/10.1016/j.psychres.2021.113745
7. *Yadav U., Kumar P., Gupta S., Rai V.* Role of MTHFR C677T gene polymorphism in the susceptibility of schizophrenia: An updated meta-analysis // As. J. Psych. 2016. V. 20. P. 41–51. https://doi.org/10.1016/j.ajp.2016.02.002
8. *Kempisty B., Sikora J., Lianeri M. et al.* MTHFD 1958G>A and MTR 2756A>G polymorphisms are associated with bipolar disorder and schizophrenia // Psych. Genet. 2007. V. 17. № 3. P. 177–181. https://doi.org/10.1097/YPG.0b013e328029826f
9. *Lajin B., Alhaj Sakur A., Michati R., Alachkar A.* Association between MTHFR C677T and A1298C, and MTRR A66G polymorphisms and susceptibility to schizophrenia in a Syrian study cohort // As. J. Psych. 2012. V. 5. № 2. P. 144–149. https://doi.org/10.1016/j.ajp.2012.03.002
10. *Clelland J.D., Read L.L., Smeed J., Clelland C.L.* Regulation of cortical and peripheral GCH1 expression and biopterin levels in schizophrenia-spectrum disorders // Psych. Res. 2018. V. 262. P. 229–236. https://doi.org/10.1016/j.Psychres.2018.02.020
11. *Жиляева Т.В., Сергеева А.В., Благонравова А.С. и др.* Нарушения одноуглеродного метаболизма при шизофрении: генетические и терапевтические аспекты // Нейрохимия. 2019. Т. 36. № 2. С. 91–100. https://doi.org/10.1134/S1027813319020158
12. *Yang B., Liu Y., Li Y. et al.* Geographical distribution of MTHFR C677T, A1298C and MTRR A66G gene polymorphisms in China: Findings from 15357 adults of Han nationality // PLoS One. 2013. V. 8. № 3. P. E57917. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057917
13. *Binia A., Contreras A.V., Canizales-Quinteros S. et al.* Geographical and ethnic distribution of single nucleotide polymorphisms within genes of the folate/homocysteine pathway metabolism // Genes & Nutr. 2014. V. 9. № 5. P. 421. https://doi.org/10.1007/s12263-014-0421-7
14. *Yao X., Glessner J.T., Li J. et al.* Integrative analysis of genome-wide association studies identifies novel loci associated with neuropsychiatric disorders // Transl. Psych. 2021. V. 11. № 1. P. 69. https://doi.org/10.1038/s41398-020-01195-5
15. *Moruzzi S., Guarini P., Udali S. et al.* One-carbon genetic variants and the role of *MTHFD1* 1958G>A in liver and colon cancer risk according to global DNA methylation // PLoS One. 2017. V. 12. № 10. P. e0185792. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185792
16. *Zhilyaeva T.V., Chekanina O.M., Blagonravova A.S. et al.* Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-1 (MTHFD1) 1958G>A genetic polymorphism (rs2236225) is associated with lower schizophrenia risk: Preliminary study // Gene Rep. 2022. V. 27. P. 101625. https://doi.org/10.1016/j.genrep.2022.101625
17. *Roffman J.L., Brohawn D.G., Nitenson A.Z. et al.* Genetic variation throughout the folate metabolic pathway influences negative symptom severity in schizophrenia // Schiz. Bull. 2011. V. 39. № 2. P. 330–338. https://doi.org/10.1093/schbul/sbr150
18. *Wan L., Li Y., Zhang Z. et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase and psychiatric diseases // Transl. Psych. 2018. V. 8. № 1. P. 242. https://doi.org/10.1038/s41398-018-0276-6
19. *Roffman J.L., Lamberti J.S., Achtyes E. et al.* Randomized multicenter investigation of folate plus vitamin B12 supplementation in schizophrenia // Jama Psych. 2013. V. 70. № 5. P. 481. https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2013.900
20. *Жиляева Т.В., Благонравова А.С., Мазо Г.Э.* Влияние разных форм фолатов на когнитивные функции у больных хронической шизофренией // Журн. неврол. и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2020. Т. 120. № 9. С. 87–92. https://doi.org/10.17116/jnevro202012009187
21. *Htun N.C., Miyaki K., Zhao C. et al.* Epistasis effects of COMT and MTHFR on inter-individual differences in mental health: Under the inverted U-shaped prefrontal dopamine model // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2014. V. 451. № 4. P. 574–579. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.08.023
22. *Галинская Т.В., Щепетов Д.М., Лысенков С.Н.* Предубеждения о микросателлитных исследованиях и как им противостоять // Генетика. 2019. Т. 55. № 6. С. 617–632. https://doi.org/10.1134/S0016675819060043

Mathematical Model Development for Schizophrenia Risk Prediction Based on Assessment of Polymorphic Alleles Carriage in 13 Genetic Loci Affecting Pterin Metabolism

T. V. Zhilyaeva[a, b, *], A. P. Bavrina[a], E. D. Kasyanov[b], A. S. Blagonravova[a], and G. E. Mazo[b]

[a] *Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, 603005 Russia*

[b] *Bekhterev National Research Medical Center Psychiatry and Neurology, St. Petersburg, 192019 Russia*

**e-mail: bizet@inbox.ru*

Real-time PCR was used to analyze the carriage of alleles in 13 genetic loci that affect pterin metabolism in 116 patients with schizophrenia and 62 healthy volunteers. To analyze the accuracy of predicting the risk of schizophrenia, we used the binary logistic regression method with the assessment of the contribution of all studied loci. Results: A mathematical model was developed that makes it possible to predict the risk of schizophrenia manifestation in a carrier of the combination of genotypes *MTHFD1* 1958*CC*/*MTRR* 66*GG* with a probability of 90.6%, *MTHFD1* 1958*CC*/*MTRR*66*AG* with a probability of 81.9%. The use of this model is expedient in routine psychiatric practice among individuals at high risk of schizophrenia manifestation after replication in other samples and obtaining a larger volume of observations.

Keywords: single nucleotide polymorphism, schizophrenia, pterins, folates, methylation.

ГЕНЕТИКА, 2023, том 59, № 5, с. 584–600

МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ И МЕТОДЫ

УДК 343.98+575.174:599.742.1

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДНК-ИДЕНТИФИКАЦИИ ОСОБЕЙ ВИДА ЕНОТОВИДНАЯ СОБАКА

© 2023 г. А. Е. Гребенчук[1], *, О. Н. Лукашкова[2], С. А. Котова[2], И. С. Цыбовский[3]

[1]Государственный комитет судебных экспертиз Республики Беларусь, Минск, 220073 Республика Беларусь

[2]Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь, Минск, 220114 Республика Беларусь

[3]Республиканское унитарное предприятие "БелЮрОбеспечение", Минск, 220069 Республика Беларусь

**e-mail: iamsanya94@mail.ru*

Поступила в редакцию 04.08.2022 г.
После доработки 23.08.2022 г.
Принята к публикации 09.09.2022 г.

По результатам исследования полиморфизма 39 микросателлитных (STR) локусов и трех локусов половой принадлежности, специфичных к различным видам семейства псовые, с целью ДНК-идентификации биологических образцов животных вида енотовидная собака (*Nyctereutes procyonoides*) предложена тест-система NPlex, включающая 14 аутосомных STRs и два половых локуса. Тест-система валидирована для решения экспертных задач по установлению принадлежности биологических следов, обнаруженных на местах правонарушений (следов крови и выделений, фрагментов мышечных или костных тканей, дермы и волос и т.п.), конкретной особи животного вида енотовидная собака, а также для установления биологического родства животных данного вида. Валидационные мероприятия проведены в соответствии с протоколом Scientific Working Group on DNA Analysis Methods.

Ключевые слова: микросателлиты, идентификация, семейство псовые, криминалистика, незаконная охота.

DOI: 10.31857/S0016675823050065, **EDN:** FNOVHT

Вид енотовидная собака (*Nyctereutes procyonoides*) является самым неизученным в семействе псовые. Доступна информация о нескольких группах исследователей [1–4], которые занимаются выявлением индивидуальных генетических характеристик этого вида животных. Поскольку данный вид псовых лидирующий распространитель таких заболеваний как бешенство и чесотка, основное внимание ученых направлено именно на исследования зоонозных инфекций у вида [5–8].

Вид енотовидная собака в начале XX в. обитал только на Дальнем Востоке и включал пять подвидов: *Nyctereutes procyonoides procyonoides* (обитал в Китае и Северном Вьетнаме); *N. p. orestes* (населял горную область Китая); *N. p. ussuriensis* (был распространен в большинстве регионов Сибири и Восточного Китая); *N. p. koreensis* и *N. p. viverrinus* (обитали на территории Кореи и Японии соответственно) [9]. В Беларуси енотовидная собака была интродуцирована в 1936 г. (Гомельская, Минская и Витебская области) [10]. Но уже до этого времени на территории республики встречались единичные особи енотовидной собаки, мигрировавшие из соседних областей России, в которых их интродукция была проведена раньше [11]. Енотовидная собака в Беларуси является ненормируемым охотничьим видом, охота на которого разрешена весь год. Однако отстрел данного животного без охотничьей путевки или в заповедниках классифицируется как факт незаконной охоты, что приводит к возбуждению уголовных дел и, как следствие, к назначению судебных экспертиз. Численность енотовидной собаки на территории страны в 2020 г. составляла около 15000 особей, из которых 5500 особей (около 40% численности) были добыты в ходе плановых охотничьих мероприятий [12].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования и выделение ДНК

Для изучения STR-полиморфизма вида енотовидная собака было исследовано 165 образцов мышечной и хрящевой ткани и образцов шерсти животных (73 биологических образца самцов и 92 самок). Коллекция образцов диких животных была законно сформирована при содействии ГУ "Полесский государственный радиационно-эко-

логический заповедник", а также в сотрудничестве с РГОО "Белорусское общество охотников и рыболовов".

ДНК из биологических образцов выделяли по методике, основанной на высвобождении ДНК в ходе инкубации образцов биологического материала в лизирующем буфере 20 мМ Tris-HCl, pH 8.0, содержащем 2% SDS, 100 мМ NaCl, 20 мМ EDTA, с протеиназой K и 0.01 мМ дитиотрейтолом, при 37–56°C и периодическом встряхивании. Лизат мышечной и хрящевой ткани подвергали общепринятой процедуре очистки на силикагеле [13]. Определение количества выделенной ДНК проводили методом спектрофотометрии с использованием прибора для измерения концентрации общей фракции ДНК для микрообъемов объектов исследования DS-11 (DeNovix, США) согласно рекомендациям производителя.

Дизайн тест-системы, амплификация микросателлитных локусов и генотипирование

С целью разработки тест-системы для криминалистической ДНК-идентификации животных биологического вида енотовидная собака проведено исследование полиморфизма 39 STR-локусов и трех локусов половой принадлежности. Подробный перечень локусов указан в табл. S1 Приложения.

В процессе оптимизации условий протекания амплификации исследовали специфичность и интенсивность выявления аллелей в зависимости от значений концентрации ионов Mg^{2+}, температуры отжига и концентрации праймеров, количества и качества ДНК, с использованием различных стабилизаторов полимеразы (Triton X-100, Tween-20, BSA, TMGNa, DMSO) в изменяющихся количествах, а также с ДНК-полимеразами различных типов и производителей. В результате конечный состав реакционной смеси общим объемом 10 мкл составил: 10 мМ Tris-HCl, pH 8.6; 25 мМ KCl; 2.0 мМ $MgCl_2$; 0.2 мМ каждого из dNTP; 0.2–1.0 мкМ каждого из пары праймеров; 0.15 ед. активности ДНК-полимеразы; 1.5 нг/мкл БСА (бычий сывороточный альбумин); 0.02% Triton X-100 и 1–20 нг анализируемой ДНК.

При разработке тест-системы NPlex амплификацию проводили на программируемых приборах термоциклического типа "C1000" (BioRad, США) в следующих условиях: 10 мин инициальной инкубации при 95°C; 30× [30 с при 95°C, 40 с при 60°C и 60 с при 72°C] с финальным этапом элонгации в течение 30 мин при 72°C.

Характерное для каждого из образцов сочетание аллелей выявляли путем электрофоретического разделения продуктов ПЦР в генетическом анализаторе 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Определение размеров выявленных аллелей (в пн) и соответствующих генотипов ДНК в исследуемых локусах проводили с использованием внутренних стандартов размера Orange 500 bp (NimaGen®, Нидерланды) и GeneScan-600 LIZ™ SizeStandard v2.0 (ThermoFisher Scientific, США), а также программного пакета GeneMapper ID-X v1.6.

Секвенирование аллелей локусов

Для выявления возможных изоаллелей и микровариантов последовательности, а также для тандемного исчисления аллелей тест-системы проводили определение первичной структуры аллелей путем секвенирования методом обрыва цепи. Нуклеотидные последовательности аллелей каждого из STR-локусов и локусов половой принадлежности особей вида енотовидная собака определяли в прямом и обратном направлении. Секвенирование проводили на приборе 3500 Genetic Analyzer с использованием набора для секвенирования BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) и BrilliantDye™ Terminator kit v.3.1 (NimaGen®). Полученные результаты анализировали с помощью пакета программ Sequencing Analysis Software v.5.4 (Applied Biosystems). Сравнительный анализ последовательностей аллелей исследованных локусов у целевых видов и видов-источников проводили на основе ресурсов базы данных нуклеотидных последовательностей GenBank [14] и программного продукта BioEdit v7.0.5.3 [15]. Последовательности каждого локуса тест-системы NPlex, имеющие минимальный и максимальный молекулярный размер аллелей, были внесены в базу данных GenBank с присвоением соответствующих номеров доступа, которые указаны в табл. S2 Приложения.

Статистическая обработка результатов

Основной анализ генетического разнообразия, а именно выявление уровня полиморфизма, расчет частот встречаемости аллелей, значения наблюдаемой (H_O) и ожидаемой (H_E) гетерозиготности, оценку соответствия равновесию Харди–Вайнберга (*HWE*) и оценку сцепления локусов проводили с использованием программных пакетов GenAlEx v6.5 [16] и Arlequin v3.5.1.3 [17]. Установление возможных ошибок в интерпретации генетических профилей локусов с интенсивными статтер-фрагментами, при выпадении аллелей, при наличии "нуль"-аллелей или других возможных артефактов ПЦР проводили с помощью программ MicroChecker v2.2.1 [18] и Cervus v3.0.7 [19].

Кластерный анализ массива генотипов выборки енотовидной собаки, полученного с разработанной тест-системой, оценивали с использованием программы Structure v2.3.4 [20, 21].

Криминалистические параметры отобранных микросателлитных локусов (расчет *PIC*, вероятностей случайного совпадения генотипов для неродственных особей и для сибсов, частоты встречаемости определенного генотипа) были рассчитаны с помощью программных продуктов GenAlEx v6.5 и Cervus v3.0.7. Конвертацию массивов генотипов енотовидной собаки в генетические файлы вышеперечисленных программ проводили с использованием вспомогательного компонента PGDSpider [22].

Валидационные мероприятия

Процесс апробации и оптимизации условий использования тест-системы был направлен на достижение высокого уровня специфичности амплификации, оптимальной интенсивности выявления флуорофоров маркера и заключался в подборе температуры отжига праймеров, концентрации праймеров и их соотношения в системе, а также количества ДНК в пробе.

Валидационные мероприятия проведены в соответствии с протоколом Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDAM) и включали в себя: исследование работоспособности тест-системы как с коммерческими наборами реагентов различных производителей (ThermoFisher Scientific, США, ОДО “Праймтех”, РБ; ООО “Синтол”, РФ; ЗАО “Евроген”, РФ; ООО “АртБиоТех”, РБ; BioRad, США), так и с реакционными смесями лабораторного приготовления, а также тестирование разработанной системы на повторяемость, воспроизводимость, специфичность, анализ смесей, чувствительность и устойчивость. Анализ результатов валидационных мероприятий проводили с помощью программного обеспечения GeneMapper ID-X v1.4 (ThermoFisher Scientific).

Повторяемость. С целью оценки повторяемости получения результатов с использованием тест-системы NPlex контрольные образцы ДНК были амплифицированы 16 раз с последующим анализом результатов генотипирования.

Воспроизводимость. Оценена вариабельность получения результатов с использованием тест-системы NPlex между операторами, временными интервалами (сутки) и используемыми приборами. Каждый оператор независимо соблюдал протокол в отдельные дни и с использованием разного оборудования.

Специфичность. В рамках анализа специфичности оценена перекрестная применимость данной системы на матрицах ДНК других представителей семейства псовые. Также для валидации тест-системы NPlex по аналитической специфичности проведена проверка возможности отжига различных комбинаций праймеров, использованных в тест-системе, на матрицах ДНК других представителей класса млекопитающие. Анализ проводили с использованием базы нуклеотидных последовательностей GenBank и программного продукта Primer-BLAST.

Анализ смесей. С использованием предлагаемой тест-системы были проанализированы образцы, содержащие смесь биологического материала различных особей енотовидной собаки, а также образцы, содержащие смесь ДНК енотовидной собаки и ДНК другого представителя семейства псовые, в различных соотношениях компонентов смеси. Соотношения смесей были следующими: 1 : 1, 1 : 2, 1 : 5, 1 : 15 и 1 : 30, причем мужской образец был второстепенным компонентом.

Чувствительность. Во время валидационных и контрольных исследований тест-система NPlex была проанализирована с использованием мартиц ДНК в разном количестве (0.1, 0.5, 1, 2, 3, 5, 10, 20 нг) и различного качества (ДНК с различным индексом деградации).

Устойчивость. В рамках валидационных мероприятий продемонстрирована устойчивость результатов, полученных с помощью тест-системы NPlex, с использованием образца контрольной ДНК енотовидной собаки. Амплификацию контрольного образца ДНК с ипользованием тест-системы NPlex проводили при 20, 25, 30, 35 и 40 циклах ПЦР в трех повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Конструирование мультиплексной тест-системы

Уже на первоначальном этапе исследования пять микросателлитных локусов были исключены из последующего анализа по причине отсутствия специфической амплификации (табл. S1 Приложения). На втором этапе оценивался уровень полиморфизма отобранных 34 локусов и их способность к амплификации в мультиплексной системе. Локусы с мономорфным проявлением признака, высокой интенсивностью статтер-фрагментов или препятствующие мультиплексированию были удалены из последующего анализа.

Исключения составили два локуса *vWF.x* и *Nyct10*, у которых были выявлены один и два аллеля соответственно. Аллели локуса *vWF.x* содержат в своей структуре гексануклеотидные тандемные повторы. У енотовидной собаки, лисицы обыкновенной и песца обыкновенного локус имеет мономорфное выявление, у собак и волков – полиморфное. Локус *Nyct10* у лисицы обыкновенной проявляется мономорфно, у енотовидной собаки – полиморфно, а у волка, собаки и песца локус не амплифицируется.

Поскольку в Беларуси объектами незаконной охоты могут быть все вышеперечисленные дикие виды животных, а охоту на енотовидную собаку нередко проводят с использованием охотничьих

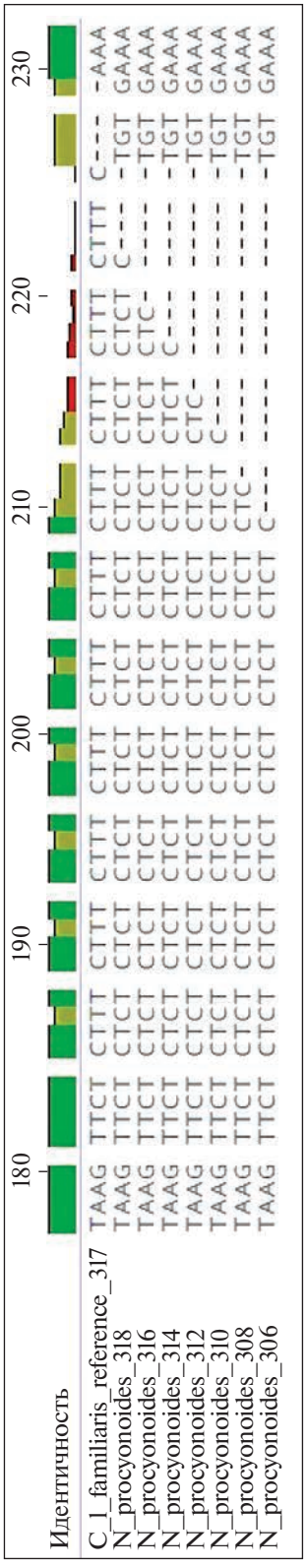


Рис. 1. Участок последовательности локуса *FH2361* у собаки домашней (на рисунке C_l_familiaris_reference_317) и у енотовидной собаки (на рисунке N_procyonoides_318, N_procyonoides_316, N_procyonoides_314, N_procyonoides_312, N_procyonoides_310, N_procyonoides_308, N_procyonoides_306).

собак, существует высокая вероятность наличия смешанных криминалистических образцов. В таком случае локусы с выраженным межвидовым дифференцирующим потенциалом могут быть полезными компонентами тест-системы в качестве внутреннего молекулярно-генетического контроля видовой принадлежности исследуемого образца.

В результате проведенного секвенирования аллелей отобранных локусов была установлена выраженная размерная гомоплазия с типом тандема $(AG)_n(GGAA)_n$ в локусе *FH3771* и было выявлено большое количество микровариантов в динуклеотидном локусе *CPH4*. Данные локусы также были исключены из дальнейшей работы. Причины исключения остальных исследованных маркеров более подробно указаны в табл. S1 Приложения.

Неожиданный результат был получен при секвенировании аллелей локуса *FH2361*. При переносе данного маркера на ДНК енотовидной собаки аллели с исходно тетрануклеотидным тандемом (CTTT)*n* у собаки домашней визуализируются при электрофорезе как динуклеотидные и имеют тандемное строение (CT)*n* (рис. 1).

Таким образом, в результате изучения полиморфизма 39 STR-локусов и трех локусов половой принадлежности было отобрано 14 аутосомных микросателлитных локусов (гексануклеотид *vWF.x* [23]; три локуса с тетрануклеотидным повтором – *FH2096* [24], *Nyct10* [2], *PEZ17* [25]; два тринуклеотидных локуса – *Nyct9*, *Nyct11* [2]; восемь динуклеотидных – *FH2361* [25], *NPPM30*, *NPPM609*, *NPPM965* [1], *Nyct3*, *Nyct4*, *Nyct6* [2] и *V602* [26]) и два половых (*DBX6*, *DBY7* [27]). Из них девять локусов разработаны для генотипирования енотовидной собаки (*Nyct10*, *Nyct9*, *Nyct11*, *NPPM30*, *NPPM609*, *NPPM965*, *Nyct3*, *Nyct4*, *Nyct6*), шесть локусов – для собаки домашней (*vWF.x*, *FH2096*, *PEZ17*, *FH2361*, *DBX6*, *DBY7*) и один локус – для лисицы обыкновенной (*V602*).

Типичная электрофореграмма разработанной тест-системы для идентификации енотовидной собаки приведена на рис. 2.

Статистический анализ результатов использования тест-системы

При статистическом анализе результатов генотипирования установлено, что распределение частот гетерозиготных профилей в исследуемой выборке соответствует нормальному (рис. 3).

При этом распределение частот гетерозиготных профилей выборки подчиняется правилу трех сигм (σ). На расстоянии одного стандартного отклонения (1σ) от среднего значения 0.658 находятся 66.7% значений из данного распределения (диапазон значений 0.530–0.786, стандартное отклонение $\sigma = 0.127$); 95.2% значений лежат на

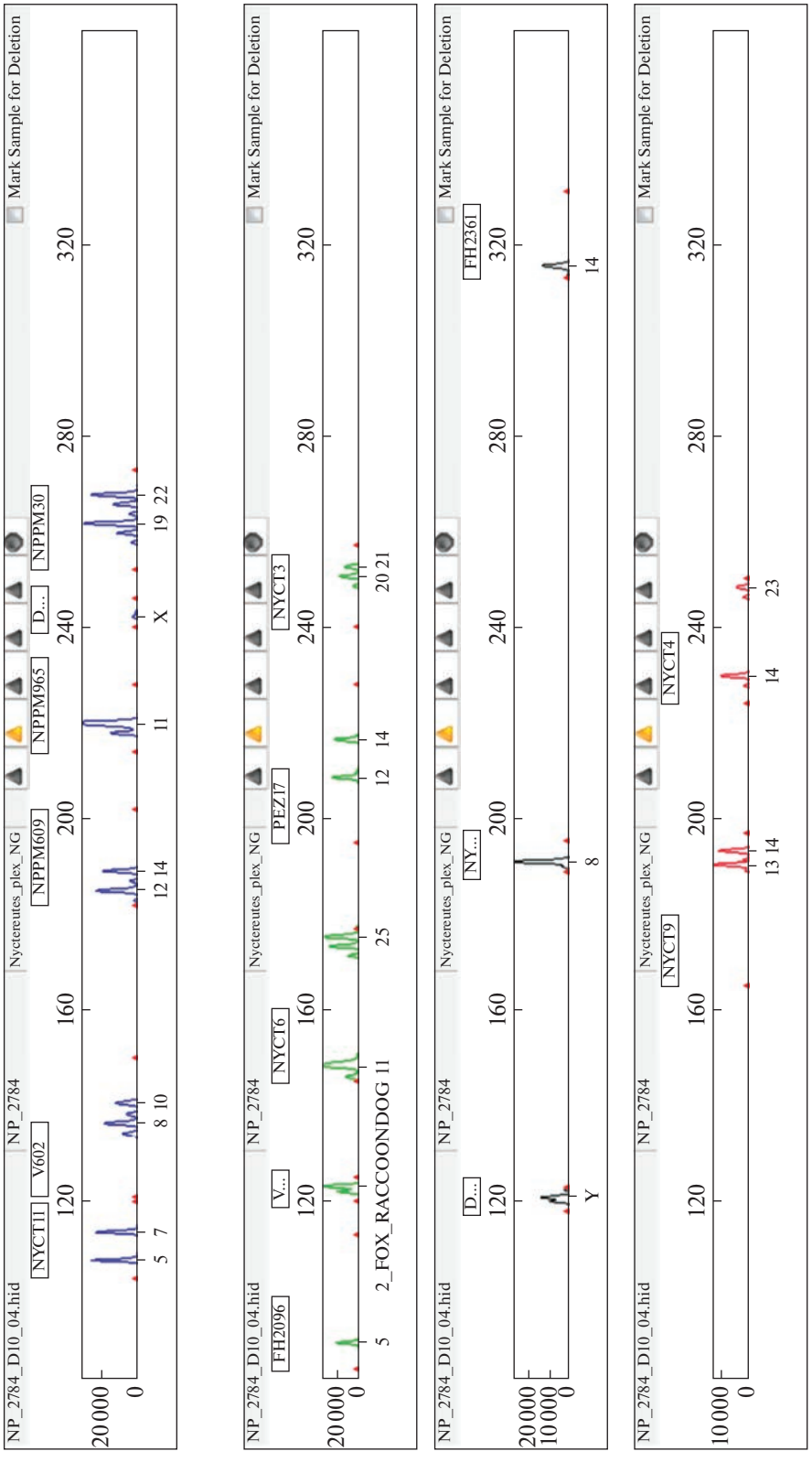


Рис. 2. Фрагмент электрофореграммы тест-системы NPIex для идентификации животного биологического вида енотовидная собака (*Nyctereutes procyonoides*).

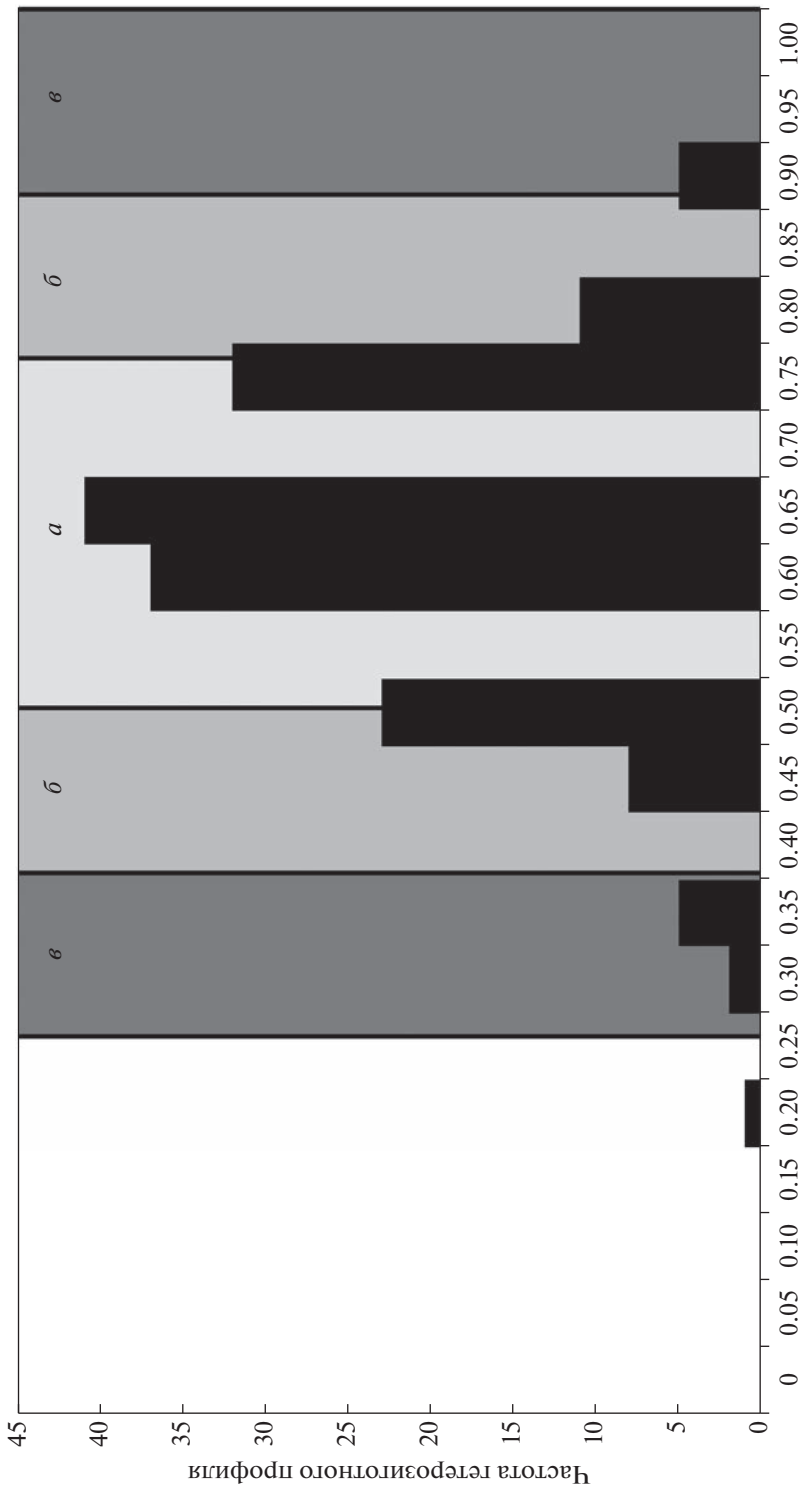


Рис. 3. Распределение частот гетерозиготных профилей в выборке енотовидной собаки с использованием тест-системы NPlex ($n = 165$). *а* – диапазон значения одного стандартного отклонения (1σ); *а* + *б* – двух стандартных отклонений (2σ); *а* + *б* + *в* – трех стандартных отклонений (3σ).

Таблица 1. Характеристика микросателлитных локусов тест-системы NPlex для идентификации особей енотовидной собаки

Локус	Выявленный размерный диапазон в тандемах	Выявленный истинный диапазон, пн	N_a	H_O	H_E	*HWE*	*PIC*
vWF.X	2/2	121/121	1	Мономорфный локус			
Nyct10	8–9	188–191	2	0.503	0.500	ns	0.375
Nyct11	5–8	103–112	3	0.570	0.585	ns	0.495
NPPM609	12–19	183–197	5	0.612	0.581	ns	0.547
NPPM965	9–13	220–228	5	0.412	0.389	ns	0.357
NPPM30	17–23	226–238	6	0.648	0.741	ns	0.695
Nyct9	6–14	162–186	6	0.776	0.785	ns	0.752
Nyct3	16–22	237–249	7	0.636	0.691	ns	0.652
FH2361	14–20	306–318	7	0.463	0.436	ns	0.409
Nyct4	10–23	215–241	7	0.780	0.795	ns	0.765
FH2096	4–10	84–108	7	0.661	0.635	ns	0.595
Nyct6	11–25	143–171	8	0.812	0.799	ns	0.771
PEZ17	9–17	192–224	9	0.818	0.768	ns	0.737
V602	3–14	124–146	9	0.855	0.811	ns	0.785
DBX6	X	246	1	Мономорфный локус			
DBY7	Y	117	1	Мономорфный локус			

Примечание. * N_a – число выявленных аллелей в локусе; H_O – наблюдаемая гетерозиготность; H_E – ожидаемая гетерозиготность; *HWE* – значимость отклонения от равновесия Харди–Вайнберга; ns – статистически незначимое отклонение от равновесия *HWE*; *PIC* – показатель информативности генетического полиморфизма.

расстоянии двух стандартных отклонений (диапазон 0.402–0.914); 99.4% – не более трех σ (диапазон значений 0.274–1.041). Результаты свидетельствуют, что выборка животных репрезентативна и панель локусов тест-системы NPlex выявляет полиморфизм образцов адекватно.

Одновременно был проведен анализ результатов генотипирования с помощью программ MicroChecker v2.2.1 и Cervus v3.0.7 на предмет выпадения аллелей, неверной интерпретации результатов генотипирования по причине интенсивных статтерфрагментов, артефактов ПЦР, “нуль”-аллелей и т.п. Анализ показал отсутствие “нуль”-аллелей или других отклонений у всех исследованных локусов.

Оценка сцепления локусов с использованием программных пакетов GENALEX v6.5 и Arlequin v3.5.1.3 показала отсутствие сцепленного наследования признаков, что свидетельствует о независимом распределении аллелей локусов тест-системы.

Кластерный анализ выборки, проведенный с использованием программы Structure v2.3.4, показал отсутствие подразделения на популяции и признал выборку образцов генетически однородной.

Аллельное распределение в суммарной выборке енотовидных собак для всех исследованных полиморфных локусов соответствовало распределению Харди–Вайнберга ($P > 0.05$).

Средняя ожидаемая гетерозиготность (H_E) для микросателлитных локусов, входящих в тест-систему, составила 0.655. Средняя наблюдаемая гетерозиготность (H_O) составила 0.657. Детальная информация об исследованных локусах представлена в табл. 1.

Согласно D. Botstein et al. [28] *PIC* для высокоинформативного локуса должен превышать значение 0.5, для достаточно информативного может быть менее 0.5, но обязательно превышать значение 0.25. Показатель *PIC* для малоинформативного локуса имеет значение менее 0.25. Как следует из табл. 1, минимальные значения *PIC* выявлены у локусов *Nyct10* (0.375), *NPPM965* (0.357). Такое значение *PIC* для локуса *Nyct10* обусловлено существованием только двух аллелей, а для локуса *NPPM965* (пять аллелей) – сильной выраженностью мажорного аллеля. Максимальное значение *PIC* выявлено у локуса *V602* (0.785), что объясняется большим количеством выявленных аллелей с относительно равномерным распределением в популяции. Среднее значение *PIC* составило 0.629. Таким образом, полученные нами данные следует считать значимыми для интерпретации результатов и оценки уровня изменчивости.

Суммарно в выборке с использованием тест-системы NPlex были идентифицированы 82 аллеля, частоты встречаемости которых приведены в

Таблица 2. Частоты встречаемости аллелей локусов тест-системы NPlex в популяции енотовидной собаки

Аллель	*NYCT11*	*V602*	*NYCT10*	*NPPM609*	*NPPM965*	*NPPM30*	*FH2096*	*NYCT6*	*NYCT3*	*PEZ17*	*FH2361*	*NYCT9*	*NYCT4*
3		0.130											
4		0.091					0.006						
5	0.464	0.161					0.545						
6		0.009					0.155					0.097	
7	0.436						0.073						
8	0.100	0.300	0.494		0.003		0.012					0.197	
9		0.097	0.506		0.094		0.015			0.003			
10		0.197			0.136		0.194			0.036		0.176	0.015
11		0.003			0.764			0.209		0.091			
12				0.164						0.170		0.024	
13				0.612	0.003					0.379		0.191	0.284
14		0.012		0.094						0.191	0.735	0.315	0.235
15				0.067						0.118	0.018		
16									0.012	0.009	0.024		
17						0.055		0.009	0.482	0.003	0.012		0.216
18						0.282		0.300	0.152		0.073		
19				0.064		0.321		0.152	0.079		0.134		0.116
20								0.024	0.209		0.003		
21						0.064			0.061				0.073
22						0.264		0.070	0.006				
23						0.015		0.045					0.061
25								0.191					

табл. 2. Наиболее полиморфными оказались локусы *V602* и *PEZ17*, у них было выявлено по девять аллелей. Наименьший уровень полиморфизма показали локусы *Nyct10* (два аллеля), *Nyct11* (три аллеля). Наиболее выраженные мажорные аллели были обнаружены в локусах *NPPM965* – аллель 11 (частота 0.764), *FH2361* – 14 (0.735), *NPPM609* – 13 (0.612), *FH2096* – 5 (0.545) и *Nyct3* – 17 (0.482). В локусах *Nyct11*, *NPPM30*, *Nyct6* и *Nyct4* выявлено два и более доминантных аллеля.

Криминалистическую применимость локусов тест-системы NPlex для идентификационных целей оценивали по таким критериям как вероятность случайного совпадения генотипов двух индивидуумов (*P*(*ID*) – для неродственных особей и *P*(*ID*)*sib* – для родственных животных) и частота встречаемости определенного генотипа. Поскольку в исследованной выборке отсутствует подразделение на популяции, расчет показателей проводили на основе полученных данных совокупной выборки для 13 несцепленных локусов. Результаты приведены в табл. 3, при этом перечень локусов отражает убывание их значений *P*(*ID*).

Значение вероятности случайного совпадения исследуемого образца по заданному генотипу было максимальным для локуса *NPPM965*, а минимальным для локуса *V602*. Высокий уровень значения *P*(*ID*) для локуса *NPPM965* (пять аллелей) объясняется сильно выраженным мажорным аллелем 11 (частотой встречаемости 0.764). Минимальное значение случайного совпадения для локуса *V602* обусловлено максимальным числом аллелей (9) с относительно равномерным распределением частот в популяции.

Частота встречаемости генотипа в выборке варьировала от 6.3×10^{-17} до 2.5×10^{-10} со средним значением 1.1×10^{-11}. Значения *P*(*ID*) и *P*(*ID*)*sib* для тест-системы NPlex составляли 1.6×10^{-11} и 3.9×10^{-5} соответственно. Значения LR для неродственных особей и сибсов составили 6.4×10^{10} и 2.5×10^{4} соответственно. Учитывая, что численность популяции енотовидной собаки в Республике Беларусь по состоянию на 2020 г. оценивалась в 15000 особей, сила исключения, обеспечиваемая STR-локусами тест-системы NPlex, позволяет

Таблица 3. Значения вероятности случайного совпадения генотипов двух неродственных особей и сибсов для отдельных локусов и их комбинаций

Локус	*P*(*ID*) для одного локуса	*P*(*ID*)*sib* для одного локуса	*P*(*ID*) с включением последующего локуса	*P*(*ID*)*sib* с включением последующего локуса
NPPM965	4.1×10^{-1}	6.6×10^{-1}	4.1×10^{-1}	6.6×10^{-1}
NYCT10	3.8×10^{-1}	5.9×10^{-1}	1.5×10^{-1}*	3.9×10^{-1}**
FH2361	3.5×10^{-1}	6.2×10^{-1}	5.2×10^{-2}	2.4×10^{-1}
NYCT11	2.6×10^{-1}	5.2×10^{-1}	1.4×10^{-2}	1.3×10^{-1}
NPPM609	2.1×10^{-1}	5.1×10^{-1}	2.9×10^{-3}	6.5×10^{-2}
FH2096	1.8×10^{-1}	4.8×10^{-1}	5.1×10^{-4}	3.1×10^{-2}
NYCT3	1.3×10^{-1}	4.4×10^{-1}	6.8×10^{-5}	1.3×10^{-2}
NPPM30	1.1×10^{-1}	4.1×10^{-1}	7.7×10^{-6}	5.5×10^{-3}
PEZ17	8.5×10^{-2}	3.9×10^{-1}	6.5×10^{-7}	2.1×10^{-3}
NYCT9	7.9×10^{-2}	3.8×10^{-1}	5.2×10^{-8}	8.0×10^{-4}
NYCT4	7.2×10^{-2}	3.7×10^{-1}	3.7×10^{-9}	3.0×10^{-4}
NYCT6	6.9×10^{-2}	3.7×10^{-1}	2.6×10^{-10}	1.1×10^{-4}
V602	6.1×10^{-2}	3.6×10^{-1}	1.6×10^{-11}	3.9×10^{-5}
LR			6.4×10^{10}	2.5×10^{4}

Примечание. *P*(*ID*) – вероятность случайного совпадения генотипов двух индивидуумов для неродственных особей; *P*(*ID*)*sib* – вероятность случайного совпадения генотипов двух индивидуумов для родственных животных; * – здесь и далее произведение *P*(*ID*) предыдущих и данного локусов; ** – здесь и далее произведение *P*(*ID*)*sib* предыдущих и данного локусов.

достигать надежного уровня доказательств в криминалистическом ДНК-анализе.

При этом необходимо учитывать, что исследованная выборка была однородной и, как следствие, при расчете вероятности случайного совпадения не были учтены значения F_{ST} (коэффициента инбридинга) для данной конкретной популяции енотовидной собаки. В случае использования NPlex для других регионов и мест обитаний енотовидной собаки следует создать соответствующий массив генотипов и оценить уровень субструктурирования популяции. При наличии субструктурирования значения *P*(*ID*) и *P*(*ID*)*sib* будут различные для каждой субпопуляции.

Валидация тест-системы NPlex

При разработке тест-системы NPlex синтез праймеров, входящих в тест-систему, проводился в АО “Гентерра” (Российская Федерация).

В результате валидационных мероприятий по исследованию работоспособности тест-системы с коммерческими наборами реагентов различных производителей (ThermoFisher Scientific, США; ОДО “Праймтех”, РБ; ООО “Синтол”, РФ; ЗАО “Евроген”, РФ; ООО “АртБиоТех”, РБ; BioRad, США) установлено, что использование различных реагентов данных производителей на выявляемые параметры системы не влияет.

Повторяемость. При проведении исследований в одинаковых условиях продемонстрирована повторяемость результатов, полученных с помощью тест-системы NPlex.

В каждом параллельном анализе для каждого образца ДНК при использовании тест-системы NPlex выявлены все ожидаемые аллели во всех локусах. Полученные данные указывают на то, что тест-система NPlex стабильно дает результат с высокой повторяемостью.

Воспроизводимость. Для оценки вариабельности исследования тест-системы NPlex было получено 88 результатов. Прецизионность каждого образца, генотипированного тест-системой NPlex, составила 100%.

Специфичность. Тест-система NPlex предназначена для ДНК-идентификации и установления родства животных вида енотовидная собака, обитающих на территории Беларуси. Перекрестная активность тест-системы NPlex при генотипирования ДНК других видов семейства псовые

Таблица 4. Результаты перекрестной амплификации микросателлитных локусов тест-системы NPlex на матрицах ДНК других видов семейства псовые

Локус	*Vulpes vulpes* (лисица обыкновенная)	*Vulpes lagopus* (песец обыкновенный)	*Canis lupus lupus* (волк обыкновенный) и *Canis lupus familiaris* (собака домашняя)
vWF.X	В аллельном диапазоне		Вне аллельного диапазона
DBX	Вне аллельного диапазона		В аллельном диапазоне
NPPM609	n/a		»
Nyct6	n/a		»
NPPM965	Вне аллельного диапазона	n/a	
Nyct10	»	n/a	
Nyct4	n/a	В аллельном диапазоне	
Nyct11	Общий аллельный диапазон для всех видов		
V602	»		
NPPM30	»		
FH2096	»		
PEZ17	»		
FH2361	»		
Nyct9	»		
DBY	»		
Nyct3	n/a		

Примечание. n/a – отсутствие специфического продукта амплификации.

(в части совпадения диапазона выявляемых аллелей других видов семейства псовые с диапазоном енотовидной собаки) представлена в табл. 4.

Из приведенных результатов следует, что локусы тест-системы NPlex проявляют значительную перекрестную активность с матрицами ДНК других видов из семейства псовых. Последнее не кажется удивительным, поскольку семейство объединяет виды, связанные общим происхождением в силу филогенетического родства. С учетом перекрестной активности локусов включение в тест-систему NPlex локусов с низкой полиморфностью (*vWF.x*, *Nyct10*), но с выраженным межвидовым дифференцирующим потенциалом является оправданным.

При использовании данной тест-системы на матрицах ДНК представителей семейства кошачьи (кошка домашняя, рысь европейская), семейства куньи (хорь лесной, выдра речная, куница лесная, ласка, норка американская, барсук), семейства бобровые (бобр речной), семейства заячьи (заяц-русак, заяц-беляк), отряда парнокопытные (косуля европейская, олень благородный, олень пятнистый, лось, лань европейская, бык домашний, зубр европейский, кабан европейский), отряда непарнокопытные (лошадь домашняя), класса птицы (курица домашняя, гусь серый, индейка) и отряда приматы (человек) продукты ПЦР в используемых локусах не выявляются.

Также с использованием базы нуклеотидных последовательностей GenBank и программного продукта Primer-BLAST было проанализировано суммарно 289 возможных комбинаций праймеров тест-системы NPlex. Установлено, что только одна комбинация потенциально может приводить к неспецифической амплификации: праймер “DBY7 F” дает неспецифическую амплификацию (фрагмент в 173 пн) с праймером “Nyct10 R” на матрице ДНК кабана европейского (*Sus scrofa*). Полученный результат свидетельствует о высокой аналитической специфичности тест-системы.

Анализ смесей. Образцы, содержащие смесь биологического материала различных особей енотовидной собаки, а также енотовидной собаки и различных представителей семейства псовые могут быть проанализированы с использованием тест-системы. В данном случае интерпретация результатов генотипирования будет в значительной мере зависеть от качественных и количественных

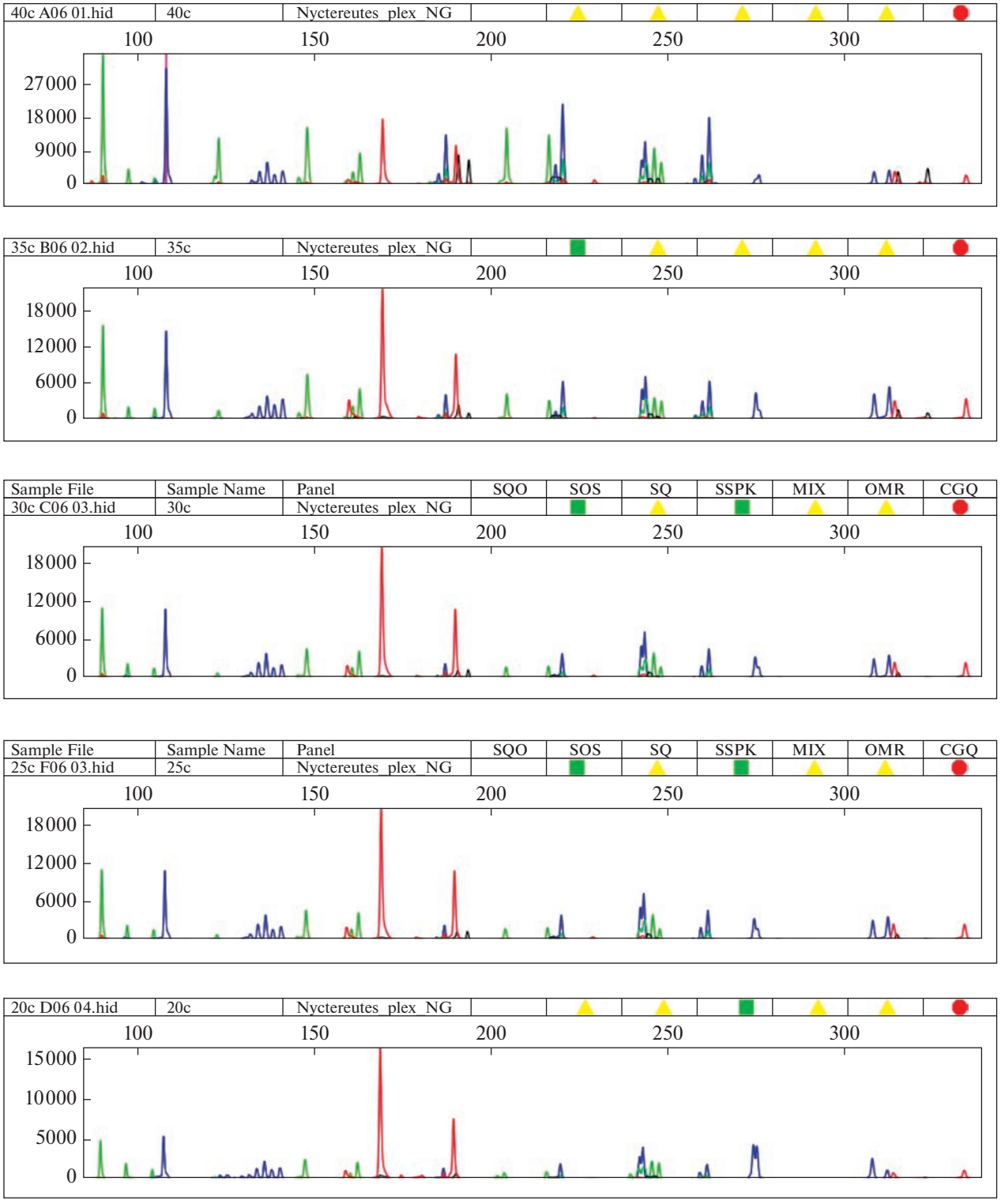


Рис. 4. Электрофореграмма результатов амплификации контрольного образца ДНК енотовидной собаки при различных количествах циклов амплификации. 40c, 35c, 30c, 25c, 20c – число циклов амплификации. По вертикали – интенсивность флуоресценции.

характеристик смеси. Тем не менее необходимо отметить, что наличие в ПЦР-смеси примеси ДНК другого псового легко диагностируется ввиду различий в аллельном диапазоне локусов, обладающих дифференцирующим потенциалом.

Чувствительность. Для тест-системы NPlex оптимальное количество ДНК, вносимой в ПЦР, составляет 2 нг. Во время валидационных и контрольных исследований тест-система показала полное выявление генотипа животного в диапазоне от 0.5 до 15 нг ДНК.

Минимальное вносимое количество ДНК, позволяющее получить полный генетический профиль животного, составляет 0.5 нг и является пределом определения тест-системы.

Устойчивость. Тест-система NPlex оптимизирована при использовании 30 циклов амплификации. В рамках валидационных мероприятий продемонстрирована устойчивость результатов, полученных с помощью тест-системы NPlex на образце контрольной ДНК енотовидной собаки. Для тест-системы NPlex получено 15 результатов, демонстрирующих устойчивость исследования. Электрофореграмма результатов амплификации контрольного образца ДНК енотовидной собаки при различном количестве циклов аплификации представлена на рис. 4.

Минимальное количество циклов амплификации, при которых возможно полное выявление генотипа животного с использованием тест-системы NPlex, составляет 20. Оптимальное количество циклов амплификации с использованием тест-системы NPlex составляет 30. При этом увеличение циклов амплификации до 40 не приводит к появлению неспецифических продуктов амплификации, а уменьшение количества циклов до 20 может приводить к выпадению аллелей только в локусах *DBX* и *Nyct9*. Остальные локусы NPlex амплифицируются эффективно.

В ходе настоящего исследования был определен спектр STR-локусов, которые обладают достаточным полиморфизмом при работе с ДНК енотовидной собаки, и была разработана мультиплексная тест-система NPlex для идентификации особей енотовидной собаки в криминалистических исследованиях. В ходе экспериментов была проведена оценка полиморфизма, криминалистических параметров локусов, включенных в тест-систему, а также подтверждена тандемная структура аллелей локусов. Разработанная тест-система NPlex обладает высокой повторяемостью и прецизионностью в 100%, имеет высокую аналитическую специфичность и низкий предел обнаружения генетического материала. По результатам генетико-статистического анализа массива генотипов образцов енотовидной собаки все локусы наследуются независимо и соответствуют равновесию Харди–Вайнберга. Разработанная тест-система NPlex может применяться при исследовании вещественных доказательств по делам о незаконной охоте, о нападении диких животных и по иным делам, связанным с участием енотовидных собак.

Итогом разработки тест-системы явилась методика ДНК-идентификации биологических образцов животных вида енотовидная собака (*Nyctereutes procyonoides*), предназначенная для практикующих судебных экспертов Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь и научных сотрудников по профилю исследования. Методика включена в Реестр судебно-экспертных методик и иных методических материалов Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь, что соответствует имплементации разработки в национальную правовую систему.

Авторы выражают благодарность Республиканскому государственому общественному объединению “Белорусское общество охотников и рыболовов” и персонально И.С. Юрченко, заведующему отдела экологии фауны Государственного природоохранного научно-исследовательского учреждения “Полесский государственный радиационно-экологический заповедник” за помощь в формировании коллекции биологических образцов.

Подробная информация об используемых последовательностях праймеров и особенностях исследованных локусов, а также номера доступа к последовательностям аллелей в GenBank приведены в табл. S1 и S2 Приложения.

Все авторы участвовали в исследовании и анализе результатов.

Данная работа выполнялась на базе государственного учреждения “Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь” и финансировалась Национальной Академией наук Республики Беларусь (номер государственной регистрации НИОК(Т)Р: 20190195).

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. *Yan S.Q., Li Y.M., Bai C.Y. et al.* Development and characterization of polymorphic microsatellite markers for Chinese raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides procyonoides*) // Genet. Mol. Res. 2013. V. 12. P. 6351–6355. https://doi.org/10.4238/2013.December.6.2
2. *Hong Y., Kim K.S., Lee H., Min M.S.* Population genetic study of the raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) in South Korea using newly developed 12 microsatellite markers // Genes & Genet. Systems. 2013. V. 88. № 1. P. 69–76. https://doi.org/10.1266/ggs.88.69
3. *Paulauskas A., Griciuvienė L., Juknelyte S. et al.* Genetic diversity and population structure of raccoon dog

(*Nyctereutes procyonoides*) in invaded areas // XMAT. 2014. P. 78. Antalya, Turkey. https://www.neobiota.eu/wp/wp-content/uploads/NEOBIOTA-2014-Abstract-Book.pdf

4. *Nørgaard L.S., Mikkelsen D.M.G., Elmeros M. et al.* Population genomics of the raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) in Denmark: Insights into invasion history and population development // Biol. Invasions. 2017. V. 19. № 5. P. 1637–1652. https://doi.org/10.1007/s10530-017-1385-5
5. *Oh S.Y., Kim S.A., Kim J.Y. et al.* Detection of antibodies against the rabies virus in Korean raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides koreensis*) // J. Zoo and Wildlife Med. 2012. V. 43. № 1. P. 174–176. https://doi.org/10.1638/2011-0063.1
6. *Kido N., Itabashi M., Takahashi M., Futami M.* Epidemiology of sarcoptic mange in free-ranging raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) in Yokohama // Jap. Veter. Parasitology. 2013. V. 191. № 1–2. P. 102–107. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.07.026
7. *Bagrade G., Deksne G., Ozoliņa Z. et al. Echinococcus multilocularis* in foxes and raccoon dogs: an increasing concern for Baltic countries // Parasites & Vectors. 2016. V. 9. № 1. P. 1–9. https://doi.org/10.1186/s13071-016-1891-9
8. *Griciuvienė L., Paulauskas A., Radzijevskaja J. et al.* Impact of anthropogenic pressure on the formation of population structure and genetic diversity of raccoon dog *Nyctereutes procyonoides* // Curr. Zool. 2016. V. 62. № 5. P. 413–420. https://doi.org/10.1093/cz/zow038
9. *Kauhala K., Kowalczyk R.* Invasion of the raccoon dog *Nyctereutes procyonoides* in Europe: history of colonization, features behind its success, and threats to native fauna // Curr. Zool. 2011. V. 57. № 5. P. 584–598. https://doi.org/10.1093/czoolo/57.5.584
10. *Lever C.* Naturalized Mammals of the World. London: Longman, 1985. Available from: https://www.cabi.org/isc/abstract/19860537058
11. *Deinet S., Ieronymidou C., McRae L. et al.* Wildlife comeback in Europe: The recovery of selected mammal and bird species // Final Rep. to Rewilding Europe by ZSL, BirdLife International and the European Bird Census Council. London, UK, 2013. Available from: https://rewildingeurope.com/wp-content/uploads/2013/11/Wildlife-Comeback-in-Europe-the-recovery-of-selected-mammal-and-bird-species.pdf
12. *Sillero-Zubiri C., Hoffmann M., Macdonald D.W.* Canids: Foxes, wolves, jackals, and dogs // Status Survey and Conservation Action Plan. 2004. V. 95. Gland, Switzerland: IUCN, available from: https://www.carnivoreconservation.org/files/actionplans/canids.pdf
13. *Boom R.C.J.A., Sol C.J., Salimans M.M. et al.* Rapid and simple method for purification of nucleic acids // J. Clin. Microbiol. 1990. V. 28. № 3. P. 495–503. https://doi.org/10.1128/jcm.28.3.495-503.1990
14. *Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J. et al.* GenBank // Nucl. Acids Res. 2005. V. 34. P. D16–D20. https://doi.org/10.1093/nar/gkj157
15. *Hall T., Biosciences I., Carlsbad C.* BioEdit: An important software for molecular biology // GERF Bull. Biosci. 2011. V. 2. № 1. P. 60–61. https://www.researchgate.net/profile/Ahmed-Alzohairy/publication/258565830_BioEdit_An_important_software_for_molecular_biology/links/0deec528a87d3f2ee0000000/BioEdit-An-important-software-for-molecular-biology.pdf
16. *Peakall R.O.D., Smouse P.E.* GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Mol. Ecol. Notes. 2006. V. 6. № 1. P. 288–295. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460
17. *Excoffier L., Lischer H.* An integrated software package for population genetics data analysis // Comput. and Mol. Popul. Genet. Lab (CMPG). 2006. Berne, Switzerland: Institute Zool., Univ. Berne, PMID 19325852.
18. *Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P., Shipley P.* MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data // Mol. Ecol. Notes. 2004. V. 4. № 3. P. 535–538. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x
19. *Marshall T.C., Slate J.B.K.E., Kruuk L.E.B., Pemberton J.M.* Statistical confidence for likelihood – based paternity inference in natural populations // Mol. Ecol. 1998. V. 7. № 5. P. 639–655. https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00374.x
20. *Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P.* Inference of population structure using multilocus genotype data // Genetics. 2000. V. 155. № 2. P. 945–959. https://doi.org/10.1534/genetics.116.195164
21. *Earl D.A., VonHoldt B.M.* STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method // Conservation Genet. Res. 2012. V. 4. № 2. P. 359–361. https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7
22. *Lischer H.E., Excoffier L.* PGDSpider: An automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs // Bioinformatics. 2012. V. 28. № 2. P. 298–299. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr642
23. *DeNise S., Johnston E., Halverson J. et al.* Power of exclusion for parentage verification and probability of match for identity in American kennel club breeds using 17 canine microsatellite markers // Animal Genet. 2004. V. 35. № 1. P. 14–17. https://doi.org/10.1046/j.1365-2052.2003.01074.x
24. *Caniglia R., Fabbri E., Greco C. et al.* Forensic DNA against wildlife poaching: Identification of a serial wolf killing in Italy // Forensic Sci. Int. Genet. 2010. V. 4. № 5. P. 334–338. https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2009.10.012
25. *Dayton M., Koskinen M.T., Tom B.K. et al.* Developmental validation of short tandem repeat reagent kit for forensic DNA profiling of canine biological material // Croatian Med. J. 2009. V. 50. № 3. P. 268–285. https://doi.org/10.3325/cmj.2009.50.268
26. *Whiteside H.M., Dawson D.A., Soulsbury C.D., Harris S.* Mother knows best: Dominant females determine offspring dispersal in red foxes (*Vulpes vulpes*) // PLoS One. 2011. V. 6. № 7. P. e22145. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022145
27. *Seddon J.M.* Canid-specific primers for molecular sexing using tissue or non-invasive samples // Conservation Genet. 2005. V. 6. № 1. P. 147–149. https://doi.org/10.1007/s10592-004-7734-9
28. *Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms // Am. J. Hum. Genet. 1980. V. 32. № 3. P. 314. PMID 6247908.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица S1. Микросателлитные и половые локусы, задействованные в исследовании

№ п/п	Маркер	Вид-источник	Тандем	Результат исследования	Ссылка на источник литературы
1	*NPPM30*	*N. procyonoides*	$(TG)_n$	Включен в тест-систему	Yan S.Q. et al., 2013
2	*NPPM609*	*N. procyonoides*	$(GT)_n$	Включен в тест-систему	Yan S.Q. et al., 2013
3	*NPPM905*	*N. procyonoides*	$(TG)_n$	Высокое содержание нуль-аллелей	Yan S.Q. et al., 2013
4	*NPPM941*	*N. procyonoides*	$(TG)_n$	Нестабильная амплификация в мультиплексной системе	Yan S.Q. et al., 2013
5	*NPPM965*	*N. procyonoides*	$(GT)_n$	Включен в тест-систему	Yan S.Q. et al., 2013
6	*Nyct1*	*N. procyonoides*	$(GT)_n$	Высокая интенсивность статтеров	Hong Y. et al., 2013
7	*Nyct3*	*N. procyonoides*	$(TG)_n$	Включен в тест-систему	Hong Y. et al., 2013
8	*Nyct4*	*N. procyonoides*	$(TG)_n$	Включен в тест-систему	Hong Y. et al., 2013
9	*Nyct6*	*N. procyonoides*	$(GA)_n$	Включен в тест-систему	Hong Y. et al., 2013
10	*Nyct7*	*N. procyonoides*	$(CT)_n$	Нестабильная амплификация в мультиплексной системе	Hong Y. et al., 2013
11	*Nyct8*	*N. procyonoides*	$(TG)_n$	Несоответствие распределению Харди–Вайнберга	Hong Y. et al., 2013
12	*Nyct9*	*N. procyonoides*	$(CTG)_n$	Включен в тест-систему	Hong Y. et al., 2013
13	*Nyct10*	*N. procyonoides*	$(GCT)_n$	Включен в тест-систему	Hong Y. et al., 2013
14	*Nyct11*	*N. procyonoides*	$(TGC)_n$	Включен в тест-систему	Hong Y. et al., 2013
15	*Nyct12*	*N. procyonoides*	$(GCA)_n$	Нестабильная амплификация в мультиплексной системе	Hong Y. et al., 2013
16	*CPH4*	*C. lupus familiaris*	$(CA)_n$	Динуклеотидный повтор с микровариантами	Caniglia R. et al., 2010
17	*CPH12*	*C. lupus familiaris*	$(CA)_n$	Мономорфное проявление признака	Caniglia R. et al., 2010
18	*Ren112I02*	*C. lupus familiaris*	$(TG)_n$	Нестабильная амплификация в мультиплексной системе	Breen M. et al., 2001
19	*vWF.x*	*C. lupus familiaris*	$(AGGAAT)_n$	Включен в тест-систему	DeNise S. et al., 2004
20	*VGL3438*	*C. lupus familiaris*	$(AAAG)_n$	Сцепленное наследование признака с локусом FH2010	Magory Cohen T. et al., 2013
21	*V602*	*V.vulpes*	$(CT)_n(CA)_{16}$	Включен в тест-систему	Whiteside H.M. et al., 2011
22	*PEZ08*	*C. lupus familiaris*	$(GA)_n$	Нестабильная амплификация в мультиплексной системе	Halverson J. et al., 2005
23	*PEZ10*	*C. lupus familiaris*	$(GAAA)_n$	Отсутствие специфической амплификации	Halverson J. et al., 2005

Таблица S1. Окончание

№ п/п	Маркер	Вид-источник	Тандем	Результат исследования	Ссылка на источник литературы
24	*PEZ12*	*C. lupus familiaris*	$(AAAG)_n$	Мономорфное проявление признака	Padar Z. et al., 2004
25	*PEZ16*	*C. lupus familiaris*	$(GAAA)_n$	Несоответствие распределению Харди–Вайнберга	Halverson J. et al., 2005
26	*PEZ17*	*C. lupus familiaris*	$(TTTC)_n$	Включен в тест-систему	Dayton M. et al., 2009
27	*FH2001*	*C. lupus familiaris*	$(ATCT)_n$	Выявлено 2 аллельных варианта	Francisco L.V. et al., 1996
28	*FH2004*	*C. lupus familiaris*	$(TTCT)_n$	Отсутствие специфической амплификации	Caniglia R. et al., 2010
29	*FH2010*	*C. lupus familiaris*	$(GAAT)_n$	Сцепленное наследование признака с локусом VGL3438	Halverson J. et al., 2005
30	*FH2016*	*C. lupus familiaris*	$(CTTT)_n$	Мономорфное проявление признака	Halverson J. et al., 2005
31	*FH2054*	*C. lupus familiaris*	$(ATCT)_n$	Мономорфное проявление признака	Halverson J. et al., 2005
32	*FH2079*	*C. lupus familiaris*	$(GGAT)_n$	Отсутствие специфической амплификации	Francisco L.V. et al., 1996
33	*FH2096*	*C. lupus familiaris*	$(AATG)_n$	Включен в тест-систему	Caniglia R. et al., 2010
34	*FH2274*	*C. lupus familiaris*	$(CTTT)_n$	Высокое содержание нуль-аллелей	Verardi A. et al., 2006
35	*FH2309*	*C. lupus familiaris*	$(GAAA)_n$	Высокое содержание нуль-аллелей	Dayton M. et al., 2009
36	*FH2328*	*C. lupus familiaris*	$(AAAG)_n$	Отсутствие специфической амплификации	Mellersh C.S. et al., 1997
37	*FH2361*	*C. lupus familiaris*	$(TTTC)_n$	Включен в тест-систему	Dayton M. et al., 2009
38	*FH3241*	*C. lupus familiaris*	$(TTCT)_n$	Несоответствие распределению Харди–Вайнберга	van Asch et al., 2009
39	*FH3771*	*C. lupus familiaris*	$(AG)_n(GGAA)_n$	Наличие размерной гомоплазии	Zatoń-Dobrowolska M. et al., 2014
40	*DBX*	*Hyaena hyaena*	–	Включен в тест-систему	Seddon J.M. et al., 2005
41	*DBY*	*Hyaena hyaena*	–	Включен в тест-систему	Seddon J.M. et al., 2005
42	*SRY*	*C. lupus familiaris*	–	Перекрытие размерных диапазонов с локусом тест-системы	DeCandia A. et al., 2016

Таблица S2. Номер доступа GenBank, последовательности праймеров и локусов, входящих в тест-систему NPlex

Локус	Флуорофор	Последовательности праймеров	Номер доступа GenBank
vWF.X	VIC	CTCCCCTTCTCTACCTCCACCTCTAA	OM371048
		CAGAGGTCAGCAAGGGTACTATTGTG	
Nyct10	NED	CTTGCTGCAAATCTCCCATT	OM716956
		CAAGGAGAGGAGCTGTTTGC	OM716957
Nyct11	FAM	CCAGTCATCCTGCCTTTGTT	OM716958
		GTGCCCTTGTGGGTTTCTTA	OM716959
NPPM609	FAM	TTTGGGGTCACTCAGATAGGAAG	OM716960
		TTTTCCAGAAGGGAGAACAGGT	OM716961
NPPM965	FAM	AGAGCAAAGAAACAGGGCTATAG	OM716962
		GCTGATTTTGTGTTCTGCTCTGT	OM716963
NPPM30	FAM	AGGACTATTTCACGCCTTGTTG	OM716964
		ATTCCCACCTCAGTGATTACAG	OM716965
Nyct9	PET	CCCTCAATGGTCTTATCCCC	OM716966
		ACGACCCCTTCATCTGACTG	OM716967
Nyct3	VIC	TGGACAAGGTCACACAGGAA	OM716968
		ACCCTCCAAGTGTTCACGAC	OM716969
FH2361	NED	GCTTGGAAGGTGAGACTGAATG	OM716970
		AGCACTTAGAATGTACCAGGCA	OM716971
Nyct4	PET	TGCTTCTGTCTCCCCTGTCT	OM716972
		AGTTCAGCCGGGTTGTAATG	OM716973
FH2096	VIC	CCGTCTAAGAGCCTCCC	OM716974
		GACAAGGTTTCCTGGTTCCA	OM716975
Nyct6	VIC	GATCCAGCTGTCACTGCTTT	OM716976
		GTCTGCTTCTCCCTCTCCCT	OM716977
PEZ17	VIC	CTAAGGGACTGAACTTCTCC	OM716978
		GTGGAACCTGCTTAAGATTC	OM716979
V602	FAM	CAGCCTGGACTACAATTCTCTTT	OM716980
		CCCCAAGTCTTTTGTCCAGA	OM716981
DBX	FAM	ATGCTGCAGTTTTTCCAGA	OM630073
		TACGCTGGGTCTTAGTT	
DBY	NED	GGTCCAGGAGAGGCTTTGAA	OM630074
		TGCCATTGTTTAAAAGGAAG	

A Robust Test System for DNA Identification of Raccoon Dogs

A. E. Hrebianchuk[a], *, O. N. Lukashkova[b], S. A. Kotava[b], and I. S. Tsybovsky[c]

[a]*State Forensic Examination Committee of the Republic of Belarus, Minsk, 220073 Belarus*

[b]*Scientific and Practical Center of the State Forensic Examination Committee of the Republic Belarus, Minsk, 220114 Belarus*

[c]*RUP "BelJurZabespjachjenne", Minsk, 220069 Belarus*

**e-mail: iamsanya94@mail.ru*

To establish a system for DNA identification of biological samples of the raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*), we carried out a study of polymorphism of 39 microsatellite loci and three sex loci specific to various species of the Canidae family. This resulted in the development of the NPlex test system, which includes 14 autosomal STRs and two sex loci. The test system has been validated for use in forensic identification of racoon dogs based on biological traces (such as traces of blood and secretions, fragments of muscle tissue or bones, dermis and hair, etc.) found at crime scenes, as well as for establishing biological relationship of animals of this species. Validation efforts were performed in accordance with the protocol of the Scientific Working Group on DNA Analysis Methods.

Keywords: microsatellites, identification, Canidae family, forensics, illegal hunting.

ГЕНЕТИКА, 2023, том 59, № 5, с. 601–605

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 576.316.32:599.323.4

ГЕОГРАФИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЧАСТОТ ВСТРЕЧАЕМОСТИ B-ХРОМОСОМ У ЛЕСНЫХ МЫШЕЙ *Sylvaemus flavicollis* ВОСТОЧНОЙ ЕВРОПЫ

© 2023 г. Ю. М. Борисов[1], *, И. А. Крищук[2], **, З. З. Борисова[1]

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

[2]*Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по биоресурсам, Минск, 220072 Беларусь*

**e-mail: boriss-spb@yandex.ru*

***e-mail: ikryshchuk@yandex.by*

Поступила в редакцию 18.07.2022 г.
После доработки 12.09.2022 г.
Принята к публикации 20.09.2022 г.

Изучены кариотипы 95 особей (57 самцов и 38 самок) желтогорлой мыши (*Sylvaemus flavicollis* Melchior, 1834), отловленных в семи пунктах на территории Восточной Европы. Только у одной особи выявлена одна добавочная хромосома. Показано, что у *Sylvaemus flavicollis* в обследованных пунктах из центральной части данного ареала частота встречаемости особей с B-хромосомами очень низка и вероятно не зависит от экологических условий мест обитания.

Ключевые слова: лесные мыши, *Apodemus peninsulae*, *Sylvaemus flavicollis*, B-хромосомы.

DOI: 10.31857/S001667582305003X, **EDN:** FNNPMP

К настоящему времени так называемые добавочные, или B-хромосомы, представляющие дополнение к основному набору хромосом обнаружены более чем у 500 видов животных и 3000 видов растений. У млекопитающих наличие добавочных хромосом известно у 85 видов, что составляет около 1.9% от всех кариотипически изученных видов класса [1, 2]. При этом у разных видов число их варьирует от 1–3 до 10–30 [1–4]. Однако несмотря на достаточную изученность B-хромосом у видов млекопитающих, вопрос их происхождения, организации, а также, какие факторы определяют распределение данных хромосом среди различных видов, до конца остается не решенным.

Наиболее часто добавочные хромосомы встречаются у представителей отряда грызуны (Mammalia, Rodentia) – виды лесных и полевых мышей: восточноазиатская мышь (*Apodemus peninsulae*), японская мышь (*A. argenteus*), полевая мышь (*A. agrarius*), малоазиатская мышь (*A. mystacinus*), желтогорлая мышь (*Sylvaemus flavicollis*), европейская лесная мышь (*S. sylvaticus*) [1]. В связи с чем род мышей *Apodemus* считается модельным при изучении B-хромосом [5]. Наиболее часто добавочные хромосомы выявляются у двух широкореареальных видов этого рода – восточноазиатская мышь (от 1 до 30 B-хромосом) [3–5] и желтогорлая мышь (от 1 до 7 B-хромосом) [2, 6].

Все мыши континентальных популяций *A. peninsulae* – более 30 локалитетов Палеарктики – характеризуются высокой частотой встречаемости в кариотипе B-хромосом [4, 5]. Известно лишь две популяции вида, обитающие на островах Сахалин и Стенин, особи которых не имели в кариотипе B-хромосомы [5]. В европейской части ареала лесных мышей широко представлен вид *Sylvaemus flavicollis*. Согласно данным по частоте встречаемости добавочных хромосом у желтогорлой мыши на территории Западной Европы, только некоторые популяции характеризуются наличием 1–3 мелких акроцентрических B-хромосом, при этом наиболее часто встречались мыши с одной B-хромосомой – 23%, реже с двумя – 12% и тремя – 7% [2, 7–9]. При обследовании небольшой выборки из азиатской части Турции, состоящей из восьми особей желтогорлых мышей, B-хромосомы ни у одной из них не были обнаружены [6, 7].

В восточной части Европы хромосомный полиморфизм *S. flavicollis* по числу B-хромосом изучен недостаточно, лишь по выборкам из нескольких пунктов [9–11]. По данным этих работ у *Sylvaemus flavicollis* Восточной Европы частота добавочных хромосом варьирует от 0 до 80% [11]. Согласно работе [12] у желтогорлой мыши наблюдается клинальная тенденция увеличения частот B-хромосом от юго-восточной к центральной части Европы. Возможно эта тенденция может проявляться и

Таблица 1. Локалитеты и представленность особей с добавочными хромосомами (собственные и литературные данные)

№	Локалитет	Число исследованных животных		Источник
		всего	с B-хромосомами	
1	Северная Богемия (Чехия)	138	109	[12]
2	Северная Моравия (Чехия)	36	29	То же
3	Южная Моравия (Чехия)	84	34	»
4	Словакия	42	15	»
5	Югославия	421	169	»
6	Македония, Греция, Болгария	55	22	»
7	Румыния	19	2	»
8	Северо-Восточная Польша	146	41	[6]
9	ст. Поселок, Ленинградская обл., Россия	20	1	Наши данные
10	д. Бельково, Тверская обл., Россия	20	0	Наши данные
11	д. Борзово, Тверская обл., Россия	20	0	Наши данные
12	г. Новозыбков, Брянская обл., Россия	19	6	[12]
13	г. Добруш, Гомельская обл., Беларусь	5	0	Наши данные
14	д. Вялье, Гомельская обл., Беларусь	15	0	Наши данные
15	с. Плесецкое, Киевская обл., Украина	15	0	Наши данные
16	Турция	41	9	[12]
17	Турция	8	0	[10]
18	г. Саратов, Россия	21	17	[10]
19	ст. Вешенская, Ростовская обл., Россия	9	0	[15]
20	Средний Урал, Россия	7	0	[14]

дальше в восточной и северной частях Европы. Однако это предположение не подтверждается данными из северо-восточной части Польши [6]. В связи с этим важно получение дополнительных сведений о географической изменчивости частот B-хромосом в популяциях желтогорлой мыши Восточной Европы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучены кариотипы 95 особей *Sylvaemus flavicollis*, отловленных в семи пунктах территории восточной части Европы: 20 особей из окр. ст. Поселок, Ленинградская обл.; 20 особей из д. Бельково и 20 из д. Борзово, Тверская обл. (Россия); 15 особей – д. Вялье и 5 – особей окр. г. Добруш, Гомельская обл. (Беларусь), 15 особей – д. Плесецкое, Киевская обл. (Украина) (табл. 1, рис. 1).

Хромосомные препараты приготовлены по стандартной методике из клеток костного мозга и селезенки [13]. Для характеристики кариотипа от каждого животного анализировали от 20 и более метафазных пластинок. Подсчет хромосом и определение B-хромосом производилось с использованием микроскопа Leica D5000.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кариотипы от всех 95 желтогорлых мышей *S. flavicollis* при рутинной окраске имели стабильный основной хромосомный набор, состоящий из убывающего по размеру ряда акроцентрических хромосом с $2n = 48$; $NF = 48$. При этом половые хромосомы акроцентрические, X-хромосома – самый крупный акроцентрик набора. Y-хромосома является самым мелким акроцентриком набора.

Среди особей анализируемой выборки выявили одну добавочную хромосому (5%) в клетках костного мозга самца из окр. ст. Поселок Ленинградской обл. При этом в мейотических клетках этого самца на стадии диакинеза хорошо была видна ее парная структура (рис. 2). Таким образом, в мейотических клетках были выявлены две B-хромосомы, в отличие от клеток костного мозга, где наблюдалась только одна B-хромосома. Что согласуется с данными 1985 г.: из трех изученных особей данной местности одна содержала в своем кариотипе одну добавочную хромосому [10]. В то же время среди особей восточноазиатской лесной мыши *A. peninsulae* из Сибири, где каждая мышь имеет определенное число B-хромосом (от 1 до 30) [2, 3], а число B-хромосом у

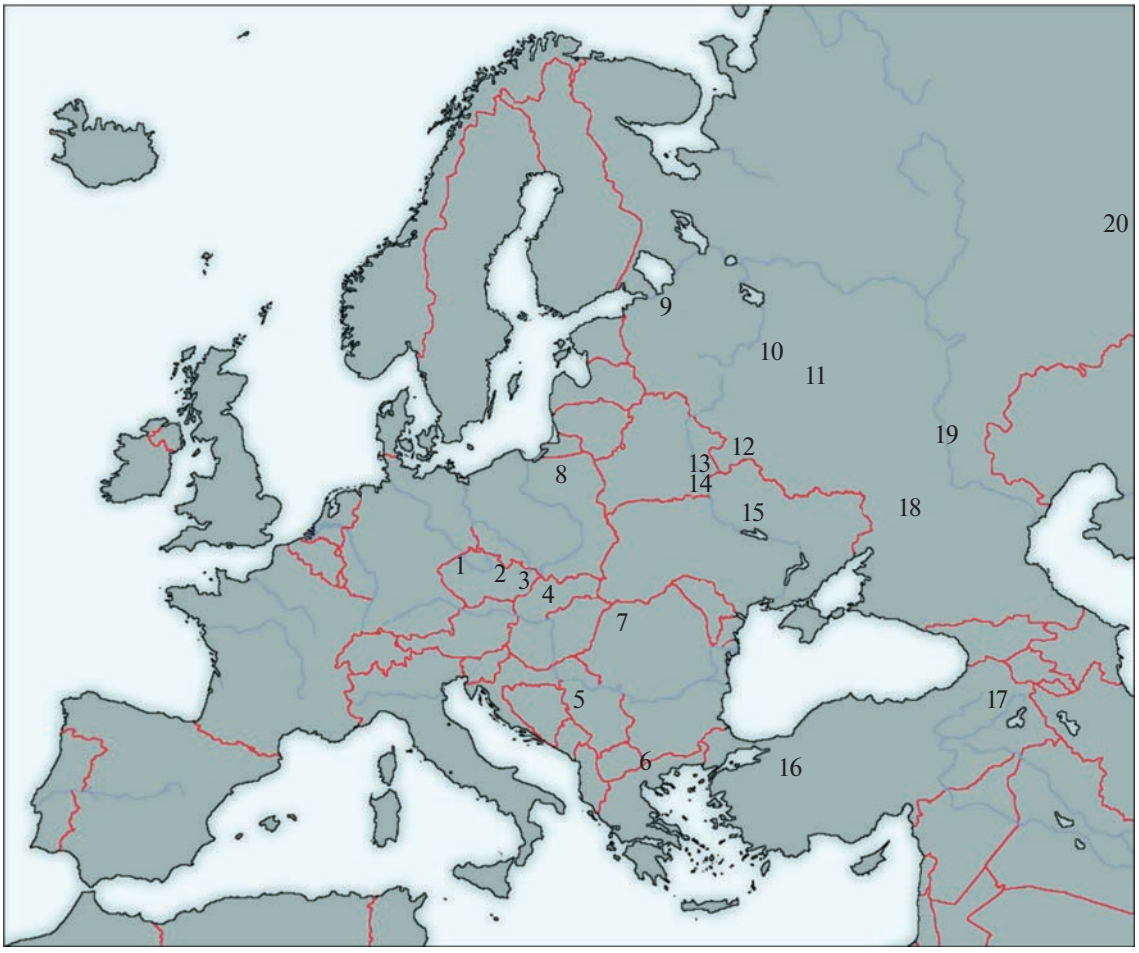


Рис. 1. Пункты отлова желтогорлых мышей (*S. flavicollis*) (собственные и литературные данные).

особей желтогорлой мыши *S. flavicollis* варьирует от 1 до 7 [6–10].

В настоящем исследовании не обнаружили В-хромосом у особей *Sylvaemus flavicollis* на значительной территории Валдайской возвышенности – Тверская обл. (40 особей), на территории Беларуси (35 особей), на территории Украины (15 особей), что согласуется с данными более ранних исследований [10].

Анализируя литературные данные по встречаемости В-хромосом у 1006 особей из 13 районов Европейской части ареала *S. flavicollis* (табл. 1) установлено, что частоты встречаемости мелких акроцентрических В-хромосом на данной территории варьируют от 5.2 до 81%. Так в Македонии, Греции и Болгарии частота встречаемости добавочных хромосом у желтогорлой мыши составила 5.2% ($n = 55$), в Румынии – 10.2% ($n = 19$), в северной части Польши – 20.1% ($n = 146$), в Словакии – 35.7% ($n = 42$), в Югославии – 40.1% ($n = 421$), в Чехии частота В-хромосом варьировала от 40.5 до 80.6% ($n = 258$), в окр. г. Саратова добавочные хромосомы встречались у 81% особей желтогор-

Рис. 2. Метафазная пластинка мыши *S. flavicollis* из окр. ст. Поселок Ленинградской обл., Россия. Стрелкой указана В-хромосома.

лой мыши. В азиатской части Турции В-хромосомы у желтогорлой мыши выявлены не были. По краям ареала – Средний Урал и Ростовская обл. [14, 15], добавочные хромосомы в кариотипе желтогорлых мышей не выявлены. Также отмечено, что среди особей *Sylvaemus flavicollis* с В-хромосомами чаще всего встречались мыши с одной (23%) и реже с двумя (12%) и тремя (7%) добавочными хромосомами. Мыши, имеющие четыре и более В-хромосомы, встречались крайне редко [6–10].

Таким образом, в целом по ареалу, географическая изменчивость частоты добавочных хромосом у лесных мышей *Sylvaemus flavicollis* восточной Европы случайна. Это заключение получено на основании изучения 1006 особей как по литературным данным, так и в настоящей работе (табл. 1). Впервые при анализе значительных выборок территории центральной части ареала *S. flavicollis* В-хромосомы не обнаружены. Эти предварительные данные указывают на особенность формирования популяций этого вида в данном месте ее ареала.

Мы предполагаем, что одним из факторов, определяющим распределение добавочных хромосом у лесных мышей является техногенный фактор. В связи с этим выборки мышей были разделены следующим образом. Выборку, подверженную техногенным факторам, составили: 20 особей из районов Гомельской обл. Республики Беларусь (Брагинского, Хойникского и Добрушского р-ов) и 15 особей из окрестностей г. Киева (Украина) – районы, подверженные воздействию техногенных факторов Чернобыльской аварии. К выборкам из достаточно чистых регионов можно отнести 60 особей желтогорлой мыши из Ленинградской и Тверской областей (Россия) (табл. 1). Таким образом, у *Sylvaemus flavicollis* в обследованных пунктах из центральной части ареала частота встречаемости особей с В-хромосомами очень низка и не зависит от экологических условий мест обитания, в данном случае от факторов техногенной природы.

Авторы благодарны за помощь в отлове мышей Ф.Н. Голинищеву, Е.С. Гайдученко и Д.В. Лукашову.

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. *Vujošević M., Blagojević J.* B chromosomes in populations of mammals // Cytogenet. Genome Res. 2004. V. 106. P. 247–256.
2. *Vujosevic M., Rajicic M., Blagojevic J.* B chromosomes in populations of mammals revisited // Genes. 2018. V. 9(10). https://doi.org/10.3390/genes9100487
3. *Борисов Ю.М., Афанасьев А.Г., Лебедев Т.Т., Бочкарев М.Н.* Множествомикро-В-хромосом в сибирской популяции мышей *Apodemus peninsulae* // Генетика. 2010. Т. 46. № 6. С. 798–804.
4. *Borisov Yu.M., Zhigarev I.A.* B-chromosome system in the korean field mouse *Apodemus peninsulae* Thomas 1907 (Rodentia, Muridae) // Genes. 2018. V. 9. P. 147–158. https://doi.org/10.3390/genes9100472
5. *Zima J., Ieradi L.A., Allegra F., Sartoretti A. et al.* Frequencies of B chromosomes in *Apodemusflavicollis* are not directly related to mutagenetic environmental effects // Folia Zool. 1999. V. 48. Suppl. 1. P. 115–119.
6. *Wojcik J.M., Wojcik A.M., Macholan M.* The mammalian model for population studies of B chromosomes: The wood mouse (*Apodemus*) // Cytogenet. Genome Res. 2004. V. 106. № 2–4. P. 264–270. https://doi.org/10.1159/000079297
7. *Kartavtseva I.V., Roslik G.V.* A complex B chromosome system in the Korean field mouse *Apodemus peninsulae* // Cytogenet. Genome Res. 2004. V. 106. № 2–4. P. 271–278. https://doi.org/10.1159/000079298
8. *Саблина О.В., Раджабли С.И., Голенищев Ф.И.* Добавочные хромосомы в кариотипе желтогорлой мыши (*Apodemus flavicollis*) из Ленинградской области // Зоол. журнал. 1985. Т. 64. № 12. С. 1901–1903.
9. *Наджафова Р.С.* Уникальные перестройки хромосом в кариотипах желтогорлых мышей (*Apodemus flavicollis*) разных популяций // Генетика. 1997. Т. 33. № 1. С. 126–129.
10. *Картавцева И.В.* Кариосистематика лесных и полевых мышей (Rodentia, Muridae). Владивосток: Дальнаука, 2002. 142 с.
11. *Боескоров Г.Г., Картавцева И.В., Загороднюк И.В. и др.* Ядрышкообразующие районы и В-хромосомы лесных мышей (Mammalia, Rodentia, Apodemus) // Генетика. 1995. Т. 31. № 2. С. 185–192.
12. *Zima J., Machola'n M.* B chromosomes in the wood mice (genus *Apodemus*) // Acta Theriol. 1995. Suppl. 3. P. 75–86.
13. *Орлов В.Н.* Кариосистематика млекопитающих. (Цитогенетические методы в систематике млекопитающих). М.: Наука, 1974. 208 с.
14. *Ялковская Л.Э., Сибиряков П.А., Зыков С.В.* Генетическая изменчивость желтогорлой мыши (*Sylvaemus flavicollis* Melch., 1834, Muridae, Rodentia) на восточной границе ареала // Генетика. 2018. Т. 54. № 6. С. 643–651. https://doi.org/10.7868/S001667581806005X
15. *Стахеев В.В., Богданов А.С., Водолажский Д.И.* Уточнение видового состава лесных мышей рода *Sylvaemus* на территории Ростовской области посредством кариологического, аллозимного и молекулярно-генетического анализов // Генетика. 2011. Т. 47. № 5. С. 660–670.

Geographic Variability in the Frequency of B Chromosome Occurrence in the Wood Mice *Sylvaemus flavicollis* of Eastern Europe

Yu. M. Borisov[a], *, I. A. Kryshchuk[b], **, and Z. Z. Borisova[a]

[a] *Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Science, Moscow, 119071 Russia*

[b] *Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus on Bioresource, Minsk, 220072 Belarus*

**e-mail: boriss-spb@yandex.ru*

***e-mail: ikryshchuk@yandex.by*

The karyotypes of 95 individuals (57 males and 38 females) of the yellow-throated mouse (*Sylvaemus flavicollis* Melchior, 1834), caught at seven points in Eastern Europe, were studied. Only one individual had one extra chromosome. It was shown that in *Sylvaemus flavicollis* in the surveyed sites from the central part of the range (Eastern Europe), the frequency of occurrence of individuals with B chromosomes is very low and probably does not depend on the ecological conditions of habitats.

Keywords: wild mice, *Apodemus peninsulae*, *Sylvaemus flavicollis*, B chromosomes.

ГЕНЕТИКА, 2023, том 59, № 5, с. 606–610

ХРОНИКА

УДК 575

ПЕРВАЯ УНИВЕРСИТЕТСКАЯ ШКОЛА РОССИЙСКОЙ ГЕНЕТИКИ

© 2023 г. С. Г. Инге-Вечтомов[1], Е. В. Голубкова[1, *], Г. А. Журавлёва[1]

[1]Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербург, 199034 Россия

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

Поступила в редакцию 08.12.2022 г.
После доработки 12.12.2022 г.
Принята к публикации 14.12.2022 г.

Первая кафедра генетики (тогда генетики и экспериментальной зоологии) в России была основана в 1919 г. профессором Ю.А. Филипченко. Первые шаги первая кафедра генетики в России делала в контексте мировой науки, чему способствовали тесные контакты между ведущими учеными-генетиками, которые сегодня являются признанными классиками генетики: Т.Х. Морган, Ю.А. Филипченко, Н.И. Вавилов, У. Бэтсон, Г.А. Левитский, Г.Д. Карпеченко, Ф.Г. Добржанский, Г.Д. Мёллер, М.Е. Лобашев и др. Современная научно-образовательная деятельность кафедры предопределена ее предыдущей историей и коллектив кафедры продолжает развивать традиции учебно-научного комплекса, в котором преподавательская работа неразрывно связана с исследовательской работой в рамках общей проблемы – "Механизмы интеграции генетических процессов". Формулировка широкой проблемы позволяет противостоять центробежным тенденциям, причиной которых может стать дифференцировка интересов и конкретных задач исследователей, а это, в свою очередь, таит опасность "зауживания" в подготовке специалистов. Оформление некоторой объединяющей проблемы традиционно для кафедры и сохраняет основу взаимопонимания между разными специалистами-генетиками, а также акцентирует представления о генетике как об одной из важнейших общебиологических дисциплин.

Ключевые слова: научная школа, история генетики, кафедра генетики СПбГУ, генетическое образование, парадигма.

DOI: 10.31857/S0016675823050077, **EDN:** FNRIFJ

"*Овладеть методом научного знания можно, только наблюдая его в его живой работе. Метод передается не путем книг, а путем заразы, путем непосредственной передачи его от человека к человеку*"
С.И. Гессен [1]

Важную роль в становлении ученого играет принадлежность к научной школе. Примером такой научной школы является кафедра генетики Санкт-Петербургского университета, отметившая в 2019 г. свое столетие. Это первая кафедра генетики (первое название – "генетики и экспериментальной зоологии") в нашей стране, она была основана в 1919 г. в Петроградском университете Юрием Александровичем Филипченко. С самого начала становление основных отечественных генетических школ – Н.К. Кольцова в Москве и Ю.А. Филипченко (а также Н.И. Вавилова) в Петрограде–Ленинграде, происходило при взаимодействии, во-первых, между собой, а во-вторых, с ведущими школами мировой генетики.

В Петергофский естественнонаучный институт Петроградского университета – ПЕНИ (до 2007 г. это был Биологический научно-исследовательский институт (БиНИИ) СПбГУ), также основанный Ю.А. Филипченко, приезжал У. Бэтсон, который по приглашению Н.И. Вавилова посетил СССР в период празднования 200-летия нашей Академии. Контакты Ю.А. Филипченко с Т.Х. Морганом вылились в публикацию небольшой брошюры "Наследственны ли приобретенные признаки" [2]. Эти контакты, развивавшиеся в дальнейшем [3], привели к командировке Ф.Г. Добржанского в 1927 г. по Рокфеллеровской стипендии в лабораторию Т.Х. Моргана для освоения работ с Drosophila. Позже, уже после кончины Ю.А. Филипченко, Г.Дж. Мёллер и К. Бриджес работали в Институте генетики АН СССР и на кафедрах генетики (тогда их было уже две – "генетики животных" и "генетики растений") Ленинградского университета. Кафедра генетики растений появилась благодаря инициативе Н.И. Вавилова (1932 г.). На должность заведующего этой кафедрой он рекомендовал своего молодого сотрудника – Г.Д. Карпеченко.

Как известно, Ф.Г. Добржанский не вернулся из командировки в США и в дальнейшем занял позицию лидера в школе Т. Моргана после его кончины и стал крупнейшим генетиком-эволюционистом, основателем синтетической теории эволюции [4, 5]. Оказавшись в школе Моргана, Добржанский не мог не испытать влияния Г.Дж. Мёллера, стремившегося найти общие основы генетики и теории эволюции и испытывавшего особый интерес к малым мутациям, генам-модификаторам и плейотропии мутаций. Скорее всего влияние было обоюдным. В конце концов Г. Мёллер в 1930-е гг. оказался в СССР в институте Н.И. Вавилова и на кафедре, основанной Ю.А. Филипченко.

Ф.Г. Добржанский трижды пытался приехать в СССР. Трижды ему было отказано (личное сообщение Добржанского). Тем не менее он сохранял связи с российскими генетиками, в частности, в 1966 г., после "реабилитации" генетики в СССР была организована поездка четырех советских генетиков (Б.Л. Астаурова, С.И. Алиханяна, Д.К. Беляева, Н.П. Дубинина) в США. В 1967 г. С.Г. Инге-Вечтомов, будучи на стажировке в Йельском университете, был приглашен Ф. Добржанским в Нью-Йорк к себе в лабораторию в Рокфеллеровском университете. С.Г. Инге-Вечтомов, ныне академик РАН, заведовал кафедрой генетики и селекции СПбГУ с 1972 по 2015 гг.

Научные интересы Ю.А. Филипченко охватывали широкий круг проблем, среди которых были генетика животных, генетика растений, генетика человека (евгеника). Исследования разных биологических объектов объединяют интерес Филипченко к наследованию количественных признаков. В связи с этим понятен его интерес к вариационной статистике. Юрий Александрович был последовательным пропагандистом идей Г.И. Менделя и Ф. Гальтона. Это объясняет и его интерес как к евгенике, так и к генетике человека в более широком смысле. Большое значение для понимания научного мировоззрения Ю.А. Филипченко имеет знакомство с его эволюционными взглядами. Наиболее полно они отражены в труде "Эволюционная идея в биологии" (1926 г.). Кроме того, нужно напомнить, что именно Филипченко ввел в 1927 г. понятия "макроэволюция" и "микроэволюция" [6]. Символично, что Первый всесоюзный съезд генетиков и селекционеров в 1929 г. в Ленинграде открывали два доклада: Н.И. Вавилова "Проблема происхождения культурных растений и животных в современном понимании" и Ю.А. Филипченко "Проблема гена" [7].

Особый интерес сегодня представляют взгляды Филипченко на различную роль генома и плазмона в процессах микро- и макроэволюции [8]. Интересен сам факт обращения автора к тому, что теперь принято называть "эпигенетикой", значение которой в индивидуальном и эволюционном развитии мы не до конца понимаем и сегодня. Юрий Александрович Филипченко создал обширную научную школу, многие представители которой стали известными учеными-генетиками: М.Л. Бельговский, А.А. Прокофьева-Бельговская, Н.С. Бутарин, Ф.Г. Добржанский, А.И. Зуйтин, И.И. Канаев, Ю.Я. Керкис, Н.Н. Колесник, Т.К. Лепин, Я.Я. Лус, Н.Н. Медведев, Ю.М. Оленов, Е.П. Раджабли, Н.Я. Федорова, Р.А. Мазинг, Ю.Л. Горощенко и др.

Кафедра, созданная Ю.А. Филипченко, пережила тяжелый период гонений, завершившийся разгромом отечественной генетики после печально известной августовской Сессии ВАСХНИЛ 1948 г., и стала одним из главных центров возрождения отечественной генетики в 50–60-е гг. XX в. В восстановлении преподавания генетики в нашей стране сыграл огромную роль Михаил Ефимович Лобашёв, выпускник кафедры генетики и экспериментальной зоологии 1932 г. [9, 10]. Лобашёв начал специализироваться по генетике уже на первом курсе. Он пришел на кафедру генетики и экспериментальной зоологии весной 1930 г., когда скончался проф. Ю.А. Филипченко. Сильное влияние на формирование М.Е. Лобашёва как ученого оказали дисциплины физиологического цикла, которым он уделял большое внимание в студенческие годы. Курс цитофизиологии проф. Д.Н. Насонова, который он слушал факультативно, подтолкнул Михаила Ефимовича к формулированию впоследствии его физиологической гипотезы мутационного процесса. Еще до поступления в аспирантуру Лобашёв был принят на работу в Институт генетики АН СССР, который организовал Н.И. Вавилов на базе лаборатории генетики, созданной еще Ю.А. Филипченко. В Институте генетики М.Е. Лобашёв познакомился с Н.И. Вавиловым и был очарован силой его личности и талантом ученого. Там же он познакомился и подружился с Я.Я. Лусом – одним из первых сотрудников Ю.А. Филипченко, а также с американскими генетиками К. Бриджесом и Г. Мёллером, которых М.Е. Лобашёв считал "лучшими дрозофилистами мира". Поступив в аспирантуру, Лобашёв увлекся проблемой химического мутагенеза, в чем и преуспел. Он (почти одновременно с В.В. Сахаровым [11]) индуцировал летальные сцепленные с полом мутации у дрозофилы с помощью аммиака, уксусной кислоты и асфиксии [12–14]. В 1935 г. Михаил Ефимович защитил кандидатскую диссертацию на тему "О природе действия химических факторов на мутационный процесс". Оппонентами на защите выступили: Г. Мёллер (будущий лауреат Нобелевской премии), Г.Д. Карпеченко (позже расстрелянный в период уничтожения генетики), Э. Бауэр (расстрелянный в 1938 г.). 11 апреля 1936 г. газета "Известия" опубликовала статью М.Е. Лобашёва "Искусственное получение мутаций". Заключение к ней написал Г. Мёллер. Он в частности

отметил: “Мы горячо приветствуем те возможности, которые открывает работа М.Е. Лобашёва, и надеемся, что он пойдет в этом направлении еще дальше и скоро найдет себе множество последователей среди генетиков, так как эти данные относительно получения мутаций химическим методом являются важным событием... Наша радость тем больше, что успех не случаен, а является результатом критического и в то же время оригинального мышления, комбинированного с знанием всей предыдущей работы и с большой затратой утомительного физического и умственного труда. Здесь был необходим настоящий синтез. И наибольшее удовлетворение дает то обстоятельство, что перед нами достижение члена комсомола. С энтузиазмом я приношу мои поздравления т. Лобашёву и мои сердечные пожелания дальнейшего успеха”. Дружбу с Г. Мёллером Михаил Ефимович сохранил на всю жизнь. Напоминанием об этом периоде на кафедре генетики служит набор таблиц, собственноручно изготовленных Г.Дж. Мёллером для курса по генетике дрозофилы, который он читал студентам. Эти таблицы подарил кафедре в 1974 г. Н.Н. Медведев, друживший с Г. Мёллером. В студенческие годы М.Е. Лобашёва Н.Н. Медведев был его куратором.

Михаил Ефимович прошел всю войну, закончив ее в чине капитана, он демобилизовался в октябре 1945 г. Уже в 1946 г. М.Е. Лобашёв защитил докторскую диссертацию “О природе действия внешних условий на динамику мутационного процесса” [15]. На следующий год краткое изложение диссертации было опубликовано им в журнале “Вестник Ленинградского университета”: “Физиологическая (паранекротическая) гипотеза мутационного процесса” [16]. В своей работе М.Е. Лобашёв впервые поставил рядом два понятия: “мутация” и “репарация”. Он считал, что мутация это – результат нетождественной репарации клетки после повреждающего воздействия. Свои идеи Лобашёв и его ученики обосновывали при исследовании последействия повышенной температуры (не мутагенного фактора) на частоту мутаций, индуцированных рентгеновыми лучами. Такое воздействие повышало частоту мутаций [17]. Следовательно, мутации – не одноактные события, а результат процесса, длящегося во времени – устранения в процессе репарации первичного повреждения (М.Е. Лобашёв называл их предмутационными изменениями) генетического материала либо превращения его в мутацию. Так оно и оказалось в дальнейшем. Много позже ученики Михаила Ефимовича, а также ученики его учеников разработали подходы к изучению фенотипического проявления первичных повреждений в локусе типов спаривания у дрожжей-сахаромицетов [18, 19]. Зависимость мутагенеза от состояния систем репарации ДНК общепризнана в настоящее время. Увы, автор физиологической гипотезы вскоре был лишен возможности разрабатывать ее далее. В августе 1948 г. прошла печально известная сессия ВАСХНиЛ, после чего все генетики и им сочувствующие были изгнаны из университетов страны. В течение последующего десятилетия генетика в Советском Союзе была под запретом, что послужило причиной отставания советской и российской биологии от развития мировой науки. Восстановление генетики в нашей стране началось после 1957 г., в этом году стало возможным возвращение на кафедру М.Е. Лобашёва. Прежде всего он выдвинул лозунг “Кадры для кадров!”, и первой его заботой было восстановление преподавания генетики в университете. С 1957 г. Лобашёв читал курс общей генетики, который затем стал основой его учебника “Генетика” [20, 21], который долгое время служил единственным учебным пособием для университетских биологов в постижении науки о наследственности и изменчивости. М. Лобашёв на всю жизнь сохранил интерес к проблеме изменчивости и к соотношению наследственной и ненаследственной изменчивости. Традиции М.Е. Лобашёва живут по сию пору на кафедре генетики и биотехнологии СПбГУ. В настоящее время кафедра разрабатывает в основном два дополняющих друг друга направления. 1) Развитие матричного принципа, восходящего к идеям Н.К. Кольцова и воплощенного в Центральной Догме молекулярной биологии Ф. Крика. 2) Экологическая генетика как основа нового эволюционного синтеза. Кафедра разрабатывает общую проблему “Механизмы интеграции генетических процессов”.

Последние десятилетия (начиная с 70-х гг. XX в.) школа генетики нашего университета сознательно и целенаправленно опирается на структуру научного метода [22], творчески объединяя проблемы, возникающие в исследовательской работе и в преподавании генетики. При этом и само содержание научного метода становится областью творчества. Достаточно напомнить, что Т. Кун, предложивший понятие парадигмы как характеристики “нормальной” науки, так и не дал определения этого понятия в своем классическом труде, хотя и постоянно его использовал. Наиболее удачно дал определение парадигмы Н.Н. Хромов-Борисов, окончивший химфак в 1963 г., а затем он был аспирантом и сотрудником кафедры генетики. Н.Н. Хромов-Борисов наполовину в шутку определил науку как “круговую поруку гипотез”. Замените “науку” на “парадигму” и вы получите хорошее определение последней.

Еще одно “уточнение” структуры научного метода мы находим у А.С. Пушкина:

“О сколько нам открытий чудных

Готовит просвещенья дух.

И опыт – сын ошибок трудных,

И гений – парадоксов друг ...” А.С. Пушкин [23].

Сам Т. Кун писал о фактах, не укладывающихся в существующую парадигму, как об “аномалиях”. Понятие “парадокса” здесь уместнее и с лингвистической точки зрения для обозначения нового направления при наличии твердых доказательств в пользу его существования. Продуктивность парадигмального подхода в сопоставлении с наблюдаемыми парадоксами хорошо иллюстрируют работы по изучению структуры и функции гена (парадигмальный подход), проводившиеся на кафедре генетики с 60-х гг. XX в. (Связь супрессии и межаллельной комплементации у *S. cerevisiae*) и приведшие к расшифровке генетического контроля дрожжевого приона [PSI^+] (парадоксальный феномен) [24]. Сопоставление парадигмы и парадоксов в преподавании (не только генетики) закладывает основы критического мышления у студентов и стимулирует их творческие потенции.

Научные школы представляют собой уникальный феномен коллективного творческого саморазвития, в основе которого лежит взаимное обогащение знаниями, идеями и исследовательским интересом. Они характеризуются большой концентрацией выдающихся исследователей и чрезвычайно высокой производительностью. Это не единственная возможная форма коллективного осуществления научной деятельности, но, по всей видимости, самая эффективная. Наличие такого феномена как научная школа опровергает распространенную в настоящее время гипотезу о единственно правильном способе организации исследовательской деятельности – временные творческие коллективы, создаваемые и финансируемые на конкурсной основе, “под заказ” [25]. Наиболее мощным стимулом развития науки является творческий поиск (исследовательский интерес). Именно фундаментальные исследования, не имеющие, на первый взгляд, сиюминутной практической ценности, являются основой открытий и научных революций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Гессен С.И.* Основы педагогики. Введение в прикладную философию. М.: Школа-Пресс, 1995. 448 с.
2. *Морган Т.Г., Филипченко Ю.А.* Наследственны ли приобретенные признаки. Л.: “Сеятель”, 1925. 58 с.
3. *Инге-Вечтомов С.Г.* История о том, как Филипченко дружил с Морганом и послал к нему Добржанского, как Кольцов отправил в Германию Тимофеева-Ресовского, а тот посоветовал Мёллеру ехать в Ленинград к Вавилову, и что из этого вышло // Экол. генетика. 2004. Т. 1. Вып. 4. С. 5–11. https://doi.org/10.17816/ecogen245-11
4. *Dobzhansky Th.* Genetics and the Origin of Species. N.Y.: Columbia Univ. Press, 1937. 446 p.
5. *Добжанский Ф.* Генетика и происхождение видов. Ижевск: Регулярная и хаотическая динамика, 2010. 384 с.
6. *Philiptschenko Ju.* Varibilitat und Variation. Berlin, 1927. 101 s.
7. *Филипченко Ю.А.* Эволюционная идея в биологии. 3-е изд. М.: Наука, 1977. 227 с.
8. *Александров Д.А.* Юрий Александрович Филипченко как генетик-эволюционист // Эволюционная генетика (К 100-летию со дня рождения Ю.А. Филипченко). Л.: Ленинградский университет, 1988. С. 3–21.
9. *Инге-Вечтомов С.Г.* Не проигрывайте выигрышных партий. К 100-летию М.Е. Лобашёва // Генетика. 2007. Т. 43. № 10. С. 1287–1298.
10. *Инге-Вечтомов С.Г.* Ретроспектива генетики. Genetics in Retrospect (курс лекций). СПб.: Изд-во Н.–Л., 2015. 336 с.
11. *Сахаров В.В.* Йод как химический фактор, действующий на мутационный процесс у *Drosophila melanogaster* // Биол. журн. 1932. Т. 1. Вып. 3–4. С. 1–8.
12. *Лобашёв М.Е.* Влияние удушья на мутационный процесс у *Drosophila melanogaster* // Тр. Ленингр. о-ва естествоисп. 1934. Вып. 3. С. 371–378.
13. *Лобашёв М.Е., Смирнов Ф.А.* К природе действия химических агентов на мутационный процесс у *Drosophila melanogaster*. I. Действие уксусной кислоты на nondisjunction хромосом и трансгенации у *Drosophila melanogaster* // Докл. АН СССР. 1934. Т. 3. Вып. 3. С. 307–311.
14. *Лобашёв М.Е., Смирнов Ф.А.* К природе действия химических агентов на мутационный процесс у *Drosophila melanogaster*. II. Действие аммиака на возникновение летальных трансгенаций // Докл. АН СССР. 1934. Т. 3. Вып. 3. С. 174–176.
15. *Лобашёв М.Е.* О природе действия внешних условий на динамику мутационного прцесса. Тезисы диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук. Л.: Лен. ун-тет, 1946. 3 с.
16. *Лобашёв М.Е.* Физиологическая (паранекротическая) гипотеза мутационного процесса // Вестник Ленингр. ун-та. 1947. № 8. С. 10–29.
17. *Тихомирова М.М.* Сравнительный анализ эффекта последействия радиации на мутагенез разного типа у самок дрозофилы // Генетика. 1975. Т. 11. № 2. С. 125–134.
18. *Inge-Vechtomov S.G., Repnevskaya M.V.* Phenotypic expression of primary lesions of genetic material in *Saccharomyces* yeast // Genome. 1989. V. 31. P. 497–502. https://doi.org/10.1139/g89-097
19. *Жук А.С., Степченкова Е.И., Инге-Вечтомов С.Г.* Выявление модификаций первичной структуры ДНК, возникших под действием аналога азотистых оснований 6-n-гидроксиламинопурина, в альфа-тесте у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Экол. генетика. 2020. Т. 18. № 3. С. 357–366. https://doi.org/10.17816/ecogen34581
20. *Лобашёв М.Е.* Генетика: курс лекций. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1963. 478 с.
21. *Лобашёв М.Е.* Генетика. Учебное пособие. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1967. 751 с.

22. *Кун Т.* Структура научных революций. М.: Прогресс, 1975. 288 с.
23. *Пушкин А.С.* Собрание сочинений в 16-ти томах. М.: Худ. лит-ра, Т. 3. 1948. С. 464.
24. *Галкин А.П., Миронова Л.Н., Журавлева Г.А. и др.* Прионы дрожжей, амилоидозы млекопитающих и проблема протеомных сетей // Генетика. 2006. Т. 42. № 11. С. 1558–1570.
25. *Устюжанина Е.В., Евсюков С.Г., Петров А.Г. и др.* Научная школа как структурная единица научной деятельности. Препринт #WP/2011/288. М.: ЦЭМИ РАН, 2011. 73 с.

The First University School of Russian Genetics

S. G. Inge-Vechtomov[a], E. V. Golubkova[a], *, and G. A. Zhouravleva[a]

[a]Saint Petersburg State University, Department of Genetics and Biotechnology, St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia

**e-mail: e.golubkova@spbu.ru*

Professor Yu.A. Filipchenko founded the first department of genetics (then genetics and experimental zoology) in Russia in 1919. The first department of genetics in Russia made its first steps in the context of world science was facilitatedthrough contacts between leading scientists in genetics, who today are recognized as classics of genetics – T.H. Morgan, Yu.A. Filipchenko, N.I. Vavilov, W. Bateson, G.A. Levitsky, G.D. Karpechenko, F.G. Dobzhansky, H.J. Muller, M.E. Lobashev and others. The modern scientific and educational activities of the department are predetermined by its previous history and the staff of the department continues to develop the traditions of the educational and scientific complex. Teaching work is link inextricably with research work within the framework of a common problem – "Mechanisms of the genetic processes integration". The formulation of a broad problem makes it possible to resist centrifugal tendencies, the cause of which may be the differentiation of interests and specific tasks of researchers, what, in turn, is fraught with the danger of training narrow specialists. The formularization of some unifying problem is traditional for the department and preserves the basis of mutual understanding between different geneticists, and emphasizes that geneticsis one of the most important general biological disciplines.

Keywords: scientific school, history of genetics, department of genetics, St. Petersburg State University, genetic education, paradigm.