

ISSN 0016-6758

Том 59, Номер 9

Сентябрь 2023



ГЕНЕТИКА



www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 59, номер 9, 2023

Обзорные и теоретические статьи

Клеточные и эпигенетические аспекты программирования тренированного иммунитета и перспективы создания универсальных вакцин в преддверии учащающихся пандемий

*И. В. Алексеенко, Р. Г. Васильев, Л. Г. Кондратьева,
С. В. Костров, И. П. Чернов, Е. Д. Свердлов*

981

Закон гомологических рядов Н.И. Вавилова и возможная его судьба

А. Ю. Розанов

1002

Изменчивость В-хромосом у растений и животных в экстремальных условиях обитания

Ю. М. Борисов, Т. С. Седелникова

1012

Генетика растений

Элиминация хромосом как механизм возникновения диплоидных растений в диплоидно-тетраплоидных скрещиваниях у кукурузы (*Zea mays* L.)

*Л. А. Эльконин, Л. И. Мавлютова, А. Ю. Колесова,
В. М. Панин, М. И. Цветова*

1023

Взаимосвязь содержания антоцианов с уровнем экспрессии регуляторных и структурных генов пути биосинтеза антоцианов у видов перца *Capsicum* L.

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

1036

Генетика животных

Генетическая структура русской верховой породы лошадей

*Э. А. Николаева, В. Н. Воронкова, М. А. Политова,
Е. В. Рябова, В. А. Демин, Ю. А. Столповский*

1048

Генетика человека

Репликативное исследование ассоциации GWAS-значимых полиморфных локусов генов *TUFM*, *SH2B1*, *ZNF638*, *NEGR1*, *ATP2A1*, *EXOC4*, *CSE1L* с когнитивными способностями

*А. В. Казанцева, Ю. Д. Давыдова, Р. Ф. Еникеева, З. Р. Тахирова,
Р. Н. Мустафин, М. М. Лобаскова, С. Б. Малых, Э. К. Хуснутдинова*

1059

Генетическая история русских старожилов арктического побережья Якутии из с. Русское Устье по данным Y-хромосомы и широкогеномного анализа

*А. В. Соловьев, Т. В. Борисова, Г. П. Романов, Ф. М. Терюгин,
В. Г. Пшенникова, С. Е. Никитина, А. Н. Алексеев,
Н. А. Барашков, С. А. Федорова*

1070

Генетико-демографический анализ параметров естественного воспроизводства и индексов Кроу в этнических группах Москвы и Санкт-Петербурга (по материалам Всероссийской переписи населения 2010 г.)

А. С. Грачева, И. Г. Удина, О. Л. Курбатова

1078

Краткие сообщения

Анализ мутаций генов автономного эмбрио- и эндоспермогенеза кукурузы

Е. М. Моисеева, В. В. Фадеев, Ю. В. Красова, М. И. Чумаков

1090

Влияние делеции в некаталитическом домене GdpP на фенотип *Staphylococcus aureus* посредством направленного геномного редактирования с помощью системы CRISPR/Cas9

*Ю. В. Сопова, М. Е. Велижанина, Д. А. Кандина, В. В. Гостев,
П. С. Чулкова, О. С. Сулян, С. В. Сидоренко*

1094

Contents

Vol. 59, No. 9, 2023

Reviews and Theoretical Articles

Cellular and Epigenetic Aspects of Trained Immunity and Prospects for Creation of Universal Vaccines in the Face of Increasingly Frequent Pandemics

*I. V. Alekseenko, R. G. Vasilov, L. G. Kondratyeva,
S. V. Kostrov, I. P. Chernov, and E. D. Sverdlov*

981

The Law of Homological Series of N.I. Vavilov and Its Possible Fate

A. Yu. Rozanov

1002

B-Chromosome Variability in Plants and Animals under Extreme Environments

Yu. M. Borisov and T. S. Sedel'nikova

1012

Plant Genetics

Elimination of Chromosomes as a Mechanism for the Formation of Diploid Plants in Diploid–Tetraploid Crosses in Maize (*Zea mays* L.)

*L. A. Elkonin, L. I. Mavlyutova, A. Yu. Kolesova,
V. M. Panin, and M. I. Tsvetova*

1023

Relationship of the Anthocyanin Content with the Expression Level of the Anthocyanin Biosynthesis Pathway Regulatory and Structural Genes in *Capsicum* L. Species

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

1036

Animal Genetics

Genetic Structure of Russian Riding Horse Breed

*E. A. Nikolaeva, V. N. Voronkova, M. A. Politova,
E. V. Ryabova, V. A. Demin, and Yu. A. Stolpovsky*

1048

Human Genetics

Replication Study of GWAS-Associated Variants in the *TUFM*, *SH2B1*, *ZNF638*, *NEGR1*, *ATP2A1*, *EXOC4*, and *CSE1L* Genes and Cognitive Abilities

*A. V. Kazantseva, Yu. D. Davydova, R. F. Enikeeva, Z. R. Takhirova,
R. N. Mustafin, M. M. Lobaskova, S. B. Malykh, and E. K. Khusnutdinova*

1059

The Genetic History of the Russian Old Settlers of the Arctic Coast of Yakutia from the Village Russkoye Ust'ye

*A. V. Solovyev, T. V. Borisova, G. P. Romanov, F. M. Teryutin,
V. G. Pshennikova, S. E. Nikitina, A. N. Alekseev,
N. A. Barashkov, and S. A. Fedorova*

1070

Genetic-Demographic Analysis of Natural Reproduction Parameters and Crow's Indices in Ethnic Groups of Moscow and St. Petersburg (Based on the 2010 Russia's Population Census)

A. S. Gracheva, I. G. Udina, and O. L. Kurbatova

1078

Short Communications

Analysis of Mutations of the Maize Genes of Autonomous Embryo-, Endospermogenesis

E. M. Moiseeva, V. V. Fadeev, Yu. V. Krasova, and M. I. Chumakov

1090

The Influence of Deletion in the Non-Catalytic Domain of GdpP Mediated
by Genome Editing with CRISPR/Cas9 on the Phenotype of *Staphylococcus aureus*

*Yu. V. Sopova, M. E. Velizhanina, D. A. Kandina, V. V. Gostev,
P. S. Chulkova, O. S. Sulian, and S. V. Sidorenko*

1094

ОБЗОРНЫЕ
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 571.27

**КЛЕТОЧНЫЕ И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ
ПРОГРАММИРОВАНИЯ ТРЕНИРОВАННОГО ИММУНИТЕТА
И ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ УНИВЕРСАЛЬНЫХ ВАКЦИН
В ПРЕДДВЕРИИ УЧАЩАЮЩИХСЯ ПАНДЕМИЙ**

© 2023 г. И. В. Алексеенко^{1, 2}, Р. Г. Васильов¹, Л. Г. Кондратьева^{1, 2, *}, С. В. Костров¹,
И. П. Чернов², Е. Д. Свердлов^{1, **}

¹Национальный исследовательский центр Курчатовский институт, Москва, 123182 Россия

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук,
Москва, 117997 Россия

*e-mail: liakondratyeva@yandex.ru

**e-mail: edsverd@gmail.com

Поступила в редакцию 14.04.2023 г.

После доработки 19.04.2023 г.

Принята к публикации 20.04.2023 г.

Неизбежность вспышек пандемических болезней вызывает острую необходимость чрезвычайных мер, направленных на создание эффективных технологий снижения их вреда для человеческой популяции в промежутки времени от появления эпидемии до разработки соответствующих вакцин и организации их производства. В данном обзоре мы обсуждаем возможность создания универсальных вакцин, которые, используя неспецифический антипатогенный потенциал врожденного иммунитета, позволяли бы при появлении неидентифицированного патогена вакцинировать популяцию, в которой произошла вспышка болезни, и снижать ее остроту до появления специфических к данному патогену вакцин. В целом имеются убедительные доказательства того, что живые бактериальные или вирусные вакцины, например, от туберкулеза (БЦЖ), кори и полиомиелита, оказывают гетерологичное защитное воздействие против неродственных патогенов. Это связано со способностью врожденной иммунной системы хранить память о прошлых инфекциях и использовать ее для выработки иммунной защиты против новых. Этот эффект получил название “обученного” или “тренированного” иммунитета. Использование тренированного иммунитета также может представлять собой важный новый подход к улучшению существующих вакцин или к разработке новых вакцин, которые сочетают в себе индукцию классической адаптивной иммунной памяти и врожденной иммунной памяти. Такие подходы могут быть усилены с помощью генетических технологий и могут оказаться чрезвычайно полезными в борьбе с будущими пандемиями.

Ключевые слова: БЦЖ, врожденная иммунная система, мостовые вакцины, тренированный иммунитет, TLR.

DOI: 10.31857/S0016675823090023, **EDN:** WROKEZ

Некоторые из самых опасных пандемий в истории, такие как холера, чума, ВИЧ/СПИД и грипп, привели к увеличению показателей смертности, а испанский грипп, возникший всего столетие назад, стал одним из самых смертоносных, унеся жизни около 50 млн человек. Столетие спустя человечество столкнулось с пандемией COVID-19, инфекционным заболеванием дыхательных путей, вызванным ранее неизвестным вирусным патогеном человека, SARS-CoV-2, которое на момент написания этой статьи унесло почти семь миллионов жизней во всем мире.

“Перенаправить военные бюджеты на борьбу с изменением климата и пандемиями” — так назва-

ла свой комментарий Дениз Гарсия из Северо-Восточного университета в Бостоне [1]. “Правительства должны прекратить тратить миллиарды долларов на оружие и защитить граждан от реальных угроз, с которыми они сталкиваются” — вот призыв, который она обращает к мировым лидерам под влиянием пандемии COVID-19 [1]. Такие призывы не новы: после вспышек тяжелого острого респираторного синдрома (ТОРС) и вируса Зика обсуждались расходы бюджета безопасности на обеспечение готовности к пандемиям. В XXI в. произошли также вспышки вызванного коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома в 2003 г., пандемия свиного гриппа в

2009 г., вспышка коронавирусного ближневосточного респираторного синдрома в 2012 г., эпидемия болезни, вызванной вирусом Эбола в Западной Африке, очаги которой были зафиксированы в США и Испании в 2013–2016 гг. Начавшаяся в 2019 г. и продолжающаяся доныне пандемия COVID-19, вызванная коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2), нанесла совершенно беспрецедентный урон мировой системе здравоохранения и экономике. В то же время последние несколько десятилетий ознаменовались столь же беспрецедентной эрой технологических, демографических и климатических изменений: с 2000 г. число авиарейсов удвоилось, с 2007 г. в городах проживает больше людей, чем в сельской местности, численность населения продолжает расти, а изменение климата представляет нарастающую угрозу обществу. Ученые определили девять границ, превышение которых ставит под угрозу целостность нашего существования. К сожалению, человечество их не соблюдает и уже преодолело четыре из девяти границ, которые позволяли удерживать Планету на комфортном для современной жизни уровне. Мы медленно приближаемся к пересечению последних пяти границ [2, 3]. В ноябре 2021 в Глазго состоялась Конференция сторон Рамочной конвенции ООН об изменении климата (COP26), в которой принимали участие почти 196 государств. Ее итоговый документ – Климатический пакт Глазго [4]. Государства, присоединившиеся к конвенции, согласились сократить к 2030 г. глобальные выбросы углекислого газа на 45% по сравнению с уровнем 2010 г. Тем не менее эксперты говорят, что предпринимаемые сейчас усилия недостаточны, чтобы не допустить повышения среднегодовой температуры на Земле более чем на 2°C [5]. Каждый градус потепления имеет значение для ледников. Половина всех ледников исчезнет к 2100 г., даже если глобальное потепление будет ограничено целью Парижского соглашения – на 1.5°C выше доиндустриального уровня. Если нынешняя тенденция сохранится, это приведет к потеплению на 2.7°C и вызовет широкомасштабное таяние ледников в большинстве регионов к 2100 г. [6].

Если усилия по контролю за изменением климата подкрепляются сетью международных договоров и юридических соглашений, то в применении к глобальному здравоохранению такие инструменты не были полностью развиты [7, 8], хотя еще в 2000 г. была организована Глобальная сеть оповещения и реагирования на вспышки эпидемий (Global Outbreak Alert and Response Network, GOARN), состоящая из многочисленных медицинских учреждений, лабораторий, производственных организаций и других структур, которые наблюдают за угрожающими эпидемиями и реагируют на них, сотрудничая с Все-

мирной организацией здравоохранения (ВОЗ). Пандемия COVID-19 показала, что безотлагательно нужны дополнительные шаги, которые позволят эффективнее смягчать последствия следующих пандемий [9, 10].

В последние десятилетия появилось несколько многообещающих иммунотерапевтических подходов, которые в основном воздействуют на клетки адаптивной иммунной системы. Однако в последние годы внимание исследователей все чаще обращается на потенциал врожденной иммунной системы [11].

В 1959 г. Ллойд Олд и его коллеги сообщили об использовании вакцины против туберкулеза БЦЖ (*Bacillus Calmette Guérin*, BCG) в качестве иммунотерапевтического средства для лечения рака [12]. Сегодня вакцина БЦЖ является одобренным Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США методом лечения рака мочевого пузыря, и, как сообщается, другие злокачественные новообразования, такие как лимфома и меланома, также реагируют на вакцину БЦЖ [11].

Во многих последующих исследованиях сообщалось о защитном действии вакцины БЦЖ в отношении заболеваний, не связанных с туберкулезом. Иммунный ответ на неродственный патоген называют гетерологичной защитой (*heterologous protection*). Этот гетерологичный эффект можно частично объяснить памятью врожденной иммунной системы, которую называют тренированным иммунитетом, и использовать БЦЖ для вакцинации от различных инфекционных заболеваний. В ситуациях, когда другие конкретные профилактические средства недоступны, как это было в начальной стадии инфекции SARS-CoV-2, такая вакцина может использоваться в качестве мостовой (*bridging*) для снижения заболеваемости и/или для смягчения остроты болезни [13, 14].

Однако эффективность такого подхода остается спорной из-за ограниченного числа опубликованных данных клинических испытаний. В отсутствие доказательств Всемирная организация здравоохранения 12 апреля 2020 г. выпустила научную записку против вакцинации БЦЖ для предотвращения COVID-19, и эта рекомендация остается неизменной до настоящего времени [13].

Отсылая читателя, желающего ознакомиться с проблемами, связанными с организацией подготовки к грядущим пандемиям, к соответствующим обзорам [3, 15–23], в настоящем обзоре мы пытаемся обсудить возможность создания универсальных вакцин, которые, используя неспецифический антипатогенный потенциал врожденного иммунитета, позволяли бы при появлении неидентифицированного патогена вакцинировать инфицированную популяцию и снижать остроту пато-



Рис. 1. Схематическое представление иммунной системы (модифицировано по [29]).

логии до появления специфических к данному патогену вакцин.

ОБЩАЯ СХЕМА ОТКЛИКА ОРГАНИЗМА НА ПАТОГЕНЫ И ДРУГИЕ НАРУШЕНИЯ

Общая схема строения иммунной системы человека представлена на рис. 1. В организме человека существуют две основные системы защиты от инфекций: врожденный (ВИ) и приобретенный (ПИ) иммунитет [24]. Первый выступает в качестве первой линии защиты, которая должна выиграть время, чтобы второй тип успел активироваться. В настоящем обзоре мы будем рассматривать только клеточный компонент ВИ. Эта часть ВИ представляет собой быстрый (от минут до часов и дней) иммунный ответ хозяина, характеризующийся неспецифическим распознаванием различных высококонсервативных микробных молекулярных структур клеточными рецепторами распознавания образов (pattern-recognition receptors, PRR, см. ниже). В систему врожденного иммунитета включают также так называемый собственный (intrinsic) иммунитет. Собственный противовирусный иммунитет относится к форме врожденного иммунитета, который напрямую ограничивает репликацию и сборку вируса, тем самым делая клетку непермиссивной для определенного класса или вида вирусов. Он обеспечивается факторами рестрикции, которые в значительной степени уже существуют в определенных типах клеток, хотя они также могут в дальнейшем индуцироваться вирусной инфекцией. Внутренние противовирусные факторы рестрикции распознают определен-

ные вирусные компоненты, но в отличие от распознавания PRR, которые ингибируют вирусную инфекцию косвенно, индуцируя интерфероны и другие противовирусные молекулы, внутренние противовирусные факторы блокируют репликацию вируса немедленно и напрямую [25, 26]. Напротив, адаптивный иммунитет характеризуется высокой специфичностью к определенным микробным инфекциям и требует от нескольких дней до двух недель для эффективного гуморального и клеточного ответа. Приобретенный иммунитет узнает и атакует патогены по специфическим антигенам, формирует иммунологическую память о прошлых инфекциях, что позволяет в следующий раз вызывать иммунный ответ на данный антиген быстрее [27, 28]. Основными характеристиками, различающими эти две ветви иммунитета, являются, среди прочего, антиген-зависимая специфичность и время ответа на конкретный патоген, а также продолжительность долговременной памяти.

Врожденная иммунная система как первая линия защиты необходима для обнаружения патогена и последующей активации приобретенного иммунитета. Врожденный клеточный иммунный ответ осуществляется с помощью рецепторов PRR иммунными клетками, такими как моноциты/макрофаги и дендритные клетки [30–33], а также неиммунными клетками, такими как эпителии.

Клетки врожденного иммунитета запрограммированы на узнавание и отклик на разнообразные стимулы, от патогенных инфекций до поврежденных тканей. Ключевым принципом успешной

иммунной защиты от патогенов системой первой линии является индукция программы экспрессии генов 1) специфичной для поступающих сигналов и 2) специфичной для клеточных линий. После распознавания клеточными PRR консервативных признаков микроорганизмов, отсутствующих у хозяина (патоген-ассоциированных молекулярных паттернов, pathogen-associated molecular patterns, PAMP), или молекул, происходящих от хозяина, но появляющихся только в условиях гибели клеток и повреждения тканей (связанные с повреждением молекулярные паттерны, damage-associated molecular patterns, DAMP), последующая передача сигнала и сдвиги клеточного метаболизма в клетках врожденного иммунитета (см. следующий раздел) приводят к активации определенной группы факторов транскрипции. Эти факторы связываются с регуляторными участками индуцируемых генов, кодирующими цитокины, факторы транскрипции, эффекторные белки и регуляторы метаболизма, которые, в конечном счете, обеспечивают элиминацию патогенов, способствуют возникновению адаптивного иммунитета и восстанавливают поврежденные ткани. Хотя эти процессы интенсивно изучаются, многие проблемы еще далеки от расшифровки [31].

PRR могут распознавать различные компоненты патогенов — PAMP, например, элементы бактериальной клеточной стенки, такие как липополисахариды (LPS), или двуцепочечные рибонуклеиновые кислоты, образующиеся в процессе экспрессии некоторых вирусов в клетках [34]. Взаимодействия клеточных PRR с PAMP могут запускать воспалительную реакцию, которая является началом неспецифического иммунного ответа. Разрушенные клетки, высвобождая DAMP, могут рекрутировать врожденные иммунные клетки и в отсутствие патогенов [32, 35, 36].

В результате всех этих взаимодействий клетки секретируют воспалительные цитокины и активные формы кислорода. Процессы, вызывающие воспалительную реакцию, зависят от природы первоначального раздражителя и его локализации в организме. При всех их различиях они имеют общие механизмы: 1) PRR распознают PAMP и DAMP; 2) в результате активируются воспалительные сигнальные пути (inflammatory pathways); 3) высвобождаются воспалительные цитокины, сигнальные белки, экспрессирующиеся в ряде тканей, особенно в моноцитах/макрофагах, эндотелиальных клетках сосудов, жировой ткани и нейронах, которые реагируют на повреждение; 4) рекрутируются другие иммунные клетки и активируют адаптивный иммунный ответ, в конечном счете подавляя распространение патогена [37–41].

Воспалительные стимулы активируют внутриклеточные сигнальные пути, которые, в свою

очередь, активируют выработку медиаторов воспаления. Первичные воспалительные процессы включают цитокины, такие как интерлейкин-1 β , интерлейкин-6 и фактор некроза опухоли- α , факторы транскрипции (NF- κ B или MAPK), факторы роста, DAMP, PAMP, TLR, Nod-подобные рецепторы (NLR), а также метаболические (высокий уровень глюкозы, продвинутое конечные продукты гликозилирования) и иммунные медиаторы [35].

На стадиях воспаления во врожденных и адаптивных иммунных клетках происходят (рис. 2): 1) перепрограммирование выработки энергии и биосинтеза, включая усиление гликолиза и снижение окислительного фосфорилирования, для обеспечения более быстрого производства АТФ для защитного ответа и восстановления повреждений; 2) эпигенетическое перепрограммирование, включая усиленное ацетилирование гистонов и подавление метилирования ДНК, за счет изменения доступности донора ацетильной/метильной группы и ферментативной активности, модулируемой метаболитами [45, 46].

Тренированный иммунитет (ТИ)

Традиционно иммунная память считалась исключительным свойством адаптивного иммунитета. Появление ТИ в ответ на неспецифические стимулы, сохраняемого клетками врожденной иммунной системы, было осознано в последнее десятилетие [11, 27, 28, 43, 47–62].

ТИ — это программирование клеток при первом воздействии патогена, которое позволит им отвечать аналогичными, но более сильными эффектами на последующий вызов, связанный с последующими воздействиями этого и, возможно, других патогенов (рис. 2 и 3). Механизмы, которые позволяют клеткам врожденной иммунной системы приобрести долговременную память, являются предметом обширных исследований, но уже ясно, что они связаны с перепрограммированием на метаболическом, эпигенетическом и транскрипционном уровнях [51]. Это приводит к изменениям в их фенотипическом поведении, что обеспечивает более сильный иммунный ответ на вторичные стимулы. В частности, выше уже упоминалось, что тренированный иммунитет может быть механизмом, с помощью которого БЦЖ оказывает терапевтическое действие при раке мочевого пузыря [11]. Существуют серьезные основания полагать, что БЦЖ может быть эффективна при терапии и других типов опухолей [63].

Индукция ТИ была продемонстрирована как в миелоидных клетках, таких как моноциты, макрофаги, дендритные клетки и нейтрофилы, так и в лимфоидных клетках, таких как естественные клетки-киллеры (natural killer, NK) и врожденные

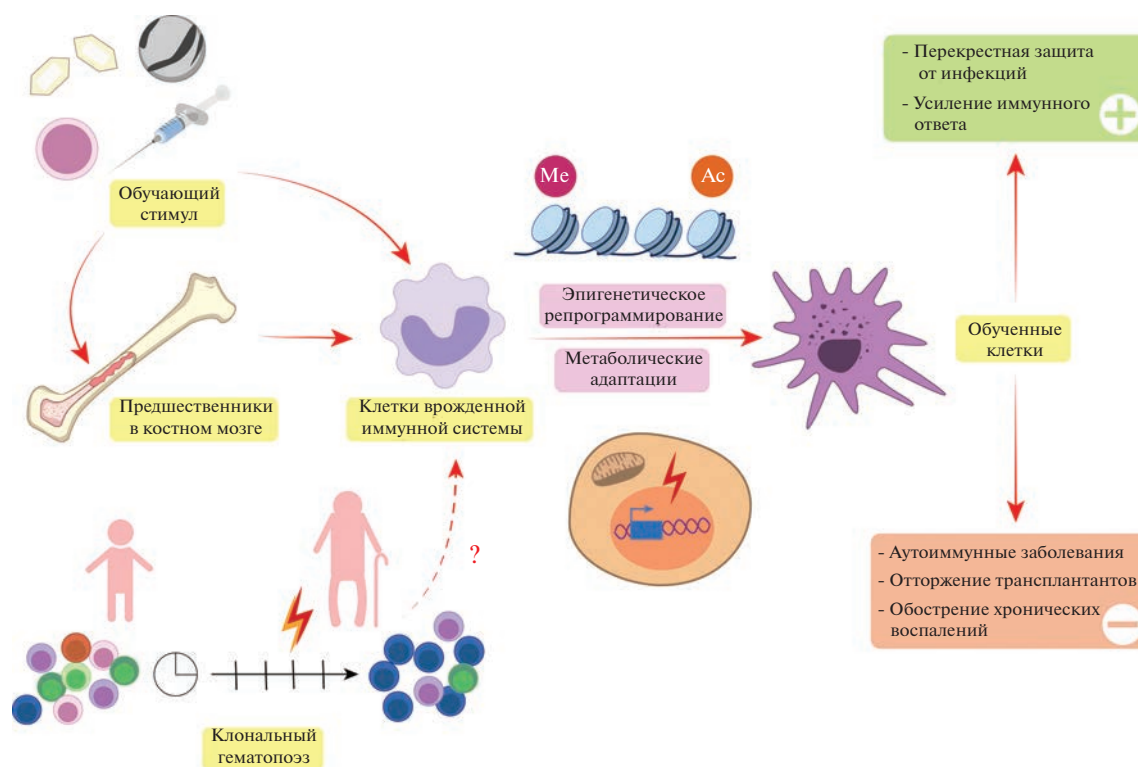


Рис. 2. Схематическое представление процессов, ведущих к возникновению тренированного иммунитета. Тренированный иммунитет может обеспечить защиту от гетерологичных инфекций и усиленный иммунный ответ, но может вызвать и неблагоприятные последствия, например аутоиммунные заболевания [42–44].

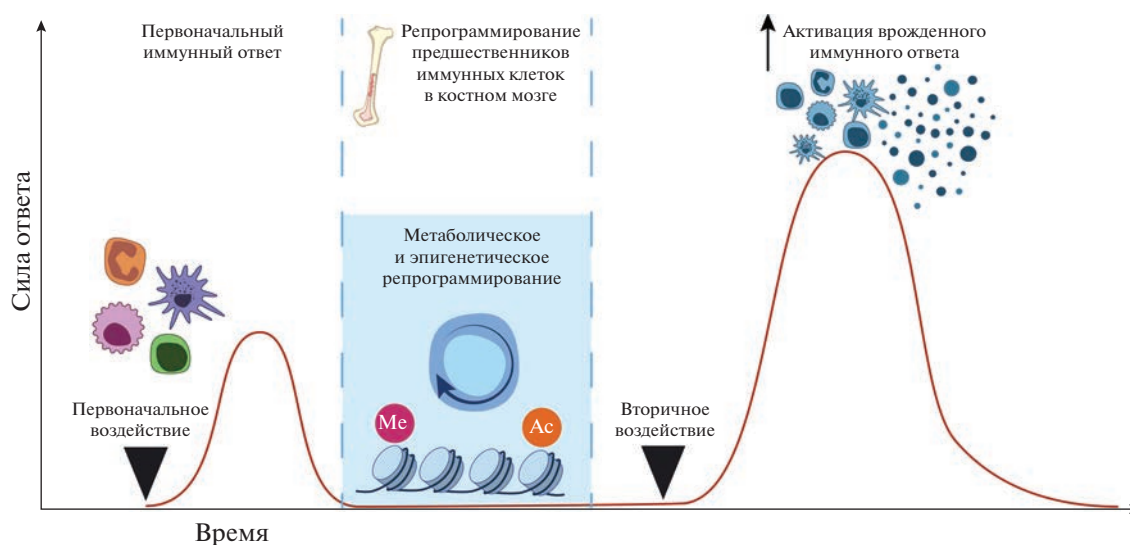


Рис. 3. Тренированный иммунитет — это усиление врожденных иммунных ответов после первоначального воздействия, так что последующие ответы усиливаются, представляя форму врожденной иммунологической памяти [43, 53, 64] (модифицировано по [50]).

лимфоидные клетки (innate lymphoid cell, ILC). Для объяснения долговременной защиты, вызванной ТИ, рассматриваются два механизма: 1) перепрограммирование клеток-предшествен-

ников костного мозга (центральный тренированный иммунитет); 2) функциональные изменения популяций тканевых клеток (периферический тренированный иммунитет) [50].

ТИ включает изменения в зрелых клетках врожденной иммунной системы (см. ниже), а также более длительные изменения в гемопоэтических клетках-предшественниках в костном мозге. В неактивном состоянии их незначительные метаболические потребности удовлетворяются окислением глюкозы посредством окислительного фосфорилирования и окисления жирных кислот для выработки энергии. Это относится к моноцитам, дендритным клеткам (ДК), NK-клеткам, макрофагам, когда они находятся в состоянии покоя или “патрулирования”. Однако как только их PRR встречаются с патогенами или вакцинами, происходит сдвиг к гликолизу.

Исключением являются нейтрофилы – короткоживущие клетки, основная функция которых заключается в фагоцитозе и уничтожении патогенов, поэтому они содержат митохондрии с высоким уровнем гликолитического метаболизма [46]. Индукция долговременного ответа на вакцинацию зависит от эпигенетического ремоделирования в моноцитах/макрофагах и NK-клетках. В этих клетках промоторы и/или энхансеры провоспалительных генов находятся в открытой конформации, что способствует повышенной реактивности после повторной стимуляции теми же или другими стимулами. Эти изменения могут поддерживаться в течение месяцев или даже лет (см. ниже) за счет стабильных и длительных эпигенетических модификаций клеток, происходящих из ниши гемопоэтических предшественников в костном мозге.

Способность врожденной и адаптивной иммунных систем взаимодействовать (см. следующий раздел) играет основную роль в защитных иммунных реакциях. Миелоидные клетки врожденной иммунной системы способны воспринимать микробные лиганды, нарушения клеточного гомеостаза и факторы вирулентности, передавая различную патоген-специфическую информацию наивным Т-клеткам в форме продуктов патогенного происхождения и цитокинов (детальный обзор цитокинов и их функций в иммунной системе на русском языке можно найти онлайн, например: <http://propionix.ru/citokiny>).

Было показано, что живые аттенуированные вакцины, такие как БЦЖ, вакцины против кори и пероральная вакцина против полиомиелита, снижают смертность не только при заболеваниях, против которых была направлена иммунизация, но и при других, гетерологичных, инфекциях. Это может быть связано с неспецифическим врожденным иммунитетом [65] (также см. ниже). Этот эффект позволяет рассчитывать на то, что уже известные вакцины против различных патогенов могут оказаться полезными против новых инфекций, в том числе против COVID-19 [42, 66, 67].

Функциональные изменения, связанные с индукцией ТИ, сохраняются не менее года, хотя эпидемиологические исследования показали и более долгосрочные эффекты (до пяти лет) в случае неспецифической защиты, вызванной вакцинацией [25, 27, 50, 68].

Вакцины, основанные на тренированном иммунитете, могли бы служить мощными иммунными стимуляторами, способствовать уничтожению патогенов в организме за счет гетерологичных эффектов и обеспечивать защиту как от специфических, так и от неспецифических патогенов [69–71].

Тренированный иммунитет можно считать противоположностью *иммунной толерантности*. Тренированный иммунитет включает увеличение метаболической и эпигенетической активности клетки, что приводит к усилению ответа на вторичную стимуляцию (рис. 2). Толерантность сопровождается снижением общей метаболической активности клетки и отсутствием накопления активных эпигенетических модификаций гистонов на промоторах и энхансерах генов, связанных с иммунными функциями. В ситуациях с чрезмерным воспалением толерантность действует как механизм, ослабляющий воспалительную реакцию хозяина для поддержания гомеостаза и предотвращения повреждения тканей. Однако продолжительная активация иммунной толерантности может, в конечном счете, привести к повышенной восприимчивости к инфекциям. Таким образом, тренированный иммунитет и толерантность являются чашами весов, которые должны быть в равновесии [51].

В природе соблюдается баланс между активацией и толерантностью, как Инь и Янь в традиционной китайской философии, в которой Янь представляет активные, позитивные и агрессивные факторы, тогда как Инь представляет пассивные, негативные и тормозящие факторы. Для использования тренированного иммунитета для практических медицинских целей необходимо добиваться преимуществ его Янь-стороны и минимизации Инь [43, 72].

В заключение этого раздела следует заметить, что тренированному иммунитету в мире уделяется чрезвычайно большое внимание. В частности, создан международный консорциум по изучению тренированного иммунитета (The International Trained Immunity (INTRIM) consortium): (<https://www.trainedimmunity.org>) с целью “улучшения понимания иммунного ответа и выявления новых стратегий для улучшения вакцинации, диагностики и лечения болезней”.

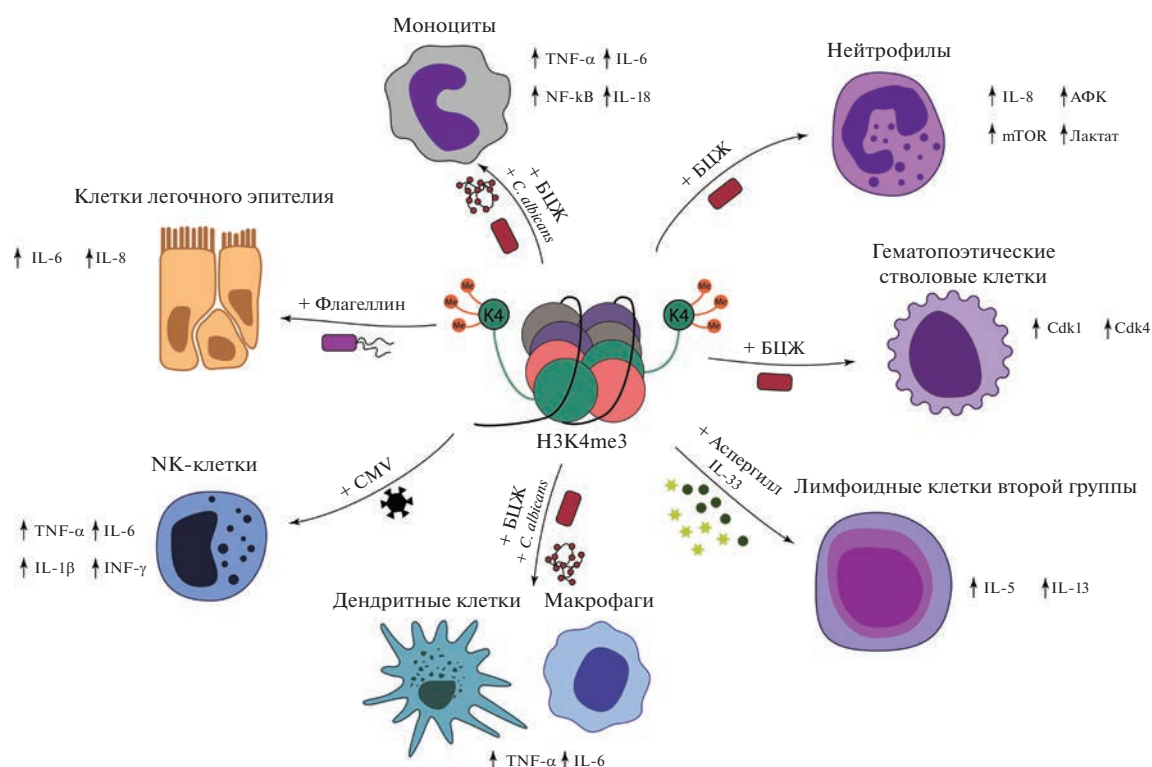


Рис. 4. Подмножества клеток, в которых описан тренированный иммунитет. Различные стимулы, включая БЦЖ, β -глюкан, цитокины, CMV и бактериальные компоненты, могут индуцировать тренированный иммунитет. Общим признаком тренированного иммунитета в этих случаях является присутствие H3K4me3 в хроматине в области промоторов генов, кодирующих различные цитокины, показанные на рисунке [74–76] (модифицировано по [77]).

КЛЕТКИ, ЛИГАНДЫ И РЕЦЕПТОРЫ ВРОЖДЕННОЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

*Клетки врожденной иммунной системы.
Первый взгляд на взаимосвязь тренированного
и адаптивного иммунитета*

Во всех процессах, описанных выше, участвуют клетки врожденной иммунной системы, в частности фагоциты, включающие в себя моноциты, макрофаги, нейтрофилы и дендритные клетки (см. рис. 1, 4), гранулоциты, NK-клетки, врожденные лимфоидные клетки (ILC), а также неиммунные клетки, такие как эпителий [73].

Макрофаги и дендритные клетки распознают патогены с помощью PRR, поглощают и уничтожают большинство из них, выставляя на свою поверхность фрагменты патогенов — антигены, которые затем распознаются клетками адаптивной иммунной системы. Эти два типа клеток называют профессиональными антиген-представляющими клетками (АПК) [78] (профессиональными АПК являются также В-клетки, но их рассмотрение лежит за рамками данного обзора). Профессиональные клетки способны представлять антигены расщепленного патогена на своей поверхности в комплексе с белками главного комплекса гистосовместимости типа II (major histocompati-

bility complex, МНСII) и с ко-стимулирующими молекулами CD40 и CD40L (рис. 5). Это наряду со способностью секретировать требуемые цитокины дает им возможность связываться с рецепторами CD4⁺ хелперных клеток (CD4⁺Th) адаптивной иммунной системы и активировать их для узнавания и уничтожения патогенов носителей данного антигена и создавать память иммунной системы. АПК, поглотившие патоген, секретируют цитокины, которые связываются со своими рецепторами на поверхности других АПК, привлекая их к месту нахождения патогена [79–82]. АПК продвигаются в лимфатические узлы организма. Там они передают информацию лимфоцитам: Т-клеткам и В-клеткам. Наряду с МНСII профессиональные клетки содержат также и молекулы МНСI, способные связываться в комплексе с этим же антигеном с помощью ко-стимулирующих молекул CD80/CD86 и CD28 (рис. 5) (МНСI в комплексе с фрагментами эндогенных белков способны экспонировать на поверхность все ядерные клетки с последующим связыванием с цитотоксическими лимфоцитами).

После праймирования (праймирование — это первый контакт предшественников антиген-специфических Т-хелперных клеток с антигеном на поверхности АПК, необходимый для последую-

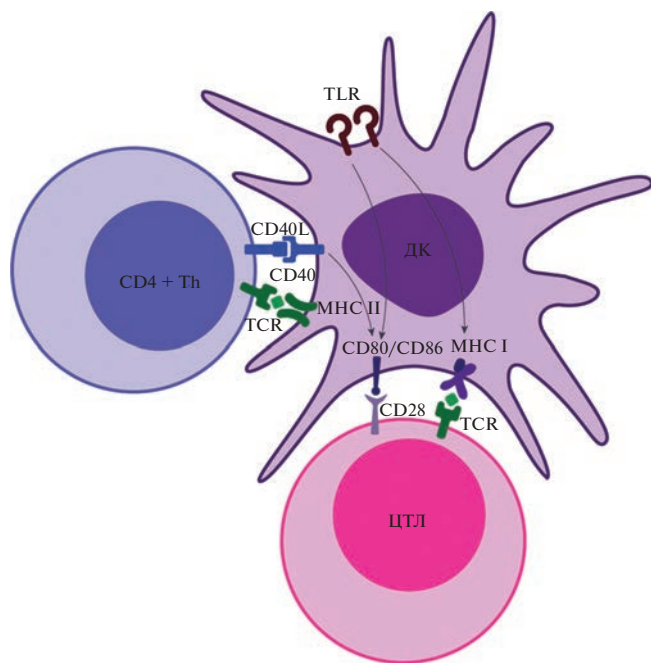


Рис. 5. Лицензирование дендритных клеток (ДК) для перекрестного праймирования, опосредуемое Т-хелперами ($CD4^{+}Th$), усиливается лигандами Т-клеточных рецепторов (T-cell receptors, TCR). Подробнее см. в тексте. MHC I/MHC II — главный комплекс гистосовместимости (major histocompatibility complex) класса I и II; TLR — Толл-подобные рецепторы (Toll-like receptors); CTL — цитотоксические Т-лимфоциты (cytotoxic T-lymphocyte) (модифицировано по [85]).

шего их взаимодействия с В-клетками для выработки антител) эффекторные Т-хелперы продуцируют цитокины, помогающие бороться с данным патогеном. Часть этих клеток сохраняется в виде популяций клеток памяти или эффекторной памяти. Затем эти Т-клетки памяти играют двойную роль в защите хозяина, быстро реагируя на повторное заражение этим же патогеном и индустрируя врожденные миелоидные клетки экспрессировать определенные цитокины. Таким образом, осуществляется двунаправленный поток информации сначала от врожденной к адаптивной иммунной системе, а затем от адаптивной обратно к врожденной иммунной системе [39, 77].

Различные про- и противовоспалительные цитокины, включая TGF- β , IL-10, BAFF, IL-6, IFN- α , IFN- γ , IL-17 и IL-23, играют важную регуляторную роль в этих взаимодействиях. Они могут генерироваться клетками врожденного и адаптивного иммунитета. Их действие зависит от конкретного микроокружения. Они образуют сложную сеть, связывающую различные клетки иммунной системы и таким образом поддерживают иммунный гомеостаз [83].

При этом клетки врожденной иммунной системы передают информацию клеткам адаптивной

при условии “лицензирования” — “разрешения”, получаемого от *третьего* компонента (рис. 5). Перенос антигенов в ДК и их презентация на молекулах главного комплекса гистосовместимости класса I и II вместе с ко-стимулирующими сигналами имеют первостепенное значение для индукции противовирусного и противоракового иммунитета [84]. Классическое лицензирование ДК для перекрестного праймирования опосредуется Т-хелперами ($CD4^{+}Th$) и усиливается лигандами Т-клеточных рецепторов (T-cell receptors, TCR). Сигналы, посылаемые TCR и ко-стимуляторами, приводят к усилению экспрессии MHC класса I и ко-стимуляторов, что позволяет ДК взаимодействовать с цитотоксическими Т-клетками (cytotoxic lymphocytes, CTL) [85]. Таким образом индукция CTL зависит от предварительной активации ДК Т-хелперными клетками (“второе мнение”). При этом ДК представляют один и тот же антиген с помощью MHC II $CD4^{+}Th$ -клеткам и с помощью MHC I — $CD8^{+}T$ -клеткам. Те CTL, которые не получают “помощи” Th при праймировании, называют беспомощными (“helpless”), и они неспособны поддерживать стабильный $CD8^{+}T$ -клеточный ответ и память. Эта концепция получила название “родственное лицензирование”. Функционируя как “второе мнение”, это дополнительное взаимодействие снижает риск неадекватных ответов против безвредных антигенов или собственных пептидов [85, 86].

На протяжении многих лет НК-клетки считались единственным представителем врожденной ветви лимфоцитов, в отличие от адаптивных В- и Т-клеток. Совсем недавно к ним присоединились врожденные лимфоидные клетки (ILC), представляющие собой сложную смесь преимущественно тканевых цитокин-продуцирующих врожденных лимфоцитов [87–91]. Хотя в последние годы в понимании развития и биологии ILC был достигнут существенный прогресс, тем не менее остается множество проблем, которые в настоящее время ограничивают наше понимание функции ILC при заболеваниях. Функции ILC могут различаться в зависимости от ткани. ILC могут играть противоположные роли, как вызывая заболевания, так и способствуя их лечению. Первоначально они были разделены на три группы: НК-клетки и ILC1, составляющие группу 1; ILC2, представляющую группу 2; ILC3 и клетки-индукторы лимфоидной ткани (Lymphoid tissue inducer, LTi) — группа 3. Совсем недавно на основании дополнительных данных пять подмножеств, т. е. НК-клетки, LTi, ILC1, ILC2 и ILC3, были установлены как отдельные линии. Происхождение человеческих ILC и то, насколько тесно человеческие ILC и НК-клетки связаны в развитии, до сих пор неизвестны, несмотря на идентификацию общих и подтип-специфических предшественников.

Сложные взаимоотношения с различными органами позволяют ИС быстро реагировать на нарушения условий окружающей среды и гомеостаза органов, например при инфекциях и повреждениях тканей. Постепенно появляются данные, свидетельствующие о том, что ИС также играют сложные и разнообразные роли в развитии макрофагов, в гомеостазе, поляризации, воспалении и вирусной инфекции. В свою очередь, макрофаги также влияют на судьбу ИС [92]. Ожидаемые клинические последствия терапии, направленной на ИС, кажутся весьма перспективными [88, 91, 93].

Процессы, контролируемые тренированным иммунитетом на эпигенетическом, клеточном и системном уровнях. Более детальное рассмотрение взаимосвязи врожденного и адаптивного иммунитета

ТИ может быть вызван широким спектром стимулов, включая микобактерии БЦЖ, β -глюкан (компонент клеточной стенки грибов), половые гормоны, такие как β -эстрадиол, и другие эндогенные лиганды, такие как окисленные липопротеины низкой плотности (oxidized low density lipoprotein, oxLDL) [48, 94, 95].

Важно выяснить механизмы, регулирующие ТИ, чтобы обеспечить усиленную защиту хозяина, предотвращая вредное воспаление в различных тканях [77]. ТИ связан с функциональным перепрограммированием клеток врожденной иммунной системы, вызываемым эндогенными или экзогенными воздействиями, сохраняющимся достаточно долго (см. выше). При этом через какое-то время клетки возвращаются в неактивированное состояние, но при последующих воздействиях тем же или другим неродственным патогеном проявляют усиленный ответ [43]. Точные модификации гистонов, которые происходят при эпигенетических реорганизациях, до конца неизвестны. Однако в случае индуцированного тренированного иммунитета бациллами БЦЖ и β -глюканом показана корреляция “обученности” с триметилированием гистоновых меток H3K4 (H3K4me3) (рис. 4).

Молекулярные механизмы, опосредующие иммунную память при ТИ или адаптивном иммунитете, различны: эпигенетическое репрограммирование в случае ТИ [96, 97] по сравнению с рекомбинацией генов и клональной экспансией клеток в случае адаптивной иммунной памяти [60].

Отличительной чертой врожденной иммунной системы является ее способность быстро инициировать короткоживущие или устойчивые клеточно-специфические и патоген-специфические программы транскрипции, динамически варьи-

руя состояния хроматина. В основном эпигенетический ландшафт устанавливается во время клеточной дифференцировки; однако патогены и другие сигналы окружающей среды вызывают дополнительные изменения в хроматине, которые могут либо “тренировать” врожденные иммунные клетки для усиленных вторичных ответов, либо способствовать толерантности [31, 50, 68]. Как уже отмечалось выше, важными эпигенетическими маркерами открытого хроматина, коррелирующими с ТИ, является триметилирование гистонов в области активных промоторов генов провоспалительных цитокинов (H3K4me3). Кроме того, наблюдается монометилирование гистонов (H3K4me), маркирующее дистальные энхансеры; и ацетилирование гистонов (H3K27ac), маркирующее активные энхансеры и промоторы генов, связанных с гликолизом и синтезом цитокинов [27].

С метаболическими следствиями изменений в регуляции генов читатель может ознакомиться в обзорах [45, 46, 50, 51, 77, 96, 98–100]. В частности, в случае макрофагов метаболическое перепрограммирование во время их активации в инфекционном процессе затрагивает пять основных метаболических путей, включая гликолиз, пентозофосфатный путь, окисление и синтез жирных кислот, цикл трикарбоновых кислот и метаболизм аминокислот, которые реагируют в ответ на паразитарные, бактериальные и вирусные инфекции [101]. При этом решающую роль играют перестройки ген-регуляторных систем, в частности эффекторных генов, использующие разные комплекты факторов транскрипции и энхансеров, в зависимости от сигналов, которые каждый тип клеток получает во время инфекции [102].

Метаболическое и эпигенетическое перепрограммирование как врожденного, так и адаптивного иммунного ответа стало краеугольным камнем для разработки вакцин. Процесс вакцинации запускает сложное взаимодействие между АПК и наивными Т- и В-клетками. Для целей данного обзора мы даем весьма упрощенную картину этих процессов. После вакцинации активированные АПК мигрируют в дренирующие лимфатические узлы, активируя Т- и В-клетки. При активации лимфоцитам необходимо быстро пролиферировать, продуцировать и высвобождать различные белки (антитела в случае В-клеток, цитокины в случае Т-клеток). Это требует быстрой доступности больших количеств АТФ и наличия липидов для синтеза мембран и нуклеиновых кислот новых клеток, а также индукции синтеза белка. Как уже говорилось выше, происходят перестройка энергетического метаболизма от окислительного фосфорилирования к аэробному гликолизу и уве-

личение синтеза холестерина и глутаминолиза. Также наблюдаются модификации гистонов, ведущие к изменениям в экспрессии генов. Эти изменения приводят к увеличению продукции цитокинов миелоидными клетками при повторной стимуляции [46]. Увеличиваются также активность синтеза белка, метаболизм инозитолфосфатов, глицерофосфолипидов и стероидов, которые могут выступать в качестве альтернативных источников энергии.

Активированные В-клетки также пролиферируют и подвергаются соматическим гипермутациям и изотипическим изменениям иммуноглобулинов на своей поверхности, что позволяет отбирать В-клетки, которые распознают вакцинные антигены с наибольшей аффинностью.

Раннее распознавание PAMP патогенов PRR клеток врожденного иммунитета активирует в них серию внутриклеточных сигнальных путей, приводящих к инициации иммунных ответов, включая фагоцитоз, продукцию активных форм кислорода (АФК) и секрецию иммуномодулирующих хемокинов и цитокинов. Образующиеся в результате этих процессов антигены презентуются лимфоцитам через главный комплекс гистосовместимости, способствуя образованию иммунного синапса с Т- и В-клетками, запуская активацию адаптивных иммунных ответов.

Основными механизмами, задействованными в тренированной иммунной памяти, являются: 1) измененная экспрессия PRR: фенотипические изменения клеток врожденного иммунитета со свойствами памяти включают повышенную экспрессию PRR на поверхности клетки и улучшенное распознавание патогенов; 2) метаболическое перепрограммирование; 3) эпигенетическое репрограммирование: триметилирование гистона H3 по лизину 4 (H3K4me3) является маркером активации промотора провоспалительных генов, специфически индуцируемых зависимой от β -глюкана памятью; 4) измененная секреция цитокинов [103].

Рецепторы, принимающие сигнал о патогене или повреждении, акцент на TLR

Выше уже упоминалось о рецепторах распознавания образов PRR. Классы семейств PRR включают, в частности, Толл-подобные рецепторы (TLR), лектиновые рецепторы С-типа (CLR) и NOD-подобные рецепторы (NLR) [104]. Из известных PRR наиболее хорошо изучены члены семейства TLR млекопитающих [105–107]. Мы здесь рассмотрим на их примере общие принципы распознавания сигналов опасности клетками врожденного иммунитета.

Семейство TLR включает рецепторы, находящиеся как на клеточной поверхности, так и внутриклеточно, что обеспечивает специализацию подмножеств рецепторов для решения конкретных задач [108–113]. TLR представляют собой класс рецепторов распознавания образов, которые играют критическую роль во врожденном и адаптивном иммунитете. Агонисты Толл-подобных рецепторов (TLRa) в качестве кандидатов в адъюванты вакцин стали одной из недавних горячих точек исследований в этой области (см. ниже). Тем не менее многочисленные существующие системы доставки TLRa не идеальны для клинического применения из-за их низкой эффективности и системных побочных реакций [112].

Лиганды TLR индуцируют гомодимеризацию и в некоторых случаях гетеродимеризацию TLR и привлечение адаптерных белков к внутриклеточным доменам рецептора Толл/интерлейкин 1 (Toll/interleukin-1, TIR) для инициации передачи сигналов [113]. Сигнальные каскады, запускаемые посредством этих TIR-доменов, опосредуются специфическими адаптерными молекулами: первичный ответ миелоидной дифференцировки 88 (MyD88); MyD88-адаптер-подобный (MAL), также известный как адаптерный белок, содержащий домен TIR (TIRAP); IFN, индуцирующий адаптер, содержащий домен TIR (TRIF); и адаптер, родственник TRIF (TRAM). В конечном счете активируются внутриклеточные сигнальные каскады, приводящие к транслокации в ядро факторов транскрипции, например активаторного белка-1 (AP-1), NF- κ B или регуляторного фактора интерферона 3 (IRF3). Молекулы DAMP и PAMP имеют общие рецепторы, такие как TLR4, что указывает на сходство между инфекционными и неинфекционными воспалительными реакциями [35, 113].

Важно заметить, что наряду с другими DAMP и PAMP внутриклеточные TLR распознают также различные типы нуклеиновых кислот (рис. 6). Так, например, TLR3 распознает двуцепочечную РНК (дцРНК), не требуя специфических последовательностей для связывания. Для индукции TLR3 требуется участок с минимальной длиной 40 пар оснований. Рецептор TLR3 также распознает полиинозин-полицитидиловую кислоту [поли(I:C)] – вариант синтетической РНК. После распознавания нуклеиновой кислоты начинается сигнальный каскад, который будет продуцировать провоспалительные цитокины, важные для рекрутирования и активации иммунных клеток [107, 114].

Обычные PRR оказывают активирующее действие, однако недавно обсуждалась возможность существования также ингибирующих рецепторов, которые могли бы уравновешивать действие активирующих [115].

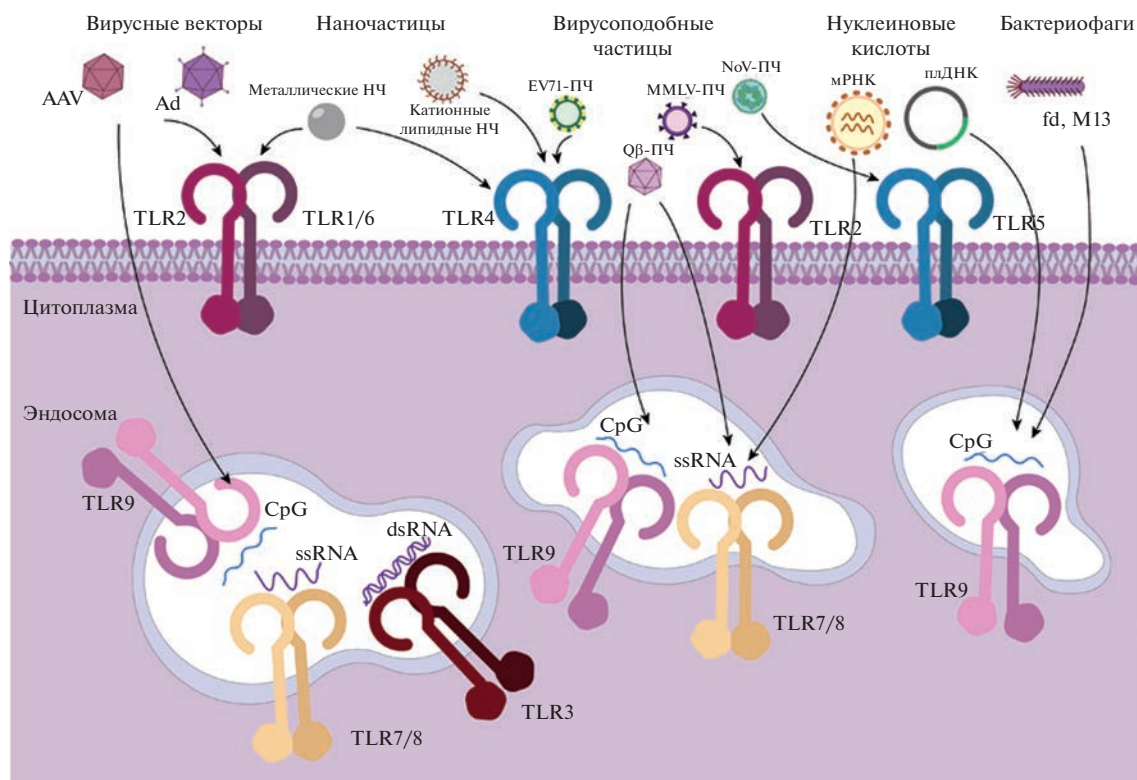


Рис. 6. TLR-распознавание вирусных паттернов в вакцинах. Вирусные мотивы, такие как белки E1v, РНК или ДНК вирусных векторов AAV, Ad и коровьей оспы, могут связываться и активировать TLR2 клеточной поверхности и эндосомальные TLR3, TLR7, TLR8 и TLR9, в то время как специфические структуры капсидов VLP (virus-like particles, вирусоподобных частиц) могут быть обнаружены с помощью TLR2, TLR4 и TLR5, как описано для NoV (Norovirus), MLV (murine leukemia virus) и энтеровирусов. В некоторых случаях самоупаковка нуклеиновых кислот во время сборки VLP может привести к активации TLR7/8 и TLR9. Металлические НЧ (наночастицы) могут быть обнаружены TLR3, TLR4, TLR6 и TLR7, в зависимости от их состава, в то время как НЧ на основе липидов могут быть распознаны через гетеродимеры TLR2. Вакцины на основе нуклеиновых кислот (например, вакцины с голой плазмидной ДНК или мРНК, инкапсулированные в липосомы) запускают пути TLR7/8 или TLR9. Как и природные наночастицы бактериофаги интернализируются иммунными клетками и могут достигать эндосомальных компартментов, где их нуклеиновые кислоты обнаруживаются внутриклеточными TLR. Нитевидные фаги, такие как M13 и fd, могут активировать TLR9 через последовательности ДНК, богатые CpG [32, 113, 114]. Модифицировано по [114].

Своевременная и точная доставка эндосомальных TLR к месту узнавания лиганда имеет большое значение для эффективного иммунного ответа, при этом TLR должны избегать реакции на собственные нуклеиновые кислоты. Это, по-видимому, достигается благодаря дифференциальному экспрессии и пространственному распределению (на клеточной поверхности или в эндосомах) TLR. После пребывания в эндоплазматическом ретикулуме рецепторы направляются в аппарат Гольджи для добавления N-связанных гликанов, однако они также могут достигать эндосом, минуя эту органеллу [107, 116].

Различные формы эндосомальных TLR могут транспортироваться к клеточной мембране. TLR9 является исключением в этом маршруте внутриклеточного транспорта. После гликозилирования рецептор транспортируется на клеточную по-

верхность и рекрутирует комплекс AP-2 (адаптерный комплекс AP2 представляет мультимерный белок, который работает на клеточной мембране для интернализации груза при клатрин-опосредованном эндоцитозе).

Эндосомальные TLR содержат отличительные последовательности-мишени, которые направляют рецепторы к их внутриклеточному местоположению. Сворачивание адекватной структуры белка TLR также может определять его локализацию в клетке [116].

В конечном счете TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 и TLR6 экспонируются на поверхности АПК, тогда как TLR3, TLR7, TLR8 и TLR9 находятся в эндосомах. Посредством своих эктодоменов TLR распознают большое разнообразие патогенов. Большинство TLR-связывающих белковых бактери-

альных агонистов активируют TLR2, TLR4 и TLR5 врожденных иммунных клеток [113].

Агонисты TLR и агонист-адъювант дихотомия

Адъюванты представляют собой широкий спектр молекул и материалов, которые могут увеличить действенность, широту и устойчивость иммунных реакций. Несмотря на множество соединений с адъювантными свойствами, менее десятка находятся в клиническом применении в вакцинах против инфекционных заболеваний. Причиной этого являются высокие стандарты безопасности и эффективности, установленные для современных адъювантов в вакцинах, используемых в здравоохранении. Механизм их действия сложен и не все аспекты его достаточно хорошо поняты. Более полное понимание действия адъювантов, передачи их сигналов и дальнейших процессов будет способствовать разработке вакцин, вызывающих устойчивый защитный иммунитет против сложных бактериальных и вирусных патогенов [117, 118].

Адъюванты можно классифицировать по разным категориям [113]. Некоторые из них представлены на рис. 6. Особый интерес представляют белковые адъюванты, детальное описание которых читатель найдет в обзорах [113, 119–121]. В принципе эти адъюванты можно производить методами генной инженерии.

Используемые в настоящее время вакцины, как правило, вызывают сильный ответ антител, но довольно плохо стимулируют ответы цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) CD8⁺. Чтобы вызвать сильную CTL-память, вакцины должны использовать механизмы перекрестной презентации антигенов (см. выше, рис. 5). Это требование было определяющим в разработке субъединичных вакцин, которые вызывают эффективный Т-клеточный иммунитет. Авторы обзора [122] описали недавние исследования эффективности используемых в клинике адъювантов вакцин, включая адъюванты на основе лигандов TLR как шаг к пониманию молекулярного механизма действия адъювантов при перекрестной презентации ДК для достижения сбалансированного иммунитета [122].

С момента открытия TLR были идентифицированы и охарактеризованы как адъюванты вакцин сотни лигандов, нацеленных на различные TLR. Это важно не только для разработки вакцин против инфекционных заболеваний, но и для иммунотерапии рака, аллергии, болезни Альцгеймера, наркомании и других заболеваний. Каждый TLR имеет свою собственную специфическую локализацию в тканях и нижележащие сигнальные пути генов, что дает исследователям возможность подбирать адъюванты для получения спе-

цифических иммунных эффектов. Агонисты разных TLR можно комбинировать друг с другом или с агонистами других рецепторов для создания комбинированных адъювантов с синергетическим или модулирующим эффектом [123].

Предполагается, что компоненты клеточной стенки бактерий распознаются TLR клеточной поверхности, тогда как геномные компоненты распознаются эндосомальными TLR (рис. 6). Активация TLR через лиганды бактериального или вирусного происхождения приводит к развитию антипатогенного ответа за счет активации продукции провоспалительных цитокинов, а также хемокинов [124].

Бактериальными лигандами у млекопитающих стимулируются TLR2, TLR4, TLR5 и TLR9. Компоненты вирусной РНК распознаются TLR 3, 7 и 8, которые расположены во внутриклеточных компартментах и запускаются на поздних эндосомно-лизосомных стадиях, в отличие от других TLR, которые расположены в плазматической мембране. Вирусы с оболочкой проникают в клетки, взаимодействуя с рецепторами или факторами прикрепления, что помогает им интернализироваться в клетки посредством различных эндоцитарных процессов. TLR3 распознает двуцепочечную РНК, которая является геномом многих семейств вирусов или промежуточным звеном в цикле репликации ДНК-вирусов. Сообщалось также, что TLR3 активируется инфицированными вирусом апоптотическими клетками. TLR, распознающие вирусы, активируют иммунную систему посредством IFN- α или β -зависимого или независимого механизма [124].

Комбинация нескольких TLRa для терапии опухолей была изучена в нескольких работах (обзор [112]). Индукция сразу нескольких TLR имеет значительные преимущества в клиническом применении, если она вызывает синергизм между несколькими сигнальными путями TLR. Например, синергетическая иммунная активация двумя адъювантами (Poly(I:C), нацеленным на TLR3, и БЦЖ-индуктором TLR2/4) приводила к более эффективному подавлению опухоли высокой степени злокачественности и формированию длительного защитного иммунитета у мышей MBT-2 (модель рака мочевого пузыря). Связывание двух лигандов TLR, Poly(I:C) и синтетический триацетилованный липопептид Pam3CSK4 [114], эффективно активировало мышинные макрофаги, происходящие из костного мозга (BMDM). Однако бактериальный LPS, агонист TLR4, ингибировал продукцию TLR3-индуцированных провоспалительных цитокинов в ДК, которые опосредовались IL-10 [125]. При этом наблюдалось, что некоторые комбинации TLRa являются синергетическими, в то время как другие имеют антагонистический эффект. Поэтому выбор правильных комбинаций

имеет первостепенное значение и требует экспериментальной проверки. Детальное рассмотрение различных адъювант-TLR взаимодействий читатель может найти в обзорах [32, 105, 113, 114, 117, 119, 120, 122, 123].

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ВАКЦИНЫ, ИСПОЛЬЗУЮЩИЕ ТРЕНИРОВАННЫЙ ИММУНИТЕТ. БЦЖ-ИНДУЦИРОВАННЫЙ ТРЕНИРОВАННЫЙ ИММУНИТЕТ

Сообщалось, что живые аттенуированные вакцины защищают от гетерологичных инфекций и снижают общую смертность. Этот эффект наблюдали в странах с низким уровнем жизни для нескольких вакцин, например БЦЖ, вакцины против кори и полиомиелита, хотя исследования, проведенные в странах с высоким уровнем жизни, дают противоречивые результаты [126–128]. Тем не менее вакцинация БЦЖ была предложена для защиты от *Staphylococcus aureus* и инфекции области хирургического вмешательства, а также от инфекций *Leishmania*.

Живые, аттенуированные или инактивированные микроорганизмы часто обладают внутренней адъювантной активностью, активируя PRR, при этом БЦЖ является прототипом такой вакцины. БЦЖ широко используется на людях в течение 100 лет [63, 64, 129, 130]. Обширный обзор всех эпидемиологических исследований, проведенных в отношении гетерологичных эффектов детских вакцин, недавно был представлен Р. Аабу и С. Бенн [131] (цит. по [50]). БЦЖ-вакцинация мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID) снижает инфекционное бремя диссеминированного кандидоза, снижает вирусную нагрузку в случае вируса гриппа А и защищает от вируса простого герпеса 2 типа (HSV2) [64]. Однако необходимы дополнительные исследования для широкой и всесторонней оценки гетерологичных эффектов различных вакцин и влияния тренированного иммунитета на эти процессы [50]. В недавнем обзоре [132] с долей пессимизма говорится: “Несмотря на совместную эволюцию с человеком на протяжении веков и интенсивное изучение в течение десятилетий, иммунные компоненты защиты от *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) еще предстоит полностью определить”.

Надежный профиль безопасности и иммуногенности БЦЖ является основанием для использования ее в качестве вектора и разработки вакцин против других инфекционных заболеваний. Современный уровень иммунологии и молекулярной биологии позволяет получить рекомбинантные вакцины БЦЖ [133, 134], модифицированные генами, продукты которых способствуют лучшей активации клеток врожденного иммунитета. Рекомбинантные варианты БЦЖ, экспрессирующие различные антигены, могут оказаться

полезными для введения антигенов SARS-CoV-2 (rBCG-SARS-CoV-2) для индукции длительного иммунитета [64] и как мост к разработке конкретной вакцины.

Для задач противовирусного и противоопухолевого иммунитета особую роль играют макрофаги [57, 135], нейтрофилы [136] и NK-клетки [137]. Возможно, введение в *Mycobacterium bovis* генов, продукты которых способствуют лучшей активации и/или пролиферации этих клеток, позволит получить рекомбинантные формы БЦЖ более эффективные в качестве средства профилактики вирусного заболевания или в противоопухолевой терапии.

Функционируя как RAMP, некоторые индукторы обученного иммунитета, такие как β -глюкан, флагеллин или MDP (мурамилдипептид), также проявляют адъювантную активность, и их применение в качестве иммунных усилителей в вакцинах может поддерживать врожденную иммунную память и улучшать функциональность специфического адаптивного иммунитета. Параллельно с этим адъюванты обученного иммунитета могут обеспечивать неспецифическую защиту от различных вариантов одного и того же патогена, особенно в контексте вирусных инфекций.

Указывалось на существование фармакологических соединений, которые могут усиливать или подавлять активность определенных метаболических путей и эпигенетических механизмов. Использование таких модуляторов, возможно, позволит осуществить тонкую настройку специфических и неспецифических эффектов вакцин [46]. Для таких вакцинных добавок был предложен термин “амплификатор”.

Авторы [46] выражают надежду, что прогресс протеомики, метаболомики, транскриптомики и эпигеномики позволит идентифицировать потенциальные новые свойства тренированного иммунитета и привести к новым клиническим подходам.

Последние несколько лет БЦЖ рассматривалась как привлекательный вектор для разработки новых вакцин, сочетающих как специфическую, так и неспецифическую защиту. Еще одно возможное применение живых вакцин — это создание рекомбинантных векторов для введения иммуногенных вирусных антигенов [138]. Например, новые технологии, использующие рекомбинантные штаммы БЦЖ (рБЦЖ), сконструированные для экспрессии антигенов SARS-CoV-2, потенциально могут обеспечить защиту от COVID-19 и находятся в стадии изучения. Рекомбинантные штаммы БЦЖ, экспрессирующие антигены SARS-CoV-2, возможно могут обеспечить защиту от COVID-19 за счет активации как врожденного, так и специфического адаптивного иммунного ответа. Известные данные о безопасно-

сти БЦЖ для людей, ее адъювантная активность и низкая стоимость производства делают ее лидером в разработке вакцины для остановки пандемии COVID-19 [139]. Штамм БЦЖ, содержащий листериолизин (VPM-1002), проходит клинические испытания как для туберкулеза, так и для COVID-19 [43]. Было разработано несколько рекомбинантных штаммов БЦЖ, экспрессирующих другие гетерологичные вирусные антигены. Например, введение нуклеокапсидного белка вируса кори, экспрессируемого рБЦЖ-вакциной (гBCG-MV), значительно снизило вирусные титры в гомогенатах мозга и смертность на мышинной модели индуцированного корью энцефалита, а также увеличило пролиферацию антиген-специфических Т-клеток *in vitro*. Более того, введение гBCG-MV обезьянам макак уменьшало патологию легких [64]. В этом отношении БЦЖ имеет ряд преимуществ, включая безопасность использования, относительную простоту и низкую стоимость изготовления, температурную стабильность и активность адъювантов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: ПАНДЕМИЯ COVID-19 ДЕМОНСТРИРУЕТ НЕОБХОДИМОСТЬ МОСТОВЫХ ВАКЦИН, ТРЕНИРОВАННЫЙ ИММУНИТЕТ МОЖЕТ СЛУЖИТЬ ОСНОВОЙ ДЛЯ ИХ СОЗДАНИЯ

Более 20 вакцин против SARS-CoV-2 получили экстренное одобрение для использования как минимум в одной стране. Почти все эти вакцины были получены либо из инактивированного цельного вируса, либо из его компонентов, вызывающих В- и Т-клеточный ответ [140]. Однако недавнее появление множества вариантов SARS-CoV-2 поставило под угрозу эффективность доступных в настоящее время вакцин. Для защиты от этих вариантов желательно применение вакцин, вызывающих трениrovанный иммунитет. Вакцины, использующие вирусные или бактериальные системы доставки, имеют несколько явных достоинств. Во-первых, поскольку вектор доставки сам по себе обладает различными PAMP, адъювантная терапия не требуется для активации врожденных клеток. Во-вторых, эти вакцины могут индуцировать как Т-клеточный, так и гуморальный иммунный ответ против инфекции SARS-CoV-2. В-третьих, они могут индуцировать широкий спектр гетерологичных вакцинных эффектов через сам вектор, опосредованный трениrovанным иммунитетом. Новые вакцины с использованием вирусных или бактериальных систем доставки находятся в стадии разработки и ожидается, что эти подходы расширят репертуар схем вакцинации против COVID-19 [96, 138]. Обсуждается возможность использования для предотвращения инфекций COVID-19 лицензированных живых вакцин против других инфекций, включая БЦЖ,

оральные вакцины против полиомиелита и MMR (measles-mumps-rubella, комбинированная вакцина против кори, эпидемического паротита и краснухи, которая представляет собой смесь ослабленных (аттенуированных) вирусов трех заболеваний) [138] (база данных ClinicalTrials <https://clinicaltrials.gov/>; см. также [49, 64, 130, 141–144]).

Авторы [145] показывают, что ранее существовавшие Т-клетки памяти, специфичные к антигенам ранее введенных MMR и Tdap (столбняк–дифтерия–коклюш), реактивируются антигенами коронавируса SARS-CoV-2 после вакцинации против коронавирусной болезни. Анализ большой и хорошо охарактеризованной когорты пациентов с COVID-19 показал, что предшествующая вакцинация MMR или Tdap связана с уменьшением тяжести заболевания и смертности. Индукция врожденной иммунной памяти кажется наиболее правдоподобным объяснением этого эффекта [14, 140, 146].

Как показывалось выше, TLR являются ключевыми сенсорами врожденного иммунитета, которые активируют передачу сигналов для продукции провоспалительных цитокинов и хемокинов. Однако TLR также могут усиливать иммуно-опосредованную патологию, а не обеспечивать защиту. Правильное понимание взаимодействия между TLR и SARS-CoV-2 важно для разработки терапевтических и профилактических стратегий [147]. Использование агонистов TLR в качестве адъювантов вакцин можно было бы применить при конструировании вакцин против COVID-19 [148].

В настоящий момент по всему миру проходит не менее двух десятков клинических испытаний, позволяющих проверить эту гипотезу (база данных ClinicalTrials <https://clinicaltrials.gov/>; [49, 64, 130, 141, 149]). Исследование на 30 участниках предоставило данные, что предварительная вакцинация БЦЖ медицинского персонала приводила к повышенным титрам нейтрализующих антител после последующей вакцинации COVID-19 вакциной Pfizer/BioNTech. Недавние эпидемиологические исследования также показали гетерологичное защитное действие вакцин против COVID-19, против гриппа (исследование с участием примерно 10000 человек) и Varicella zoster (исследование с участием более 400000 человек).

Если эти клинические испытания подтвердят эффективность вакцины БЦЖ против COVID-19, то по мнению авторов [13, 50] вакцины БЦЖ могут оказаться очень полезными во время пандемии, подобной COVID-19, когда появляются новые варианты патогена, что создает угрозу эффективности существующих вакцин [43].

Однако многое еще предстоит узнать о механизмах врожденной иммунной памяти, чтобы понять пока еще малоизученные факторы, влияю-

шие на ее эффекты. В частности, неясно, почему только примерно у половины людей, вакцинированных БЦЖ, проявляется отчетливый ТИ. Разработка усилителей эффектов тренированного иммунитета (см. выше) после вакцинации или новых более эффективных вакцин должна стать важной целью будущих исследований [46, 50]. Данные из последних обзоров см. также [43, 46, 50, 69, 72, 138, 150, 151].

Появление ранее неизвестных патогенов всегда будет представлять угрозу для человека. Во время нынешней пандемии COVID-19 несколько специфических вакцин против SARS-CoV-2 были разработаны и одобрены в ускоренные сроки, но процесс разработки, тестирования, производства и распространения новых вакцин по-прежнему требовал более года, на фоне высокого уровня заражения и смертности. При новой опасной инфекционной вспышке вакцины, связанные с тренированным иммунитетом, можно было бы немедленно протестировать в клинических испытаниях и в идеале использовать для частичной защиты от нового идентифицированного патогена. Тем временем специфические вакцины могут разрабатываться, тестироваться, производиться и распространяться [43].

Работа выполнена при поддержке НИЦ “Курчатовский институт”.

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. *Garcia D.* Redirect military budgets to tackle climate change and pandemics // *Nature*. 2020. V. 584. № 7822. P. 521–523.
<https://doi.org/10.1038/d41586-020-02460-9>
2. *Steffen W., Richardson K., Rockstrom J. et al.* Sustainability. Planetary boundaries: guiding human development on a changing planet // *Science*. 2015. V. 347. № 6223.
<https://doi.org/10.1126/science.1259855>
3. *Vora N.M., Hannah L., Lieberman S. et al.* Want to prevent pandemics? Stop spillovers // *Nature*. 2022. V. 605. № 7910. P. 419–422.
<https://doi.org/10.1038/d41586-022-01312-y>
4. *Lennan M., Morgera E.* The glasgow climate conference (COP26) // *The Intern. J. of Marine and Coastal Law*. 2022. V. 37. № 1. P. 137–151.
<https://doi.org/10.1163/15718085-bja10083>
5. *Schiermeier Q.* The US has left the Paris climate deal – what’s next? // *Nature*. 2020.
<https://doi.org/10.1038/d41586-020-03066-x>
6. *Rounce D.R., Hock R., Maussion F. et al.* Global glacier change in the 21st century: Every increase in temperature matters // *Science*. 2023. V. 379. № 6627. P. 78–83.
<https://doi.org/10.1126/science.abq1324>
7. *Phelan A.L., Carlson C.J.* A treaty to break the pandemic cycle // *Science*. 2022. V. 377. № 6605. P. 475–477.
<https://doi.org/10.1126/science.abq5917>
8. *A Pandemic Era* // *Lancet Planet Health*. 2021. V. 5. № 1. P. e1.
[https://doi.org/10.1016/s2542-5196\(20\)30305-3](https://doi.org/10.1016/s2542-5196(20)30305-3)
9. *Fisher D., Suri S., Carson G. et al.* What comes next in the COVID-19 pandemic? // *Lancet*. 2022. V. 399. № 10336. P. 1691–1692.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)00580-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00580-3)
10. *Baker R.E., Mahmud A.S., Miller I.F. et al.* Infectious disease in an era of global change // *Nat. Rev. Microbiol.* 2022. V. 20. № 4. P. 193–205.
<https://doi.org/10.1038/s41579-021-00639-z>
11. *Mulder W.J.M., Ochando J., Joosten L.A.B. et al.* Therapeutic targeting of trained immunity // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2019. V. 18. № 7. P. 553–566.
<https://doi.org/10.1038/s41573-019-0025-4>
12. *Old L.J., Clarke D.A., Benacerraf B.* Effect of *Bacillus Calmette-Guerin* infection on transplanted tumours in the mouse // *Nature*. 1959. V. 184 (Suppl. 5). P. 291–292.
<https://doi.org/10.1038/184291a0>
13. *Gong W., An H., Wang J. et al.* The natural effect of BCG vaccination on COVID-19: The debate continues // *Front. Immunol.* 2022. V. 13.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.953228>
14. *Gonzalez-Perez M., Sanchez-Tarjuelo R., Shor B. et al.* The BCG vaccine for COVID-19: First verdict and future directions // *Front. Immunol.* 2021. V. 12.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.632478>
15. *Carlson C.J., Phelan A.L.* A choice between two futures for pandemic recovery // *Lancet Planet Health*. 2020. V. 4. № 12. P. e545–e546.
[https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(20\)30245-X](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(20)30245-X)
16. *Hernandez J., Meisner J., Bardosh K., Rabinowitz P.* Prevent pandemics and halt climate change? Strengthen land rights for Indigenous peoples // *Lancet Planet Health*. 2022. V. 6. № 5. P. e381–e382.
[https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(22\)00069-9](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(22)00069-9)
17. *Jones M., Mills D., Gray R.* Expecting the unexpected? Improving rural health in the era of bushfires, novel coronavirus and climate change // *Aust. J. Rural Health*. 2020. V. 28. № 2. P. 107–109.
<https://doi.org/10.1111/ajr.12623>
18. *The Lancet Global collaboration for health: rhetoric versus reality* // *Lancet*. 2020. V. 396. № 10253. P. 735.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31900-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31900-0)
19. *Murdoch D.R., Crengle S., Frame B. et al.* We have been warned—preparing now to prevent the next pandemic // *N.Z. Med. J.* 2021. V. 134. № 1536. P. 8–11.
20. *Selin N.E.* Lessons from a pandemic for systems-oriented sustainability research // *Sci. Adv.* 2021. V. 7.

- № 22.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.abd8988>
21. Folke C., Polasky S., Rockstrom J. et al. Our future in the Anthropocene biosphere // *Ambio*. 2021. V. 50. № 4. P. 834–869.
<https://doi.org/10.1007/s13280-021-01544-8>
 22. Cousins T., Pentecost M., Alvergne A. et al. The changing climates of global health // *BMJ Glob Health*. 2021. V. 6. № 3.
<https://doi.org/10.1136/bmjgh-2021-005442>
 23. Sleepwalking into the next pandemic // *Nat. Med*. 2022. V. 28. № 7. P. 1325.
<https://doi.org/10.1038/s41591-022-01918-9>
 24. Meyer C.U., Zepp F. Principles in immunology for the design and development of vaccines // *Methods Mol. Biol*. 2022. V. 2410. P. 27–56.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1884-4_2
 25. Arico E., Bracci L., Castiello L. et al. Exploiting natural antiviral immunity for the control of pandemics: Lessons from Covid-19 // *Cytokine Growth Factor Rev*. 2022. V. 63. P. 23–33.
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2021.12.001>
 26. Yan N., Chen Z.J. Intrinsic antiviral immunity // *Nat. Immunol*. 2012. V. 13. № 3. P. 214–222.
<https://doi.org/10.1038/ni.2229>
 27. Netea M.G., Dominguez-Andres J., Barreiro L.B. et al. Defining trained immunity and its role in health and disease // *Nat. Rev. Immunol*. 2020. V. 20. № 6. P. 375–388.
<https://doi.org/10.1038/s41577-020-0285-6>
 28. Netea M.G., Giamarellos-Bourboulis E.J., Dominguez-Andres J. et al. Trained immunity: A tool for reducing susceptibility to and the severity of SARS-CoV-2 infection // *Cell*. 2020. V. 181. № 5. P. 969–977.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.042>
 29. Paul S., Hmar E.B., Sharma H.K. Strengthening immunity with immunostimulants: a review // *Curr. Trends Pharm. Res*. 2020. V. 7. № 1.
 30. Anaeigoudari A., Mollaei H.R., Arababadi M.K., Nosratabadi R. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2: The role of the main components of the innate immune system // *Inflammation*. 2021. V. 44. № 6. P. 2151–2169.
<https://doi.org/10.1007/s10753-021-01519-7>
 31. Fraschilla I., Amatullah H., Jeffrey K.L. One genome, many cell states: epigenetic control of innate immunity // *Curr. Opin. Immunol*. 2022. V. 75.
<https://doi.org/10.1016/j.coi.2022.102173>
 32. Ong G.H., Lian B.S.X., Kawasaki T., Kawai T. Exploration of pattern recognition receptor agonists as candidate adjuvants // *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2021. V. 11.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.745016>
 33. Labarrere C.A., Kassab G.S. Pattern recognition proteins: First line of defense against coronaviruses // *Front. Immunol*. 2021. V. 12.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.652252>
 34. Marshall J.S., Warrington R., Watson W., Kim H.L. An introduction to immunology and immunopathology // *Allergy Asthma Clin. Immunol*. 2018. V. 14. Suppl. 2. P. 49.
<https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1>
 35. Chen L., Deng H., Cui H. et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs // *Oncotarget*. 2018. V. 9. № 6. P. 7204–7218.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.23208>
 36. Jenthoe E., Weis S. DAMPs and Innate Immune Training // *Front. Immunol*. 2021. V. 12.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.699563>
 37. Zhang J.M., An J. Cytokines, inflammation, and pain // *Int. Anesthesiol. Clin*. 2007. V. 45. № 2. P. 27–37.
<https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318034194e>
 38. Lazzaro B.P., Tate A.V. Balancing sensitivity, risk, and immunopathology in immune regulation // *Curr. Opin. Insect. Sci*. 2022. V. 50.
<https://doi.org/10.1016/j.cois.2022.100874>
 39. McDaniel M.M., Meibers H.E., Pasare C. Innate control of adaptive immunity and adaptive instruction of innate immunity: bi-directional flow of information // *Curr. Opin. Immunol*. 2021. V. 73. P. 25–33.
<https://doi.org/10.1016/j.coi.2021.07.013>
 40. Vincenzo B., Asif I.J., Nikolaos P., Francesco M. Adaptive immunity and inflammation // *Int. J. Inflamm*. 2015. V. 2015.
<https://doi.org/10.1155/2015/575406>
 41. Kiss A. Inflammation in focus: The beginning and the end // *Pathol. Oncol. Res*. 2021. V. 27.
<https://doi.org/10.3389/pore.2021.1610136>
 42. Tercan H., Riksen N.P., Joosten L.A.B. et al. Trained immunity: Long-term adaptation in innate immune responses // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2021. V. 41. № 1. P. 55–61.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.314212>
 43. Ziogas A., Netea M.G. Trained immunity-related vaccines: innate immune memory and heterologous protection against infections // *Trends Mol. Med*. 2022. V. 28. № 6. P. 497–512.
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2022.03.009>
 44. Barton G.M. A calculated response: Control of inflammation by the innate immune system // *J. Clin. Invest*. 2008. V. 118. № 2. P. 413–420.
<https://doi.org/10.1172/JCI34431>
 45. Sun L., Yang X., Yuan Z., Wang H. Metabolic reprogramming in immune response and tissue inflammation // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2020. V. 40. № 9. P. 1990–2001.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.314037>
 46. Domínguez-Andrés J., van Crevel R., Divangahi M., Netea M. G. Designing the next generation of vaccines: Relevance for future pandemics // *MBio*. 2020. V. 11. № 6.
<https://doi.org/10.1128/mBio.02616-20>
 47. Netea M.G., Joosten L.A., Latz E. et al. Trained immunity: A program of innate immune memory in health

- and disease // *Science*. 2016. V. 352. № 6284. <https://doi.org/10.1126/science.aaf1098>
48. Kopf M., Nielsen P.J. Training myeloid precursors with fungi, bacteria and chips // *Nat. Immunol.* 2018. V. 19. № 4. P. 320–322. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0073-7>
 49. Larenas-Linnemann D., Rodriguez-Perez N., Arias-Cruz A. et al. Enhancing innate immunity against virus in times of COVID-19: Trying to untangle facts from fictions // *World Allergy Organ. J.* 2020. V. 13. № 11. <https://doi.org/10.1016/j.waojou.2020.100476>
 50. Geckin B., Konstantin Fohse F., Dominguez-Andres J., Netea M.G. Trained immunity: implications for vaccination // *Curr. Opin. Immunol.* 2022. V. 77. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2022.102190>
 51. Dominguez-Andres J., Netea M.G. Long-term reprogramming of the innate immune system // *J. Leukoc. Biol.* 2019. V. 105. № 2. P. 329–338. <https://doi.org/10.1002/JLB.MR0318-104R>
 52. De Zuani M., Fric J. Train the trainer: Hematopoietic stem cell control of trained immunity // *Front. Immunol.* 2022. V. 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.827250>
 53. Arneith B. Trained innate immunity // *Immunol. Res.* 2021. V. 69. № 1. P. 1–7. <https://doi.org/10.1007/s12026-021-09170-y>
 54. Bekkering S., Blok B.A., Joosten L.A. et al. In vitro experimental model of trained innate immunity in human primary monocytes // *Clin. Vaccine Immunol.* 2016. V. 23. № 12. P. 926–933. <https://doi.org/10.1128/CI.00349-16>
 55. Ciarlo E., Heinonen T., Theroude C. et al. Trained immunity confers broad-spectrum protection against bacterial infections // *J. Infect. Dis.* 2020. V. 222. № 11. P. 1869–1881. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz692>
 56. Dominguez-Andres J., Arts R.J.W., Bekkering S. et al. In vitro induction of trained immunity in adherent human monocytes // *STAR Protoc.* 2021. V. 2. № 1. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100365>
 57. Drummer C.V., Saaoud F., Shao Y. et al. Trained immunity and reactivity of macrophages and endothelial cells // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2021. V. 41. № 3. P. 1032–1046. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.315452>
 58. Hellinga A.H., Tsallis T., Eshuis T. et al. In vitro induction of trained innate immunity by bIgG and whey protein extracts // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 23. <https://doi.org/10.3390/ijms21239077>
 59. Mourits V.P., Arts R.J.W., Novakovic B. et al. The role of Toll-like receptor 10 in modulation of trained immunity // *Immunology*. 2020. V. 159. № 3. P. 289–297. <https://doi.org/10.1111/imm.13145>
 60. Netea M.G., Schlitz A., Placek K. et al. Innate and adaptive immune memory: An evolutionary continuum in the host's response to pathogens // *Cell Host Microbe*. 2019. V. 25. № 1. P. 13–26. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.12.006>
 61. Pasco S.T., Anguita J. Lessons from *Bacillus calmette-guerin*: Harnessing trained immunity for vaccine development // *Cells*. 2020. V. 9. № 9. <https://doi.org/10.3390/cells9092109>
 62. Peignier A., Parker D. Trained immunity and host-pathogen interactions // *Cell. Microbiol.* 2020. V. 22. № 12. <https://doi.org/10.1111/cmi.13261>
 63. Locht C., Lerm M. Good old BCG – what a century-old vaccine can contribute to modern medicine // *J. Intern. Med.* 2020. V. 288. № 6. P. 611–613. <https://doi.org/10.1111/joim.13195>
 64. Moulson A.J., Av-Gay Y. BCG immunomodulation: From the “hygiene hypothesis” to COVID-19 // *Immunobiology*. 2021. V. 226. № 1. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2020.152052>
 65. Taks E.J.M., Moorlag S., Netea M.G., van der Meer J.W.M. Shifting the immune memory paradigm: Trained immunity in viral infections // *Annu. Rev. Virol.* V. 9. № 1. P. 469–489. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-091919-072546>
 66. Alsulaiman J.W., Khasawneh A.I., Kheirallah K.A. Could “trained immunity” be induced by live attenuated vaccines protect against COVID-19? Review of available evidence // *J. Infect. Dev. Ctries.* 2020. V. 14. № 9. P. 957–962. <https://doi.org/10.3855/jidc.12805>
 67. Chumakov K., Avidan M.S., Benn C.S. et al. Old vaccines for new infections: Exploiting innate immunity to control COVID-19 and prevent future pandemics // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2021. V. 118. № 21. <https://doi.org/10.1073/pnas.2101718118>
 68. Bekkering S., Dominguez-Andres J., Joosten L.A.B. et al. Trained immunity: Reprogramming innate immunity in health and disease // *Annu. Rev. Immunol.* 2021. V. 39. P. 667–693. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-102119-073855>
 69. Bindu S., Dandapat S., Manikandan R. et al. Prophylactic and therapeutic insights into trained immunity: A renewed concept of innate immune memory // *Hum. Vaccin. Immunother.* 2022. V. 18. № 1. <https://doi.org/10.1080/21645515.2022.2040238>
 70. Sherwood E.R., Burelbach K.R., McBride M.A. et al. Innate immune memory and the host response to infection // *J. Immunol.* 2022. V. 208. № 4. P. 785–792. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2101058>
 71. Marin-Hernandez D., Nixon D.F., Hupert N. Heterologous vaccine interventions: boosting immunity against future pandemics // *Mol. Med.* 2021. V. 27. № 1. P. 54. <https://doi.org/10.1186/s10020-021-00317-z>
 72. Hu Z., Lu S.H., Lowrie D.B., Fan X.Y. Trained immunity: A Yin-Yang balance // *MedComm*. 2022. V. 3. № 1. <https://doi.org/10.1002/mco2.121>
 73. Ross E.A., Devitt A., Johnson J.R. Macrophages: The Good, the Bad, and the Gluttony // *Front. Immunol.*

2021. V. 12.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.708186>
74. *Prane Kumar K., Nicholls A.J., Wong C.H.Y.* Partners in crime: neutrophils and monocytes/macrophages in inflammation and disease // *Cell Tissue Res.* 2018. V. 371. № 3. P. 551–565.
<https://doi.org/10.1007/s00441-017-2753-2>
75. *Rawat S., Vratil S., Banerjee A.* Neutrophils at the crossroads of acute viral infections and severity // *Mol. Aspects Med.* 2021. V. 81.
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2021.100996>
76. *Schulz C., Petzold T., Ishikawa-Ankerhold H.* Macrophage regulation of granulopoiesis and neutrophil functions // *Antioxid. Redox Signal.* 2021. V. 35. № 3. P. 182–191.
<https://doi.org/10.1089/ars.2020.8203>
77. *Acevedo O.A., Berrios R.V., Rodriguez-Guilarte L. et al.* Molecular and cellular mechanisms modulating trained immunity by various cell types in response to pathogen encounter // *Front. Immunol.* 2021. V. 12.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.745332>
78. *Eiz-Vesper B., Schmetzer H.M.* Antigen-presenting cells: potential of proven and new players in immune therapies // *Transfus. Med. Hemother.* 2020. V. 47. № 6. P. 429–431.
<https://doi.org/10.1159/000512729>
79. *Arango Duque G., Descoteaux A.* Macrophage cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases // *Front. Immunol.* 2014. V. 5.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00491>
80. *Yu S., Ge H., Li S., Qiu H.J.* Modulation of macrophage polarization by viruses: turning off/on host antiviral responses // *Front. Microbiol.* 2022. V. 13.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.839585>
81. *Banete A., Barilo J., Whittaker R., Basta S.* The activated macrophage – A tough fortress for virus invasion: How viruses strike back // *Front. Microbiol.* 2021. V. 12.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.803427>
82. *Patel S., Werstuck G.H.* Macrophage function and the role of GSK3 // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 4. P. 2206.
<https://doi.org/10.3390/ijms22042206>
83. *Su D.L., Lu Z.M., Shen M.N. et al.* Roles of pro- and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of SLE // *J. Biomed. Biotechnol.* 2012. V. 2012.
<https://doi.org/10.1155/2012/347141>
84. *Sanchez-Paulete A.R., Teixeira A., Cueto F.J. et al.* Antigen cross-presentation and T-cell cross-priming in cancer immunology and immunotherapy // *Ann. Oncol.* 2017. V. 28. Suppl. 12. P. xii44–xii55.
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdx237>
85. *Thaïss C.A., Semmling V., Franken L. et al.* Chemokines: A new dendritic cell signal for T-cell activation // *Front. Immunol.* 2011. V. 2.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00031>
86. *Kurts C., Robinson B.W., Knolle P.A.* Cross-priming in health and disease // *Nat. Rev. Immunol.* 2010. V. 10. № 6. P. 403–414.
<https://doi.org/10.1038/nri2780>
87. *Kumar V.* Innate lymphoid cell and adaptive immune cell cross-talk: A talk meant not to forget // *J. Leukoc. Biol.* 2020. V. 108. № 1. P. 397–417.
<https://doi.org/10.1002/JLB.4MIR0420-500RRR>
88. *Bennstein S.B., Uhrberg M.* Biology and therapeutic potential of human innate lymphoid cells // *FEBS J.* 2022. V. 289. № 14. P. 3967–3981.
<https://doi.org/10.1111/febs.15866>
89. *Pelletier A., Stockmann C.* The Metabolic Basis of ILC Plasticity // *Front. Immunol.* 2022. V. 13.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.858051>
90. *Favaro R.R., Phillips K., Delaunay-Danguy R. et al.* Emerging concepts in innate lymphoid cells, memory, and reproduction // *Front. Immunol.* 2022. V. 13.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.824263>
91. *Cobb L.M., Verneris M.R.* Therapeutic manipulation of innate lymphoid cells // *JCI Insight.* 2021. V. 6. № 6.
<https://doi.org/10.1172/jci.insight.146006>
92. *Yin G., Zhao C., Pei W.* Crosstalk between macrophages and innate lymphoid cells (ILCs) in diseases // *Int. Immunopharmacol.* 2022. V. 110.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.108937>
93. *Verma D., Verma M., Mishra R.* Stem cell therapy and innate lymphoid cells // *Stem Cells Int.* 2022. V. 2022.
<https://doi.org/10.1155/2022/3530520>
94. *Mitroulis I., Ruppova K., Wang B. et al.* Modulation of myelopoiesis progenitors is an integral component of trained immunity // *Cell.* 2018. V. 172. № 1–2. P. 147–161 e12.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.034>
95. *Song W.M., Colonna M.* Immune training unlocks innate potential // *Cell.* 2018. V. 172. № 1–2. P. 3–5.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.034>
96. *Fanucchi S., Dominguez-Andres J., Joosten L.A.B. et al.* The intersection of epigenetics and metabolism in trained immunity // *Immunity.* 2021. V. 54. № 1. P. 32–43.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.10.011>
97. *Saeed S., Quintin J., Kerstens H.H. et al.* Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity // *Science.* 2014. V. 345. № 6204.
<https://doi.org/10.1126/science.1251086>
98. *Ferreira A.V., Dominguez-Andres J., Netea M.G.* The role of cell metabolism in innate immune memory // *J. Innate Immun.* 2022. V. 14. № 1. P. 42–50.
<https://doi.org/10.1159/000512280>
99. *Diskin C., Palsson-McDermott E.M.* Metabolic modulation in macrophage effector function // *Front. Immunol.* 2018. V. 9.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00270>
100. *Llibre A., Dedicoat M., Burel J.G. et al.* Host immune-metabolic adaptations upon mycobacterial infections and associated co-morbidities // *Front. Immunol.* 2021. V. 12.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.747387>

101. *Gauthier T., Chen W.* Modulation of macrophage immunometabolism: a new approach to fight infections // *Front. Immunol.* 2022. V. 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.780839>
102. *Saini A., Ghoneim H.E., Lio C.J. et al.* Gene regulatory circuits in innate and adaptive immune cells // *Annu. Rev. Immunol.* 2022. V. 40. P. 387–411. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-101320-025949>
103. *Topfer E., Boraschi D., Italiani P.* Innate immune memory: The latest frontier of adjuvanticity // *J. Immunol. Res.* 2015. V. 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/478408>
104. *Pei G., Dorhoi A.* NOD-like receptors: guards of cellular homeostasis perturbation during infection // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 13. <https://doi.org/10.3390/ijms22136714>
105. *Duan T., Du Y., Xing C. et al.* Toll-like receptor signaling and its role in cell-mediated immunity // *Front. Immunol.* 2022. V. 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.812774>
106. *Behzadi P., Garcia-Perdomo H.A., Karpinski T.M.* Toll-like receptors: general molecular and structural biology // *J. Immunol. Res.* 2021. V. 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/9914854>
107. *Jannuzzi G.P., de Almeida J.R.F., Paulo L.N.M. et al.* Intracellular PRRs activation in targeting the immune response against fungal infections // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020. V. 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.591970>
108. *Lee B.L., Barton G.M.* Trafficking of endosomal Toll-like receptors // *Trends Cell. Biol.* 2014. V. 24. № 6. P. 360–369. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.12.002>
109. *Blasius A.L., Beutler B.* Intracellular toll-like receptors // *Immunity.* 2010. V. 32. № 3. P. 305–315. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.03.012>
110. *Petes C., Odoardi N., Gee K.* The toll for trafficking: Toll-like receptor 7 delivery to the endosome // *Front. Immunol.* 2017. V. 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01075>
111. *Xia P., Wu Y., Lian S. et al.* Research progress on Toll-like receptor signal transduction and its roles in antimicrobial immune responses // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2021. V. 105. № 13. P. 5341–5355. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11406-8>
112. *Huang L., Ge X., Liu Y. et al.* The role of toll-like receptor agonists and their nanomedicines for tumor immunotherapy // *Pharmaceutics.* 2022. V. 14. № 6. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14061228>
113. *Diaz-Dinamarca D.A., Salazar M.L., Castillo B.N. et al.* Protein-based adjuvants for vaccines as immunomodulators of the innate and adaptive immune response: Current knowledge, challenges, and future opportunities // *Pharmaceutics.* 2022. V. 14. № 8. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081671>
114. *Sartorius R., Trovato M., Manco R. et al.* Exploiting viral sensing mediated by Toll-like receptors to design innovative vaccines // *NPJ Vaccines.* 2021. V. 6. № 1. P. 127. <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00391-8>
115. *Rumpret M., von Richthofen H.J., Peperzak V., Meygaard L.* Inhibitory pattern recognition receptors // *J. Exp. Med.* 2022. V. 219. № 1. <https://doi.org/10.1084/jem.20211463>
116. *Mielcarska M.B., Bossowska-Nowicka M., Toka F.N.* Cell surface expression of endosomal toll-like receptors—a necessity or a superfluous duplication? // *Front. Immunol.* 2020. V. 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.620972>
117. *Turley J.L., Lavelle E.P.* Resolving adjuvant mode of action to enhance vaccine efficacy // *Curr. Opin. Immunol.* 2022. V. 77. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2022.102229>
118. *Pulendran B., Arunachalam P.S., O'Hagan D.V.* Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants // *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2021. № 20. P. 454–475. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00163-y>
119. *Kumar S., Sunagar R., Gosselin E.* Bacterial protein toll-like-receptor agonists: A novel perspective on vaccine adjuvants // *Front. Immunol.* 2019. V. 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01144>
120. *Yang J.X., Tseng J.C., Yu G.Y. et al.* Recent advances in the development of toll-like receptor agonist-based vaccine adjuvants for infectious diseases // *Pharmaceutics.* 2022. V. 14. № 2. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020423>
121. *Xu Z., Moyle P.M.* Bioconjugation approaches to producing subunit vaccines composed of protein or peptide antigens and covalently attached toll-like receptor ligands // *Bioconjug. Chem.* 2018. V. 29. № 3. P. 572–586. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00478>
122. *Lee W., Suresh M.* Vaccine adjuvants to engage the cross-presentation pathway // *Front. Immunol.* 2022. V. 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.940047>
123. *Kaur A., Baldwin J., Brar D. et al.* Toll-like receptor (TLR) agonists as a driving force behind next-generation vaccine adjuvants and cancer therapeutics // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2022. V. 70. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2022.102172>
124. *Farooq M., Batool M., Kim M.S., Choi S.* Toll-like receptors as a therapeutic target in the era of immunotherapies // *Front. Cell. Dev. Biol.* 2021. V. 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.756315>
125. *Bogunovic D., Manches O., Godefroy E. et al.* TLR4 engagement during TLR3-induced proinflammatory signaling in dendritic cells promotes IL-10-mediated suppression of antitumor immunity // *Cancer Res.* 2011. V. 71. № 16. P. 5467–5476. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3988>
126. *Goodridge H.S., Ahmed S.S., Curtis N. et al.* Harnessing the beneficial heterologous effects of vaccination // *Nat. Rev. Immunol.* 2016. V. 16. № 6. P. 392–400. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.43>

127. *Shann F.* The non-specific effects of vaccines // *Arch. Dis. Child.* 2010. V. 95. № 9. P. 662–667. <https://doi.org/10.1136/adc.2009.157537>
128. *Aaby P., Roth A., Ravn H. et al.* Randomized trial of BCG vaccination at birth to low-birth-weight children: Beneficial nonspecific effects in the neonatal period? // *J. Infect. Dis.* 2011. V. 204. № 2. P. 245–252. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir240>
129. *Bagcchi S.* WHO's global tuberculosis report 2022 // *The Lancet Microbe.* 2023. V. 4. № 1. P. e20. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(22\)00359-7](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(22)00359-7)
130. *Escobar L.E., Molina-Cruz A., Barillas-Mury C.* BCG vaccine protection from severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2020. V. 117. № 30. P. 17720–17726. <https://doi.org/10.1073/pnas.2008410117>
131. *Aaby P., Benn C.S.* Developing the concept of beneficial non-specific effect of live vaccines with epidemiological studies // *Clin. Microbiol. Infect.* 2019. V. 25. № 12. P. 1459–1467. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.08.011>
132. *Larsen S.E., Williams B.D., Rais M. et al.* It takes a village: The multifaceted immune response to *Mycobacterium tuberculosis* infection and vaccine-induced immunity // *Front. Immunol.* 2022. V. 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.840225>
133. *Nieuwenhuizen N.E., Kulkarni P.S., Shaligram U. et al.* The recombinant bacille calmette-guerin vaccine VPM1002: Ready for clinical efficacy testing // *Front. Immunol.* 2017. V. 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01147>
134. *Nieuwenhuizen N.E., Kaufmann S.H.E.* Next-generation vaccines based on bacille calmette-guerin // *Front. Immunol.* 2018. V. 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00121>
135. *Camilli G., Bohm M., Piffer A.P. et al.* beta-Glucan-induced reprogramming of human macrophages inhibits NLRP3 inflammasome activation in cryopyrinopathies // *J. Clin. Invest.* 2020. V. 130. № 9. P. 4561–4573. <https://doi.org/10.1172/JCI134778>
136. *Moorlag S., van Deuren R.P., van Werkhoven C.H. et al.* Safety and COVID-19 symptoms in individuals recently vaccinated with BCG: A retrospective cohort study // *Cell. Rep. Med.* 2020. V. 1. № 5. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100073>
137. *Smith S.G., Kleinnijenhuis J., Netea M.G., Dockrell H.M.* Whole blood profiling of bacillus calmette-guerin-induced trained innate immunity in infants identifies epidermal growth factor, IL-6, platelet-derived growth factor-AB/BB, and natural killer cell activation // *Front. Immunol.* 2017. V. 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00644>
138. *Lee M.H., Kim B.J.* COVID-19 vaccine development based on recombinant viral and bacterial vector systems: Combinatorial effect of adaptive and trained immunity // *J. Microbiol.* 2022. V. 60. № 3. P. 321–334. <https://doi.org/10.1007/s12275-022-1621-2>
139. *Gupta P.K.* New disease old vaccine: Is recombinant BCG vaccine an answer for COVID-19? // *Cell. Immunol.* 2020. V. 356. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2020.104187>
140. *Kaur G., Singh S., Nanda S. et al.* Fiction and facts about BCG imparting trained immunity against COVID-19 // *Vaccines (Basel).* 2022. V. 10. № 7. <https://doi.org/10.3390/vaccines10071006>
141. *Melenotte C., Silvini A., Goubet A.G. et al.* Immune responses during COVID-19 infection // *Oncoimmunology.* 2020. V. 9. № 1. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1807836>
142. *Kleen T.O., Galdon A.A., MacDonald A.S., Dalglish A.G.* Mitigating coronavirus induced dysfunctional immunity for at-risk populations in COVID-19: Trained immunity, BCG and “New Old Friends” // *Front. Immunol.* 2020. V. 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02059>
143. *Seo S.U., Seong B.L.* Prospects on repurposing a live attenuated vaccine for the control of unrelated infections // *Front. Immunol.* 2022. V. 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.877845>
144. *Basak P., Sachdeva N., Dayal D.* Can BCG vaccine protect against COVID-19 via trained immunity and tolerogenesis? // *Bioessays.* 2021. V. 43. № 3. <https://doi.org/10.1002/bies.202000200>
145. *Mysore V., Cullere X., Settles M.L. et al.* Protective heterologous T cell immunity in COVID-19 induced by the trivalent MMR and Tdap vaccine antigens // *Med (N.Y.).* 2021. V. 2. № 9. P. 1050–1071 e7. <https://doi.org/10.1016/j.medj.2021.08.004>
146. *Malik Y.S., Ansari M.I., Ganesh B. et al.* BCG vaccine: A hope to control COVID-19 pandemic amid crisis // *Hum. Vaccin. Immunother.* 2020. V. 16. № 12. P. 2954–2962. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1818522>
147. *Jung H.E., Lee H.K.* Current understanding of the innate control of toll-like receptors in response to SARS-CoV-2 infection // *Viruses.* 2021. V. 13. № 11. <https://doi.org/10.3390/v13112132>
148. *Kayesh M.E.H., Kohara M., Tsukiyama-Kohara K.* An overview of recent insights into the response of TLR to SARS-CoV-2 infection and the potential of TLR agonists as SARS-CoV-2 vaccine adjuvants // *Viruses.* 2021. V. 13. № 11. <https://doi.org/10.3390/v13112302>
149. *Gong W., Aspatwar A., Wang S. et al.* COVID-19 pandemic: SARS-CoV-2 specific vaccines and challenges, protection via BCG trained immunity, and clinical trials // *Expert Rev. Vaccines.* 2021. V. 20. № 7. P. 857–880. <https://doi.org/10.1080/14760584.2021.1938550>
150. *Brueggeman J.M., Zhao J., Schank M. et al.* Trained immunity: An overview and the impact on COVID-19 // *Front. Immunol.* 2022. V. 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.837524>
151. *Cox A., Cevik H., Feldman H.A. et al.* Targeting natural killer cells to enhance vaccine responses // *Trends Pharmacol. Sci.* 2021. V. 42. № 9. P. 789–801. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2021.06.004>

Cellular and Epigenetic Aspects of Trained Immunity and Prospects for Creation of Universal Vaccines in the Face of Increasingly Frequent Pandemics

I. V. Alekseenko^{a, b}, R. G. Vasilov^a, L. G. Kondratyeva^{a, b, *}, S. V. Kostrov^a,
I. P. Chernov^b, and E. D. Sverdlov^{a, **}

^aNational Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, 123182 Russia

^bShemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

*e-mail: liakondratyeva@yandex.ru

**e-mail: edsverd@gmail.com

The inevitability of pandemics creates an urgent requirement for emergency action to develop effective technologies to reduce harm to the human population in the period between the onset of an epidemic and the development and production of a vaccine. In this review we discuss the possibility of engineering universal vaccines. Such vaccines would exploit the nonspecific potential of innate immunity, would allow the population to be vaccinated when an unidentified pathogen appears, and would reduce disease severity until pathogen-specific vaccines become available. There are strong evidences that bacterial or viral vaccines such as BCG, measles and polio have heterologous protective effects against unrelated pathogens. This is attributed to the innate immune system's ability to maintain the memory of past infections and use it to develop immune defenses against new ones. This effect has been called "trained" immunity. The use of trained immunity may also represent an important new approach to improving existing vaccines or to developing new vaccines that combine the induction of classical adaptive immune memory and innate immune memory. Such approaches can be boosted by genetic technology and prove extremely useful against future pandemics.

Keywords: BCG, innate immune system, bridge vaccines, trained immunity, TLR.

ОБЗОРНЫЕ
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 57.01.011:59.01

ЗАКОН ГОМОЛОГИЧЕСКИХ РЯДОВ Н.И. ВАВИЛОВА И ВОЗМОЖНАЯ ЕГО СУДЬБА

© 2023 г. А. Ю. Розанов*

Палеонтологический институт им. А.А. Борисяка Российской академии наук, Москва, 117647 Россия

**e-mail: aroza@paleo.ru*

Поступила в редакцию 17.04.2023 г.

После доработки 20.04.2023 г.

Принята к публикации 21.04.2023 г.

На мировом материале по одной из древнейших групп беспозвоночных — археоциат, показана применимость Закона гомологических рядов Н.И. Вавилова для построения системы этой группы. Доказывается, что закономерности эволюционной морфологии являются частными случаями закона гомологических рядов. Анализ особенностей развития нашей галактики до образования Земли ставит вопрос о том, что закон гомологических рядов является финальной частью более общего закона автокомбинаторики.

Ключевые слова: закон гомологических рядов, археоциаты, гомологическая изменчивость, палеогеография, происхождение жизни, “мир РНК”, закон автокомбинаторики.

DOI: 10.31857/S0016675823090102, **EDN:** WUXPWG

Уже более 100 лет прошло с момента опубликования Н.И. Вавиловым Закона гомологических рядов. Большинство современников он был встречен восторженно. Притом что закон гомологических рядов был сформулирован в основном на основании анализа материала по сельскохозяйственным культурам, Н.И. Вавилов подчеркивал, что действие закона должно распространяться на весь растительный и животный мир, и привел некоторые примеры [1]. Большинство ученых, заинтересовавшихся этим открытием и позитивно его оценивших, были неонтологами, то есть специалистами по современным живым организмам, это позволяло проводить осмысление закона в рамках лишь одного временного среза. Но ощущение установленных Н.И. Вавиловым закономерностей возникало и у палеонтологов. В это же время появляются и сформулированные общие концепции эволюции Л.С. Берга и других ученых, которые легко увязываются с представлениями Н.И. Вавилова, что упомянутые ученые специально отмечают в своих публикациях. Более того, в этих работах, особенно у Л.С. Берга [2], отдельно проводится сравнение концепции номогенеза и дарвинизма.

Одновременно с обнародованием Закона гомологических рядов Н.И. Вавилов публикует статью “Закономерности в развитии живого мира” [3], в которой пишет: “Конечно, понадобится еще огромная коллективная работа ботаников и зоологов в течение многих десятилетий для подготовки

общей системы, в основу которой придется поставить явление тождества рядов изменчивости. Но это — неизбежный путь при исследовании многообразия живого мира”. Тем не менее, поскольку основная масса исследователей, как принявших закон Н.И. Вавилова, так и не принявших, были специалистами в области изучения современных организмов, необходимо было проверить идеи о гомологических рядах во времени, то есть попытаться проанализировать ископаемый материал, отражающий развитие органического мира за всю историю его существования на Земле. Конечно проанализировать весь ископаемый материал — это непосильная задача. Интуитивные попытки распознать нечто подобное в прошлом делались исследователями разных групп и чаще всего специалистами в области изучения фораминифер, археоциат и аммонитов, это: Д.Г. Борнеман, П.С. Краснопева, О.Х. Шиндевольф и др. [4]. Наиболее значимые полноценные материалы были получены по археоциатам [4–9]. Археоциаты — это группа примитивных эвкариотических многоклеточных животных, близких к губкам. Обычно они имеют форму цилиндрических или конических кубков размером в несколько сантиметров.

В 1958 г. мой учитель академик В.В. Меннер поручил мне начать заниматься изучением археоциат и при этом настоятельно рекомендовал ознакомиться с работами Н.И. Вавилова, которые в то время были не очень популярны. Несомненной

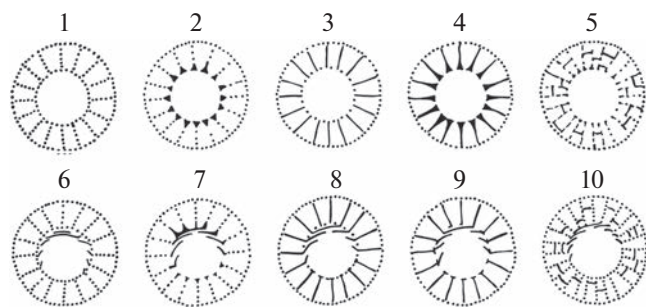


Рис. 1. Гомологическая изменчивость археоциат. 1–5 – семейство Ajacicyathidae, 6–10 – семейство Bronchocyathidae [4].

удачей было то, что моим учителем и консультантом по изучению археоциат стала И.Т. Журавлева. Она в 50–60-е гг. возглавила выдающуюся российскую школу изучения археоциат, в которую входило более 30 (в основном молодых) специалистов, которые работали или начали работать в это время в Ленинграде, Москве, Новосибирске, Красноярске, Иркутске, Новокузнецке, Чите, Якутске и Владивостоке. Для сравнения напомним, что с момента первого описания археоциат Ф.В. Миком (F.V. Meek) в 1861 г. во всем мире по этой теме работали: в США три человека, в Канаде – два, в Европе – четыре, в Австралии – пять, в Китае – два исследователя, то есть совокупно за 100 лет за пределами России археоциатами занимались 16 человек, из которых шесть опубликовали по одной работе на эту тему. Это не умаляет достоинств наших замечательных зарубежных коллег таких как Г. Тейлор, Р. Бедфорд, Д. Бедфорд, В. Окулич, Д. Грейвсток и, конечно, Франсуаз Дебрэнн. В обзоре [8] в предисловии указано, в каких музеях изучались материалы по этой группе, а это – практически важнейшие музеи мира; также авторами обзора и И.Т. Журавлевой были изучены авторские коллекции.

Археоциаты являются совершенно уникальной группой по нескольким особенностям: а) это очень просто устроенная группа организмов, подобных губкам, б) морфология археоциат геометрична, в) морфологически их элементы очень яркие и легко распознаваемы, г) на сегодняшний день мы уже достоверно знаем начало (томотский ярус нижнего кембрия) и конец (конец раннего кембрия) существования этой группы, д) мы имеем ясное представление о временном и пространственном распространении этой группы по поверхности Земли.

В 1974 г. в журнале *Geological Magazine* мною была опубликована статья по параллельной морфологической изменчивости двух семейств археоциат, которые отличаются строением внутренней стенки (рис. 1). У семейства Bronchocyathidae все морфологические признаки кубка

повторяются, так же как и у семейства Ajacicyathidae. Однако внутренняя стенка в одном случае простая (у семейства Ajacicyathidae), а в другом усложненная – кольцевая (у семейства Bronchocyathidae). Первая таблица гомологических рядов правильных археоциат была опубликована более полувека тому назад [6] и включала 64 валидных рода (рис. 2). По мере дальнейшего изучения и описания новых таксонов публиковались несколько вариантов гомологических рядов археоциат [4, 8, 9]. Последняя опубликованная в 1990 г. таблица включала уже 227 валидных родов. Если дополнить ее данными последних тридцати лет, то она пополнится еще двумя–тремя десятками новых описанных родов. Самое существенное, что вновь описанные рода укладывались в эту таблицу, и за все это время не было найдено каких-либо форм археоциат, которые не могли бы быть помещены в соответствующую ячейку (рис. 2, 3). Сама по себе стопроцентная прогнозируемость тоже очень важна. Но более того, прогнозируемость оказалась возможной и в определении центра диверсификации (рис. 4).

Если вспомнить центры культурных растений Н.И. Вавилова и прогнозирование по возрасту, исходя из морфологии, становится ясно, что зачастую даже по отдельным признакам фрагментов кубков можно дать точное определение возраста (до яруса). Мировая схема корреляции, составленная еще 30 лет тому назад, не была ни опровергнута, ни даже подвергнута серьезной коррекции до настоящего времени (рис. 5). Упомянутый выше материал дал возможность выяснить и ряд других чрезвычайно важных обстоятельств, касающихся эволюционной морфологии. Уже давно установлен ряд неоспоримых закономерностей эволюционной морфологии, которые в конечном счете, как теперь становится ясно, являются частными закономерностями Закона гомологических рядов Н.И. Вавилова [1], так же как и теории номогенеза Л.С. Берга. Приведу в пример принцип олигомеризации, открытый В.А. Догелем. На рисунке представлены примеры простой пористости и тумул (образований в виде мешочков на поверхности кубка) одностенных археоциат (рис. 6). В качестве примера приведу олигомеризацию тумул с томотского времени до ботомского. Выигрывает материал по археоциатам состоит и в том, что к настоящему времени обстоятельно и документально проанализирован онтогенез представителей нескольких десятков родов. Особенно интересно изучение гетерохроний, прослеженных в онтогенезе, что показано на схеме (рис. 7). Левый продольный срез *Leptosocyathus polyseptus* является документальной прорисовкой продольного среза (шлиф).

Еще более интересным оказалось выяснение соотношения появления новых признаков у правильных археоциат и количества новых родов по

Monocyathina	Capsulocyathina	Dokidocyathina	Ajacyathina	Nochoroicyathina	Coscincyathina

1 Archaeolynthus; 2 Tumuliolunthus; 3 Rabdocyathella; 4 Capsulocyathus; 5 Fransuaacyathus; 6 Fransuaacyathidae; 7 Uralocyathella; 8 Dokidocyathus; 9 Incurvocyathus; 10 Alphacyathus; 11 Dokidocyathella; 12 Kalatocyathus; 13 Papillocyathus; 14 Soanicyathus; 15 Zhuravlevacyathus; 16 Kidjacyathus; 17 Tchijacyathus; 18 Ajacyathus; 19 Orbicyathus; 20 Archaeocyathellus; 21 Urcyathus; 22 Archaeofungia; 23 Leptanocyathus; 24 Leptanocyathellus; 25 Gordonicyathus; 26 Compositocyathus; 27 Gordonicyathus; 28 Ehmophyllum; 29 Ehmophyllum; 30 Ajacyathus; 31 Tumulocyathus; 32 Tumulocyathellus; 33 Porocyathus; 34 Kjacayathus; 35 Annulofungia; 36 Vologdinocyathus; 37 Rassocyathella; 38 Ladacyathus; 39 Erboicyathus; 40 Urcyathella; 41 Preinocyathus; 42 Tegerocyathus; 43 Nochoroicyathus; 44 Nochoroicyathidae; 45 Pectenocyathus; 46 Thalamocyathus; 47 Firmosocyathus; 48 Kanocyathus; 49 Jakatocyathus; 50 Lenocyathus; 51 Genocyathus; 52 Koridicyathus; 53 Coscincyathus; 54 Asterocyathus; 55 Salatocyathus; 56 Coscincyathellus; 57 Tumulococinus; 58 Alatucyathus; 59 Asteronumulus; 60 Procoscincus; 61 Tomocyathus kandatus; 62 Tomocyathus operatus; 63 Kaszyrcyathus; 64 Mrassucyathus

Рис. 2. Таблица гомологических рядов археоциат [6].

зонам — ярусам нижнего кембрия (рис. 8). Примечательно, что в ботомское время, несмотря на то, что у археоциат не возникает новых признаков, фиксируется появление большого числа новых родов. Это явление, документально установленное, хорошо согласуется с Законом гомологических рядов Н.И. Вавилова. Крайне интересным оказалось изучение у археоциат всевозможных патологий кубков и особенно результатов заживления повреждений различных участков скелетов. Например у самых древних археоциат *Nochoroicyatys sunnaginicus* при разрушении кубка его укрепление производилось с помощью синоптикул (поперечные балочки между перегородками), которые в норме появляются у родов спустя десять млн лет (рис. 9).

Другой пример. У *Coscynocyatys diantus* из низов атдабанского яруса заживление повреждения производилось с помощью бугорчатых тумул (рис. 10), которые в норме появляются тоже спустя 10–15 млн лет. Это удивительное явление (заживление повреждений с помощью конструкций, свойственных более молодым таксонам) может говорить о существовании потенциальных возможностей возникновения любых признаков со времени возникновения археоциат вообще. Вероятно можно полагать, что такое явление так-

же в принципе согласуется с концепцией Закона гомологических рядов.

Попытаемся проанализировать данные о событиях, которые предшествуют появлению на Земле осадочных пород, поскольку мне представляется, что Закон гомологических рядов начал работать еще до момента реального присутствия ископаемых в первых осадочных породах Земли. Представление А.С. Спирина [11, 12] и А.Б. Четверина [13] о возникновении “мира РНК” во время формирования Солнечной системы достаточно правдоподобно, поскольку А.Б. Четверин и ряд предшествующих исследователей довольно убедительно предположили возможность возникновения колоний РНК в межслоевом пространстве монтморелонита. Похоже, что такой минерал как монтморелонит уже мог существовать с момента вспышки Сверхновой. В нашей галактике через некоторое время после Большого взрыва и возникновения собственно биофильных элементов запускается процесс автокомбинаторики этих элементов, который продолжается до момента вспышки Сверхновой. В результате процесса автокомбинаторики за это время, а это — не менее восьми млрд лет, возникает более 200 (данные на сегодняшнее время) соединений, представляющих собой комбинации биофильных элементов. Другими словами, в это время работает

Стенки		Монотрихы	Ажацикты						Капсулы	
Наружная	Внутренняя		Трихы	Дикотрихы	Ажацикты			Эризматоскопия	Капсулы	Капсулы
J	VI V IV III II I				191 137	136				
I	VI V IV III II I				89, 184 58 143 61 62	184 58 170		224		190 197
H	VI V IV III II I				57			107 142		
G	VI V IV III II I	28.203			101 155 65, 222 66 102, 114 64, 146 41	163, 15, 168 184 159, 165 183 158, 206		82, 204 134 82 108 84	106	
F	VI V IV III II I	3.8			125 113 99 25 212 182	113 95, 96 153 154 135, 124 167		100 112, 174 93 144, 160 221	9	
E	VI V IV III II I	103			68 70 23			129, 145 199		81
D	VI V IV III II I	2			160 69 188 89 22	91 97 90		83 80		6.225
C	VI V IV III II I				52 56 151, 193 149 209	56 151 92, 164		140 117 110, 121 148 123	185 ?	
B	VI V IV III II I				63 50 53 27	189 53		86, 88 150, 87 192 111, 213	7	196 85
A	VI V IV III II I	1.224			220 24, 166 202, 207 150, 181, 100 22, 181 46, 158 17 12, 13, 14, 20	157 46, 163 115, 201 211, 213 46, 34 106, 31 166, 74 165, 113, 110 119 37, 40, 205 157, 210		176 48 22, 104, 109 67 78 212 156	79 187 75	
Вертикальные элементы интервала				Δ	α	β	γ	α	β	γ

Рис. 3. Таблица гомологических рядов правильных археоциат (по [4] с дополнениями по [8]). Условные обозначения по вертикали: α — полнопористые перегородки, β — неполнопористые перегородки, γ — перегородки с синоптикулами, Δ — радиальные стержни. Каждая ячейка таблицы поделена по диагонали: в левой верхней части помещены рода с несколькими рядами пор во внутренней стенке по ширину интерсептума, в правой нижней — с одним рядом пор; квадратом помечены роды с кубком орбициантусовой формы, треугольником с основанием внизу — со звездчатой наружной стенкой, треугольником с основанием вверх — со звездчатой внутренней стенкой. Наружные стенки (признак надсемейств): А — простые, В — с претиозоциатусовой дополнительной оболочкой, С — с эрбоциатусовой дополнительной оболочкой, D — с простыми тумулами, Е — с бугорчатыми тумулами, F — с козырьками, G — с каналами, H — каркас с каналами и дополнительной оболочкой, I — терциатусовая стенка, J — кольцевые стенки. Внутренние стенки (признак семейств): I — простые, II — с объемлющими козырьками или чешуями, III — кольцевые, IV — с несообщающимися каналами, V — с сообщающимися каналами, VI — с дополнительной оболочкой. Рода в таблице обозначены цифрами. 1 *Archaeolynthus*, 2 *Tumuliolynthus*, 3 *Propriolynthus*, 4 *Palaeoconularia*, 5 *Capsulocyathus*, 6 *Fransuaecyathus*, 7 *Rhabdolynthus*, 8 *Melkanyathus*, 9 *Tubericyathus*, 10, 11 *Stapicyathus*, 12 *Tabulacyathus*, 13 *Aptocyathus*, 14 *Aptocyathella*, 15 *Rotundocyathus*, 16, 17 *Putapacyathus*, 18 *Dokidocyathus*, 19 *Incurvocyathus*, 20 *Alphacyathus*, 21 *Dokidocyathella*, 22 *Kaltatocyathus*, 23 *Papillocyathus*, 24 *Kyarocyathus*, 25 *Zhuravlevaacyathus*, 26 *Batschkykiacyathus*, 27 *Kidriasocyathus*, 28 *Robertiolynthus*, 29 *Robustocyathus*, 30 *Orbicyathus*, 31 *Urcyathus*, 32 *Ajacyathellus*, 33 *Ajacyacyathus*, 34 *Hemithalamocyathus*, 35 *Sibirecyathus*, 36 *Tennericyathus*, 37 *Leptosocyathus*, 38 *Taylorcyathus*, 39 *Gordonicyathus*, 40 *Cyclocyathella*, 41 *Kymbecyathus*, 42 *Compositocyathus*, 43 *Dencocyathus*, 44 *Gordonifungia*, 45 *Ethmophyllum*, 46 *Zonacyathus*, 47 *Degeletticyathus*, 48 *Afiacyathus*, 49 *Robertocyathus*, 50 *Pretiosocyathus*, 51 *Urcyathella*, 52 *Krasnopeevaacyathus*, 53 *Peregrinicyathus*, 54 *Butakovicyathus*, 55 *Erbocyathus*, 56 *Tegerocyathus*, 57 *Hupecyathellus*, 58 *Tercyathus*, 59 *Clathricyathus*, 60 *Joanaecyathus*, 61 *Botomocyathus*, 62 *Piamaecyathellus*, 63 *Kordecyathus*, 64 *Falloycyathus*, 65 *Carinacyathus*, 66 *Fanscyathus*, 67 *Kotuyicoscinus*, 68 *Lenocyathus*, 69 *Geocyathus*, 70 *Japhanicyathus*, 71 *Nochoroicyathus*, 72 *Deceptioncyathus*, 73 *Leptosocyathellus*, 74 *Formosocyathus*, 75 *Coscincocyathus*, 76 *Retecoscincus*, 77 *Asterocyathus*, 78 *Salairocyathus*, 79 *Coscincocyathellus*, 80 *Tumulocoscincus*, 81 *Alataucyathus*, 82 *Porocoscincus*, 83 *Asterotumulus*, 84 *Rozanovicyathus*, 85 *Coscincocyathella*, 86 *Membranacyathus*, 87 *Kasyricyathus*, 88 *Mrassocyathus*, 89 *Tumulocyathus*, 90 *Plicocyathus*, 91 *Sanarkocyathus*, 92 *Vologdinocyathus*, 93 *Tumulifungia*, 94 *Gloriosocyathus*, 95 *Rossocyathella*, 96 *Russocyathus*, 97 *Ringifungia*, 98 *Ussuricyathus*, 99 *Annulocyathus*, 100 *Annulofungia*, 101 *Squamosocyathus*, 102 *Kijacyathus*, 103 *Sajanolynthus*, 104 *Inessocyathellus*, 105 *Churanocyathus*, 106 *Muchattocyathus*, 107 *Schumnyicyathus*, 108 *Ethmocoscincus*, 109 *Cryptoporocyathus*, 110 *Erugatocyathus*, 111 *Polycoscincus*, 112 *Sigmocoscincus*, 113 *Gagarinicyathus*, 114 *Yudjaicyathus*, 115 *Densocyathus*, 116 *Svetlanocyathus*, 117 *Orienticyathus*, 118 *Inessocyathus*, 119 *Cadniacyathus*, 120 *Mattajacyathus*, 121 *Anaptyctocyathus*, 122 *Kellericyathus*, 123 *Bractocyathus*, 124 *Arturocyathus*, 125 *Jacutocarinus*, 126 *Ethmocyathus*, 127 *Kiwicyathus*, 128 *Cyathocricus*, 129 *Pachycoscincus*, 130 *Frinalicyathus*, 131 *Rozanovicoscincus*, 132 *Stillicidocyathus*, 133 *Thalamocyathus*, 134 *Tubicoscincus*, 135 *Dailycyathus*, 136 *Sigmocyathus*, 137 *Didymocyathus*, 138 *Sekwicyathus*, 139 *Rasetticyathus*, 140 *Zonacoscincus*, 141 *Isiticyathus*, 142 *Lunulacyathus*, 143 *Olgaecyathus*, 144 *Retetumulus*, 145 *Jebileticoscincus*, 146 *Nalivkinicyathus*, 147 *Nalivkinicyathus*, 148 *Veronicacyathus*, 149 *Inacyathella*, 150 *Agyrekocyathus*, 151 *Syringocyathus*, 152 *Rectannulus*, 153 *Annulocyathella*, 154 *Kisasacyathus*, 155 *Porocyathellus*, 156 *Antonioscincus*, 157 *Orbicyathellus*, 158 *Ichnusocyathus*, 159 *Aporosocyathus*, 160 *Kolbicyathus*, 161 *Orbicoscincus*, 162 *Alconeracyathus*, 163 *Chakassicyathus*, 164 *Sanarkophyllum*, 165 *Flexanulus*, 166 *Irinaecyathus*, 167 *Sclerocyathus*, 168 *Stephenicyathus*, 169, 170 *Clathrithalamus*, 171, 172 *Mikhncocyathus*, 173 *Cordobicyathus*, 174 *Statanulocyathus*, 175 *Erismacoscincus*, 176 *Crassicoscincus*, 177 *Conannulofungia*, 178 *Dentatocoscincus*, 179, 180 *Torosocyathus*, 181 *Morenicyathus*, 182 *Subtilocyathus*, 183 *Baikalocyathus*, 184 *Tercyathellus*, 185 *Tylocyathus*, 186 *Dupliporocyathus*, 187 *Mawsonicoscincus*, 188 *Borocyathus*, 189 *Jangudacyathus*, 190 *Lanicyathus*, 191 *Wrighticyathus*, 192 *Xestecyathus*, 193 *Gnaltacyathus*, 194 *Angaricyathus*, 195 *Gumbicyathus*, 196 *Calyptocoscincus*, 197 *Clathricoscincus*, 198 *Cordilleracyathus*, 199 *Coscinoptycta*, 200 *Bipallicyathus*, 201 *Diplocyathellus*, 202 *Carpicyathus*, 203 *Favilynthus*, 204 *Geniculicyathus*, 205 *Halysicyathus*, 206 *Yukonocyathus*, 207 *Heckericyathus*, 208 *Iljinicyathus*, 209 *Ladaecyathus*, 210, 211 *Mackenzicyathus*, 212 *Tologoicyathus*, 213 *Mennericyathus*, 214 *Orbiasterocyathus*, 215 *Palmericyathus*, 216 *Prethmophyllum*, 217 *Hypocyathus*, 218 *Robustocyathellus*, 219 *Rudanulus*, 220 *Sajanocyathus*, 221 *Sylviacoscincus*, 222 *Vologdinocyathellus*, 223 *Trininaecyathus*, 224 *Mootwingecyathus*, 225 *Acanthopyrgus*, 226 *Aulocricus*, 227 *Parethmophyllum*.

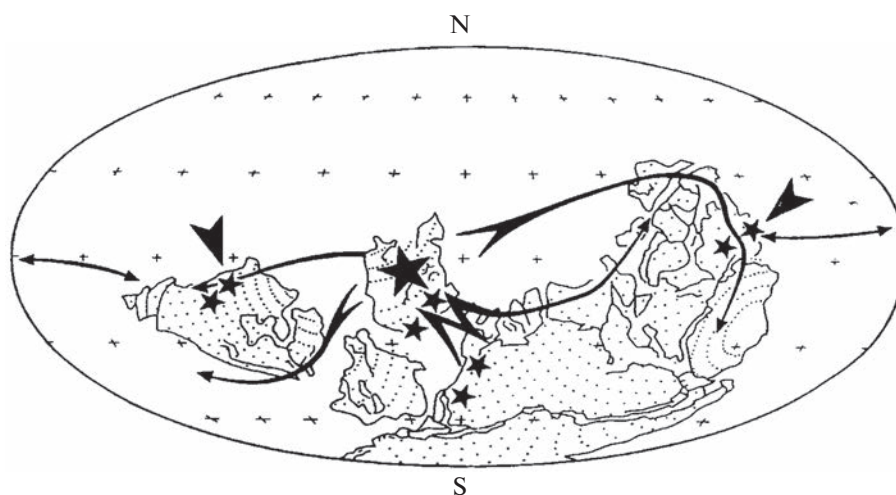


Рис. 4. Палеогеографическая карта раннего кембрия. В центре большая звезда — Сибирская платформа; маленькие звездочки обозначают вторичные центры диверсификации на разных континентах; две больших стрелки указывают на Австралию (справа) и Америку (слева) [10].

Кембрий, отдел, ярус				Место находок
Є ₁ t	Є ₁ a	Є ₁ b	Є ₁ tn	
				Мексика
	?			Калифорния
				Невада
				Западная Канада
			?	Аляска
				Корякия
				Гренландия
				Ньюфаундленд-Лабрадор
				Нью-Джерси-Вирджиния
				Марокко
				Испания
	?			Сардиния, Черные горы
				Нормандия
				Германия
				Иран, Кавказ
				Средняя Азия
				Казахстан
				Южный Урал
?				Кузнецкий Алатау
?				Западный Саян, Алтай, Тува
				Восточный Саян
				Юг Сибирской пл.
				Север Сибирский пл.
				Приколымье
				Запад Забайкалья
				Восток Забайкалья
				Монголия
				Сев. Хабаровского края
				Юг Хабаровского края
				Китай (Хинган)
				Китай (Тарим)
				Китай (Янцзы)
				Австралия (Сев. Территория)
				Южная Австралия
				Новый Южный Уэльс
				Антарктида

Рис. 5. Стратиграфическое положение комплексов археоциат в различных регионах мира (модифицировано по [9]).

закон автокомбинаторики биофильных элементов. С событием вспышки Сверхновой вероятно сопряжено “становление Периодического закона Д.И. Менделеева”, поскольку, похоже, в это время уже появляется необходимое многообразие элементов.

Через какое-то время после появления “мира РНК” вероятно возникает “мир ДНК”, и логично предположить, что образуется некая авторазвивающаяся субстанция, которую назовем ПРОГЕНОМ. В нее закладываются и авторазвиваются все генетические возможности органического мира. Я думаю, что К.Р. Уоз и его единомышленники в поисках единого предка не случайно пришли к мысли о коммунальном предке, что прин-

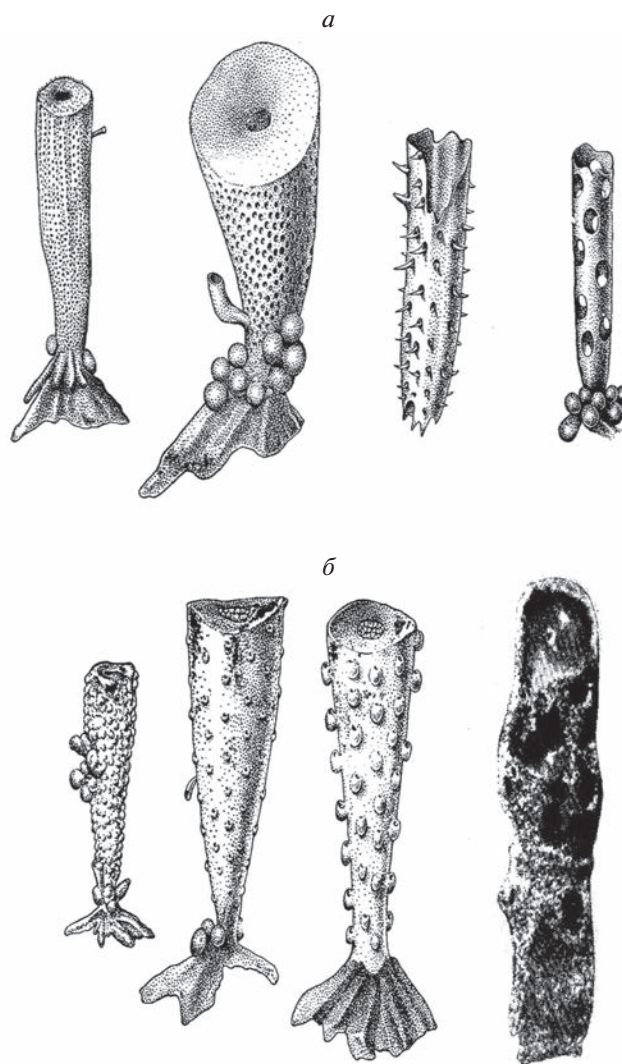


Рис. 6. Примеры простой пористости и тумулодно-стенных археоциат. а — род *Archaeolynthus*, слева изображены самые древние виды, а справа — самые молодые; б — род *Tumuliolynthus*, слева изображены самые древние виды, а справа — самые молодые [4].

ципально не отличается от предположительного образования прогена. Нужно отметить, что в сборнике “Проблема происхождения жизни” на эту тему опубликованы интереснейшие сообщения В.И. Агола [14], В.Н. Сныткова [15] и др.

Как видно, мы располагаем информацией, хотя и не очень подробной, о том, что происходило на Земле в интервале между 4 и 5.5 млрд лет назад (л.н.). 5.5 млрд л.н. — время образования Солнечной системы, 4.5 млрд л.н. — время образования Земли [16]. 4–4.5 млрд л.н. — это период от образования Земли до появления осадочных пород, что означает появление водных бассейнов и организмов в них, в том числе эвкариотной организации [17, 18]. В этот интервал времени поверхность Земли не была покрыта сплошным океаном. Тем-

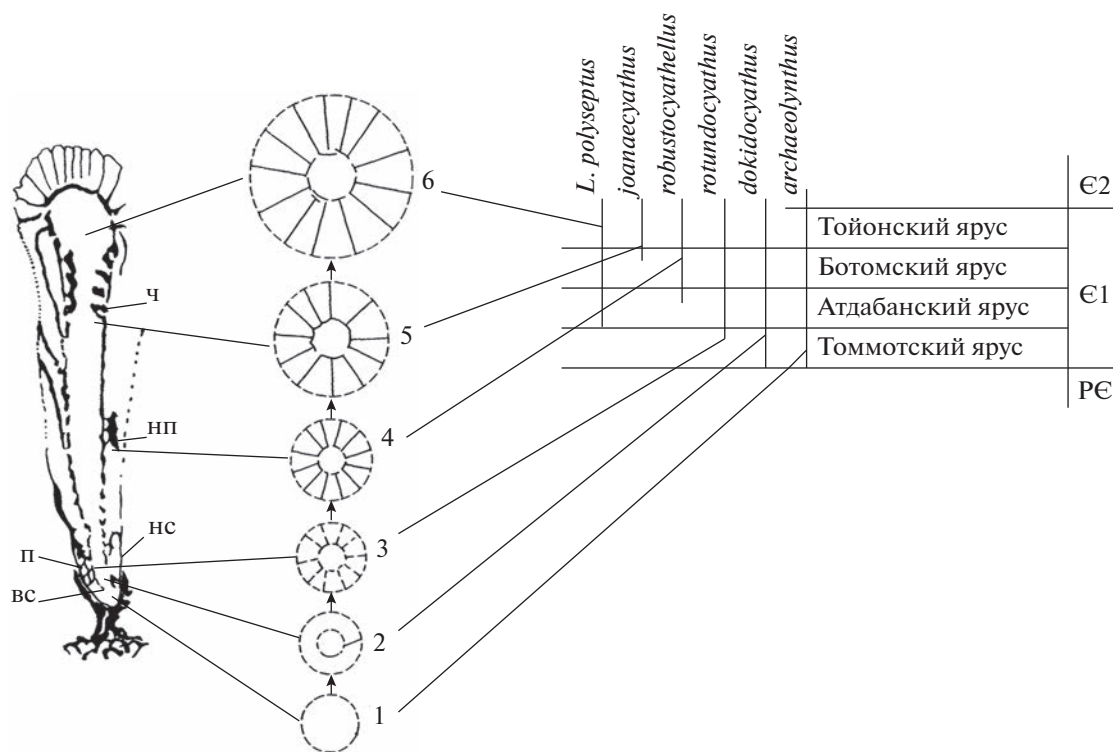


Рис. 7. Гетерохронии у вида *Leptosocyathus polyseptus*. Слева изображен продольный срез в шлифе, в центре — схема поперечных срезов, справа — положение в геологической летописи в нижнем кембрии [10].

пература поверхности от момента образования планеты была достаточно высокой, поэтому представить себе ситуацию, что на ней могла появиться жизнь, довольно трудно. Однако нельзя исключить, что в это время на Землю прилетали ледяные кометы с организмами прокариотной или даже протистовой организации. Ледяные кометы таяли, образуя небольшие эфемерные бассейны, в которых эти организмы могли некоторое время существовать, рис. 11.

Появление осадочных пород в районе четырех млрд л.н. вероятнее всего связано с последней мощной метеоритной бомбардировкой. Продолжительность этой бомбардировки и массу прилетевших ледяных тел нужно будет пытаться каким-то образом вычислить. Количество зеленокаменных поясов первой половины архея говорит о том, что воды на поверхности Земли становится достаточно много, но еще недостаточно для образования Мирового океана. По представлениям М.А. Жаркова [19] реальный объем воды, сопоставимый с современным, достигается только около 1.3 млрд л.н.

Теперь необходимо вкратце остановиться на изменениях системы наших представлений о развитии органического мира на Земле, особенно в докембрии. Крупные изменения на границе мела и палеогена, перми и триаса, в начале кембрия, с которыми связано массовое появление скелетной

фауны, появление вендской фауны в верхах докембрия сейчас уже хорошо известны. Однако внимательный анализ уже опубликованных данных и новые материалы последних десятилетий показывают, что: целоматы (Coelomata) уже существовали 1.6 млрд л.н., многоклеточные существа (Metazoa) заведомо существовали уже 2 млрд л.н., а в самых древних осадочных породах уже присутствуют эукариоты (приблизительно 3.8 млрд л.н.). Особенно хочу подчеркнуть, что попытки организации скелета у организмов происходили, вероятно, уже давно. Так, например, *Udocania* и подобные им формы, которые являются вероятными предками кишечнотелостных и губок, обнаружены в породах возраста 2 млрд лет [20]. Еще более странная картина вырисовывается при изучении ископаемых остатков организмов в метеоритах. Например обнаружение в метеорите Оргей панцирных амёб (Атлас Оргей) заставляет задуматься сразу о двух проблемах. Во-первых, о том, что в метеоритах, которые старше по возрасту, чем Земля, присутствуют эукариоты, во-вторых, присутствуют скелетные формы. Хотя не очевидно, что скелет у протистов и скелетных организмов Metazoa — это одно и то же. Из астробиологических данных необходимо добавить, что в углистых хондритах на сегодняшний день обнаружен целый спектр организмов, как прокариот, так и эукариот; рис. 12.

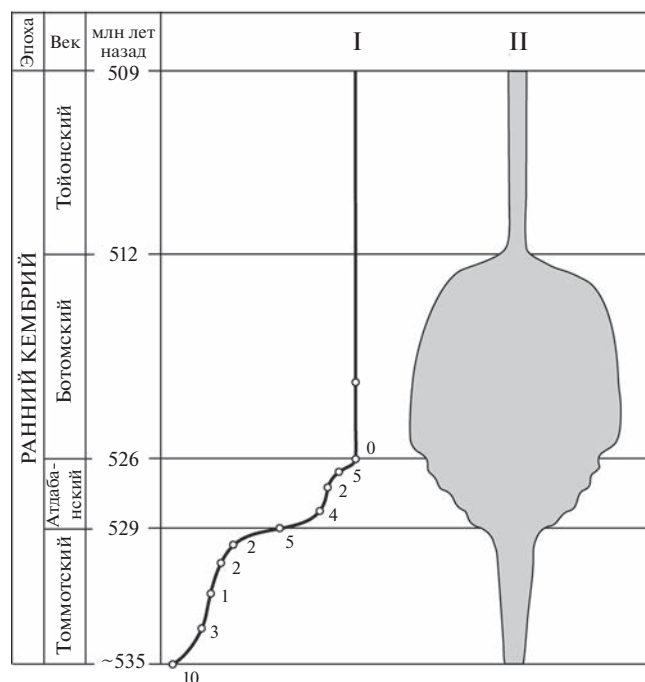


Рис. 8. Схема соотношения появления числа новых морфологических признаков (I) и числа новых таксонов (II) у правильных археоциат [10].

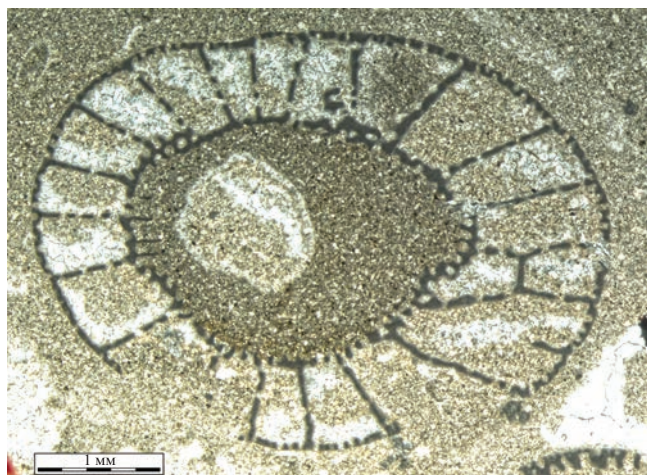


Рис. 9. Синоптикулы у археоциата *Nochoroicyatys sunnaginicus*. На фото справа видна поперечная балочка между перегородками.

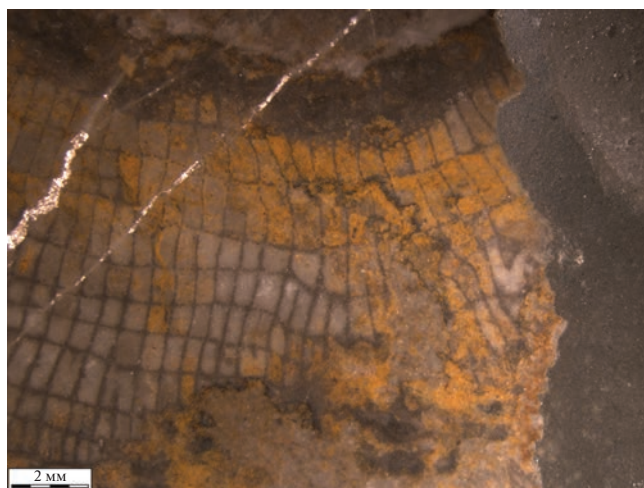


Рис. 10. *Coscynocyatys diantus* — залечивание повреждения с помощью бугорчатых тумул.

ВЫВОДЫ

На примере археоциат мы видим документально установленные явления, которые хорошо согласуются с Законом гомологических рядов Н.И. Вавилова.

Во-первых это — соотношение появления новых признаков и новых родов в нижнем кембрии. Во-вторых это — представление о потенциальной возможности возникновения у некоторых родов

морфологических признаков (синоптики и залечивание повреждений при помощи бугорчатых тумул) за миллионы лет до того, как эти признаки становятся принадлежностью всех родов. Таким образом, подводя итог сказанному выше, можно предположить, что Закон гомологических рядов Н.И. Вавилова в том виде, как он обычно трактуется, — это финальная часть всеобщего закона автокомбинаторики. По-видимому все высказывания об определенной предопределенности разви-

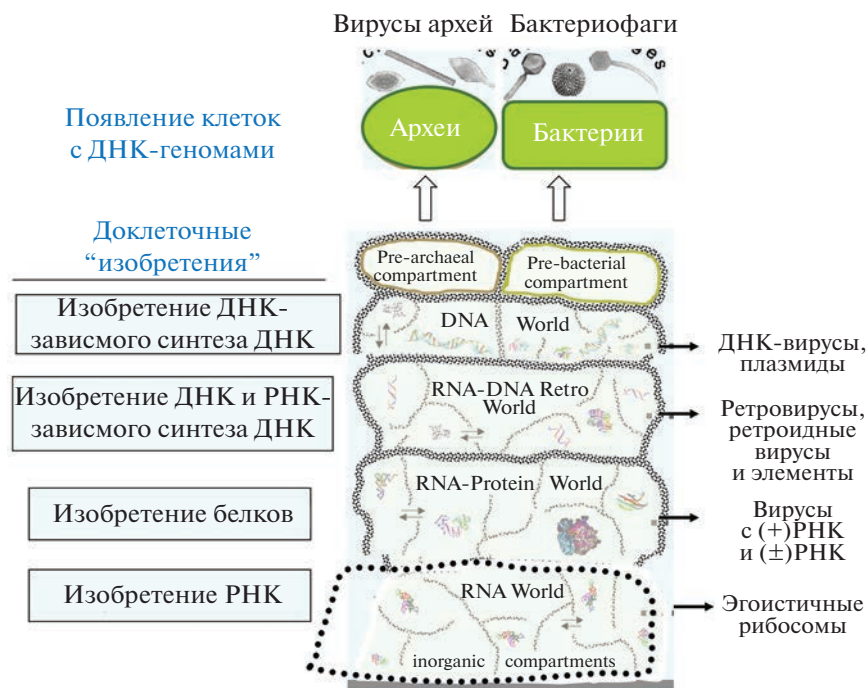


Рис. 11. Модель перехода от доклеточного мира РНК к археям и бактериям по [16].

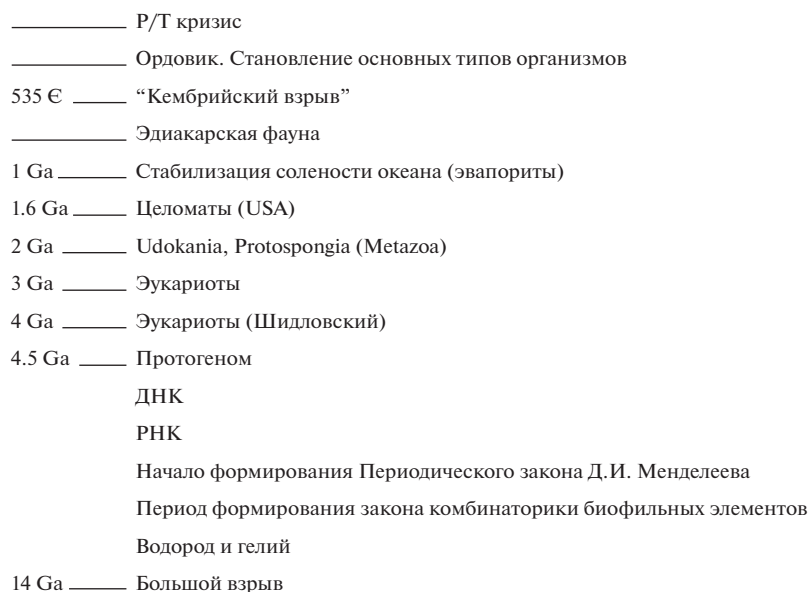


Рис. 12. Этапы развития органического мира на Земле [20].

тия, как например концепция номогенеза Л.С. Берга, имеют серьезную подоплеку.

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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Вавилов Н.И.* Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости. Ленинград: Наука, 1987. 260 с.
2. *Берг Л.С.* Номогенез, или эволюция на основе закономерностей. Петербург: Госиздат, 1922. 321 с.
3. *Вавилов Н.И.* Закономерности в развитии живого мира // К вопросу о закономерностях в мор-

- фологии растений. Саратов: ГСНХ, 1920. С. 3–15.
4. Розанов А.Ю. Закономерности морфологической эволюции археоциат и вопросы ярусного расчленения нижнего кембрия // Тр. ГИН АН СССР. 1973. Вып. № 241. 153 с.
 5. Журавлева И.Т. Археоциаты Сибирской платформы. М.: Изд-во АН СССР, 1960. 346 с.
 6. Розанов А.Ю., Мисаржевский В.В. Биостратиграфия и фауна нижних горизонтов кембрия // Тр. ГИН АН СССР. 1966. Вып. № 148. С. 127–135.
 7. Липина О.А., Розанов А.Ю. О гомологической изменчивости фораминифер и археоциат // Биостратиграфия и палеонтология нижнего кембрия Сибири и Дальнего Востока. М.: Наука, 1973. № 3. С. 164–171.
 8. Дебрин Ф., Журавлев А.Ю., Розанов А.Ю. Правильные археоциаты // Тр. ПИН РАН. Т. 233. М.: Наука, 1989. С. 198–210.
 9. Debren F., Rozanov A., Zhuravlev A. Regular Archaeocyaths: Morphology, Ontogeny, Systematics, Biostratigraphy, Paleogeology. Paris: CNRS Editions, 1989. 218 p.
 10. Розанов А.Ю. Скорлотова Н.А. Правильные археоциаты. М.: ПИН РАН. 2013. 190 с.
 11. Спиринов А.С. Когда, где и в каких условиях мог возникнуть и эволюционировать мир РНК? // Палеонтол. журн. 2007. № 5. С. 11–19.
 12. Спиринов А.С. Древний мир РНК // Пробл. происхождения жизни. М.: ПИН РАН, 2009. С. 43–59.
 13. Четверин А.Б. Можно ли собрать клетку из ее компонентов? // Пробл. происхождения жизни. М.: ПИН РАН, 2009. С. 9–30.
 14. Агол В.И. Вирус — до или после клетки? // Пробл. происхождения жизни. М.: Наука, 2009. С. 31–42.
 15. Снытников В.Н. Астрокатализ — абиогенный синтез и химическая эволюция на догеологических этапах формирования Земли // Пробл. происхождения жизни. М.: Наука, 2009. С. 79–101.
 16. Koonin E.V., Martin W. On the origin of genomes and cells within inorganic compartments // Trends Genet. 2005. V. 21. P. 647–654. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2005.09.006>
 17. Schidlowski M. Carbon isotopes as biogeochemical records of life over 3.8 Ga of Earth history: Evolution of concept // Precamb. Res. 2001. V. 106. P. 117–134. [https://doi.org/10.1016/S0301-9268\(00\)00128-5](https://doi.org/10.1016/S0301-9268(00)00128-5)
 18. Westall F., Walsh M.M. Early Archean fossil bacteria // Bacterial Paleontology. Moscow: PIN RAS, 2002. P. 84–90.
 19. Жарков М.А. Эволюция эвапоритов в докембрии в связи с преобразованиями биосферы и химического состава мирового океана. I. Эвапориты архея и раннего протерозоя // Стратиграфия. Геологическая корреляция. 2005. Т. 13. № 2. С. 19–29.
 20. Розанов А.Ю., Хувер Р.Б., Красавин Е.А. и др. Метеорит Оргей (Атлас микрофоссилий). М.: ПИН РАН, 2020. 132 с.

The Law of Homological Series of N.I. Vavilov and Its Possible Fate

A. Yu. Rozanov*

Borisysak Paleontological Institute of Russian Academy of Sciences, Moscow, 117647 Russia

**e-mail: aroza@paleo.ru*

On the world material on one of the most ancient groups of invertebrates — archeocyats, the applicability of the law of homologous series of N.I. Vavilov to construct a system of this group. It is proved that the laws of evolutionary morphology are special cases of the law of homological series. An analysis of the features of the development of our galaxy before the formation of the Earth raises the question that the law of homological series is the final part of a more general law of autocombinatorics.

Keywords: law of homological series, archaeocyates, homological variability, paleogeography, origin of life, RNA world, law of autocombinatorics.

ОБЗОРНЫЕ
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 576.316.32:599.323.4+582.475.2

ИЗМЕНЧИВОСТЬ В-ХРОМОСОМ У РАСТЕНИЙ И ЖИВОТНЫХ В ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ ОБИТАНИЯ

© 2023 г. Ю. М. Борисов¹, *, Т. С. Седельникова², **

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

²Институт леса им. В.Н. Сукачева — обособленное подразделение Федерального исследовательского центра
“Красноярский научный центр” Сибирского отделения Российской академии наук, Красноярск, 660036 Россия

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

**e-mail: tss@ksc.krasn.ru

Поступила в редакцию 20.02.2023 г.

После доработки 28.03.2023 г.

Принята к публикации 29.03.2023 г.

Приведен обзор данных о В-хромосомах в популяциях различных систематических групп растений и животных из экстремальных мест их обитания — границ ареала и его участков, подвергающихся воздействию неблагоприятных факторов среды. Анализ показал достаточно сходную картину распределения В-хромосом в экстремальных условиях обитания видов: прослеживается тенденция повышения полиморфизма и увеличения числа и встречаемости В-хромосом, что сопровождается изменениями кариотипа, геномными и хромосомными нарушениями у их носителей. В-хромосомы часто выявляются у видов, имеющих широкие ареалы. Обсуждается возможная адаптивная роль В-хромосом в жизнедеятельности организма и эволюции геномов.

Ключевые слова: В-хромосомы, популяции растений и животных, экстремальные условия обитания, антропогенные факторы, адаптация.

DOI: 10.31857/S0016675823080040, **EDN:** XSQVRV

Адаптация живых организмов к меняющимся условиям окружающей среды является одной из наиболее важных проблем в современном мире. Как процессы адаптации связаны с изменчивостью генома эукариот известно еще недостаточно. Поэтому актуальность таких исследований несомненна. Существует предположение, что адаптивный потенциал организмов могут повышать добавочные хромосомы. Добавочные (дополнительные, сверхчисленные), или В-хромосомы известны более 100 лет. Они являются необязательными сверхкомплектными элементами генома эукариот, которые не рекомбинируют с А-хромосомами, имеют неменделевский характер наследования и идут собственным эволюционным путем. В отличие от А-хромосом, содержащих наряду с некодирующими повторами функциональные гены, В-хромосомы практически целиком состоят из повторенных последовательностей ДНК [1]. В-хромосомы найдены более чем у 1800 видов растений и животных [2–4], с каждым годом это число растет. Вопросы о происхождении В-хромосом (из аутосом, половых хромосом или вследствие межвидовой гибридизации) и их биологическом значении (“паразитическая”, инертная

или же адаптивная роль) остаются дискуссионными [5, 6].

Проведенные исследования В-хромосом в различных систематических группах организмов показали, что их наличие сказывается на работе А-генома [2–5, 7–11]. С вариабельностью В-хромосом связаны процессы, в результате реализации которых может изменяться частота хиазм в А-хромосомах, модифицируя тем самым уровень рекомбинационной изменчивости, обычно рассматриваемой как эволюционный резерв [12]. Благодаря этим эффектам В-хромосомы служат источником генетических новшеств и тем самым позволяют организму справляться с новыми условиями среды, не изменяя своего основного набора. Вариабельность числа и морфологии добавочных В-хромосом у ряда видов, по-видимому, является очень значимой, поскольку способствует выживанию популяций в необычных и экстремальных для них условиях [5, 13, 14]. У растений и животных В-хромосомы могут выявляться в разных частях ареала вида, но наиболее часто — на его границах, а также на участках с неблагоприятными и даже экстремальными условиями обитания. Литературные данные об изменчивости В-хромосом у организмов, вынужденных адаптироваться к воз-

действиям экстремальных факторов среды, разрозненны. Обобщение сведений, содержащихся в таких работах, отсутствует. Цель настоящей работы заключается в обзоре статей о В-хромосомах у видов, населяющих местообитания с высоким уровнем естественной и антропогенной экстремальности.

ПОКРЫТОСЕМЕННЫЕ РАСТЕНИЯ (Angiospermae)

По последним данным, примерно 23652 видов покрытосеменных (из них около 8% однодольных и 3% двудольных) растений имеют В-хромосомы. На самом деле это число может быть больше [6]. В природных популяциях цветковых растений встречаемость экземпляров с В-хромосомами в целом невысокая, но она возрастает в экстремальных или стрессовых условиях произрастания. Виды и формы растений, имеющие добавочные хромосомы, более устойчивы, например, к засухе и низким температурам. Такие данные получены при исследовании популяций видов жимолости (*Lonicera* L.). Жимолость съедобная (*Lonicera edulis* Turcz. et Freyn.) и жимолость алтайская (*Lonicera altaica* Pall.) из Тувы и Читинской области — регионов Забайкалья с низким количеством осадков — несут 2–4 В-хромосомы. *L. altaica* является горным и даже высокогорным растением, приспособленным переносить суровые морозы и сильную засуху. Жимолость Палласа (*Lonicera pallasii* Ledeb.) — обитатель субарктических областей, несет две В-хромосомы в условиях Бурятии. У жимолости узкоцветковой (*Lonicera stenantha* Pojark.) из Джунгарского Алатау (Казахстан) обнаружено три В-хромосомы. *L. stenantha* растет в высокогорьях Средней Азии и выносит резкие колебания температуры. В то же время жимолость съедобная из более мягкого климата Дальнего Востока и жимолость камчатская (*Lonicera kamtschatica* Pojark.), зимующая под обильным снежным покровом, В-хромосом не имеют [15]. В популяциях скерды сибирской (*Crepis sibirica* L.) из Западной Сибири, растущих в неблагоприятных условиях, наблюдается хромосомный полиморфизм, обусловленный системой В-хромосом и анеуплоидией. Система В-хромосом *C. sibirica* включает пять их типов — субметацентрические, метацентрические, субметацентрические со спутником, точечные и субакроцентрические [16].

Очевидно неслучайно, что среди растений, у которых чаще встречаются В-хромосомы и их количество может достигать больших значений (до 34 на клетку), много культурных злаков и других видов с широкими ареалами, охватывающими различные экологические условия [5]. Например, лук-резун (*Allium schoenoprasum* L.), распространенный даже в Арктике вплоть до 75° с. ш. (Новая Земля), может нести в этих условиях до 20 В-хромо-

сом в одной клетке. Установленная для *A. schoenoprasum* высокая экологическая пластичность сопровождается увеличением числа В-хромосом и их встречаемости [13]. Еще одним примером может служить космополитный вид луговик дернистый, или щучка (*Deschampsia cespitosa* (L.) Beauv.), ареал которого охватывает Европу, Азию, Африку, Северную и Южную Америку, Австралию. *D. cespitosa* произрастает повсеместно в лесной и лесостепной зонах, в горных районах, отчасти в зоне тундр. При исследовании луговика дернистого в популяциях Северного Онтарио (Канада) было выявлено, что растения содержат В-хромосомы и отличаются высоким уровнем анеуплоидии [17].

У другого вида луговика — щучки антарктической (*Deschampsia antarctica* Desv.), встречающегося в Антарктиде, одна–две мелкие В-хромосомы обнаружены в кариотипах растений с самого южного о-ва Дарбу (соответственно подвергающихся наиболее экстремальным воздействиям среды) и с мыса Расмуссен, расположенного на западном антарктическом побережье. Помимо типичных диплоидных экземпляров *D. antarctica*, среди образцов с о-ва Грейт-Ялур обнаружено миксоплоидное растение, в основном с триплоидными клетками, несущими Робертсоновскую перестройку между гомологичными хромосомами. У *D. antarctica* в антарктических регионах найдены полиплоидные и миксоплоидные популяции, в которых наблюдался практически весь спектр изменчивости кариотипа, характерный для рода *Deschampsia* [18–22].

Было установлено, что среди 862 видов кариологически исследованных древесных растений Гималаев — высочайшей горной системы Земли — около 3.9% имели В-хромосомы, что оказалось почти в 2 раза выше общего процента (1.9%) видов цветковых растений с В-хромосомами, известного на тот момент [23].

ГОЛОСЕМЕННЫЕ РАСТЕНИЯ (Gymnospermae)

У голосеменных растений, имеющих крупные геномы, В-хромосомы встречаются у 31 из 633 видов, что составляет около 5% от их общего числа. Как правило, В-хромосомы голосеменных хорошо отличаются от хромосом основного кариотипа меньшей величиной, составляющей около 30% длины А-хромосом. Дополнительные хромосомы наиболее широко распространены среди представителей рода ель (*Picea* A. Dietr.) семейства сосновые (Pinaceae Spreng. ex F. Rudolphi). К настоящему времени В-хромосомы выявлены в популяциях 23 видов и внутривидовых таксонов рода *Picea* из различных местообитаний [8, 10]. Накапливаются данные о том, что увеличение концентрации и числа В-хромосом в популяциях ели связано с усилением экстремальности условий произраста-

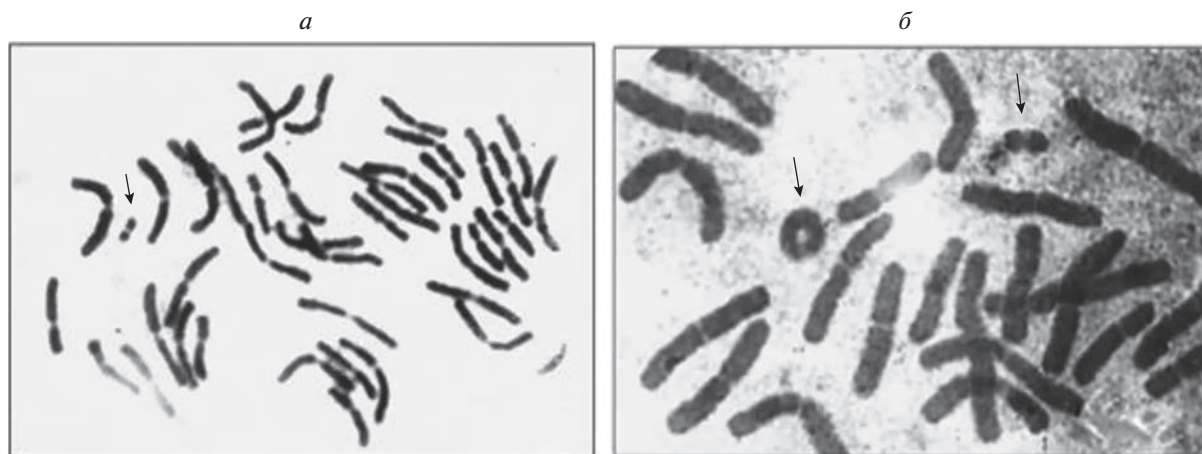


Рис. 1. Метафазные пластинки хромосом ели сибирской с В-хромосомами и хромосомной перестройкой (указаны стрелками) на евтрофном болоте (окрестности пос. 86-й квартал, Томский район, Томская область). *а* — клетка с тетраплоидным набором хромосом и одной В-хромосомой ($2n = 48 + 1V$); *б* — клетка с диплоидным набором хромосом, одной кольцевой хромосомой (К) и одной В-хромосомой ($2n = 23 + 1K + 1V$).

ния деревьев. Так, северная граница распространения В-хромосом у ели ситхинской (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.) в Северной Америке совпадает с границей залегания вечной мерзлоты, а наибольшая их встречаемость отмечена для засушливых территорий с высокой инсоляцией [24]. Для ели сизой (*Picea glauca* (Moench) Voss) из регионов Северной Америки выявлена закономерность снижения встречаемости В-хромосом в направлении с востока на запад, что связано с распределением осадков [25].

Максимальная встречаемость и наибольшее число В-хромосом наблюдались в популяциях ели сибирской (*Picea obovata* (Ledeb.)) из восточной части ареала, особенно из регионов с резко континентальным климатом — Центральной и Восточной Сибири [26–28]. Отмечено появление В-хромосом в популяциях ели Шренка (*Picea schrenkiana* Fisch. et C.A. Mey.), произрастающих в горах Северного Тянь-Шаня [29]. В-хромосомы были выявлены в насаждениях *P. glauca* и *P. obovata*, испытывающих влияние антропогенных выбросов (транспортных, промышленных) в городах Воронеж, Черногорск, Ачинск, Красноярск [30, 31]. Как правило, в кариотипах популяций ели из экстремальных условий произрастания появление В-хромосом сопровождается наличием геномных и хромосомных нарушений.

В популяциях *P. obovata* В-хромосомы обнаружены в семенном потомстве деревьев, произрастающих в Западной Сибири (Томская область, Томский район, окрестности пос. 86-й квартал) [32]. В проростках семян *P. obovata*, растущей на болоте в условиях экологического стресса, содержались одна–две добавочные хромосомы метацентрического (V_1) и субметацентрического (V_2) типов, их встречаемость составляла 6.8%. Про-

ростки семян *P. obovata*, растущей на смежном с болотом суходоле в нормальных условиях, содержали только по одной добавочной хромосоме V_1 -типа, их встречаемость была в 2 раза ниже (3.2%). Число проростков с миксоплоидией и анеуплоидией, хромосомными нарушениями (кольцевыми и полицентрическими хромосомами, фрагментами, мостами) в суходольной популяции *P. obovata* также было в 2 раза ниже (8.0%) по сравнению с болотной (15.5%). В болотной популяции ели отмечены уникальные случаи наличия В-хромосом в полиплоидных клетках и клетках с хромосомными перестройками (рис. 1).

В-хромосомы у ели обыкновенной, или европейской (*Picea abies* (L.) Н. Karst.) обнаружены впервые для вида в горном массиве Западные Родопы (Болгария, Благоевградский район), на южной границе ареала [33, 34]. Были изучены горные популяции *P. abies*, расположенные на территории Гарменского и Елешницкого государственных лесничеств в окрестностях с. Ковачевица (высота 1400 м над ур. м.) и с. Златарица (высота 1550 м над ур. м.). Район произрастания популяций *P. abies* подвержен значительному воздействию уранодобывающей промышленности и находится в зоне повышенной радиоактивности. В корневых меристемах проростков семян популяций *P. abies* из Западных Родоп содержались одна–четыре добавочные хромосомы как V_1 -, так и V_2 -типа. Наиболее часто встречались клетки с одной В-хромосомой, с наименьшей частотой — клетки с четырьмя В-хромосомами. Число В-хромосом могло варьировать в одном и том же проростке. В отдельных проростках, содержащих В-хромосомы, одновременно наблюдалась миксоплоидия. Встречаемость проростков с В-хромосомами в популяциях *P. abies* из Западных Родоп достигала 67.0%, проростков с

миксоплоидией и хромосомными перестройками — 30.0%.

Обзор данных по В-хромосомам у видов *Picea* показал, что наибольшее их число было найдено у ели сизой — до шести, ели Глена (*Picea glehnii* (Fr. Schmidt) Mast.) и ели ситхинской — до пяти [8]. Однако наличие большого числа В-хромосом, по всей вероятности, неблагоприятно для видов ели. Так, деревья *P. obovata*, содержащие три–четыре В-хромосомы, отличались низкой фертильностью пыльцы [26]. У деревьев *P. sitchensis* по мере возрастания числа В-хромосом наблюдалось прогрессирующее замедление развития женской репродуктивной сферы [35]. В то же время семена *P. abies*, *P. glauca* и *P. obovata*, несущие небольшое число (одна–две) В-хромосом, прорастали на несколько дней быстрее, чем семена без них [25, 28, 33].

Кроме видов рода ель, В-хромосомы встречаются и у других представителей семейства сосновые из родов сосна (*Pinus* L.) и лиственница (*Larix* Mill.), но лишь в неблагоприятных условиях произрастания. В роде *Pinus* В-хромосомы впервые описаны в популяции сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в Челябинской области (Чебаркульский район) на территории так называемого “Уральского ядерного следа”. У одного из деревьев в одном из 13 исследованных проростков семян в кариотипе присутствовала В-хромосома, отнесенная к типу метацентрических, а также кольцевая хромосома [36]. В эксперименте по воздействию на семена *P. sylvestris* супермутагенов у полученных мутантных растений типа “ведьмины метла” в 1.2% клеток были обнаружены В-хромосомы и различные нарушения митоза [37]. В роде *Larix* В-хромосомы впервые были открыты у лиственницы Гмелина (*Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr.) в популяции из суровых климатических условий Восточной Сибири (Читинская область). По морфологии В-хромосомы в читинской популяции *L. gmelinii* были мета- или слабо субметацентрическими, их встречаемость в проростках семян составляла 6.7% [38]. Позже В-хромосомы были обнаружены у лиственницы Сукачева (*Larix sukaczewii* Dylis) в двух популяциях Среднего и Северного Урала, их встречаемость не превышала 1% [39].

У лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) В-хромосомы выявлены впервые в популяциях данного вида на п-ове Таймыр [40, 41]. Лиственница сибирская, распространенная на Таймыре на северной границе ареала, относится к субарктической расе, включающей популяции лесотундры и северо-таежной подзоны Крайнего Севера. Исследованные популяции *L. sibirica* произрастают на вечной мерзлоте в окрестностях г. Норильска, на участках в микрорайонах Кайеркан и Оганер. Эти участки располагаются в зоне

влияния промышленных выбросов предприятий Заполярного филиала компании “Норильский никель”. По данным из открытых источников, ежегодные выбросы предприятий “Норильского никеля” составляют около 1.8 млн т загрязняющих веществ, большая часть из которых приходится на диоксид серы. В-хромосомы были найдены в 1.6% проростков семян приблизительно в половине клеток, доступных для анализа. Клетки корневых меристем содержали по одной хромосоме В₂-типа. Кроме наличия В-хромосом, в проростках были выявлены миксоплоидия и анеуплоидия, а также хромосомные перестройки — кольцевые хромосомы, фрагменты, дицентрические хромосомы и др. Геномные и хромосомные нарушения обнаружены в общей сложности в 37.1% проростков. Возникновение В-хромосом в таймырской популяции *L. sibirica* наряду с высоким уровнем мутирования хромосом основного набора может быть связано с исключительным по своей экстремальности влиянием эколого-климатических и антропогенных факторов.

В-хромосомы найдены в популяциях лиственницы сибирской, произрастающих в Республике Хакасия на территории Ширинского района, в окрестностях пос. Соленоозерное и пос. Туим [42, 43]. Насаждение *L. sibirica* в пос. Соленоозерное создано в условиях типичной степи с засушливыми и солончаковыми участками. Туимская популяция *L. sibirica* локализована на остепненных отрогах Кузнецкого Алатау (высота около 600 м над ур. м.), в непосредственной близости от пос. Туим, где располагалось ныне закрытое подземное месторождение по отработке вольфрамовых и медно-молибденовых руд, технология извлечения которых сопряжена с выносом с отвалов шахтными и карьерными водами ряда опасных для окружающей среды химических элементов. Добавочные хромосомы типа В₁ были найдены в 25.0 и 21.4% проростков семян соответственно соленоозерновской и туимской популяций *L. sibirica*. У растений присутствовала только одна В-хромосома, встречавшаяся не во всех клетках. Кроме В-хромосом, в 50% проростков соленоозерновского насаждения была обнаружена миксоплоидия. Ранее в семенном потомстве популяций *L. sibirica*, произрастающих в окрестностях пос. Туим, также были выявлены хромосомы В₁-типа, миксоплоидия и хромосомные перестройки [44]. Появление В-хромосом и хромосомных нарушений в популяциях *L. sibirica* из Хакасии может быть связано со стрессовыми для произрастания деревьев условиями, в том числе с влиянием техногенных факторов.

МЛЕКОПИТАЮЩИЕ (Mammalia)

У млекопитающих, имеющих гораздо меньшие по сравнению с растениями геномы, доля видов с В-хромосомами существенно ниже (у при-

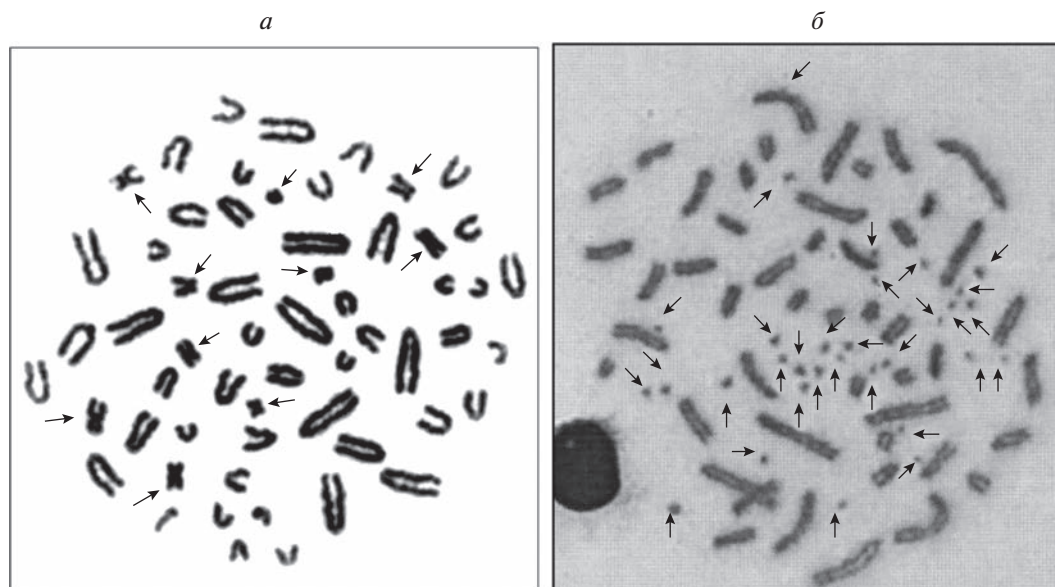


Рис. 2. Метафазные пластинки хромосом восточноазиатской мыши с В-хромосомами (указаны стрелками) из северной части ареала. *а* — клетка с диплоидным набором хромосом и восьмью В-хромосомами ($2n = 48 + 8B$) (окрестности пос. Новоангарск, Мотыгинский р-н, Красноярский край, левый берег р. Ангара); *б* — клетка с диплоидным набором хромосом и 30 В-хромосомами ($2n = 48 + 30B$) (окрестности с. Берг Таскино, Сухобузимский р-н, Красноярский край, левый берег р. Енисей).

матов, в том числе у человека, В-хромосомы не найдены). Из 4629 видов ныне живущих млекопитающих [45] добавочные хромосомы были обнаружены в кариотипах 85, или 1.8% видов, причем 42 из них составляют грызуны [11]. Существует мнение, что быстрые темпы кариотипической эволюции у грызунов сопровождаются появлением В-хромосом. Среди млекопитающих у десяти видов число дополнительных хромосом достигает десяти [46]. Максимальные числа В-хромосом (до 38, это убывающий ряд мелких акроцентрических В-хромосом) обнаружены в популяциях копытных леммингов (*Dicrostonyx torquatus* Pallas, 1778) материковых тундр Палеарктики, а именно у животных, пойманных на крайнем северо-востоке Чукотского п-ова [47]. Однако у экземпляров *D. torquatus* — носителей значительного количества В-хромосом — наблюдалось снижение размеров тела и черепа, что с высокой долей вероятности может иметь отрицательное селективное значение в условиях Крайнего Севера [48]. Эти данные указывают на противоречивость результатов и сложность изучения эффектов В-хромосом. Вероятно, устойчивость системы В-хромосом является результатом взаимовлияния процессов накопления В-хромосом и вредного воздействия большого числа В-хромосом в геноме на адаптивность их носителей в случае, когда число В-хромосом становится выше критического для популяции.

Млекопитающие с большим числом В-хромосом и их значительной популяционной вариабельностью часто имеют обширный ареал, охватывающий

широкий диапазон экологических условий. Одним из примеров является восточноазиатская мышь (*Apodemus (Alsomys) peninsulae* Thomas, 1906) с ее огромным ареалом в восточной части Палеарктики. У особей *A. peninsulae*, отловленных на краю северной части ареала вида в бассейне среднего течения р. Енисей, впервые выявлено множество микро-В-хромосом (от 4 до 30). Мыши, отловленные в окрестностях пос. Новоангарск, на левом берегу Ангара в 38 км от ее устья (Мотыгинский р-н Красноярского края), имели до восьми микро-В-хромосом. Новоангарск является базовым населенным пунктом компаний ОАО «Горевский ГОК» и ООО «Новоангарский ГОК», которые занимаются добычей и обработкой залегающих в этом районе свинцово-цинковых руд. У мышей, отловленных на левом берегу р. Енисей севернее с. Берг Таскино, ниже по течению от Железнодорожного горно-химического комбината (Сухобузимский р-н Красноярского края), выявлено до 30 микро-В-хромосом (рис. 2). Возможно, столь уникальная для вида популяция с микро-В-хромосомами появилась вследствие влияния радиационного загрязнения поймы Енисея сбросами горно-химического комбината и других видов техногенных загрязнений на обитающих здесь животных [49].

Произошедший взрывной (двух-, трехкратный) рост численности В-хромосом в 1980–2002 гг. и последующую его стабилизацию в 2002–2008 гг. в популяции восточноазиатской мыши, обитающей на территории Горного Алтая в окрестностях

пос. Артыбаш на северном берегу Телецкого озера, можно отнести к значимому микроэволюционному событию для данного вида, по-видимому имеющему адаптивное значение. Кроме макро-В-хромосом, в данной популяции мышей появились микро-В-хромосомы, возникшие в результате мутации в прицентромерных гетерохроматических участках А-хромосом. Причины, вызывающие мутации хромосом в популяции мышей Горного Алтая, могут предположительно быть связаны с тем, что район Телецкого озера находится в зоне падения ступеней ракет с остатками компонентов ракетного топлива, в частности опасного для окружающей среды вещества — гептила [50].

В целом популяции *A. peninsulae* Сибири, Алтая, Прибайкалья, Монголии отличаются самым большим разнообразием и численностью В-хромосом. При этом каждая популяция имеет свой вариант популяционной системы В-хромосом (рис. 2). Помимо вариантов только с микро- или только с макро-В-хромосомами, в популяциях мышей Сибири встречаются комбинации с 1–10 макро- и 1–12 микро-В-хромосомами в различных сочетаниях. У сибирских мышей найдено множество уникальных вариантов системы В-хромосом, сочетающих в кариотипе пять их морфотипов — микро-, мелких акроцентрических и трех морфотипов двуплечих В-хромосом [51].

РАКООБРАЗНЫЕ (Crustacea)

Дополнительные хромосомы регулярно выявляются в метафазных клетках эмбрионов байкальской амфиподы (*Polyacanthisca calceolata* Vazikalova, 1937 (Crustacea, Amphipoda)) — эндемичного вида раков-бокоплавов, обитающего в литоральной зоне оз. Байкал на глубине около 1300–1400 м. Наличие В-хромосом у байкальской амфиподы рассматривается как адаптивный механизм, позволяющий этому виду совершать миграции в районы просачивания углеводородных газогидратов на дно озера [52].

РЫБЫ (Pisces)

В реках крайнего северо-востока Евразии — Анадырь и Пенжина — в кариотипе популяций чира (*Coregonus nasus* (Pallas, 1776)) найдено варьирующее число мелких, как правило, гетерохроматиновых В-хромосом. Климат бассейна этих рек характеризуется продолжительной суровой снежной зимой и коротким холодным летом. [https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D0%BD%D0%B0%D0%B4%D1%8B%D1%80%D1%8C_\(%D1%80%D0%B5%D0%BA%D0%B0\)](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D0%BD%D0%B0%D0%B4%D1%8B%D1%80%D1%8C_(%D1%80%D0%B5%D0%BA%D0%B0)) — cite_note-ca19bd9df05a346f-14. У чира анадырской популяции резко выражен полиморфизм добавочных хромосом — самки, в отличие от самцов, не имеют В-хромосом в 1/3 клеток. Мозаицизм числа В-

хромосом осложняется наличием В-хромосом разной морфологии: мета-, субмета- и акроцентрических, которые могут быть крупными (сравнимыми по размерам с самыми мелкими акроцентрическими хромосомами основных наборов) или мелкими (в 2–3 раза мельче) и быть полностью или частично гетерохроматиновыми [53].

НАСЕКОМЫЕ (Insecta)

Имеются данные об увеличении числа и встречаемости В-хромосом у насекомых в экстремальных условиях обитания. Анализ генофонда природных популяций мошек (Diptera, Simuliidae) показал, что В-хромосомы обнаружены преимущественно у полиморфных, широко распространенных видов. Число личинок с В-хромосомами возрастает с усилением загрязнения водоемов и воздействия других факторов на популяцию. Существует корреляция между формами мошек с В-хромосомами и местообитанием популяции: чаще они выявляются на периферии ареала, в северных или высокогорных районах, например в ручьях из снежников Памира. Популяция мошки украшенной (*Odagmia ornate* Meigen, 1818) из ручья на Соловецких островах Архангельской области, удаленная от основного материка на значительное расстояние, характеризуется полиморфизмом по В-хромосомам [54, 55].

В сообществах пяти видов комаров-звонцов, или хирономид (Chironomidae Newman, 1834), обитающих в малых водоемах Псковской области с различным уровнем загрязнения биогенными элементами, наиболее высокая частота встречаемости особей с В-хромосомами обнаружена в самом загрязненном водоеме [56]. У мотыля (*Chironomus pilicornis* (Fabricius, 1787)) в арктической популяции Оймякона (“полюс холода”) в экстремальных для развития личинок условиях обнаружены множественные В-хромосомы [57]. Их насчитывается до нескольких десятков на одно ядро клетки слюнной железы. Частота встречаемости личинок с В-хромосомами очень высока в оймяконских популяциях (24–50%). В этих условиях многоядрышkovость, увеличение массы центромерного гетерохроматина и появление множественных В-хромосом могут служить клеточными механизмами адаптации к суровым условиям существования личинок в зоне вечной мерзлоты. Так, многоядрышkovость способна обеспечить синтез большого количества рибосомной РНК, необходимой для белковых синтезов, протекающих в условиях низких температур с малой эффективностью [57]. В популяции другого вида мотыля — *Chironomus bolatonicus* (Devai, Wulker & Scholl, 1983) из зоны Чернобыля в 1987–1988 гг. впервые для вида обнаружены В-хромосомы, а также широкий спектр геномных и хромосомных нарушений [58].

Таким образом, картина распределения добавочных хромосом у животных и растений в экстремальных местах их ареала достаточно сходна. В-хромосомы чаще всего выявляются у видов, имеющих широкие ареалы. В краевых (маргинальных) популяциях различных групп организмов, обитающих на границах ареала или на участках ареала с экстремальными экологическими условиями, прослеживается тенденция возрастания встречаемости и числа В-хромосом, увеличения изменчивости систем В-хромосом. Появление В-хромосом в таких популяциях обычно сопровождается изменениями кариотипа, расширением диапазона и увеличением частоты встречаемости геномных и хромосомных нарушений. Однако слишком большое число В-хромосом может иметь отрицательные эффекты для их носителей. В целом же влияние В-хромосом зависит от условий окружающей среды, действующих на популяцию и различающихся изменчивостью в пространстве и во времени. Поэтому каждый отдельный случай появления В-хромосом должен анализироваться во многих популяциях, а эффекты должны изучаться как можно в больших разнообразных условиях [2, 5].

В-ХРОМОСОМЫ И ГЕНЫ

В появлении В-хромосом определенную роль играют, очевидно, мобильные генетические элементы (транспозоны). Экспрессия транскрипционно активных ретротранспозонов растений может усиливаться под влиянием различных стрессовых факторов [59]. В-хромосомы являются идеальной мишенью для транспозиции мобильных элементов, и поэтому вставки таких элементов могут нести ответственность за создание структурной изменчивости, наблюдаемой в В-хромосомах [2]. При исследовании краевой популяции мятлика (*Aegilops speltoides* Tausch), имеющей широкий спектр хромосомных аномалий — гетерозиготность по транслокациям и изменчивость расположения на хромосомах количества сайтов 45S 5S рибосомных ДНК (рДНК), показана связь изменчивости транспозиции с изменчивостью количества В-хромосом. У одного из генотипов *A. speltoides* увеличение числа В-хромосом с трех до пяти коррелировало со значительным возрастанием копий мобильных элементов в S2-поколении [60]. Благодаря вариабельности гетерохроматиновых участков В-хромосом и подвижным мобильным генам, перемежающимся преимущественно по этим генетически “не активным” участкам, создается разнообразие генома, которое обуславливает ускорение его эволюционных преобразований. Считается, что гетерохроматиновые участки и В-хромосомы способны осуществлять глобальный контроль над адаптацией видов к условиям среды и определять эволюцию новых видов [5, 61, 62].

Представление об инертности В-хромосом связано с их очень низкой транскрипционной активностью или ее отсутствием. Основная часть исследований по молекулярной организации В-хромосом показала, что добавочные элементы богаты повторенной некодирующей ДНК (LINE и SINE), теломерными и центромерными повторами, рибосомной ДНК, гистоновыми генами и не несут экспрессирующихся уникальных генов [63]. Тем не менее, немало В-хромосом обнаруживают транскрипционную активность: большинство из них содержат кластеры генов рибосомной РНК, часть которой является транскрипционно активной [5]. В ряде исследований была показана экспрессия рибосомных генов, лежащих на добавочных элементах, у растений, в частности скерды волосовидной (*Crepis capillaries* (L.) Wallr.) [64], и животных — восточноазиатской мыши, плачущего кузнечика (*Eyprepocnemis plorans* (Charpentier, 1825)) [65, 66].

Наличие уникальных генов на В-хромосомах было впервые предсказано для овса посевного (*Avena sativa* L.) по устойчивости к ржавчине (Dherawattana, Sadanaga, 1973, цит. по [5]), позже — для паразитического гриба рода фузариум (*Fusarium* Link, 1809) *Nectria haematococca* по устойчивости к антибиотикам [67]. В последнем случае наличие гена было подтверждено скринингом фосмидной библиотеки [68] и секвенированием полного генома [69]. Использование молекулярных методов позволило выявить ряд уникальных аутосомных генов, расположенных на В-хромосомах, у различных организмов, в том числе рыб и млекопитающих [70–72].

Вопрос о транскрипционной активности генов, расположенных на В-хромосомах млекопитающих, долго оставался спорным и открытым. Первым уникальным геном, идентифицированным на В-хромосомах позвоночных, стал протоонкоген *C-KIT*, выявленный на В-хромосомах хищных — лисицы (*Vulpes vulpes* (Linnaeus, 1758)) и енотовидной собаки (*Canis procyonoides* Gray, 1834). Впоследствии было обнаружено его присутствие в добавочных элементах и других видов млекопитающих, в частности сибирской косули (*Capreolus pygargus* (Pallas, 1771)) ($2n = 70 + 0-12B$) [63, 73–75]. Обнаружение транскрипта FPGT-TNNI3K, экспрессирующегося с дублированных генов на В-хромосомах в культуре фибробластов сибирской косули, является примером транскрипционной активности уникальных генов, расположенных на добавочных элементах кариотипа млекопитающих [63, 76].

Варьирование копийности функционально значимых генов в зависимости от числа В-хромосом может оказаться критическим для жизнедеятельности вида, что способствует пересмотру представления о В-хромосомах и необходимости учитывать их возможную роль в функционировании организма и в эволюции геномов. Сейчас очевид-

но, что В-хромосомы — часть общей избыточности генома, характерной для ядерных организмов. В спецвыпуске журнала “Genes” и недавно вышедшей монографии “Evolution, composition and regulation of supernumerary B chromosomes” [77] было показано, что В-хромосомы содержат не просто скопления гетерохроматина, нефункционального при реализации наследственной информации, а включают целиком некоторые кодирующие белок гены, их фрагменты, а также сегменты дупликации (удвоения участков хромосом).

Более подробный молекулярный состав В-хромосом, известный в настоящее время для ряда видов растений и млекопитающих, подтверждает наличие генов, кодирующих белок, и транскрипционную активность для некоторых из них. Поэтому концепция инертности В-хромосом устарела, но их роль еще предстоит определить. Поддержание В-хромосом очевидно неодинаково для всех видов, поэтому текущие модели должны быть адаптированы с учетом того, что добавочные хромосомы не бездействуют, как считалось раньше. Хотя В-хромосомы не являются необходимыми для функционирования организмов, однако в них могут образовываться, например, новые гены или может происходить слияние фрагментов генов из разных частей генома. Генетики России и их зарубежные коллеги предполагают, что добавочные хромосомы могут быть “фабрикой” новых генов. Поскольку лишь в XXI в. появились методы изучения молекулярной структуры В-хромосом, позволившие получить данные по анализу некодирующей части генома и раскрыть неожиданные биологические функции у считавшихся “избыточными” последовательностей [78, 79], В-хромосомы без преувеличения можно назвать хромосомами XXI в.

Работа выполнена в рамках Базового проекта ИЛ СО РАН “Функционально-динамическая индикация биоразнообразия лесов Сибири” № FWES-2021-0009, рег. НИОКТР № 121031500336-9.

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. Rubtsov N.B., Borisov Y.M. Sequence composition and evolution of mammalian B chromosomes // *Genes*. 2018. V. 9. № 10. P. 490. <https://doi.org/10.3390/genes9100490>
2. Camacho J.P.M., Sharbel T.F., Beukeboom L.W. B chromosome evolution // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B*. 2000. V. 355 (1394). P. 163–178. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0556>
3. Camacho J.P.M. B chromosomes // *The Evolution of the Genome* / Ed. Gregory T.R. N.Y.: Acad. Press, 2005. P. 223–286.
4. Jones N. B chromosomes in plants // *Plant Biosystems — An Intern. J. Dealing with all Aspects of Plant Biology*. 2012. V. 146. № 3. P. 727–737. <https://doi.org/10.1080/11263504.2012.713406>
5. Кунах В.А. Додаткові або В-хромосоми рослин. Походження та біологічне значення // *Вісник Укр. тов-ва генетиків та селекціонерів*. 2010. Т. 8. № 1. С. 99–139.
6. Houben A., Banaei-Moghaddam A.M., Klemme S. Biology and evolution of B chromosomes // *Plant Genome Diversity*. V. 2 / Eds Leitch I.J. et al. Springer-Verlag Wien, 2013. P. 149–165. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1160-4_10
7. Jones N. New species with B-chromosomes discovered since 1980 // *Nucleus*. 2017. V. 60. P. 263–281. <https://doi.org/10.1007/s13237-017-0215-6>
8. Muratova E.N. B-chromosomes in Gymnosperms — A Review // *The Intern. J. Plant Reproductive Biol.* 2018. V. 10. № 1. P. 14–25. <https://doi.org/10.14787/ijprb.2018.10.1.14-25>
9. Борисов Ю.М., Мышлякина Т.А. В-хромосомы // *Успехи соврем. биологии*. 2018. Т. 138. № 4. С. 336–351. <https://doi.org/10.7868/S0042132418040026>
10. Rastogi S., Ohri D. B-chromosomes in Gymnosperms // *Silvae Genetica*. 2019. V. 68. № 1. P. 51–54. <https://doi.org/10.2478/sg-2019-0009>
11. Vujosevic M., Rajcic M., Blagojevic J. B chromosomes in populations of mammals Revisited // *Genes*. 2019. V. 9. № 10. P. 487. <https://doi.org/10.3390/genes9100487>
12. Jones R.N., Rees H. B Chromosomes. London; N.Y.; Paris: Acad. Press, 1982. 266 p.
13. Bougourd S.M., Plowman A.B. The inheritance of B chromosomes in *Allium schoenoprasum* L. // *Chromosome Res.* 1996. V. 4. № 2. P. 151–158. <https://doi.org/10.1007/BF02259709>
14. Bougourd S.M., Jones R.N. B Chromosomes: A physiological enigma // *The New Phytologist*. 1997. V. 137. № 1. P. 43–54. <http://www.jstor.org/stable/2559080>
15. Соловьева Л.В., Плеханова Н.М. О добавочных хромосомах жимолости // *Цитология и генетика*. 1992. Т. 26. № 3. С. 21–25.
16. Цитленок С.И., Пулькина С.В. Хромосомный полиморфизм *Crepis sibirica* (Asteraceae) // *Бот. журн.* 1991. Т. 76. № 11. С. 1538–1544.
17. Nkongolo K.K., Deck A., Michael P. Molecular and cytological analysis of *Deschampsia cespitosa* population from Northern Ontario (Canada) // *Genome*. 2001. V. 44. № 5. P. 818–825. <https://doi.org/10.1139/g01-063>
18. Cardone S., Sawatani P., Rush P. et al. Karyological studies in *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae) // *Polar Biol.* 2008. V. 32. № 3. P. 427–433. <https://doi.org/10.1007/s00300-008-0535-8>

19. Parnikoza I., Kozeretcka I., Kunakh V. Vascular plants of the maritime Antarctic: origin and adaptation // Am. J. Plant Sciences. 2011. № 3. P. 381–395.
<https://doi.org/10.4236/ajps.2011.23044>
20. González M.L., Urdampilleta J.D., Fasanella M. et al. Distribution of rDNA and polyploidy in *Deschampsia antarctica* E. Desv. in Antarctic and Patagonic populations // Polar Biol. 2016. V. 39. P. 1663–1677.
<https://doi.org/10.4236/ajps.2011.23044>
21. Amosova A.V., Bolsheva N.L., Samatadze T.E. et al. Molecular Cytogenetic Analysis of *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae), Maritime Antarctic // PLoS One. 2015. V. 10(9).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138878>
22. Amosova A.V., Bolsheva N.L., Zoshchuk S.A. et al. Comparative molecular cytogenetic characterization of seven *Deschampsia* (Poaceae) species // PLoS One. 2017. V. 12(4).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175760>
23. Bedi Y.S., Gill B.S., Bir S.S. Cytological evolution in the woody taxa of Gamopetalae and Monochlamydeae // J. Cytol. and Genet. 1985. V. 20. P. 162–203.
24. Moir R.B., Fox D.P. Supernumerary chromosomes in *Picea sitchensis* (Bong.) Carr. // Silvae Genet. 1972. V. 21. № 5. P. 182–186.
25. Teoh S.B., Rees H. B-chromosomes in white spruce // Proc. Roy. Soc. London. 1977. V. 198. № 1133. P. 325–344.
26. Брока М.В. В-хромосомный полиморфизм в природных популяциях *Picea obovata* Ledeb. // Роль селекции в улучшении латвийских лесов. Рига, 1990. С. 105–117.
27. Муратова Е.Н. В-хромосомы голосеменных // Успехи соврем. биологии. 2000. Т. 120. № 5. С. 452–465.
28. Муратова Е.Н., Владимирова О.С. Добавочные хромосомы кариотипа ели сибирской *P. obovata* // Цитология и генетика. 2001. № 4. С. 38–44.
29. Карпюк Т.В., Муратова Е.Н., Владимирова О.С., Седельникова Т.С. Кариологический анализ ели Шренка // Лесоведение. 2009. № 1. С. 52–58.
30. Буторина А.К., Богданова Е.В. Адаптивное значение и возможное происхождение В-хромосом у ели колючей // Цитология. 2001. Т. 43. № 8. С. 809–814.
31. Владимирова О.С., Муратова Е.Н. Кариологические особенности ели сибирской (*Picea obovata* Ledeb.) в условиях антропогенного загрязнения г. Красноярск // Экол. генетика. 2005. Т. III. № 1. С. 18–23.
32. Седельникова Т.С., Муратова Е.Н., Пименов А.В., Ефремов С.П. Кариологические особенности болотных и суходольных популяций *Picea obovata* в Западной Сибири // Бот. журн. 2004. Т. 89. № 5. С. 718–733.
33. Tashev A.N., Sedel'nikova T.S., Pimenov A.V. Supernumerary (B) chromosomes in populations of *Picea abies* (L.) H. Karst. from Western Rhodopes (Bulgaria) // Cytology and Genetics. 2014. V. 48. № 3. P. 160–165.
<https://doi.org/10.3103/S0095452714030116>
34. Ташев А.Н., Седельникова Т.С., Пименов А.В. Число хромосом и хромосомные перестройки у ели обыкновенной *Picea abies* (L.) H. Karst. в лесах Рило-Родопского горного массива в Болгарии // Сиб. лесной журн. 2015. № 5. С. 77–86.
<https://doi.org/10.15372/SJFS20150506>
35. Kean V.M., Fox D.P., Faulkner R. The accumulation mechanism of the supernumerary (B-) chromosome in *Picea sitchensis* (Bong.) Carr. and the effect of this chromosome on male and female flowering // Silvae Genetica. 1982. V. 31. № 4. P. 126–131.
36. Буторина А.К., Мурая Л.С., Исаков Ю.Н. Спонтанный мутагенез у сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.). Первый случай обнаружения мутанта с кольцевой и добавочной хромосомами // ДАН СССР. 1979. Т. 248. № 4. С. 977–979.
37. Молотков П.И., Кириченко О.И., Бенгус Ю.В. О происхождении “ведьминой метлы” у сосны обыкновенной // Цитология и генетика. 1989. Т. 24. № 4. С. 14–19.
38. Муратова Е.Н. Добавочные хромосомы у лиственницы Гмелина *Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr. // ДАН СССР. 1991. Т. 318. № 6. С. 1511–1514.
39. Путенихин В.П., Фарукишина Г.Г., Шуганов З.Х. Лиственница Сукачева на Урале: изменчивость и популяционно-генетическая структура. М.: Наука, 2004. 276 с.
40. Седельникова Т.С., Пименов А.В., Варахсин Г.С., Янковская В. Числа хромосом некоторых видов хвойных // Бот. журн. 2005. Т. 90. № 10. С. 1611–1612.
41. Sedel'nikova T.S., Pimenov A.V. Chromosomal mutations in Siberian larch (*Larix sibirica* Ledeb.) on Taimyr Peninsula // Biol. Bull. Russ. Acad. Sci. 2007. V. 34. № 2. P. 198–201.
<https://doi.org/10.1134/S1062359007020136>
42. Седельникова Т.С., Пименов А.В. Числа хромосом видов рода *Larix* (Pinaceae) в лесостепи и лесотундре Средней Сибири // Бот. журн. 2017. Т. 102. № 12. С. 1694–1697.
43. Седельникова Т.С., Пименов А.В. Числа хромосом форм *Larix sibirica* (Pinaceae) в Ширинской степи Республики Хакасия // Бот. журн. 2017. Т. 102. № 5. С. 693–697.
44. Сизых О.А., Квитко О.В., Муратова Е.Н., Тихонова И.В. Формовое разнообразие и кариологические особенности лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) юга Сибири // Хвойные бореальной зоны. 2006. Т. XXIII. № 2. С. 202–211.
45. Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference / Eds Wilson D.E., Reeder D.M. 2nd ed. Washington, D.C.: Smithsonian Institution Press, 1993. 1206 p.
46. Vujosevic M., Blagojevic J. B-chromosomes in populations of mammals // Cytogenet. Genome Res. 2004. V. 106. P. 247–256.
47. Чернявский Ф.Б., Козловский А.И. Видовой статус и история копытных леммингов (*Dicrostonyx*, Rodentia) острова Врангеля // Зоол. журн. 1980. Т. LIX. Вып. 2. С. 266–273.
48. Gileva E.A. The B chromosome system in the varying lemming *Dicrostonyx torquatus* Pall., 1779 from natural and laboratory populations // Russ. J. Genet. 2004. V. 40. № 12. P. 1399–1406.
<https://doi.org/10.1007/s11177-005-0011-2>

49. Borisov Y.M., Afanas'ev A.G., Lebedev T.T., Bochkarev M.N. Multiplicity of B microchromosomes in a siberian population of mice *Apodemus peninsulae* ($2n = 48 + 4 - 30$ B chromosomes) // Russ. J. Genet. 2010. V. 46. № 6. P. 705–711.
<https://doi.org/10.1134/S1022795410060116>
50. Borisov Y.M. Increase in the number of the B-chromosomes and variants of their system in mouse *Apodemus peninsulae* in Mountain Altai population over 26 years // Russ. J. Genet. 2008. V. 44. № 9. P. 1070–1079.
<https://doi.org/10.1134/S1022795408090093>
51. Borisov Y.M., Zhigarev I.A. B chromosome system in the Korean field mouse *Apodemus peninsulae* Thomas, 1907 (Rodentia, Muridae) // Genes. 2018. V. 9. № 10. P. 472.
<https://doi.org/10.3390/genes9100472>
52. Nasyaganova A.N., Sitnikova T.Ya. Karyotype of the Baikal amphipod *Polyacanthisca calceolata* Bazikalova, 1937 (Crustacea, Amphipoda) // Chromosome Science. 2012. V. 15. № 1–2. P. 43–48.
53. Фролов С.В. Добавочные хромосомы в кариотипе чира // Цитология. 1986. Т. 28. № 2. С. 215–218.
54. Чубарева Л.А. Хромосомный полиморфизм в природных популяциях кровососущих мошек и некоторых других двукрылых насекомых // Цитология. 1974. Т. 6. № 3. С. 267–280.
55. Чубарева Л.А., Петрова Н.А. Кариотипы мошек (Diptera, Simuliidae) мировой фауны // Энтомологическое обозрение. 2003. Т. 72. № 1. С. 157–222.
56. Жиров С.В. Дополнительные хромосомы (В-хромосомы) в кариотипах некоторых видов хирономид из Псковской области // Цитология. 1999. Т. 41. № 1. С. 91–95.
57. Кикнадзе И.И., Истомина А.Г., Салова Т.А. Функциональная морфология политенных хромосом хирономиды *Chironomus pilicornis* F. из водоемов криолитозоны // Цитология. 2002. Т. 44. № 1. С. 89–95.
58. Петрова Н.А., Михайлова П.А. Геномные, хромосомные, хроматидные и хромонемные нарушения у *Chironomus bolatonicus* (Diptera) из зоны Чернобыля // Генетика. 1994. Т. 30. Приложение. С. 120–121.
59. Сормачева И.Д., Блинов А.Г. LTR-ретротранспозоны растений // Вавил. журн. генетики и селекции. 2011. Т. 15. № 2. С. 351–381.
60. Belyayev A., Kalendar R., Brodsky L. et al. Transposable elements in a marginal plant population: Temporal fluctuations provide new insights into genome evolution of wild diploid wheat // Mobile DNA. 2010. V. 1. № 6.
<https://doi.org/10.1186/1759-8753-1-6>
61. Кунах В.А. Мобільні генетичні елементи і пластичність геному рослин. Київ: Логос, 2013. 288 с.
62. Борисов Ю.М. В-хромосомы и пластичность вида // Экол. генетика. 2013. Т. XI. № 2. С. 73–83.
63. Дементьева П.В. Выявление и характеристика кодирующих последовательностей на В-хромосомах сибирской косули: Дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск: ФГБУ ИМББ СО РАН, 2013. 148 с.
64. Leach C.R., Houben A., Field B. et al. Molecular evidence for transcription of genes on a B chromosome in *Crepis capillaris* // Genetics. 2005. V. 171. № 1. P. 269–278.
<https://doi.org/10.1534/genetics.105.043273>
65. Rubtsov N.B., Karamysheva T.V., Andreenkova O.V. et al. Comparative analysis of micro and macro B chromosomes in the Korean field mouse *Apodemus peninsulae* (Rodentia, Muridae) performed by chromosome microdissection and FISH // Cytogenet. Genome Res. 2004. V. 106. № 2–4. P. 289–294.
<https://doi.org/10.1159/000079301>
66. Ruiz-Estévez M., López-León M.D., Cabrero J., Camacho J.P. B-chromosome ribosomal DNA is functional in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* // PLoS One. 2012. V. 7. № 5.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036600>
67. Miao V.P., Covert S.F., VanEtten H.D. A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable (“B”) chromosome // Science. 1991. V. 254. № 5039. P. 1773–1776.
<https://doi.org/10.1126/science.1763326>
68. Han Y., Liu X., Benny U. et al. Genes determining pathogenicity to pea are clustered on a supernumerary chromosome in the fungal plant pathogen *Nectria haematococca* // Plant J. 2001. V. 25. № 3. P. 305–314.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.2001.00969.x>
69. Coleman J.J., Rounsley S.D., Rodriguez-Carres M. et al. The Genome of *Nectria haematococca*: Contribution of Supernumerary Chromosomes to Gene Expansion // PLoS Genet. 2009. V. 5. № 8.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000618>
70. Lamatsch D.K., Trifonov V., Schories S. et al. Isolation of a cancer-associated microchromosome in the sperm-dependent parthenogen *Poecilia formosa* // Cytogenet. Genome Res. 2011. V. 135. P. 135–142.
<https://doi.org/10.1159/000331271>
71. Yoshida K., Terai Y., Mizoiri S. et al. B chromosomes have a functional effect on female sex determination in Lake Victoria cichlid fishes // PLoS Genet. 2011. V. 7.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002203>
72. Martis M.M., Klemme S., Banaei-Moghaddam A.M. et al. Selfish supernumerary chromosome reveals its origin as a mosaic of host genome and organellar sequences // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. P. 13343–13346.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1204237109>
73. Graphodatsky A.S., Kukekova A.V., Yudkin D.V. et al. The proto-oncogene C kit maps to canid B-chromosomes // Chromosome Res. 2005. V. 13. P. 113–122.
<https://doi.org/10.1007/s10577-005-7474-9>
74. Yudkin D.V., Trifonov V.A., Kukekova A.V. et al. Mapping of KIT adjacent sequences on canid autosomes and B chromosomes // Genome Res. 2007. V. 116. P. 100–103.
<https://doi.org/10.1159/000097424>
75. Duke Becker S.E., Thomas R., Trifonov V.A. et al. Anchoring the dog to its relatives reveals new evolutionary breakpoints across 11 species of the Canidae and provides new clues for the role of B chromosomes // Chromosome Res. 2011. V. 19. P. 685–670.
<https://doi.org/10.1007/s10577-011-9233-4>

76. *Trifonov V.A., Dementyeva P.V., Larkin D.M. et al.* Transcription of a protein-coding gene on B chromosomes of the Siberian roe deer (*Capreolus pygargus*) // *BMC Biol.* 2013. V. 11. № 90.
<https://doi.org/10.1186/1741-7007-11-90>
77. *Houben A., Jones N., Martins C., Trifonov V.* Evolution, composition and regulation of supernumerary B chromosomes // *Genes.* 2019. V. 10. № 2.
<https://doi.org/10.3390/genes10020161>
78. *Макунин А.И., Трифонов В.А.* Современные методы анализа добавочных хромосом // *Цитология.* 2013. Т. 55. № 3. С. 148–152.
79. *Макунин А.И.* Анализ генетического состава В-хромосом млекопитающих с применением высокопроизводительного секвенирования: Дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск: ФГБУ ИМБ СО РАН, 2016. 141 с.

B-Chromosome Variability in Plants and Animals under Extreme Environments

Yu. M. Borisov^{a, *} and T. S. Sedel'nikova^{b, **}

^a*Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

^b*Sukachev Institute of Forest Siberian Branch of the Russian of Academy Sciences, Federal Research Center Krasnoyarsk Science Center Siberian Branch of the Russian of Academy Sciences, Krasnoyarsk, 660036 Russia*

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

***e-mail: tss@ksc.krasn.ru*

A review of data on B-chromosomes in populations of various systematic groups of plants and animals from their extreme habitats – the borders of the range and areas of the range exposed to unfavorable environmental factors is given. The analysis showed a rather similar picture of the distribution of B chromosomes in species from extreme habitats: there is a tendency to increase the number, occurrence and polymorphism of B chromosomes, which is accompanied by changes in the karyotype, genomic and chromosomal anomalies in their carriers. B chromosomes are often found in species with wide ranges. The possible adaptive role of B chromosomes in the vital activity of the organism and the evolution of genomes is discussed.

Keywords: B-chromosomes, plant and animal populations, extreme habitat conditions, anthropogenic factors, adaptation.

**ЭЛИМИНАЦИЯ ХРОМОСОМ КАК МЕХАНИЗМ ВОЗНИКНОВЕНИЯ
ДИПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ В ДИПЛОИДНО-ТЕТРАПЛОИДНЫХ
СКРЕЩИВАНИЯХ У КУКУРУЗЫ (*Zea mays* L.)**© 2023 г. Л. А. Эльконин¹*, Л. И. Мавлютова¹, А. Ю. Колесова¹, В. М. Панин¹, М. И. Цветова¹¹Федеральный аграрный научный центр Юго-Востока, Саратов, 410010 Россия

*e-mail: lelkonin@gmail.com

Поступила в редакцию 28.02.2023 г.

После доработки 10.04.2023 г.

Принята к публикации 12.04.2023 г.

Одним из основных компонентов апомиктичного размножения растений является формирование нередуцированных зародышевых мешков (ЗМ). Эффективным инструментом для выявления способности к формированию таких ЗМ могут служить гетероплоидные скрещивания, в которых материнские диплоидные растения опыляют пыльцой тетраплоидов. У кукурузы в скрещиваниях $2n(\text{♀}) \times 4n(\text{♂})$ формируются как правило шуплые зерновки с триплоидным зародышем, у которых развитие эндосперма нарушено ввиду отклонения баланса материнского (м) и отцовского (о) геномов от соотношения $2\text{м} : 1\text{о}$. В наших экспериментах у нескольких диплоидных линий кукурузы при опылении их пыльцой тетраплоидов наблюдалось формирование крупных выполненных зерновок, из которых развивались диплоидные растения матроклинного типа, причем материнский фенотип растений, а также гибридный фенотип эндосперма были подтверждены экспрессией генетических маркеров. Было высказано предположение, что выполненные зерновки в $2n \times 4n$ скрещиваниях возникают на основе нередуцированных ЗМ и псевдогамного апомиксиса, поскольку слияние двух диплоидных полярных ядер с диплоидным спермием обеспечивает соотношение материнского и отцовского геномов в эндосперме $2\text{м} : 1\text{о}$. С целью уточнения генетической природы диплоидных растений, фенотипически сходных с материнскими линиями, которые развивались из выполненных зерновок в скрещиваниях $2n \times 4n$, нами было проведено их генотипирование по всем десяти хромосомам генома кукурузы с помощью полиморфных кодоминантных SSR- и Indel-маркеров, дифференцирующих отцовскую линию-опылитель от материнских линий. В качестве материнских форм использовали линию ГПЛ АТ, обладающую способностью к гаплоидному партеногенезу, растения из поколения F_2 гибрида между линией В47, способной к формированию нередуцированных ЗМ, и линией ГПЛ АТ. Кроме того, в скрещивания была включена линия Коричневый Маркер (КМ), несущая маркерный ген *B* коричневой окраски стебля, а также линия ЮВ11. В качестве отцовской формы использовали тетраплоидную кукурузу Черная Тетра (ЧТ), несущую маркерный ген *A1* черной окраски зерновок. Установлено, что у всех исследованных растений при использовании маркеров пяти хромосом – 1-й (iDp525), 2-й (iDP4004), 3-й (JY_3:457), 4-й (UfIDP4_31.55), 9-й (INDEL_139329242) – наблюдалась амплификация только материнских аллелей. Однако у каждого из изученных растений при использовании маркеров других хромосом были отмечены случаи амплификации аллелей, свойственных отцовской линии. Высказывается гипотеза о формировании диплоидных растений в $2n \times 4n$ скрещиваниях у кукурузы на основе оплодотворения нередуцированных ЗМ и последующей элиминации хромосом преимущественно отцовской линии.

Ключевые слова: апомиксис, ДНК-маркеры, гетероплоидные скрещивания, элиминация хромосом.**DOI:** 10.31857/S0016675823090035, **EDN:** WRWCWX

Апомиксис – развитие семян, минуя процесс двойного оплодотворения, – относится к числу наиболее интенсивно исследуемых биологических явлений, различные формы которого описаны у многих видов растений. Такое внимание к проблеме апомиксиса связано с надеждами, что перенос апомиксиса в культурные растения будет способствовать фиксации гетерозиса у гибридов F_1 и их клональному размножению семенами [1–3].

Сложность решения данной проблемы обусловлена многокомпонентным характером апомиксиса, включающим способность к формированию нередуцированных зародышевых мешков (ЗМ) – диплопорических, возникающих в результате нарушений мейоза, либо апоспорических, развивающихся из соматических клеток, расположенных вблизи мейотического ЗМ, а также способность к партеногенетическому развитию яйцеклеток. Кро-

ме того, ключевым фактором, обеспечивающим формирование семян при апомиксисе, является также развитие эндосперма – автономного или на основе псевдогамии (оплодотворения центральной клетки ЗМ одним из спермиев) [2–4]. Эти компоненты контролируются разными генетическими системами. Перенос их в культурные растения возможен либо на основе скрещивания с дикорастущими сородичами с факультативным проявлением апомиксиса, либо с помощью методов генетической инженерии. За последние годы благодаря интенсивному исследованию дикорастущих апомиктических видов были выявлены гены, участвующие в генетическом контроле отдельных компонентов апомиксиса [4–7]. Эти исследования открывают перспективы для конструирования апомиксиса методами генетической инженерии [8, 9], что недавно было успешно продемонстрировано у риса [10]. Однако у других видов злаковых культур, несмотря на интенсивные исследования, подобный успех еще не достигнут.

У кукурузы для создания линий с апомиктическим способом размножения использовали гибридизацию с дикорастущим тетраплоидным сородичем *Tripsacum dactyloides* L., обладающим способностью к факультативному апомиксису [11]. В результате многолетних исследований были получены гибриды, которые проявляли апомиксис, но отличались по морфологическим и хозяйственным признакам от кукурузы, причем потеря хромосом трипсакума приводила к утрате апомиктических потенций [12].

Одним из эффективных инструментов для выявления способности к формированию нередуцированных ЗМ при апомиксисе может служить использование тетраплоидных опылителей [13–17]. Как известно, у кукурузы, как и у многих других видов высших растений, нормальное развитие эндосперма требует высокоспецифичного баланса экспрессирующихся генов материнского (м) и отцовского (о) геномов, соотношение которых, в соответствии с теорией балансового числа эндосперма, должно быть 2м : 1о [18–20]. При оплодотворении гаплоидного (редуцированного) ЗМ кукурузы, содержащего гаплоидную яйцеклетку и два гаплоидных полярных ядра, диплоидными спермиями происходит формирование щуплых зерновок с триплоидным зародышем и тетраплоидным эндоспермом. У таких зерновок эндосперм в той или иной степени дегенерирует ввиду нарушения соотношения родительских геномов (2м : 2о) [20, 21]. В случае оплодотворения нередуцированного диплоидного ЗМ пылью тетраплоидов слияние двух диплоидных полярных ядер с диплоидным спермием должно приводить к появлению гексаплоидного эндосперма с соотношением родительских геномов 2м : 1о, которое обеспечивает развитие нормально выполненных семян. Такие семена могут нести либо гибридный тетраплоид-

ный зародыш (в результате оплодотворения диплоидной яйцеклетки диплоидным спермием), либо апомиктический зародыш (в случае партеногенетического развития неоплодотворенной яйцеклетки).

Ранее нами при опылении тетраплоидными опылителями ряда диплоидных линий кукурузы, в том числе линии ГПЛ АТ, созданной на основе линии АТ-1, обладающей способностью к гаплоидному партеногенезу [22], было обнаружено формирование на початках крупных выполненных зерновок, из которых развивались как тетраплоидные гибриды, так и диплоидные растения материнского типа [23]. Гибридный фенотип зерновок и матроклинный фенотип растений были подтверждены экспрессией генетических маркеров [24]. С целью уточнения генетической природы диплоидных растений, развивающихся из крупных выполненных зерновок, формирующихся на початках диплоидных линий и гибридов в результате их опыления пылью тетраплоидов, нами было проведено генотипирование таких растений по всем десяти хромосомам генома кукурузы с помощью полиморфных кодоминантных SSR- и Indel-маркеров. Часть полученных экспериментальных данных была представлена нами ранее в виде краткого сообщения [25]. В настоящей статье мы приводим подробное описание проведенного исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал исследования. В качестве материнских форм в скрещиваниях использовали диплоидную линию кукурузы (*Zea mays* L.) ГПЛ АТ, которая была получена на основе линии АТ-1, характеризующейся способностью к партеногенетическому развитию яйцеклеток и высокой частотой гаплоидных растений [22], а также растения из поколения F₂ гибрида между линиями В47 и ГПЛ АТ. Линия В47 (2n) при использовании в качестве материнской формы в скрещиваниях с тетраплоидными отцовскими формами дает тетраплоидные гибриды, что указывает на наличие у нее способности к формированию нередуцированных ЗМ [23]. Кроме того, в скрещиваниях в качестве материнских форм использовали диплоидную линию Коричневый Маркер (КМ), несущую маркерный ген *B*, обуславливающий коричневую окраску стебля у гибридов F₁, и ген *R*, обуславливающий черную окраску зерновок при взаимодействии с геном *A*, а также линию ЮВ11. В качестве отцовской формы использовали тетраплоидную кукурузу Черная Тетра (ЧТ), несущую ген *A*, что позволяет использовать ее для генетического маркирования гибридных зерновок при скрещивании с линиями, несущими ген *R* (к примеру, с КМ).

Растения выращивали на изолированном от других линий кукурузы (за исключением ЧТ) опытном участке Селекционного комплекса ФАНЦ Юго-Востока (г. Саратов, Россия). Почва на опытном участке представлена южным черноземом, среднесуглинистым по механическому составу. Растения выращивали рядовым способом с междурядьем 70 см и густотой стояния четыре растения на метр.

Скрещивания, потомство которых исследовали в данной работе, были выполнены в 2019 г. Вегетационный сезон 2019 г. отличался значительным количеством осадков (для условий Саратова) и отсутствием жары. За июль — первую декаду августа (т.е. в период развития генеративных структур и цветения) сумма осадков, по данным метеостанции ФАНЦ Юго-Востока, составила 82.0 мм, среднесуточный дефицит влажности воздуха варьировал от 6.0 до 20.0 гПа, среднесуточная температура — от 18.2 до 25.1°C, число дней с максимальной температурой воздуха выше 30°C — 4; ГТК за этот период составлял 0.97.

Методика опыления. У материнских растений кукурузы, выращенных на изолированном участке, тщательно удаляли метелки и, кроме того, початки тщательно изолировали пергаментными изоляторами за 2–3 дня до цветения. Таким образом, возможность случайного опыления была исключена. У разных материнских форм было опылено 6–15 початков. Изолированные, но неопыленные початки служили контролем. Число контрольных початков в разных гибридных комбинациях составляло 5–57 штук.

Проращивание зерновок. У выполненных зерновок, сформировавшихся на початках, отделяли часть эндосперма, которую использовали впоследствии для выделения ДНК, а остальную часть зерновки стерилизовали и проращивали в культуре *in vitro*. Стерилизацию проводили 70%-ным этиловым спиртом (30 с) и 0.1%-ным раствором сулемы (15 мин) и после тщательной промывки замачивали в течение суток в воде (28°C). После повторной стерилизации сулемой (7 мин) и промывки автоклавированной водой зародыши помещали в пробирки на питательную агаризованную среду MS и выращивали в растительной комнате, оборудованной лампами Osram Fluora L36w/77 (фотопериод 16 ч день/8 ч ночь; $26 \pm 1^\circ\text{C}$). Проростки с развитыми корнями переносили на несколько дней в пробирки с водой для адаптации к нестерильным условиям, после чего высаживали в теплицу в пластиковые сосуды, и затем — на делянку на экспериментальном поле Селекционного центра ФАНЦ Юго-Востока.

Цитологический анализ. Для определения ploидности кончики корешков растений, выращенных в пластиковых сосудах, фиксировали в ацетоалкоголе (1 : 3). Фиксацию проводили в 10–11 часов

утра при 26–28°C. Перед фиксацией кончики корешков помещали на 3 часа в насыщенный раствор α -бром-нафталина для укорачивания хромосом. Кончики корешков после проведения через серию растворов в следующей последовательности: 3.6% (1 N) HCl (10 мин), 50% HCl (20 мин), дистиллированная вода (1–2 мин), 45%-ная уксусная кислота (20 мин), окрашивали в 4%-ном ацетогематоксилине (30–60 мин). Временные препараты готовили с использованием смеси 45%-ной уксусной кислоты и 70% -ного хлорал-гидрата (1 : 1), подкрашенной ацетогематоксилином. Препараты анализировали с помощью светового микроскопа AxioScore A1 и фотографировали с помощью цифровой камеры MrC (Zeiss, Германия) при увеличении $\times 1000$. Для каждого растения ploидность определяли на основании анализа 8–10 метафазных пластинок.

ПЦР-анализ. ДНК выделяли из фрагментов листьев диплоидных растений, имевших материнский фенотип, которые были выявлены в потомстве от каждого скрещивания: десять растений из скрещивания $\text{♀ПЛ AT}(2n) \times \text{♂ЧТ}(4n)$; девять растений из скрещивания $\text{♀F}_2 \text{ B47/ПЛ AT}(2n) \times \text{♂ЧТ}(4n)$ (от четырех разных материнских растений F_2 , опыленных ЧТ); три растения из скрещивания $\text{♀KM}(2n) \times \text{♂ЧТ}(4n)$; два растения из скрещивания $\text{♀ЮВ11}(2n) \times \text{♂ЧТ}(4n)$. Кроме того, выделяли также ДНК из эндосперма зерновок, из которых были получены эти растения. ДНК экстрагировали с помощью модифицированного ЦТАБ-метода [26], в котором для осаждения ДНК использовали изопропанол, а осадок ДНК промывали 70%-ным этанолом. ПЦР-анализ проводили с праймерами для кодоминантных SSR- и Indel-маркеров, при этом использовали маркеры для всех десяти хромосом генома кукурузы (табл. 1). Реакционная смесь содержала 50 нг ДНК, 0.03 ед./мкл SynTaq ДНК-полимеразы (Синтол, Москва, Россия), 0.6 пМ каждого праймера, однократный ПЦР-буфер, 2.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM смеси дНТФ (Синтол). Общий объем реакционной смеси — 25 мкл. Амплификацию проводили с использованием ДНК-амплификаторов MasterCycler (Eppendorf, Гамбург, Германия) и T100 (BioRad, Сингапур) при следующем режиме: начальная денатурация 94°C (4 мин); 35 циклов: 94°C (45 с), 57°C (45 с), 72°C (45 с); заключительная элонгация 94°C (5 мин) [28]. Амплифицированные фрагменты фракционировали в 3%-ном агарозном геле в 0.5-кратном TAE-буфере при напряжении 50 V (8 мин), 100 V (8 мин), 180 V (до 100 мин); для визуализации использовали 0.01%-ный водный раствор бромистого этидия. Все ПЦР-анализы были выполнены в двух повторениях.

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили путем сравнения до-

Таблица 1. Праймеры, использованные для генотипирования растений кукурузы, полученных в скрещиваниях с тетраплоидной линией Черная Тетра

Наименование	Хромо- сома	Последовательность (5' → 3')		Ссылка
		F	R	
iDp525 (Indel)	1	TATGGGAGTGAAAGCCATCC	GCGTGCTGAGACTTACCTGG	https://maizegdb.org/data_center/marker?id=889526
iDP4004 (Indel)	2	TTCTTTCAGGGTGTTCAGCC	TTGTTGAACACGTAGAGGCG	https://maizegdb.org/data_center/marker?id=943083
JY_3:457 (Indel)	3	CCCAATGGTACCAGAGCTTTA	GTGGGTTACGTCAGGTAT	[27]
UfiIDP4_31.55 (Indel)	4	TTCGCGTCTGTGATTACGTG	GATAGATGCACGCCCAAAAG	[27]
iDP1638 (Indel)	5	GCCCCAAAGTCTCAGAACAGG	TTGATAGAGCGATGAGAGCG	https://maizegdb.org/data_center/marker?id=888956
Umc2036 (SSR)	5	TCAATCAAGCCTCTCGTAAAGGAAC	CTCTTGATCTCAACCGAAATCCTG	https://maizegdb.org/data_center/ssr?id=308985
Umc1870 (SSR)	5	AAGATTACGTTTAGCCCGTTCGTT	GAATTCGGATTGGAATGTTGTTTC	https://www.maizegdb.org/data_center/ssr?id=301322
iDP425 (Indel)	6	TTAACGGCACAGTGCTAACC	TGTTGCCCTATGATGTCGTC	https://maizegdb.org/data_center/marker?id=889434
UfiIDP7_1.2 (Indel)	7	AGAGGACCCAGCCCTTG	GCACTCGTGGTTACAGAAAT	[27]
Umc1983 (SSR)	7	ATGGATCAGGGGAAAGAGCAAG	CTGAAGGCCCTCCTCGTCCTC	https://www.maizegdb.org/data_center/ssr?id=301435
iDP452 (Indel)	8	ATGAAGGGAAGTCTTGATGCG	TAAAGCAACGGTCGTTATGTC	https://maizegdb.org/data_center/marker?id=889457
INDEL_139329242	9	CAACAATCTCGACTCTTGTC	AGGGCATCGGCTACAATT	[27]
iDp1606 (Indel)	10	TGGCTTCTTCTTCCATCC	GCCTGACTTTGTTAGGTGCC	https://maizegdb.org/data_center/marker?id=888925

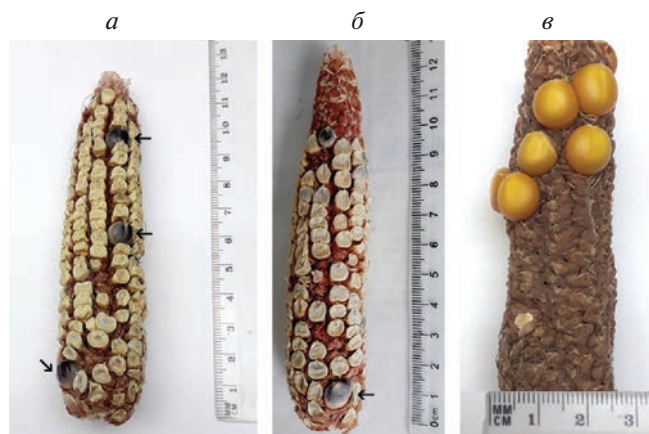


Рис. 1. Початки линии кукурузы КМ(2n) (а, б) и растения из поколения F₂ В47/ГПЛ АТ(2n) (в), опыленные пылью линии Черная Тетра(4n). Стрелками отмечены выполненные зерновки.

лей по методу Фишера, применяющемуся для малых, а также неравновеликих выборок [29].

РЕЗУЛЬТАТЫ

На початках диплоидных линий кукурузы, а также растений из F₂ В47/ГПЛ АТ, опыленных пылью тетраплоидной кукурузы ЧТ, в ряде случаев наблюдалось формирование полностью выполненных зерновок (рис. 1, табл. 2). На початках КМ эти зерновки имели черную окраску в результате взаимодействия маркерного гена *A* отцовской формы и гена *R* материнской линии, тогда как на початке гибрида F₂ В47/ГПЛ АТ — желтую окраску вследствие отсутствия гена *R* у данного гибрида. В результате проращивания этих зерновок были получены растения, фенотипически сход-

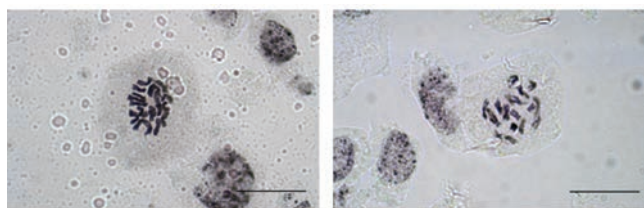


Рис. 2. Метафазные пластинки клеток корней растений, полученных из зерновок, завязавшихся в скрещивании [F₂ В47/ГПЛ АТ(2n)] × Черная Тетра(4n). Шкала 20 мкм.

ные с материнскими линиями, которые имели диплоидный набор хромосом (рис. 2). В комбинации ♀ГПЛ АТ(2n) × ♂ЧТ(4n) было выращено 20 таких растений; в комбинации ♀КМ(2n) × ♂ЧТ(4n) — три растения; в комбинации ♀ЮВ11(2n) × ♂ЧТ(4n) — четыре растения; в комбинации ♀(F₂ В47/ГПЛ АТ)(2n) × ♂ЧТ(4n) — десять растений (от четырех разных растений F₂). При самоопылении эти растения формировали полностью озерненные початки, на которых присутствовали только нормально развитые выполненные зерновки, что следовало ожидать в случае диплоидной природы этих растений.

Диплоидные растения, полученные из выполненных зерновок, были подвергнуты генотипированию посредством ПЦР-анализа с полиморфными SSR- и Indel-маркерами, дифференцирующими тетраплоидную линию-опылитель ЧТ от материнских линий, использованных в экспериментах.

При использовании маркера JY_3:457 (хромосома 3) у двух из восьми растений из гибридной комбинации ♀ГПЛ АТ(2n) × ♂ЧТ(4n) (№ 9-8-8 и 9-8-10) было обнаружено присутствие обоих ам-

Таблица 2. Завязываемость зерновок на початках ряда диплоидных линий и гибридов кукурузы, опыленных тетраплоидной линией Черная Тетра (2019 г.)

Комбинация скрещивания	Число початков, шт.		Число початков с зерновками				
			всего (%) ¹	с числом выполненных зерновок			
				1–5	6–15	15–30	≥30
ГПЛ АТ-1	Контроль	9	0	—	—	—	—
	Опылено	6	2 (33.3)*	2	—	—	—
F ₂ В47/ГПЛ АТ-1	Контроль	57	2 (3.6)	2	—	—	—
	Опылено	15	5 (30.0)**	3	1	—	1
КМ	Контроль	5	0	—	—	—	—
	Опылено	12	4 (33.3)*	3	1	—	—
ЮВ11	Контроль	11	0	—	—	—	—
	Опылено	8	2 (25.0)*	—	2	—	—

Примечание. ¹ — процент початков с выполненными зерновками по отношению к числу опыленных початков; *, ** — различия между контролем и опытом значимы при $P > 0.95$ и $P > 0.99$ соответственно.

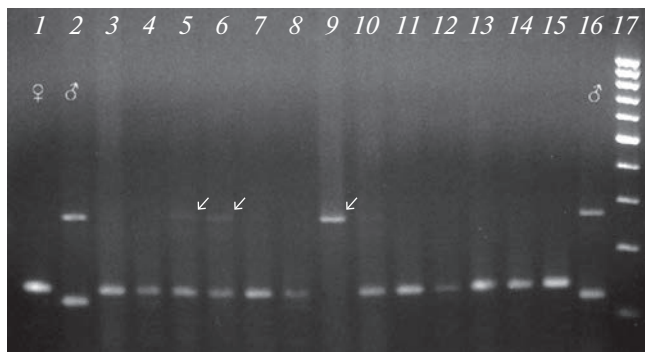


Рис. 3. Амплификация Indel-маркера JY_3:457 (хромосома 3) у растений линии ГПЛ АТ(2n) (1, 15); тетраплоидной кукурузы Черная Тетра (ЧТ, 4n) (2, 16) и диплоидных растений № 9-8-3 (3, 4), № 9-8-8 (5, 6), № 9-8-9 (7, 8), № 9-8-6 (9), № 9-8-10 (10), № 9-8-17 (11, 12), № 9-8-11 (13), № 9-8-13 (14) из гибридной комбинации ♀ГПЛ АТ(2n) × ♂ЧТ(4n) (1, 2, 3, 5, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16 – ДНК из листьев растений; 4, 6, 8 – ДНК из эндосперма зерновок, из которых были получены опытные растения); 17 – маркеры длины фрагментов ДНК (ООО “Синтол”). У растений № 9-8-6 (трек 9) и № 9-8-8 (треки 5, 6) отчетливо заметен фрагмент ДНК, специфичный для отцовской формы, или его следы (отмечены стрелками).

пликонов, характерных как для материнской линии, так и для линии-опылителя (рис. 3), что указывает на гибридную природу этих растений. В то же время у шести растений наблюдалась амплификация только ампликона, характерного для материнской линии. Причем, несмотря на кодоминантную природу данных маркеров, никаких признаков амплификации отцовского фрагмента в ДНК этих растений выявлено не было.

Аналогичным образом, при использовании этого маркера у растений, полученных из гибридных комбинаций ♀КМ(2n) × ♂ЧТ(4n), ♀ЮВ11(2n) × ♂ЧТ(4n), ♀(F₂ В47/ГПЛ АТ)(2n) × ♂ЧТ(4n), наблюдалась амплификация только ампликонов, характерных для материнских линий (табл. 3).

При использовании маркера INDEL_139329242 (хромосома 9) у ряда растений, полученных из зерновок из гибридной комбинации ♀(F₂ В47/ГПЛ АТ) (2n) × ♂ЧТ(4n), определенных в экспериментах с маркером JY_3:457 как “матроклинные” (№ 5-19, 5-21, 13-1-9-1, 13-6-1), также наблюдалась амплификация только материнского ампликона (рис. 4). В то же время у других растений, определенных как “матроклинные” в экспериментах с маркером JY_3:457 (№ 13-1-9-2, 13-6-4), отчетливо был заметен ампликон линии-опылителя ЧТ, свидетельствовавший об их гибридной природе (рис. 4,а). Аналогичная ситуация наблюдалась и среди растений, полученных из зерновок, завязавшихся на початках ГПЛ АТ (рис. 4,б): у растений № 9-8-4, 9-8-11 и 9-8-13,

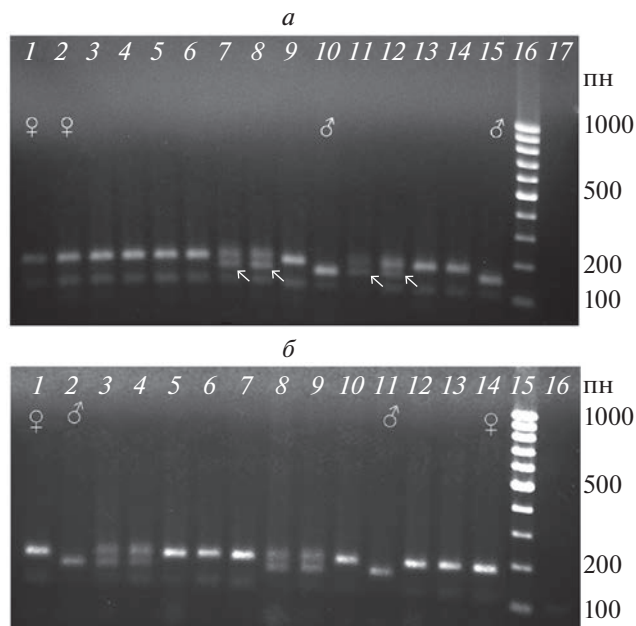


Рис. 4. Амплификация маркера INDEL_139329242 (хромосома 9) у диплоидных растений кукурузы из гибридных комбинаций ♀(F₂ В47/ГПЛ АТ)(2n) × ♂ЧТ(4n) (а) и ♀ГПЛ АТ(2n) × ♂ЧТ(4n) (б). а: 1, 2 – материнское растение из поколения F₂ В47/ГПЛ АТ(2n), использованное в скрещивании с ЧТ(4n); 10, 15 – ЧТ; 3–9, 11–14 – диплоидные растения № 5-19 (3, 4), № 5-21 (5), № 13-1-9-1 (6), № 13-1-9-2 (7), № 13-1-9-6 (8), № 13-6-1 (9), № 13-6-4 (11, 12), № 8-11-4 (13, 14); 16 – маркеры ДНК; 17 – отрицательный контроль (нет ДНК). 1–3, 5–10, 11, 13 – ДНК из листьев растений; 4, 12, 14 – ДНК из эндосперма зерновок, из которых были получены растения. Стрелкой указан фрагмент ДНК, специфичный для отцовской линии. б: 1, 14 – ГПЛ АТ; 2, 11 – ЧТ; 3, 4 – № 9-8-4; 5, 6 – № 9-8-9; 7 – № 9-8-12; 8 – № 9-8-11; 9 – № 9-8-13; 10 – № 9-8-10; 12, 13 – № 9-8-8; 15 – маркеры ДНК; 16 – отрицательный контроль (нет ДНК). 1–3, 5, 7–14 – ДНК из листьев растений; 4, 6, 13 – ДНК из эндосперма зерновок, из которых были получены растения.

определенных как “матроклинные” в экспериментах с маркером JY_3:457, при использовании маркера INDEL_139329242 отчетливо наблюдалась амплификация отцовского фрагмента, указывавшая на их гибридную природу. В то же время у растений № 9-8-9 и 9-8-12 в экспериментах с маркером INDEL_139329242, так же, как и в экспериментах с маркером JY_3:457, наблюдалась амплификация только материнских фрагментов.

Учитывая эти факты, все растения, проявившие матроклинную природу при использовании маркеров JY_3:457 и INDEL_139329242, были проверены в экспериментах с другими маркерами, локализованными на остальных хромосомах генома кукурузы. Результаты этих экспериментов представлены в табл. 3 и 4.

Таблица 3. Результаты генотипирования диплоидных растений кукурузы, полученных из зерновок, завязавшихся в скрещиваниях диплоидных растений кукурузы с линией Черная Тетра(4n)

Номер растения	Хромосома, молекулярный маркер												
	1	2	3	4	5			6	7		8	9	10
	iDp525	iDP4004	JY_3:457	UfiDP4_31.55	iDP1638	Umc1870	Umc2036	iDP425	UfiDP7_1.2	Umc1983	iDP452	INDEL_139329242	iDp1606
♀ГПЛ АТ(2n) × ♂Черная Тетра(4n)													
9-8-9	♀	♀	♀	♀	=	=	♀	♀	♀	♀ + ♂	=	♀	♀
9-8-12	♀	♀	♀	♀	=	=	♀	♀	♀	♀ + ♂	=	♀	♀ + ♂
♀КМ(2n) × ♂Черная Тетра(4n)													
18-10-1	♀	♀	♀	♀	♀	=	=	♀	♂	=	♀ + ♂	♀	♀
18-10-3	♀	♀	♀	♀	♀	=	=	♀	♂	=	♀ + ♂	♀	♀
18-10-4	♀	♀	♀	♀	♀	=	=	♀	♀ + ♂	=	♀	♀	♀
♀ЮВ11(2n) × ♂Черная Тетра(4n)													
21-8-2	♀	♀ + ♂	♀	♀ + ♂	=	♀ + ♂	=	♀	=	♀ + ♂	♀	♀	♀ + ♂
21-8-4	♀	♀ + ♂	♀	♀ + ♂	=	♀	=	♀	=	♀ + ♂	♀	♀	♀
♀(F ₂ В47/ГПЛ АТ)(2n) × ♂Черная Тетра(4n)													
5-19	—	♀	♀	♀	=	=	♀	♀ + ♂	♀ + ♂	♀	♀	♀	♀
13-1-9-1	—	♀	♀	♀	=	=	♀	♀ + ♂	♂	♀ + ♂	♀	♀	♀ + ♂
13-6-1	—	♀	♀	♀	=	=	—	♀ + ♂	♂	♀	—	♀	—

Примечание. ♀ — амплификация только материнского аллеля; ♀ + ♂ — амплификация материнского и отцовского аллелей; ♂ — амплификация только отцовского аллеля; — маркер не выявил полиморфизма между материнской линией и ЧТ.

Было обнаружено, что у трех изученных таким образом растений, полученных из зерновок из гибридной комбинации ♀КМ(2n) × ♂ЧТ(4n), гибридная природа проявлялась только при использовании маркеров 7-й и 8-й хромосом, тогда как маркеры остальных хромосом указывали на матроклинную природу растений. Каждое из двух изученных растений из гибридной комбинации ♀ГПЛ АТ(2n) × ♂ЧТ(4n) было гибридным по одной хромосоме: № 9-8-9 — по 7-й, № 9-8-12 — по 10-й (рис. 5, в, 15 трек). Растение № 5-19 из гибридной комбинации ♀(F₂ В47/ГПЛ АТ)(2n) × ♂ЧТ(4n), оказалось гомозиготным по девяти материнским аллелям (девяти хромосомам), однако по одной хромосоме (седьмой) оказалось гетерозиготным.

У всех изученных растений ПЦР-анализ с праймерами, амплифицировавшими маркер 1-й хромосомы iDp525, свидетельствовал об их матроклинной природе, тогда как у тех же растений амплификация маркера десятой хромосомы iDp1606 в некоторых случаях выявляла их гибридную природу (рис. 5).

Примечательно, в некоторых случаях амплификация разных маркеров одной и той же хромосомы у одного и того же растения давала разные результаты. Так, у растений из гибридной комбинации ♀ГПЛ АТ(2n) × ♂ЧТ(4n) результаты амплификации Indel-маркера UfiDP7_1.2 (рис. 6, а) указывали на их матроклинную природу, тогда как SSR-маркер UMC1983 (рис. 6, б), локализованный в другом сайте этой же хромосомы, демонстрировал их гибридную природу. Различие результатов амплификации разных маркеров одной и той же хромосомы, возможно, является следствием рекомбинации родительских хромосом в процессе онтогенеза исследуемых растений, возникших в результате гибридизации.

Интересный результат наблюдался при амплификации Indel-маркера UfiDP7_1.2 у потомства от скрещивания ♀(F₂ В47/ГПЛ АТ)(2n) × ♂ЧТ(4n). У двух растений — № 5-19 и 5-21, амплифицировались фрагменты обоих родителей, тогда как у растений № 13-1-9-1 и 13-6-1 — только отцовской линии (рис. 6, в). Причем у растения 13-6-1 маркер Umc1983 выявлял аллель только материнской линии. Такой результат также может быть объяснен

Таблица 4. Сравнительный анализ генотипирования растений № 18-10-3 и 5-19, полученных из зерновок из гибридных комбинаций ♀КМ(2n) × ♂ЧТ(4n) и ♀(F₂ 47/ГПЛ АТ)(2n) × ♂ЧТ(4n), и эндосперма этих зерновок

Исследуемый материал	Хромосома, молекулярный маркер								
	1	2	5	6	7		8	9	10
	iDP525	iDP4004	Umc2036	PiDP425	UfiDP7_1.2	Umc1983	iDP452	INDEL_139329242	iDP1606
№ 18-10-3 [♀КМ(2n) × ♂ЧТ(4n)]									
Растение	♀	♀	—	♀	♂	—	—	♀	♀
Эндосперм	♀	♀	—	♀ + ♂	♂	—	—	♀ + ♂	♀
№ 5-19 [♀КМ(2n) × ♂ЧТ(4n)]									
Растение	—	♀	♀	♀	♀ + ♂	♀	♀	♀	♀
Эндосперм	—	—	♀	♀ + ♂	♀ + ♂	♀	♀ + ♂	♀	♀

Примечание см. к табл. 3.

рекомбинацией родительских хромосом и последующей элиминацией материнского или отцовского аллеля.

Результаты амплификации разных маркеров в ДНК, выделенной из листьев исследуемых растений и из эндосперма зерновок, из которых они были получены, как правило не различались между собой (рис. 4–6). Так, в случаях отсутствия отцовских маркеров у растений наблюдалось также их отсутствие и в эндосперме: к примеру, амплификация маркеров JY_3:457 у растений из комбинации ♀ГПЛ АТ(2n) × ♂ЧТ(4n) № 9-8-3, 9-8-9, 9-8-17 (рис. 3, треки 3 и 4, 7 и 8, 11 и 12 соответственно, лист и эндосперм); iDP525 у растений из комбинации ♀КМ(2n) × ♂ЧТ(4n) № 18-10-3, 18-10-1, 18-10-4 (рис. 5,а, треки 2 и 3, 4 и 5, 6 и 7 соответственно, лист и эндосперм); INDEL_139329242 у растений из комбинации ♀ГПЛ АТ(2n) × ♂ЧТ(4n) № 9-8-9, 9-8-8 (рис. 4,б, треки 5 и 6, 12 и 13 соответственно, лист и эндосперм). При амплификации маркеров обоих родителей в ДНК, выделенной из листьев, аналогичный характер амплификации наблюдался и в ДНК, выделенной из эндосперма: к примеру, амплификация маркера JY_3:457 у растения из комбинации ♀ГПЛ АТ(2n) × ♂ЧТ(4n) № 9-8-8 (рис. 3, треки 5 и 6), а также маркера INDEL_139329242 у растения № 9-8-4 из той же комбинации скрещивания (рис. 4,б, треки 3 и 4).

Однако у растения № 18-10-3 из комбинации ♀КМ(2n) × ♂ЧТ(4n) было обнаружено, что результаты амплификации маркеров 6-й и 9-й хромосом (iDP 425 и INDEL_139329242 соответственно) различались при использовании ДНК, выделенной из листа и эндосперма (табл. 4). Аналогичный результат наблюдался у растения № 5-19 из

гибридной комбинации ♀(F₂ В47/ГПЛ АТ)(2n) × ♂ЧТ(4n), у которого амплификация маркеров 6-й и 8-й хромосом также различалась в ДНК, выделенной из листа и эндосперма. У этих растений в листе наблюдалась амплификация только аллелей материнской линии, тогда как в эндосперме присутствовали аллели как материнской, так и отцовской линии. Разный характер амплификации разных маркеров в одном и том же эндосперме свидетельствует о возможной элиминации отцовских аллелей в ДНК эндосперма, подобно тому, что наблюдалось в ДНК растений.

ОБСУЖДЕНИЕ

Возникновение диплоидных гибридных растений в скрещиваниях диплоидных и тетраплоидных линий — нередкое явление. Такие диплоидные гибриды могут возникать в результате формирования гаплоидных пыльцевых зерен у тетраплоидов вследствие их генетической нестабильности, вызванной, как полагают, соматической редукцией. Такое предположение ранее высказывалось в ряде работ, выполненных на *Fagopyrum esculentum* Moench [30], *Sorghum halepense* Linn. [31], *Pennisetum americanum* (L.) Leeke [32], *S. bicolor* L. (Moench) [33], *Zea mays* L. [23]. Такие диплоидные гибриды должны быть идентичны гибридам, возникающим при скрещивании обычных диплоидных индивидуумов, и в этой связи должны иметь один набор хромосом материнской линии и один набор хромосом линии-опылителя.

Представленные выше результаты генотипирования диплоидных растений кукурузы, развивающихся из выполненных зерновок, формирующихся

на початках диплоидных линий в скрещиваниях с тетраплоидным опылителем, показывают, однако, что эти растения существенным образом отличаются от таких гибридов. У растений, полученных из зерновок, сформировавшихся на початках линий ГПЛ АТ и КМ, фенотипически не отличавшихся от материнских линий, гибридность проявлялась только при анализе молекулярных маркеров двух хромосом, тогда как по восьми хромосомам растения были гомозиготны по материнским аллелям, т.е. у них отсутствовали хромосомы отцовской формы. Наличие двух наборов хромосом материнской линии может свидетельствовать о происхождении этих растений из диплоидных яйцеклеток, иначе говоря, на основе нередуцированных зародышевых мешков — одного из элементов апомиксиса. Вместе с тем амплификация молекулярных маркеров, характерных для двух хромосом отцовской линии-опылителя, свидетельствует о происхождении таких растений в результате оплодотворения. Возможно, крупные выполненные зерновки, несущие диплоидные зародыши, в проведенных нами скрещиваниях $2n \times 4n$ формируются в результате оплодотворения нередуцированных ЗМ материнских линий диплоидной пыльцой тетраплоидной отцовской формы, при этом возникает тетраплоидный зародыш, у которого в ходе последующего эмбриогенеза восстанавливается диплоидный набор хромосом за счет элиминации хромосом одной из родительских линий. Такая элиминация, по-видимому, носит неслучайный характер, и чаще всего элиминируют хромосомы тетраплоидной линии-опылителя. Хотя в некоторых случаях, по-видимому, имела место элиминация хромосом материнской линии (хромосома 7 у растения № 18-10-3, полученного на основе линии КМ, и растений № 13-1-9-1 и 13-6-1 из гибридной комбинации $\text{♀}(\text{F}_2 \text{ B47/ГПЛ АТ})(2n) \times \text{♂ЧТ}(4n)$).

Подобная элиминация хромосом отцовской линии-опылителя известна и описана в литературе достаточно подробно. Так, возникновение гаплоидов у ячменя и у кукурузы является следствием элиминации хромосом линий гаплоиндукторов [34–38], хотя возникновение гаплоидов у кукурузы может быть обусловлено также мутацией в гене фосфолипазы, необходимой для преодоления спермием мембраны яйцеклетки [39, 40]. У тетраплоидных сортов рапса при их скрещивании с экспериментально полученными октоплоидными линиями описано появление матроклиных тетраплоидных растений [41], формирование которых авторы связывают с “индуцирующей” способностью линий-опылителей. Следовательно, образование в гетероплоидных скрещиваниях растений матроклиного типа с плоидностью, аналогичной плоидности материнской формы, — реально существующее в природе явление. Для возникновения таких растений наряду с элиминацией хромосом

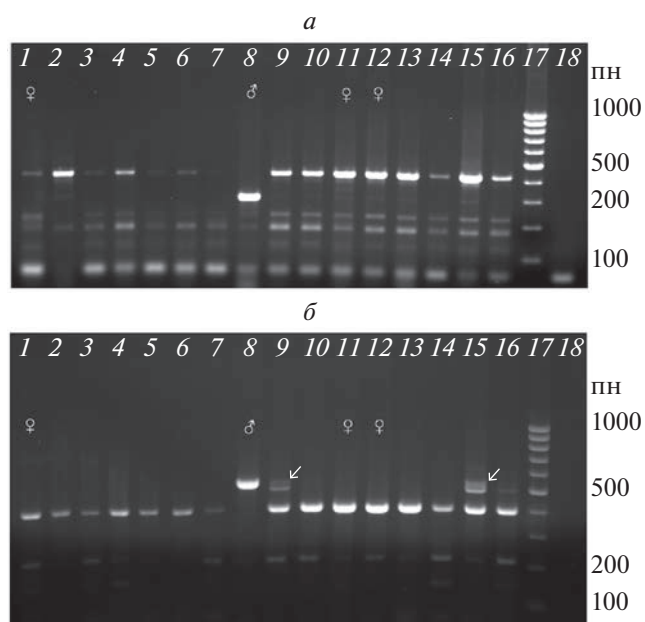


Рис. 5. Амплификация SSR-маркера iDP525 (хромосома 1) (а) и SSR-маркера iDP1606 (хромосома 10) (б) у материнских линий кукурузы КМ, ЮВ-11, ГПЛ АТ, тетраплоидной кукурузы Черная Тетра (ЧТ)(4n) и диплоидных растений, полученных из зерновок, завязавшихся на початках, опыленных пыльцой ЧТ. 1 — КМ; 2–7 — диплоидные растения № 18-10-3 (2, 3), № 18-10-1 (4, 5), № 18-10-4 (6, 7) из гибридной комбинации $\text{♀КМ}(2n) \times \text{♂ЧТ}(4n)$; 8 — ЧТ; 9, 10 — диплоидные растения № 21-8-2 (9), № 21-8-4 (10) из гибридной комбинации $\text{♀ЮВ 11}(2n) \times \text{♂ЧТ}(4n)$; 11 — ЮВ-11; 12 — ГПЛ АТ; 13–16 — диплоидные растения № 9-8-9 (13, 14), № 9-8-12 (15, 16) из гибридной комбинации $\text{♀ГПЛ АТ}(2n) \times \text{♂ЧТ}(4n)$; 17 — маркеры ДНК; 18 — отрицательный контроль (нет ДНК).

опылителя должен функционировать механизм формирования нередуцированных зародышевых мешков у материнской линии, что, возможно, имеет место у исследованных нами линий кукурузы. Нельзя, однако, исключать и возможность индуцированного опылителем удвоения хромосом яйцеклетки нормального мейотического ЗМ, которое, по-видимому, имеет место у рапса, поскольку в экспериментах китайских исследователей [41] использовались обычные ЦМС-линии, применяющиеся для получения гибридов F_1 .

Обращает на себя внимание, что у всех исследованных растений маркеры пяти хромосом (1-й, 2-й, 3-й, 4-й и 9-й) демонстрировали амплификацию только материнских аллелей, и на этом основании можно было бы сделать вывод о происхождении этих растений на основе апомиксиса. Однако расширение набора молекулярных маркеров позволило, во-первых, установить гибридное происхождение исследуемых растений и, во-вторых, выявить у кукурузы явление, которое можно было бы описать термином “диплоиндукция”, при кото-

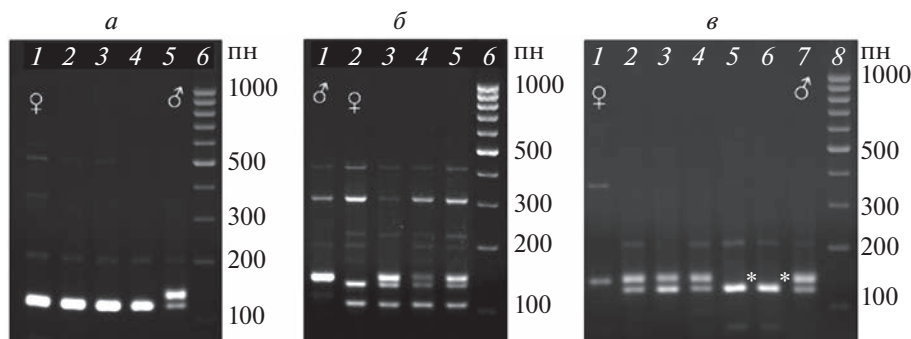


Рис. 6. Амплификация Indel-маркера UfiDP7_1.2 (*а, в*) и SSR-маркера Umc1983 (*б*), локализующихся на 7-й хромосоме генома кукурузы, у потомства, полученного из зерновок, завязавшихся на початках растений ГПЛ АТ (*а, б*) и F₂ В47/ГПЛ АТ (*в*) после опыления пылью ЧТ. *а:* 1 – ГПЛ АТ; 2–4 – диплоидные растения № 9-8-9 (2), 9-8-12 (3, 4); 5 – ЧТ; 6 – маркеры длины фрагментов ДНК; 1–3, 5 – ДНК из листьев растений; 4 – ДНК из эндосперма зерновки, из которой было получено растение № 9-8-12. *б:* 1 – ЧТ; 2 – ГПЛ АТ; 3–5 – диплоидные растения № 9-8-9 (3, 4); № 9-8-12 (5); 6 – маркеры длины фрагментов ДНК; 1–3, 5 – ДНК из листьев растений; 4 – ДНК из эндосперма зерновки, из которой было получено растение № 9-8-12. *в:* 1 – материнское растение из поколения F₂ В47/ГПЛ АТ, участвовавшее в скрещивании с ЧТ; 2–6 – диплоидные растения № 5-19 (2, 3), № 5-21 (4), № 13-1-9-1 (5), № 13-6-1 (6); 7 – ЧТ; 8 – маркеры ДНК; 1, 2, 4–7 – ДНК из листьев; 3 – ДНК из эндосперма зерновки, из которой было получено растение № 5-19.

ром подавляющее большинство хромосом тетраплоидной линии-опылителя элиминирует и формируется диплоидный генотип зародыша, несущий преимущественно хромосомы материнского родителя.

Механизмы, лежащие в основе элиминации хромосом тетраплоидной отцовской линии, заслуживают дальнейшего детального исследования. Объяснение элиминации отцовских хромосом в результате несбалансированности генома, свойственной отдаленной гибридизации [34, 42–44], вряд ли может быть убедительным, поскольку мы проводили скрещивания линий, принадлежащих к одному виду. В то же время элиминация отцовских хромосом в скрещиваниях с линиями-гаплоиндукторами, использующимися в качестве опылителя, которые несут мутации в гене центрального гистона CENH3 [45–47], участвующего в формировании центромеры и влияющего на расхождение хромосом, наводит на мысль, что в некоторых случаях у гибридов $2n \times 4n$ может иметь место аналогичный процесс. Не исключено, что ген центрального гистона CENH3 тетраплоидного опылителя в геноме гибридов $2n \times 4n$ может подвергаться импринтингу, а материнской гистон CENH3 в силу мутаций или эпигенетических эффектов слабо взаимодействует с отцовскими хромосомами, которые в результате этого элиминируются в ходе клеточных делений.

Примечательно, что в некоторых случаях амплификация разных маркеров одной и той же хромосомы у одного и того же растения давала разные результаты. Так, у обоих растений, полученных из зерновок, завязавшихся на початке линии ГПЛ АТ, № 9-8-9 и 9-8-12, SSR-маркер 5-й хромосомы Umc2036 выявлял аллели только ма-

теринской линии, тогда как другой SSR-маркер этой же хромосомы (Umc1870) – аллели как материнской, так и отцовской линии. Эти маркеры находятся на значительном удалении друг от друга на 5-й хромосоме: Umc2036 картирован в области 6993294...7011505, тогда как Umc1870 – в области 64135849...64145035 (<https://www.maizegdb.org>). Вполне возможно, что в процессе онтогенеза у исследуемых растений имела место рекомбинация родительских хромосом, в результате чего пятая хромосома приобрела рекомбинантную природу и несла как отцовские, так и материнские маркеры. Аналогичным образом, у растения № 13-6-1 Indel-маркер 7-й хромосомы UfiDP7_1.2 (локализация в сайте 1298878 [27]) выявлял аллель отцовской линии, тогда как SSR-маркер Umc1983, локализованный на той же хромосоме (113048246...113049029) (<https://www.maizegdb.org>), – аллель материнской линии. Различие результатов амплификации разных маркеров одной и той же хромосомы, возможно, является следствием рекомбинации родительских хромосом в процессе онтогенеза исследуемых растений, возникших в результате гибридизации.

Процессы элиминации хромосом, как свидетельствуют данные рис. 4–6, протекали не только в тканях зародыша, но и в эндосперме. При этом в большинстве случаев результаты амплификации ДНК из листьев растений, полученных из зерновок с початков, опыленных ЧТ, и из эндосперма этих же зерновок совпадали между собой, за исключением растений № 18-10-3 и 5-19, полученных из зерновок из гибридных комбинаций ♀КМ($2n$) $\times$ ♂ЧТ($4n$) и ♀(F₂ В47/ГПЛ АТ)($2n$) $\times$ ♂ЧТ($4n$) соответственно (табл. 4). У этих растений в листе наблюдалась амплификация только

аллелей материнской линии, тогда как в эндосперме присутствовали аллели как материнской, так и отцовской линии. Такой гибридный характер эндосперма зерновки в сочетании с отсутствием отцовских аллелей у растений мог бы свидетельствовать в пользу псевдогамного апомиксиса, однако факт амплификации отцовского аллеля маркера uFIDP7_1.2 (7-я хромосома) в ДНК этих же растений отвергает эту гипотезу и указывает на их возникновение в результате двойного оплодотворения.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют в пользу гипотезы о том, что диплоидная природа растений, развивающихся у кукурузы из выполненных зерновок, формирующихся в $2n \times 4n$ скрещиваниях, по-видимому, является следствием оплодотворения нередуцированных зародышевых мешков диплоидных линий пыльцой тетраплоидов и последующей элиминации хромосом преимущественно тетраплоидного отцовского родителя. Гипотеза о происхождении этих растений в результате псевдогамного апомиксиса, предложенная нами ранее [23], в данном материале не нашла своего экспериментального подтверждения. Тем не менее диплоидная природа растений, гомозиготных по подавляющему большинству молекулярных маркеров материнских линий, свидетельствует о развитии таких растений на основе диплоидных яйцеклеток и, следовательно, о наличии у использованных линий способности к формированию нередуцированных зародышевых мешков — одного из основных компонентов апомиктического размножения.

Авторы благодарят д.б.н. Э.Б. Хатефова (Всемирный институт генетических ресурсов растений (ВИР) им. Н.И. Вавилова) за предоставление семян тетраплоидной линии Черная Тетра; к.б.н. А.Н. Завалишину (Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского) за предоставление семян линий ГПЛ АТ и Коричневый Маркер; д.с.-х.н. В.И. Жужукина (РосНИИСК "Россорго") за предоставление семян линий В47 и ЮВ11; к.б.н. Г.А. Геращенко (ИБГ УФИЦ РАН) и рецензентов за внимательное прочтение рукописи и ценные замечания.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования России согласно тематическому плану ФАНЦ Юго-Востока (тема FNWF-2022-0006).

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. Barcaccia G., Albertini E. Apomixis in plant reproduction: A novel perspective on an old dilemma // *Plant Reprod.* 2013. V. 26(3). P. 159–179. <https://doi.org/10.1007/s00497-013-0222-y>
2. Tavva S.S., Mohan D., Venkateswara R.Y. et al. Apomixis in crop improvement // *Plant Biology and Biotechnology*. V. I. Plant diversity, organization, function and improvement / Eds Bahadur B., Rajam M.V., Sahijram L., Krishnamurthy K.V. Springer, 2015. P. 656–669. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2286-6>
3. Fiaz S., Wang X., Younas A. et al. Apomixis and strategies to induce apomixis to preserve hybrid vigor for multiple generations // *GM Crops Food*. 2020. V. 12(1). P. 57–70. <https://doi.org/10.1080/21645698.2020.1808423>
4. Hand M.L., Koltunow A.M.G. The genetic control of apomixis: asexual seed formation // *Genetics*. 2014. V. 197(2). P. 441–450. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.163105>
5. Брюхин В.Б. Молекулярно-генетическая регуляция апомиксиса // *Генетика*. 2017. Т. 53. № 9. С. 1001–1024.
6. Vijverberg K., Ozias-Akins P., Schranz M.E. Identifying and engineering genes for parthenogenesis in plants // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00128>
7. Worthington M., Ebina M., Yamanaka N. et al. Translocation of a parthenogenesis gene candidate to an alternate carrier chromosome in apomictic *Brachiaria humidicola* // *Genomics*. 2019. V. 20(1). P. 41–58. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5392-4>
8. Xie E., Li Y., Tang D. et al. A strategy for generating rice apomixis by gene editing // *J. Integr. Plant Biol.* 2019. V. 61(8). P. 911–916. <https://doi.org/10.1111/jipb.12785>
9. Xiong J., Hu F., Ren J. Synthetic apomixis: The beginning of a new era // *Curr. Opinion in Biotechnol.* 2023. V. 79. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102877>
10. Vernet A., Meynard D., Lian Q. et al. High-frequency synthetic apomixis in hybrid rice // *Nat. Commun.* 2022. V. 13. P. 7963. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35679-3>
11. Sokolov V.A., Kravtchenko A.Yu., Nakagawa H., Knaty-pova I.Y. Apomictic maize-*Tripsacum* hybrids: genetics and breeding perspectives // *Grassland Sci.* 2002. V. 48. P. 342–343.
12. Белова И.В., Тараканова Т.К., Абдырахманова Э.А. и др. Хромосомный контроль апомиксиса у гибридов кукурузы с гамаграссом // *Генетика*. 2010. Т. 46. № 9. С. 1188–1191.
13. Sarkar K.R., Coe E.H., Jr. Origin of parthenogenetic diploids in maize and its implications for the production of homozygous lines // *Crop Sci.* 1971. V. 11. P. 543–544.
14. Petrov D.F., Belousova N.I., Fokina E.S. et al. Transfer of some elements of apomixis from *Tripsacum* to maize // *Apomixis and Its Role in Evolution and Breeding* / Ed Petrov D.F. New Delhi: Oxonian Press Ltd., 1984. P. 9–73.

15. Lamote V., Baert J., Roldán-Ruiz I. et al. Tracing of 2n EGG occurrence in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) using interploidy crosses // *Euphytica*. 2002. V. 123. P. 159–164.
<https://doi.org/10.1023/A:1014980123519>
16. Garcia-Aguilar M., Michaud C., Leblanc O., Grimanelli D. Inactivation of a DNA methylation pathway in maize reproductive organs results in apomixis-like phenotypes // *Plant Cell*. 2010. V. 22. P. 3249–3267.
<https://doi.org/10.1105/tpc.109.072181>
17. Kovalsky I.E., Neffa V.G.S. Evidence of the production of 2n eggs in diploid plants of the autopolyploid complex *Turnerasioides* L. (Passifloraceae) // *Plant Syst. Evol.* 2016. V. 302. P. 357–366.
<https://doi.org/10.1007/s00606-015-1268-0>
18. Lin B.-Y. Ploidy barrier to endosperm development in maize // *Genetics*. 1984. V. 107. P. 103–115.
<https://doi.org/10.1093/genetics/107.1.103>
19. Pennington P.D., Costa L.M., Gutierrez-Marcos J.F. et al. When genomes collide: Aberrant seed development following maize interploidy crosses // *Ann. Bot.* 2008. V. 101. P. 833–843.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcn017>
20. Birchler J.A. Interploidy hybridization barrier of endosperm as a dosage interaction // *Front. Plant Sci.* 2014. V. 5.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00281>
21. Хатевов Э.Б., Грушин А.А., Бойко В.Н. Цитогенетические факторы снижения фертильности пыльцы и початка при засорении посевов тетраплоидной кукурузы триплоидными зерновками (*Zea mays* L.) // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2022. Т. 183. № 1. С. 135–146.
22. Тырнов В.С., Еналеева Н.Х. Автономное развитие зародыша и эндосперма у кукурузы // Докл. АН СССР. 1983. № 3. С. 722–725.
23. Tsvetova M.I., Elkonin L.A., Italianskaya Yu.V. Diploid–tetraploid crosses as the instrument for obtaining apomictic maize plants // *Russ. Agric. Sci.* 2016. V. 2. № 3–4. P. 201–204.
<https://doi.org/10.3103/S106836741603023X>
24. Tsvetova M., Elkonin L., Italianskaya Y. Pseudogamous apomixis in maize and sorghum in diploid–tetraploid crosses // *Phyton*. 2019. V. 88. № 4. P. 389–401.
<https://doi.org/10.32604/phyton.2019.07485>
25. Мавлютова Л.И., Эльконин Л.А., Колесова А.Ю. Генотипирование диплоидных растений, полученных в результате диплоидно-тетраплоидных скрещиваний у линий и гибридов кукурузы, с генетически детерминированной способностью к партеногенезу // Вавиловские чтения – 2022. Межд. науч.-практ. конф. Саратов: Амирит, 2022. С. 137–142.
26. Шилов И.А., Колобова О.С., Анискина Ю.В. и др. Усовершенствование метода идентификации генов устойчивости к пирикуляриозу риса *PI-TA*, *PI-B* // Достижения науки и техники АПК. 2016. Т. 30. № 8. С. 45–48.
27. Settles A.M., Bagadion A.M., Bai F. et al. Efficient molecular marker design using the maize GDB Mo17 SNPs and indels track // *G3 (Bethesda)*. 2014. V. 4. P. 1143–1145.
<https://doi.org/10.1534/g3.114.010454>
28. Martin F., Dailey S., Settles A.M. Distributed simple sequence repeat markers for efficient mapping from maize public mutagenesis populations // *Theor. Appl. Genet.* 2010. V. 121. P. 697–704.
<https://doi.org/10.1007/s00122-010-1341-6>
29. Зайцев Г.Н. Математическая статистика в экспериментальной ботанике. М.: Наука, 1990. 424 с.
30. Сахаров В.В. Соматическая редукция как причина своеобразной мозаичности у тетраплоидной гречи // Докл. АН СССР. 1946. Т. 52. № 4. С. 349–352.
31. Raman V.S., Krishnaswami N. A chromosomal chimera in *S. halepense* (Linn.) // *Indian J. Agric. Sci.* 1955. V. 25. P. 45–50.
32. Rao P.N., Nirmala A. Chromosome numerical mosaicism in pearl millet (*Pennisetum americanum* (L.) Leeke) // *Genome*. 2011. V. 28. № 2. P. 203–206.
<https://doi.org/10.1139/g86-028>
33. Цветова М.И., Эльконин Л.А. Нестабильность уровня плоидности у аутотетраплоидов линии сорго с вариабельной мужской стерильностью // Генетика. 2002. Т. 38. № 5. С. 641–646.
34. Kasha K.J., Kao K.N. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.) // *Nature*. 1970. V. 225. P. 874–876.
<https://doi.org/10.1038/225874a0>
35. Zhang Z., Qiu F., Liu Y. et al. Chromosome elimination and *in vivo* haploid production induced by Stock 6-derived inducer line in maize (*Zea mays* L.) // *Plant Cell Rep.* 2008. V. 27 (12). P. 1851–1860.
<https://doi.org/10.1007/s00299-008-0601-2>
36. Li L., Xu X., Jin W., Chen S. Morphological and molecular evidences for DNA introgression in haploid induction via a high oil inducer *CAUHOI* in maize // *Planta*. 2009. V. 230. P. 367–376.
<https://doi.org/10.1007/s00425-009-0943-1>
37. Zhao X., Xu X., Xie H. et al. Fertilization and uniparental chromosome elimination during crosses with maize haploid inducers // *Plant Physiol.* 2013. V. 163. № 2. P. 721–731.
<https://doi.org/10.1104/pp.113.223982>
38. Qiu F., Liang Y., Li Y. et al. Morphological, cellular and molecular evidences of chromosome random elimination *in vivo* upon haploid induction in maize // *Curr. Plant Biol.* 2014. V. 1. P. 83–90.
<https://doi.org/10.5061/dryad.bt963>
39. Chenxu L., Xiang L., Dexuan M. et al. A 4-bp insertion at *ZmPLA1* encoding a putative phospholipase *a* generates haploid induction in maize // *Mol. Plant*. 2017. V. 10. № 3. P. 520–522.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.01.011>
40. Kelliher T., Starr D., Richbourg L. et al. MATRILIN-EAL, a sperm-specific phospholipase, triggers maize haploid induction // *Nature*. 2017. V. 542. P. 105.
<https://doi.org/10.1038/nature20827>
41. Fu S., Yin L., Xu M. et al. Maternal doubled haploid production in interploidy hybridization between *Brassica napus* and *Brassica allooctaploids* // *Planta*. 2018. V. 247. P. 113–125.
<https://doi.org/10.1007/s00425-017-2772-y>
42. Laurie D.A., Bennett M.D. The timing of chromosome elimination in hexaploid wheat × maize crosses // *Ge-*

- nome. 2011. V. 32(6). P. 953–961.
<https://doi.org/10.1139/g89-537>
43. Riera-Lizarazu O., Rines H.W., Phillips R.L. Cytological and molecular characterization of oat $\times$ maize partial hybrids // Theor. Appl. Genet. 1996. V. 93. P. 123–135.
<https://doi.org/10.1007/BF00225737>
 44. Gernand D., Rutten T., Varshney A. et al. Uniparental chromosome elimination at mitosis and interphase in wheat and pearl millet crosses involves micronucleus formation, progressive heterochromatinization, and DNA fragmentation // Plant Cell. 2005. V. 17. P. 2431–2438.
<https://doi.org/10.1105/tpc.105.034249>
 45. Kelliher T., Starr D., Wang W. et al. Maternal haploids are preferentially induced by CENH3-tailswap transgenic complementation in maize // Front. Plant Sci. 2016. V. 7.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00414>
 46. Wang N., Gent J., Dawe R. Haploid induction by a maize *cenH3* null mutant // Sci. Adv. 2021. V. 7. № 4.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.abe2299>
 47. Meng D., Luo H., Dong Z. et al. Over-expression of modified CENH3 in maize Stock6-Derived inducer lines can effectively improve maternal haploid induction rates // Front. Plant Sci. 2022. V. 13.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.892055>

Elimination of Chromosomes as a Mechanism for the Formation of Diploid Plants in Diploid–Tetraploid Crosses in Maize (*Zea mays* L.)

L. A. Elkonin^a, *, L. I. Mavlyutova^a, A. Yu. Kolesova^a, V. M. Panin^a, and M. I. Tsvetova^a

^aFederal Center of Agriculture Research of the South-East Region, Saratov, 410010 Russia

*e-mail: lelkonin@gmail.com

One of the main components of apomictic plant reproduction is the formation of unreduced embryo sacs (ESs). Heteroploid crosses, in which maternal diploid plants are pollinated by pollen of tetraploid paternal parent, can be used as an effective tool for identifying the ability to form unreduced ESs. In maize, in crosses $2n(\text{♀}) \times 4n(\text{♂})$, as a rule, shrunken kernels with a triploid embryo are formed, in which the development of the endosperm is impaired due to the deviation of the balance of the maternal (m) to paternal (p) genomes from the ratio of $2m : 1p$. In our experiments, in several diploid maize lines, after their pollination with tetraploid pollen, the formation of large plump kernels was observed, from which diploid maternal-type plants developed, the maternal-type phenotype, as well as the hybrid endosperm phenotype, were confirmed by the expression of genetic markers. It has been suggested that the plump kernels in $2n \times 4n$ crosses arise on the basis of unreduced embryo sacs (ESs) and pseudogamous apomixis, since the fusion of diploid sperms with diploid polar nuclei provides a $2 : 1$ ratio of maternal to paternal genomes in the endosperm. In order to clarify the genetic nature of diploid plants phenotypically similar to maternal lines that developed from plump kernels in $2n \times 4n$ crosses, we carried out their genotyping for all 10 chromosomes of the maize genome using polymorphic codominant SSR- and Indel-markers that differentiate the paternal line from maternal lines. As maternal lines, we used HPL AT, which has the ability to haploid parthenogenesis, KM, YuV-11, as well as the F_2 B47/HPL AT hybrid plants; and as a paternal line – Chernaya Tetra($4n$). It was found that in all the plants studied, when markers of five chromosomes (1, 2, 3, 4, and 9) were used, amplification of only maternal alleles was observed. However, in each of the studied plant, when using markers of other chromosomes, cases of amplification of alleles characteristic of the paternal line were noted. A hypothesis is put forward on the formation of diploid plants in $2n \times 4n$ crosses in maize as a result of fertilization of the unreduced ESs and the subsequent elimination of chromosomes, predominantly of the pollen parent.

Keywords: apomixes, DNA markers, heteroploid crosses, elimination of chromosomes.

ВЗАИМОСВЯЗЬ СОДЕРЖАНИЯ АНТОЦИАНОВ С УРОВНЕМ ЭКСПРЕССИИ РЕГУЛЯТОРНЫХ И СТРУКТУРНЫХ ГЕНОВ ПУТИ БИОСИНТЕЗА АНТОЦИАНОВ У ВИДОВ ПЕРЦА *Capsicum* L.

© 2023 г. М. А. Филюшин¹*, А. В. Щенникова¹, Е. З. Кочиева¹

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

*e-mail: michel7753@mail.ru

Поступила в редакцию 03.04.2023 г.

После доработки 24.04.2023 г.

Принята к публикации 26.04.2023 г.

В данной работе охарактеризованы содержание антоцианов и профиль экспрессии регуляторных (*CaMYB113*, *CaMYB1* и *CaMYB1-like*) и структурных (*CaCHS*, *CaCHI*, *CaF3H*, *CaDFR*, *CaANS*, *CaUFGT1* и *CaGSTF12*) генов пути биосинтеза антоцианов в листьях, лепестках цветка и кожице незрелого плода сортов перца *Capsicum frutescens* L. (Самоцвет, Рождественский букет и Эврика), различающихся паттерном антоциан-опосредованной пигментации надземных органов. Выявлена положительная корреляция уровня транскриптов *CaCHS*, *CaF3H*, *CaDFR*, *CaANS* и *CaCSTF12* с количеством антоцианов в листьях данных сортов. Показано, что из трех регуляторных генов экспрессируется только *CaMYB113*. На примере десяти сортов трех видов перца *Capsicum* подтверждено присутствие 5'-UTR в мРНК *CaMYB113*. В геноме сортов Рождественский букет и Самоцвет с фиолетовой окраской анализируемых органов выявлен второй вариант аллеля гена *CaMYB113* с инсерцией ретротранспозона *LINE-1* в интроне I.

Ключевые слова: *Capsicum* spp., сорта перца, биосинтез антоцианов, MYB113, содержание антоцианов, экспрессия гена.

DOI: 10.31857/S0016675823090047, **EDN:** WUBUUN

Род *Capsicum* (Solanaceae) объединяет около 35 видов перца, из которых культивируются только пять — *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* и *C. pubescens* [1, 2]. Плоды перца являются важной составляющей диеты человека, поскольку они богаты питательными веществами, а также антиоксидантами — аскорбатом, каротиноидами и флавоноидами [3]. Каротиноиды и относящиеся к флавоноидам антоцианы в совокупности с хлорофиллами определяют окраску плодов перца [4, 5]. Незрелые плоды имеют зеленую или фиолетовую окраску благодаря присутствию разных соотношений хлорофиллов и антоцианов. По мере созревания плода окраска становится красной, желтой или оранжевой за счет усиления синтеза и накопления каротиноидов. При этом каротиноиды запасаются благодаря формированию на данной стадии хромoplastов и секвистрирующих структур внутри них, тогда как антоцианы накапливаются в вакуолях и могут влиять на пигментацию не только плодов, но также корней, листьев, стеблей и цветковых органов.

У видов *Capsicum* антоциан-ассоциированная окраска определяется присутствием производ-

ных дельфинидина, придающих тканям сине-фиолетовые оттенки [6]. Такая окраска характерна для гипокоты и, реже, кожицы незрелого плода. Некоторые генотипы отличаются фиолетовой окраской всех надземных органов (листьев, стеблей, цветков и плодов). Ряд образцов *C. chinense* сохраняет фиолетовую окраску плода на всех стадиях его созревания, включая спелость [7].

Путь биосинтеза антоцианов у растений высоко консервативен и является ветвью флавоноидного пути. Дельфинидин, равно как и другие два антоцианидина (пеларгонидин и цианидин), образуются в результате последовательных реакций, катализируемых халконсинтазой (CHS), халконизомеразой (CHI), флаванон-3-гидроксилазой (F3H), флавоноид-3'-гидроксилазой (F3'H), флавоноид-3'5'-гидроксилазой (F3'5'H), дигидрофлавонол-4-редуктазой (DFR) и антоцианидинсинтазой (ANS). Антоцианидины затем гликозилируются с помощью UDP-глюкозофлавоноид-3-О-глюкозилтрансферазы (UFGT) с получением стабильных и водорастворимых пигментов [8, 9]. Транспорт антоцианов из цитозоля в вакуоль осуществляется

специфической глутатион-S-трансферазой класса phi (GSTF12) [10].

Профиль экспрессии структурных генов пути биосинтеза антоцианов координируется MBW-комплексом, состоящим из транскрипционных факторов (ТФ) семейств R2R3-MYB, bHLH и WD-repeat [8, 11]. Различия в составе MBW-комплекса определяют пространственно-временную регуляцию синтеза флавоноидов [12].

Согласно результатам генетических исследований, у видов *Capsicum* биосинтез антоцианов регулируется локусом *A*, картированным на хромосоме 10 [13, 14]. В данном локусе идентифицирован ген транскрипционного фактора (ТФ) семейства R2R3-MYB, ортологичный гену *anthocyanin2* (*Petunia* × *hybrida* Hort. ex E. Vilm., 1863 [4]. Позднее секвенирование геномов *C. annuum* показало, что локус *A* содержит не один, а три гена, кодирующих ТФ семейства R2R3-MYB: *MYB113* (LOC107844888; синонимы *CaMYBA*, *anthocyanin2* (*AN2*)), *MYB1* (LOC107854818; синоним *CaMYBB*) и *MYB1-like* (LOC107844901; синоним *CaPHZ*). В геноме других видов Solanaceae идентифицировано три (картофель *Solanum tuberosum* L. (*StAN1*, *StMYBA1* и *StAN2/MYB113*), баклажан *Solanum melongena* L. (*SmMYB1*, *SmMYB2* и *SmMYB75*)) и четыре (*P. × hybrida* (*PhAN2*, *PhAN4*, *PhPHZ* и *PhDPL*), томат *Solanum lycopersicum* L. (*SlANT1*, *SlAN2*, *SlMYB75* и *SlMYB113*)) гена ТФ R2R3-MYB, связанных с регуляцией биосинтеза антоцианов [16–19]. У томата и картофеля данные гены, как и у перца, расположены tandemно на хромосоме 10, тогда как у петунии и баклажана их хромосомная локализация неизвестна в связи с отсутствием финальной сборки генома по хромосомам.

Дальнейшие исследования показали, что из трех R2R3-MYB генов перца, которые связывают с регуляцией биосинтеза антоцианов, только один — *CaMYB113* (*CaMYBA*) экспрессируется в цветках и плодах фиолетовой окраски [20]. Рост уровня транскриптов данного гена сопровождается увеличением содержания дельфинидина в плоде [21]. Более того, наличие транскрипционной активности гена критично для пигментации ткани и связано с инсерцией ретротранспозона *LINE-1* в интроне I *CaMYB113* в геноме сортов, формирующих фиолетовые плоды и цветковые лепестки [20]. До недавнего времени данный интрон считался частью промотора [22]. Анализ структуры гена без интрона I у сортов *C. chinense* с различной окраской плода обнаружил высокий уровень сходства гомологов. Кроме того, показана положительная зависимость экспрессии *CcDFR* и *CcUGFT* и содержания антоцианов в коже плода от уровня транскриптов *CcMYB113* [7].

В настоящей работе последовательности гена *CaMYB113* были идентифицированы и охарактеризованы у десяти сортов перца трех видов (*C. an-*

nuum, *C. frutescens* и *C. chinense*), различающихся окраской листьев, лепестков цветка и кожицы незрелого плода. У трех сортов *C. frutescens* были определены содержание антоцианов и профиль экспрессии регуляторных и структурных генов пути биосинтеза антоцианов в надземных органах растений, на основе чего была проведена оценка возможных корреляционных связей между полученными данными.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для работы использовали сорта перца *C. annuum* (Сибиряк, Гранат, Желтый букет, Сиреневый куб, Отелло и Янтарь), *C. frutescens* (Самоцвет, Рождественский букет и Эврика) и *C. chinense* (Pimenta da Neyde) (табл. 1). Семена были любезно предоставлены Федеральным научным центром овощеводства (Московская обл.). Выбранные сорта различались окраской листьев, лепестков цветка и кожицы незрелого плода (табл. 1). Сорта Сибиряк, Гранат и Желтый букет отличались от других сортов отсутствием фиолетовой окраски данных тканей. Для сортов Сиреневый куб, Отелло, Янтарь и Эврика была характерна фиолетовая окраска кожицы незрелого плода. У сортов Самоцвет и Рождественский букет все надземные органы имели фиолетовую пигментацию, которая у спелых плодов менялась на красную. Сорт Pimenta da Neyde также формировал фиолетово-окрашенные листья, лепестки и плоды, однако плоды сорта сохраняли данную пигментацию до стадии биологической спелости.

Растения выращивали в экспериментальной установке искусственного климата (ЭУИК, ФИЦ Биотехнологии РАН; день/ночь — 16/8 ч, 22/16°C; освещенность 190 мкМ/(м²/с)). Геномную ДНК выделяли из 10-дневных проростков с помощью СТАВ-буфера [23]. Последовательности *CaMYB113* амплифицировали с помощью разработанных праймеров (табл. 2) и секвенировали на ABI Prism 3700 DNA Analyzer (ЦКП Биоинженерия, ФИЦ Биотехнологии РАН).

Выравнивание и структурно-филогенетический анализ последовательностей проводили в программе MEGA 7.0.26 (<https://www.megasoftware.net/>). Для построения дендрограммы использовали последовательности анализируемых белков и их ортологов из других видов Пасленовых (томат, картофель, баклажан) и *Arabidopsis thaliana* L. (метод Neighbor-Joining, 1000 бутстреп-реплик). Консервативные домены и мотивы в белках определяли с помощью NCBI-CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), MEME5.1.1 (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) и литературных данных.

Биохимический и экспрессионный анализы проводили с использованием сортов Эврика,

Таблица 1. Наличие/отсутствие (+/–) фиолетовой окраски органов у анализируемых сортов перца

Вид	Сорт	Листья	Лепестки цветка	Кожица незрелых плодов
<i>C. annuum</i>	Сибиряк	–	–	–
	Гранат	–	–	–
	Желтый букет	–	–	–
	Сиреневый куб	–	–	+
	Отелло	–	–	+
	Янтарь	–	–	+
<i>C. frutescens</i>	Самоцвет	+	+	+
	Рождественский букет	+	+	+
	Эврика	–	–	+
<i>C. chinense</i>	Pimenta da Neyde	+	+*	+

* – только нижняя сторона лепестков имеет светло-фиолетовую окраску.

Таблица 2. Последовательности праймеров, использованные в данной работе

Ген	Праймер	Последовательность (5' → 3')	Применение	Ожидаемый размер ампликона, пн
<i>CaMYB113</i>	an2-F	TTAAAAGTAAGACGAAGGGAT	Амплификация и секвенирование гена	1600
	an2-R	TACTTGGGATAGTACGAAC		
	L1-F	GGTGGCAGAAATGCGGATG		
	an2-prF	GGAAGGAGGCTAGTCAAATC	Детекция ретротранспозона <i>LINE-1</i>	1020/5300
	an2-R2	AACATGAACTTGCCTGTTGC		(при наличии вставки <i>LINE-1</i>)
	MYB113-rtF	GCAGAAAGAGCTGTAGATTGAG		
<i>CaMYB1</i>	MYB113-rtR	TCTCTTGTCGATGAGGAGCAG	РВ-ПЦР	131
	MYB1-rtF	GTCGGAAGAGCTGCAGACTTC		150
	MYB1-rtR	CTTCCCGGAAGTCTACCAGCA		
<i>CaMYB1-like</i>	MYB1-like-rtF	GAGGTGACTTCGATCCAGACG		145
	MYB1-like-rtR	CCTCAGAAGGTGAGTGTTCCTCAA		
<i>CaMYC</i>	CaMYC-rtF	CAATGGGGCTATAAAGACTAGGAA		215
	CaMYC-rtR	GGAAAAGAGAAAGAAACACACATG		
<i>CaCHS</i>	CaCHS-rtF	CTGTGTTGATCAAGCCACCTATC		194
	CaCHS-rtR	CTAGCATCAAGAGAAGGAGCCA		
<i>CaCHI</i>	CaCHI-rtF	TACTCAATCACCGGCTGGG		151
	CaCHI-rtR	CTTTGCGGCAGGTGAACTC		
<i>CaF3H</i>	CaF3H-rtF	GGATCACGGTTAAGCCCATTG		119
	CaF3H-rtR	TGCTATTTCGAGTTCACCACTGC		
<i>CaDFR</i>	CaDFR-rtF	GCTGGATTATCGGCTCTTGG		152
	CaDFR-rtR	GTCTGCTTTCCACAGCGTTAAG		
<i>CaANS</i>	CaANS-rtF	CAAATGCCCACAACCAGAACTAGC		142
	CaANS-rtR	CGCACTTTGCAGTTACCACTTTC		
<i>CaUFGT1</i>	CaUFGT1-rtF	CAATGAAAGAGGCAGAGGAGGA		123
	CaUFGT1-rtR	GCAGTCCAAAATGCAATCCAAGG		
<i>CaGSTF12</i>	CaGSTF12-rtF	GGTATACAACATGGTACTCCAAC		181
	CaGSTF12-rtR	GGAGGTGGCTTAGATCAGC		



Рис. 1. Внешний вид листьев, цветков и плодов (незрелого (1) и биологической спелости (2)) сортов перца Эврика, Рождественский букет и Самоцвет.

Рождественский букет и Самоцвет. Растения выращивали до стадии плодоношения и собирали листья, лепестки цветка и кожицу незрелых плодов (рис. 1). Собранные ткани растирали в жидком азоте и использовали для выделения суммарной РНК (RNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN, Германия) с последующей очисткой от примесей геномной ДНК (RNase free DNasey set, QIAGEN, Германия). Полученные препараты РНК использовали для синтеза кДНК (GoScript™ Reverse Transcription System, Promega, США). Содержание суммы антоцианов (в пересчете на дельфинидин-3-рутинозид) определяли спектрофотометрически в хлороформ-метанольных экстрактах, в двух биологических и трех технических повторах, согласно методике [24].

Профиль экспрессии анализируемых генов определяли методом количественной ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР). Относительный уровень экспрессии генов оценивали, нормализуя его по референсным генам *GAPDH* (LOC107862704) и *UBI* (LOC107873556). РВ-ПЦР проводили с использованием разработанных праймеров (табл. 2), 3 нг кДНК-матрицы, набора “Реакционная смесь для проведения РВ-ПЦР в присутствии SYBR GreenI и ROX” (ООО “Синтол”, Россия) и амплификатора CFX96 Real-Time

PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США). Реакции выполняли 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 $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Визуализацию данных и регрессионный анализ проводили с помощью программы GraphPad Prism v 7.02 (<https://www.graphpad.com>).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика генов CaMYB113, CaMYB1 и CaMYB1-like. Из локуса *A* генома перца сорта UCD-10X-F1 (GCF_002878395.1) были извлечены последовательности трех генов, *CaMYB113*, *CaMYB1* и *CaMYB1-like*, кодирующих высокомолекулярные (идентичность 56–68%) ТФ семейства R2R3-MYB (табл. 3). Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей *CaMYB113*, *CaMYB1* и *CaMYB1-like* показал, что все они содержат характерные для семейства R2R3-MYB домены (R2 (56 ак) и R3 (43 ак)) и консервативные мотивы ([D/E]Lx2[R/K]x3Lx6Lx3R и ANDV (кроме *CaMYB1-like*)) (рис. 2).

Проведенный филогенетический анализ белковых последовательностей *CaMYB113*, *CaMYB1* и *CaMYB1-like* и их ортологов из других видов *So-*

Таблица 3. Характеристика генов ТФ R2R3-MYB, расположенных в локусе *A* генома перца *S. annuum* (сорт UCD-10X-F1, сборка GCF_002878395.1)

Ген (синонимы)	Ген ID	Локализация в геноме	Длина, пн	CDS, пн	Белок, ао	MW, кДа
<i>CaMYB113</i> (<i>CaMYBA</i> , <i>anthocyanin2</i>)	LOC107844888	chr10: 173281194–173282672	1479	789	262	30.2
<i>CaMYB1</i> (<i>CaMYBB</i>)	LOC107854818	chr10: 175096270–175097356	1086	702	233	26.7
<i>CaMYB1-like</i> (<i>CaPHZ</i>)	LOC107844901	chr10: 175943586–175945054	1468	723	240	27.8

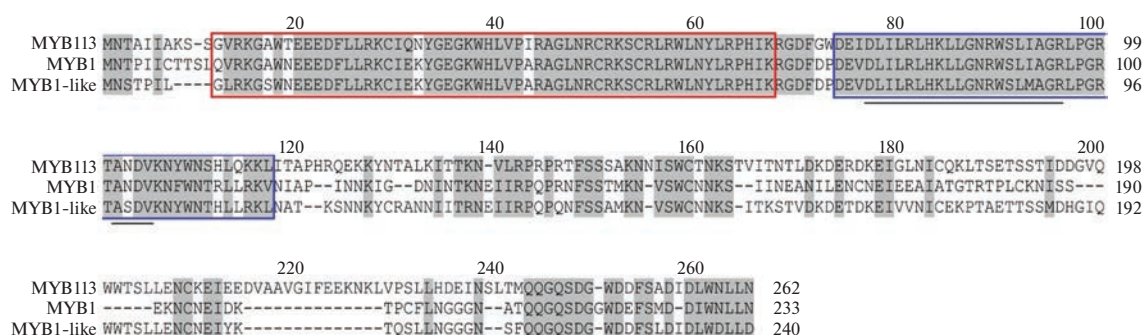


Рис. 2. Выравнивание аминокислотных последовательностей MYB113, MYB1 и MYB1-like *C. annuum* (сорт UCD-10X-F1). Красной рамкой выделен домен R2, синей рамкой — домен R3. Консервативные мотивы [D/E]Lx2[R/K]x3Lx6Lx3R и ANDV подчеркнуты черным.

lanaseae и модельного вида *A. thaliana* разделил ТФ на три клады. Белки *A. thaliana* сгруппировались отдельно (клада III), тогда как белки Пасленовых распределились по кладам I и II, каждая из которых в свою очередь делилась на два кластера. CaMYB113 попал в кластер I(1) вместе с MYB113 томата и картофеля и MYB2 баклажана. Структурно близкие друг другу белки CaMYB1 и CaMYB1-like были отнесены в кластер II(4) вместе с AN1 картофеля. Кластер II(3) содержал более отдаленные гомологи MYB1 из томата и баклажана. Таким образом, на дендрограмме белки CaMYB113, CaMYB1 и CaMYB1-like сгруппировались с соответствующими ортологами других видов Solanaceae (рис. 3,а).

Анализ консервативных мотивов в анализируемых белковых последовательностях выявил различия между кластерами MYB113 I(1), MYB75 I(2) и MYB1 II (рис. 3,а, б). Мотивы 8, 10, 12 и 13 отличали белки *A. thaliana* от их ортологов у Пасленовых, тогда как мотивы 2, 3, 5, 6, 7, 9 и 14 присутствовали только у ТФ Пасленовых. Среди последних мотив 14 (консенсус IQENKYNNAL) был специфичен только для белков кластера MYB113 I(1). Гомологи MYB1 клады II различались, главным образом, отсутствием (кластер 3)/наличием (кластер 4) мотива 7 (рис. 3,б).

Согласно последней версии сборки генома перца *C. annuum* сорта UCD-10X-F1 (NCBI:GCF_002878395.1), ген *CaMYB113* (NM_001324618.1, LOC107844888) состоит из четырех экзонов и трех интронов. Первый экзон и начало второго экзона относятся к нетранслируемой области гена, и интрон между ними различается между генотипами перца протяженным инделем (~4.3 тпн) ретротранспозона *LINE-1* (рис. 4,б), который предположительно участвует в активации экспрессии *CaMYB113* [20].

Для подтверждения наличия 5'-UTR в структуре мРНК *CaMYB113* (LOC107844888) (рис. 4,а) предполагаемая полная последовательность

мРНК была амплифицирована с помощью праймеров an2-prF/an2-R (рис. 4,б; табл. 2) на кДНК из листьев, лепестков цветка и фиолетово-окрашенной кожицы незрелого плода сортов Эврика, Рождественский букет и Самоцвет (*C. frutescens*). Фрагменты ожидаемой длины (~1100 пн) были получены для всех анализируемых образцов, за исключением листьев и лепестков сорта Эврика (рис. 5), что согласуется с различиями в окраске листьев и лепестков (фиолетовые vs. зеленые/белые) у анализируемых сортов (рис. 1). В результате секвенирования и структурного анализа ампликонов было подтверждено, что мРНК *CaMYB113* состоит из четырех экзонов и полностью соответствует референсу (LOC107844888) (рис. 4,а).

Для определения варибельности последовательности *CaMYB113* и возможного присутствия в первом интроне ретротранспозона *LINE-1* [20] был проведен анализ структуры гена у 10 сортов перца, семь из которых формируют незрелые плоды с кожицей фиолетовой окраски (табл. 1). Для этого на геномной ДНК образцов с помощью разработанных праймеров (табл. 2, рис. 4) были амплифицированы и секвенированы два участка последовательности гена *CaMYB113*: “экзон 2—экзон 4” (праймеры an2-F и an2-R) (рис. 6,а) и “экзон 1—экзон 2” (an2-prF и an2-R2) (рис. 6,б). Размер ампликонов был одинаков для всех анализируемых сортов перца как в случае фрагмента an2-F/an2-R, так и в варианте an2-prF/an2-R2.

Сравнительный анализ кодирующих последовательностей *CaMYB113* (на основе полученных ампликонов an2-F/an2-R) анализируемых сортов с референсом (сорт UCD-10X-F1) выявил 5 SNPs: g36→с (Pimenta da Neyde), a1064→g (Сибиряк, Отелло, Янтарь, Эврика, Pimenta da Neyde), a1073→g (Pimenta da Neyde), c1094→a (Сибиряк, Отелло, Янтарь, Эврика, Pimenta da Neyde) и a1284→t (Pimenta da Neyde). Три полиморфизма (a1064→g, c1094→a и a1284→t) оказались несинонимичными и приводили к замещениям ами-

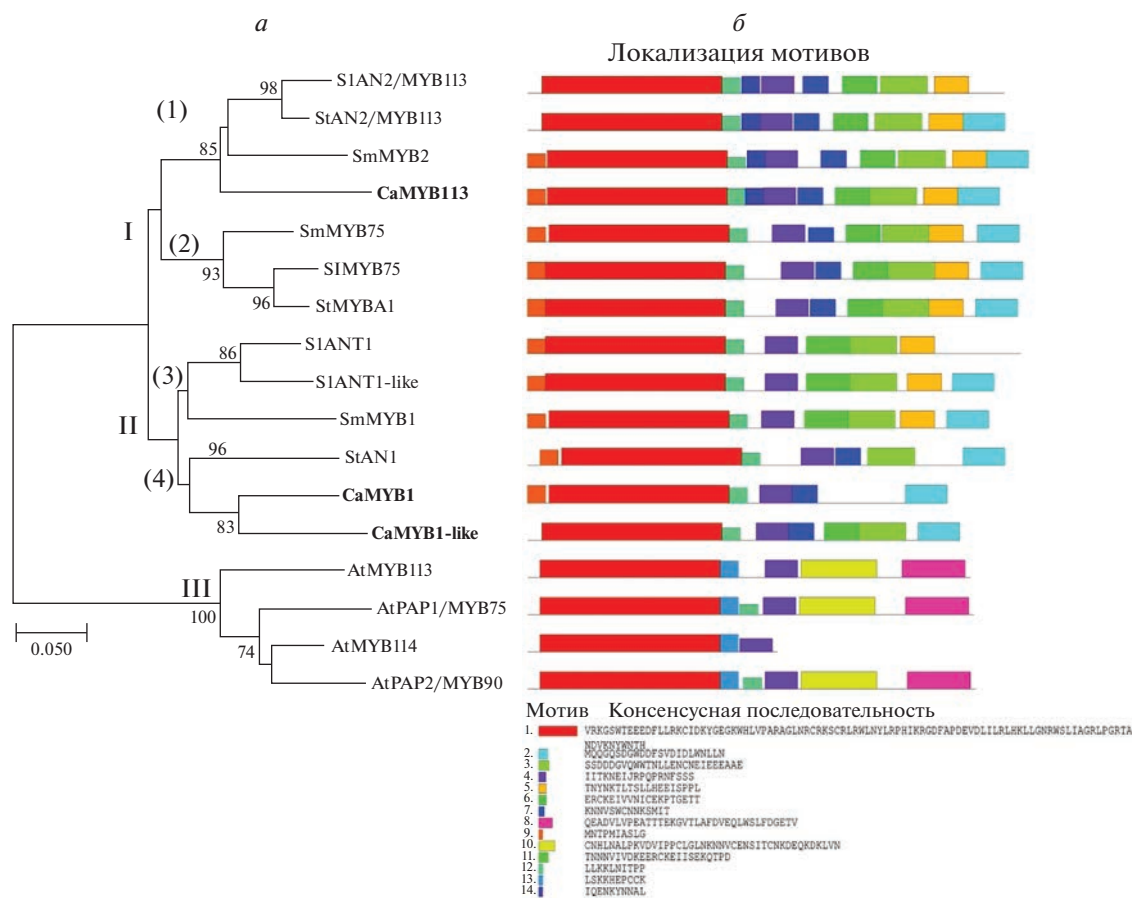


Рис. 3. Филогенетическая дендрограмма (а) и схема консервативных мотивов (б), основанные на данных анализа белковых последовательностей ТФ семейства R2R3-MYB *C. annuum* (CaMYB113 (NM 001324618.1), CaMYB1 (XM 047398268.1) и CaMYB1-like (XM 016689227.2)), *S. lycopersicum* (SIAN2/MYB113 (NM 001375636.1), SIMYB75 (NM 001279063.2), SIAN1 (NM 001247488.1) и SIAN1-like (XM 004249620.3)), *S. tuberosum* (StAN2/MYB113 (KU242748.1), StMYBA1 (NM 001318609.1) и StAN1 (XM 015304750.1)), *S. melongena* (SmMYB1 (KF727476.1), SmMYB2 (KF727477.1) и SmMYB75 (MW227236.1)) и *A. thaliana* (AtMYB113 (NM 105308.2), AtMYB114 (NM 105309.4), AtPAP1/MYB75 (NM 104541.4) и AtPAP2/MYB90 (NM 105310.4)). Дендрограмма построена с помощью программы MEGA7.0.26 (метод Neighbor-Joining, 1000 бутстреп-реплик). Консервативные мотивы определены с помощью MEME5.1.1.

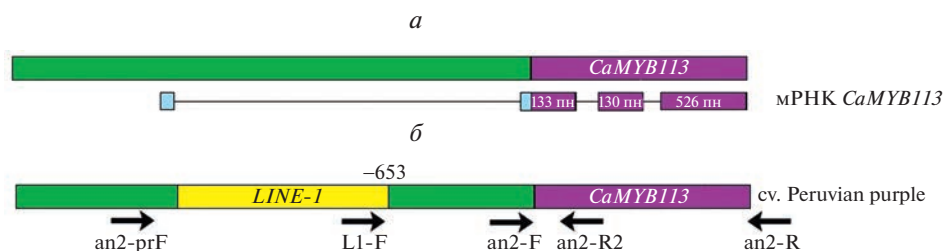


Рис. 4. Структура гена и мРНК *CaMYB113* *C. annuum* сорта UCD-10X-F1 (GCF_002878395.1) (а); структура гена *CaMYB113* *C. annuum* сорта Peruvian purple (LC473089.1) и локализация разработанных праймеров (табл. 2) (б). Зеленый участок представляет область 5'-UTR, фиолетовый – область гена, содержащая кДНК. На схеме мРНК *CaMYB113* (а) фиолетовыми блоками обозначены кодирующие экзоны, голубыми – нетранслируемые экзоны, линиями между блоками – интроны. На схеме (б) желтый блок соответствует ретротранспозону *LINE-1* в области первого интрона *CaMYB113* сорта Peruvian purple.

ноктислотных остатков (K125→R, T135→K и Q198→H соответственно). Сравнительный анализ интрона I у 10 сортов с референсом обнаружил 15 SNPs и четыре коротких инделя (1, 3, 6 и 8 пн).

Для выявления в геноме анализируемых сортов варианта аллеля гена *CaMYB113*, содержащего в первом интроне вставку ретротранспозона *LINE-1*, была проведена ПЦР на геномной ДНК с

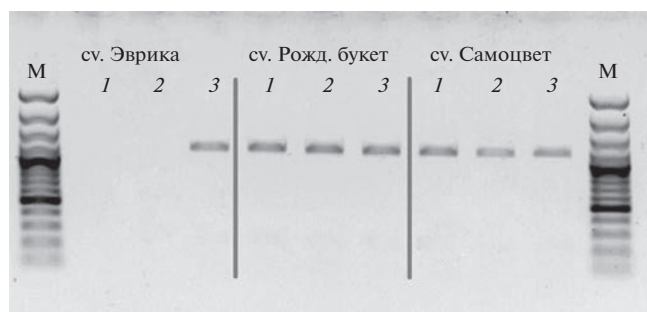


Рис. 5. Электрофоретическое разделение в 1.5%-агарозном геле ПЦР-продуктов, амплифицированных с помощью пары праймеров an2-prF/an2-R на препаратах кДНК из листьев (1), лепестков цветка (2) и кожицы незрелого плода (3) сортов (cv.) Эврика, Рождественский (Рожд.) букет и Самоцвет. М – маркер длин GeneRuler DNA Ladder Plus 100 bp Plus (Thermo Fisher Scientific).

праймерами L1-F и an2-R2 (табл. 2; рис. 4,б). В результате данный вариант аллеля (*CaMYB113*-L1) был идентифицирован у сортов Самоцвет и Рождественский букет (рис. 6,в), что подтверждено секвенированием и сравнением ампликонов с референсом; последовательности, идентичные у анализируемых сортов, отличались от последовательности сорта Peruvian purple (LC473089.1) семью SNPs. Мы пытались амплифицировать у сортов Самоцвет и Рождественский букет с помощью праймеров an2-prF/an2-R полногеномную последовательность аллеля *CaMYB113*-L1 и отдельно первый интрон, содержащий вставку ретротранспозона (праймеры an2-prF/an2-R2), однако по непонятной причине нам не удалось амплифицировать этот аллель. Поэтому о наличии аллеля *CaMYB113*-L1 у сортов Самоцвет и Рождественский букет мы судим по фрагменту (амплифицированному с помощью праймеров L1-F и an2-R2), содержащему 3'-конец ретротранспозона на *LINE-1*, интрон 1 и экзон 2.

Таким образом, можно предположить, что геном сортов Самоцвет и Рождественский букет содержит два аллеля гена *CaMYB113* – со вставкой ретротранспозона *LINE-1* (*CaMYB113*-L1) и без нее (*CaMYB113*). Нам не удалось амплифицировать у данных сортов фрагмент аллеля *CaMYB113*-L1 “экзон 1–экзон 2” (an2-prF/an2-R2), который включал бы полную последовательность (4.3 тпн) *LINE-1*, что может объясняться предпочтительной амплификацией значительно более короткого соответствующего фрагмента аллеля *CaMYB113*. Полученные данные согласуются с различиями в окраске листьев (фиолетовая vs. зеленая) анализируемых сортов перца (табл. 1), за исключением сорта Pimenta da Neyde (*C. chinense*). Все анализируемые органы данного образца, подобно сортам Самоцвет и Рождественский букет, имеют фиолетовую окраску, однако фрагмент L1-F/an2-R2 на

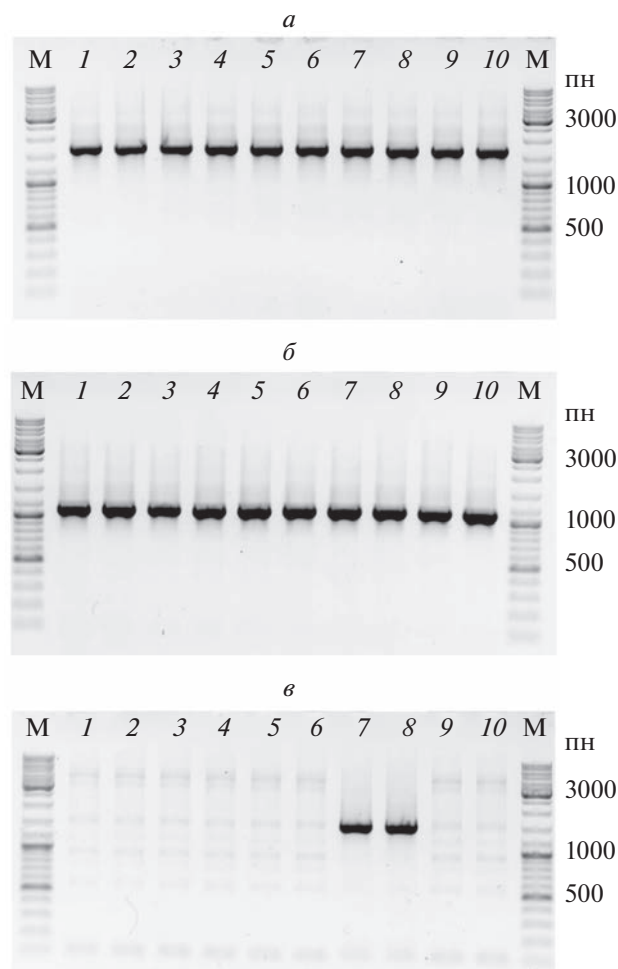


Рис. 6. Разделение в 1.5%-агарозном геле ПЦР-продуктов, амплифицированных с помощью пар праймеров an2-F/an2-R (а), an2-prF/an2-R2 (б) и L1-F/an2-R2 (в) на препаратах геномной ДНК проростков анализируемых сортов перца: 1 – Сибиряк, 2 – Гранат, 3 – Желтый букет, 4 – Сириновый куб, 5 – Отелло, 6 – Январь, 7 – Самоцвет, 8 – Рождественский букет, 9 – Эврика, 10 – Pimenta da Neyde.

геномной ДНК сорта Pimenta da Neyde не амплифицировался (рис. 6,в). Это может быть связано с генотип-специфичными полиморфизмами в последовательности *LINE-1*, которые могли повлиять на отжиг праймера L1-F.

Содержание антоцианов. Профили экспрессии генов ТФ семейств R2R3-MYB и bHLH, ферментов пути биосинтеза антоцианов, а также транспортера антоцианидинов. С целью оценки зависимости накопления антоцианов от активности генов пути их биосинтеза в листьях, лепестках цветка и кожице незрелого плода сортов Эврика, Рождественский букет и Самоцвет была определена сумма антоцианов и профили экспрессии генов ТФ (*CaMYB113*, *CaMYB1*, *CaMYB1*-like и *CaMYC*), ферментов (*CaCHS*, *CaCHI*, *CaF3H*, *CaDFR*,

CaANS, CaUFGT1) флавоноидного пути и транспортера антоцианидинов (CaGSTF12).

В результате у сорта Эврика антоцианы были выявлены только в кожице плода (~68 мкг/г), тогда как у сортов Рождественский букет и Самоцвет — во всех анализируемых органах с максимумом в кожице плода (~274 мкг/г) (Рождественский букет) и в листьях (~845 мкг/г) (Самоцвет) (рис. 7,а). В кожице плода сорта Рождественский букет содержание антоцианов было в 3 и 5.4 раза выше, чем в листьях и лепестках, тогда как у сорта Самоцвет количество антоцианов в листьях превышало в 18 и 15 раз таковое в лепестках и кожице плода соответственно.

Данные экспрессионного анализа показали отсутствие транскриптов *CaMYB1* и *CaMYB1-like* в исследуемых образцах. В случае сортов Самоцвет и Рождественский букет все остальные анализируемые гены транскрибировались во всех тканях, за исключением экспрессии *CaCHI* в кожице плода (рис. 7).

В случае сорта Эврика низкие уровни транскриптов четырех генов (*CaMYB113*, *CaMYC*, *CaF3H* и *CaUFGT1*) были обнаружены в кожице плода; в лепестках цветка присутствовала мРНК трех генов (*CaCHS*, *CaCHI* и *CaF3H*) и в листьях — одного (*CaCHI*) (рис. 7,б–к). Таким образом, регуляторные гены показывали слабую активность и только в кожице незрелого плода данного сорта.

Уровень экспрессии генов *CaMYB113* и *CaMYC* в кожице плода у сорта Эврика был значительно ниже экспрессии генов у двух других сортов, где мРНК *CaMYB113* и *CaMYC* детектировалась также в листьях и лепестках (рис. 7,б, в). При этом наибольшие межсортные различия наблюдались для гена *CaMYB113*. Так, в сравнении с сортами Рождественский букет и Самоцвет уровень транскриптов *CaMYB113* в кожице плода сорта Эврика был ниже в 31–40 и 48–72 раза соответственно. Отметим также, что у сорта Рождественский букет уровень транскриптов *CaMYB113* в листьях, лепестках и кожице плода был сопоставим, тогда как у сорта Самоцвет сходный уровень экспрессии в лепестках и кожице плода был ниже, чем в листьях (рис. 7,б).

Профиль экспрессии второго регуляторного гена *CaMYC* никак не согласовался с профилем *CaMYB113*. Сопоставимые уровни транскриптов *CaMYC* в листьях и лепестках сорта Рождественский букет превышали экспрессию гена в кожице плода в ~7 раз. У сорта Самоцвет экспрессия *CaMYC* была наиболее высокой в листьях, превышая уровень транскриптов гена в лепестках и кожице плода в 5.1 и 3.5 раза соответственно (рис. 7,в).

Несмотря на то что транскрипты структурных генов присутствовали во всех анализируемых органах сортов Рождественский букет и Самоцвет, профиль экспрессии этих генов значительно ва-

рировал между сортами. Так, количество мРНК *CaCHS*, *CaCHI*, *CaDFR*, *CaANS*, *CaUFGT1* и *CaGSTF12* было наибольшим в лепестках (Рождественский букет) или листьях (Самоцвет), а *CaF3H* — в кожице плода (Рождественский букет) или в лепестках и кожице плода (Самоцвет) (рис. 7,г–к).

Профили экспрессии анализируемых генов были сопоставлены с содержанием антоцианов. В результате с учетом совокупных данных по исследуемым органам для всех трех сортов перца была обнаружена положительная корреляция ($r = 0.93$, $p\text{-value} = 0.0002$) суммы антоцианов с уровнем транскриптов гена *CaDFR*. В случае остальных генов значимых корреляций показано не было ($r = 0.08\text{--}0.61$, $p\text{-value} > 0.05$). Анализ данных по отдельным органам трех исследуемых сортов выявил значимую корреляцию для генов *CaCHS*, *CaF3H*, *CaDFR*, *CaANS* и *CaCSTF12* ($r = 0.99$, $p\text{-value} < 0.05$) по отношению к содержанию антоцианов в листьях.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе была проведена оценка возможных корреляций содержания антоцианов с уровнем экспрессии регуляторных и структурных генов пути биосинтеза антоцианов. В качестве объекта исследований были использованы десять сортов перца трех родственных видов (*C. annuum*, *C. frutescens* и *C. chinense*), которые различались присутствием/отсутствием фиолетовой пигментации листьев, лепестков цветка и кожицы незрелого плода (табл. 1, рис. 1).

В результате проведенных экспериментов была продемонстрирована прямая зависимость окраски органов (табл. 1) от суммы антоцианов (рис. 7,а), которая, в свою очередь, положительно коррелировала с активностью структурных (*CaCHS*, *CaF3H*, *CaDFR*, *CaANS*) и транспортно-го (*CaCSTF12*) генов в листьях сортов Эврика, Рождественский букет и Самоцвет (рис. 7). В целом это дополняет данные по структурным генам пути биосинтеза антоцианов у перца, полученные нами ранее [5, 7, 25].

В MBW-комплексе, который регулирует транскрипцию генов флавоноидного пути, главная роль принадлежит ТФ R2R3-MYB. От представителя семейства, входящего в комплекс, зависит тип воздействия на ген: активация или подавление транскрипции и, как следствие, усиление или ослабление синтеза антоцианов [26]. Из трех генов данного семейства, проанализированных в настоящей работе (*CaMYB113*, *CaMYB1* и *CaMYB1-like*), которые кодируют гомологичные белки (рис. 2), только *CaMYB113* экспрессировался в исследуемых образцах перца (рис. 7,б). Нетранскрибируемые *CaMYB1* и *CaMYB1-like* являются го-

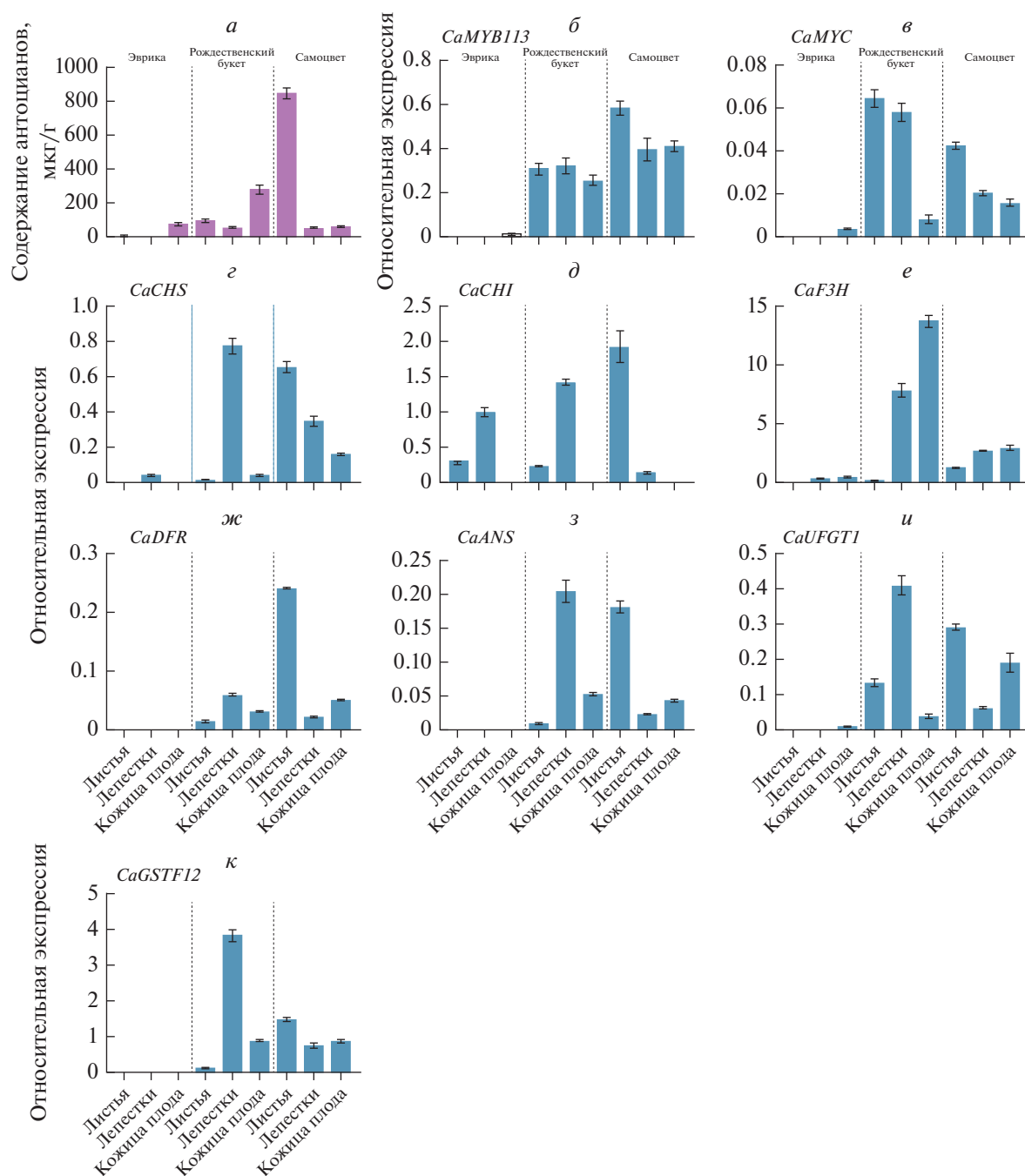


Рис. 7. Содержание антоцианов (а) и профили экспрессии генов *CaMYB113* (б), *CaMYC* (в), *CaCHS* (г), *CaCHI* (д), *CaF3H* (е), *CaDFR* (ж), *CaANS* (з), *CaUFGT1* (и) и *CaGSTF12* (к) в листьях, лепестках цветка и кожице незрелых плодов сортов перца Эврика, Рождественский букет и Самоцвет (*C. frutescens*).

мологами гена *ANT1* *S. lycopersicum* (рис. 3,а). Интересно, что именно *ANT1*, а не *AN2* (*MYB113*) считается ответственным за фиолетовую пигментацию кожицы плода томата с генотипом *ANTHOCYANIN FRUIT*, интрогрессированным из родственного вида *S. chilense* [27]. Таким образом, регуляция биосинтеза антоцианов имеет существенные видоспецифичные особенности.

Структурный анализ *CaMYB113* определил ген в кладе *MYB113* Solanaceae (рис. 3,а), члены которой тесно ассоциированы с биосинтезом антоцианов у картофеля, томата и баклажана [16–19]. Принимая во внимание результаты недавних исследований [20] и последнюю версию сборки генома перца *C. annuum* (GCF_002878395.1), мы допускаем, что отсутствие ожидаемых корреляций

между активностью гена *CaMYB113* и содержанием антоцианов связано с инделем ретротранспозона *LINE-1* в первом интроне *CaMYB113*. Инсерция *LINE-1* ассоциирована с положительной регуляцией транскрипции *MYB113* и, как следствие, с повышенным содержанием антоцианов и фиолетовой окраской ткани [20, 22].

Анализ мРНК *CaMYB113* сортов Эврика, Рождественский букет и Самоцвет подтвердил наличие 5'-UTR (рис. 5). Исходя из фиолетовой окраски кожицы незрелого плода у семи из десяти исследуемых в настоящей работе сортов (табл. 1), было сделано предположение о присутствии в геноме этих сортов второго аллеля гена *CaMYB113* с инсерцией *LINE-1*. Тестирование на возможное присутствие вставки *LINE-1* показало, что только сорта Рождественский букет и Самоцвет (*C. frutescens*), у которых фиолетово пигментированы не только кожица плода, но также листья и лепестки цветков (рис. 1), имеют второй вариант аллеля гена *CaMYB113* с инсерцией *LINE-1* (аллель *CaMYB113-L1*) (рис. 6, в). Третий сорт с фиолетовой окраской всех анализируемых тканей (листьев, лепестков цветка и кожицы незрелого плода), Pimente da Neyde (*C. chinense*), не показал инсерции *LINE-1* (рис. 6, в). Поскольку данный ген экспрессируется в коже плода Pimente da Neyde на сопоставимом с данными по сорту Самоцвет уровне [25], отсутствие подтверждения инсерции может быть связано либо с генотип-специфичными полиморфизмами в последовательности *LINE-1*, либо с особенностями регуляции транскрипции *MYB113* у вида *C. chinense* в сравнении с *C. frutescens*.

Присутствие мРНК *CaMYB113* во всех органах сортов Рождественский букет и Самоцвет, а также ее отсутствие (за исключением следовых количеств в коже плода) у сорта Эврика (рис. 7, б, в) свидетельствуют в пользу предположения о положительном влиянии инсерции *LINE-1* на экспрессию гена. Учитывая тот факт, что четыре сорта (Сиреневый куб, Отелло, Янтарь и Эврика) с фиолетовой окраской кожицы плода отличаются от сортов Рождественский букет и Самоцвет непигментированными листьями и лепестками цветка (табл. 1, рис. 1), можно предположить, что присутствие аллеля *CaMYB113-L1* сцеплено с синтезом антоцианов в листьях и лепестках цветка видов *Capsicum*.

Существенно более высокая экспрессия структурных генов у сортов Рождественский букет/Самоцвет в сравнении с сортом Эврика (рис. 7, г–к) подтверждает роль ТФ MYB113 в MBW-комплексе как активатора транскрипции генов ферментов флавоноидного пути.

Таким образом, в настоящей работе была выявлена положительная корреляция содержания антоцианов с активностью структурных (*CaCHS*, *CaF3H*, *CaDFR*, *CaANS*) и транспортного (*CaCSTF12*) генов в листьях сортов перца *C. frutescens* с разным паттерном пигментации надземных органов. Было показано, что из трех регуляторных генов семейства R2R3-MYB, *CaMYB113*, *CaMYB1* и *CaMYB1-like*, в исследуемых органах перца экспрессируется только *CaMYB113*, входящий в кладу *MYB113* Solanaceae. Было подтверждено присутствие 5'-UTR в мРНК *CaMYB113*. Десять сортов перца были исследованы на наличие вставки *LINE-1* в 5'-UTR *CaMYB113*. У сортов Рождественский букет и Самоцвет, характеризующихся фиолетовой окраской листьев, лепестков цветка и кожицы незрелого плода, был детектирован вариант аллеля *CaMYB113-L1*, тогда как в геноме сортов с другим паттерном пигментации он отсутствовал.

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

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

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Moscone E.A., Scaldaferrro M.A., Grabielle M. et al. The evolution of chili peppers (*Capsicum* – Solanaceae): A cytogenetic perspective // Acta Hort. 2007. V. 745. P. 137–170. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2007.745.5>
2. 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>
3. 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>
4. Borovsky Y., Oren-Shamir M., Ovardia 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. 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>
6. Tang B., Li L., Hu Z. et al. Anthocyanin accumulation and transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in purple pepper // J. Agric. Food. Chem. 2020. V. 68. P. 12152–12163. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02460>
7. 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. № 10. С. 1161–1170. <https://doi.org/10.31857/S0016675820090064>
8. Naing A.H., Kim C.K. Roles of R2R3-MYB transcription factors in transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in horticultural plants // Plant Mol. Biol. 2018. V. 98. P. 1–18. <https://doi.org/10.1007/s11103-018-0771-4>
9. 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>
10. Pérez-Díaz R., Madrid-Espinoza J., Salinas-Cornejo J. et al. Differential roles for *VviGST1*, *VviGST3*, and *VviGST4* in proanthocyanidin and anthocyanin transport in *Vitis vinifera* // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01166>
11. Ramsay N.A., Glover B.J. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity // Trends Plant Sci. 2005. V. 10. P. 63.
12. 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>
13. Chaim A.B., Borovsky Y., De Jong W., Paran I. Linkage of the A locus for the presence of anthocyanin and fs10.1, a major fruit-shape QTL in pepper // Theor. Appl. Genet. 2003. V. 106. P. 889–894.
14. Wang D., Bosland P.W. The genes of *Capsicum* // Hort. Science. 2006. V. 41. P. 1169–1187.
15. Borovsky Y., Oren-Shamir M., Ovardia 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>
16. Albert N.W., Lewis D.H., Zhang H. et al. Members of an R2R3-MYB transcription factor family in *Petunia* are developmentally and environmentally regulated to control complex floral and vegetative pigmentation patterning // Plant J. 2011. V. 65. P. 771–784. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04465.x>
17. Liu Y., Lin-Wang K., Espley R.V. et al. Functional diversification of the potato R2R3-MYB anthocyanin activators AN1, MYBA1, and MYB113 and their interaction with basic helix-loop-helix cofactors // J. Exp. Bot. 2016. V. 67. P. 2159–2176. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw014>
18. Strygina K.V., Kochetov A.V., Khlestkina E.K. Genetic control of anthocyanin pigmentation of potato tissues // BMC Genet. 2019. V. 20. Article 27. <https://doi.org/10.1186/s12863-019-0728-x>
19. Shi S., Liu Y., He Y. et al. R2R3-MYB transcription factor SmMYB75 promotes anthocyanin biosynthesis in eggplant (*Solanum melongena* L.) // Scientia Horticulturae. 2021. V. 282. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110020>
20. Ohno S., Ueno M., Doi M. Differences in the CaMYBA genome between anthocyanin-pigmented cultivars and non-pigmented cultivars in pepper (*Capsicum annuum*) // Hort. J. 2020. V. 89. P. 30–36. <https://doi.org/10.2503/hortj.UTD-097>
21. Zhou Y., Mumtaz M.A., Zhang Y. et al. Response of anthocyanin biosynthesis to light by strand-specific transcriptome and miRNA analysis in *Capsicum annuum* // BMC Plant Biol. 2022. V. 22. Article 79. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03423-6>
22. Jung S., Venkatesh J., Kang M.Y. et al. A non-LTR retrotransposon activates anthocyanin biosynthesis by regulating a MYB transcription factor in *Capsicum annuum* // Plant Sci. 2019. V. 287. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110181>
23. Филюшин М.А., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Характеристика генов антоцианидин-3-О-глюкозилтрансфераз перца (*Capsicum* spp.) и их роль в биосинтезе антоцианов // Генетика. 2023. Т. 59. № 5. С. 517–529.
24. 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.
25. Филюшин М.А., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Содержание антоцианов в плодах видов *Capsicum* коррелирует с уровнями транскрипции структурных и регуляторных генов флавоноидного пути // Физиол. растений. 2023. Т. 70. С. 36–44. <https://doi.org/10.31857/S001533032260036X>
26. Liu W., Feng Y., Yu S. et al. The flavonoid biosynthesis network in plants // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. <https://doi.org/10.3390/ijms222312824>
27. Schreiber G., Reuveni M., Evenor D. et al. ANTHOCYANIN1 from *Solanum chilense* is more efficient in accumulating anthocyanin metabolites than its *Solanum lycopersicum* counterpart in association with the *ANTHOCYANIN FRUIT* phenotype of tomato // Theor. Appl. Genet. 2012. V. 124. P. 295–307. <https://doi.org/10.1007/s00122-011-1705-6>

Relationship of the Anthocyanin Content with the Expression Level of the Anthocyanin Biosynthesis Pathway Regulatory and Structural Genes in *Capsicum* L. Species

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

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

*e-mail: michel7753@mail.ru

In this study, the content of anthocyanins and the expression pattern of regulatory (*CaMYB113*, *CaMYB1*, and *CaMYB1*-like) and structural (*CaCHS*, *CaCHI*, *CaF3H*, *CaDFR*, *CaANS*, *CaUFGT1*, and *CaGSTF12*) genes of the anthocyanin biosynthesis pathway in leaves, flower petals, and peel of unripe fruits of pepper *Capsicum frutescens* L. cultivars (Samotsvet, Rozhdestvenskii buket and Eureka), which differ in the pattern of anthocyanin-mediated pigmentation of aboveground organs. A positive correlation was found between the levels of *CaCHS*, *CaF3H*, *CaDFR*, *CaANS*, and *CaCSTF12* transcripts with the amount of anthocyanins in the leaves of these cultivars. It was shown that out of three regulatory genes only *CaMYB113* is expressed. Using ten cultivars of three *Capsicum* species as an example, the presence of 5'-UTR in *CaMYB113* mRNA was confirmed. The second variant of the *CaMYB113* allele with the insertion of the *LINE-1* retrotransposon in intron I was found in the genome of cv. Rozhdestvensky buket and Samotsvet with purple color of the analyzed organs.

Keywords: *Capsicum* spp., pepper cultivars, anthocyanins biosynthesis, MYB113, the content of anthocyanins, gene expression.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА РУССКОЙ ВЕРХОВОЙ ПОРОДЫ ЛОШАДЕЙ

© 2023 г. Э. А. Николаева¹, *, В. Н. Воронкова¹, М. А. Политова²,
Е. В. Рябова³, В. А. Демин³, Ю. А. Столповский¹

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

²Всесоюзный научно-исследовательский институт племенного дела,
Московская область, пос. Лесные Поляны, 141212 Россия

³Российский аграрный университет им. К.А. Тимирязева (МСХА), Москва, 127434 Россия

*e-mail: nickolaevaelina@gmail.com

Поступила в редакцию 13.03.2023 г.

После доработки 17.04.2023 г.

Принята к публикации 18.04.2023 г.

С помощью 17 микросателлитных локусов, рекомендованных ISAG, исследовано 166 лошадей русской верховой породы. Для сравнительного анализа генетического разнообразия и современной кластеризации были использованы данные микросателлитного полиморфизма 34 европейских пород – 7874 особи (Mendeleev database). По уровню аллельного богатства русская верховая имеет высокие значения – 5.4 аллеля на микросателлитный локус. Всего в породе обнаружено 122 аллеля, в том числе приват-аллель 14 в локусе HTG7. Выявлена популяционно-генетическая структура для русской верховой, арабской, ахалтекинской, немецкой верховой и чистокровной верховой. Кластеризация пород лошадей на круговой дендрограмме, полученной методом UPGMA, выявила шесть основных кластеров. При анализе методом PCA русская верховая образует единую группу с немецкими верховыми и чистокровными английскими лошадьми. При использовании программы STRUCTURE ($K=3$) породы разделились на три популяционные структуры: 1) арабская; 2) русская верховая, ахалтекинская, чистокровная верховая; 3) немецкая полукровная. Анализ дифференциации между породами (F_{st}) показал наибольшие различия между всеми породами и ахалтекинской породой лошадей, наименьшее отличие ($F_{st} = 0.22$) – между русской верховой и немецкой верховой. Различия по каждой паре пород были достоверны ($p\text{-value} < 0.001$).

Ключевые слова: лошадь, *Equus caballus*, микросателлитный анализ, генетическое разнообразие, русская верховая порода.

DOI: 10.31857/S0016675823090096, **EDN:** WUWYIE

Русская верховая является заводской породой лошадей спортивного направления. Начало ее формированию было положено в конце XVIII в. графом А.Г. Орловым-Чесменским и Ф.В. Ростопчиным. К середине XX в. орлово-ростопчинская порода была практически полностью утрачена в результате многочисленных войн [1, 2]. В 1987 г. была начата работа по воссозданию породы. Была поставлена цель получить лошадь, которая не только своим экстерьером и типом была бы близка к орлово-ростопчинской, но и обладала бы способностью к выезде. С этой целью весь молодняк Старожиловского конного завода проходил испытания по оценке двигательных качеств. В племенной работе наряду с немногочисленными носителями крови орлово-ростопчинской породы использовались лошади чистокровной верховой, арабской, ахалтекинской, тракененской пород. Таким образом были повторены скрещивания,

подобные тем, что ставил А.Г. Орлов. Регистрация воссозданной породы состоялась в 1998 г. Полученная порода хорошо зарекомендовала себя в классических видах спорта, преимущественно в выезде.

В настоящее время ведущим племенным хозяйством по работе с русской верховой породой является Старожиловский конный завод, где наряду с чистопородным разведением проводится межпородное скрещивание с использованием производителей западных европейских пород, призванное улучшить спортивные качества [1, 2]. В племенной состав в 2022 г. включены семь жеребцов русской верховой породы, один производитель чистокровной верховой, а также семь жеребцов немецкого происхождения. В породе наибольшее распространение получила линия Беспечного через жеребцов Интриган и Барин, линии Гуниба и Грохота, Монконтура [3, 4]. В породе сформирова-

лись девять семейств (Дельты, Грусти, Инспекции, Басмы, Хауры, Беспеки, Хроносферы, Хрупкой, Пальмы) и маточные гнезда: Прерии, Зори, Чудливой и Горисы (1-й том племенной книги русской верховой).

В настоящее время селекция в породе ведется с учетом как желательного типа и экстерьера, так и спортивных качеств. Русские верховые лошади, в особенности жеребцы-производители, обладают в своем большинстве сильным уравновешенным подвижным либо сильным уравновешенным инертным типом высшей нервной деятельности, в зависимости от того к какой породе они ближе по происхождению [5].

Наряду с правильными экстерьером, ростом и спортивной работоспособностью селекционируемым признаком в работе с русской верховой породой является масть: предпочтение отдается животным темных мастей с минимальным размером отметин. Благодаря отбору в породе преобладают вороная, темно-гнедая и караковая масти, но наибольший балл при бонитировке получают вороные без отметин лошади [6].

Возникновение основных мастей определяется взаимодействием двух аллелей: *E* (Extension) и *A* (Agouti) [7, 8]. Вороная и рыжая масти лошади кодируются геном *MC1R*, представленным доминантным аллелем *E* и рецессивным *e*, который возник в результате однонуклеотидной замены *C>T*. Доминантный аллель гена *MC1R* (*E*) отвечает за выработку эумеланина (черный пигмент) в корне волоса животного, у гомозигот по рецессивному аллелю (*e*) синтезируется пигмент феомеланин и проявляется рыжая масть. Распределение черного пигмента по корпусу животного контролируется α -меланоцитостимулирующим гормоном (α -MSH) и кодируется геном *ASIP* [7–9]. Доминантный аллель *A* (Agouti) осветляет масть корпуса лошади, не затрагивает гриву и хвост, детерминирует гнедую и караковую масти.

В настоящее время для вводного скрещивания допускаются ахалтекинские, чистокровные верховые и арабские, ганноверская, тракененская, голштинская, ольденбургские жеребцы по регламенту ЕАЭС (Евразийский экономический союз). Ахалтекинские лошади внесли свой вклад в развитие породы через линию Абсента, сыновей Аю-Дага и Агдама [1].

Для подтверждения достоверности происхождения в работе с породой использовались иммуногенетические маркеры (группы крови). С 2022 г. на основании решения ВНИИ коневодства для тестирования лошадей используются STR-маркеры [10, 11].

Микросателлиты характеризуются высокой вариабельностью, известной локализацией в геноме и широко используются для определения популяционной структуры пород, для изучения

микроэволюционных процессов [12]. Кроме того, этот метод позволяет оценить генетическую изменчивость в популяции, установить внутри- и межпородные филогенетические связи, гетерозиготность, выявить приват-аллели, встречающиеся только в конкретной породе или популяции. Мониторинг лошадей по микросателлитным маркерам используется при создании селекционных программ с целью предотвращения снижения уровня генетического разнообразия.

В коневодстве для генотипирования и паспортизации лошадей используется панель из 17 микросателлитных локусов, одобренная ISAG (International Society of Animal Genetics) [12, 13]. Исследование популяционно-генетической структуры русской верховой породы стало основной задачей нашего исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили волосяные фолликулы и образцы крови, собранные у 166 лошадей русской верховой породы. Образцы крови были взяты у 154 лошадей, волосы — у 12. В результате генотипирования были получены данные по распределению аллелей генов окраски *MC1R* (Extension) и *ASIP* (Agouti).

Пробы крови лошадей русской верховой породы были взяты в Старожиловском конном заводе, а также у животных, находящихся на службе в Президентском полку ФСО РФ; волосяные фолликулы русских верховых лошадей были получены от частных владельцев с приложением данных о происхождении.

Забор крови проводился из яремной вены в вакуумные пробирки с КЗ ЭДТА Vacuette (Greiner Bio-One, Австрия), сбор волос осуществляли из гривы и хвоста с дальнейшим помещением в индивидуальные бумажные конверты.

В качестве дополнительного источника по зарубежным породам была использована база данных Mendeley database (<https://data.mendeley.com/>). В табл. 1 приведены сведения о структуре выборок.

Выделение ДНК проводили с использованием набора Magna Prep 200 (для крови, Изоген, Москва), основанного на избирательной сорбции ДНК на поверхности намагниченных стеклянных шариков в присутствии высокой концентрации хаотропного агента, Gordis sprint (из волос, буккального эпителия и из сухих пятен крови на фильтровальной бумаге; ООО Гордиз, Москва). Оценку концентрации ДНК проводили с использованием прибора Implen NanoPhotometer NP 80.

Амплификацию осуществляли на приборах Bio-Rad Laboratories (США) и Thermo Fisher Scientific (США). Мультиплексный анализ был проведен с использованием микросателлитной панели COrDIS Horse, созданной компанией Гордиз,

Таблица 1. Объем исследуемых выборок

Порода	Обозна- чение	N	Порода	Обозна- чение	N	Порода	Обозна- чение	N	Порода	Обозна- чение	N
Андалузская	AND	67	Липицианская	LIP	45	Дартмурская	DAR	22	Шетлендские (Европа)	SHE1	98
Аппалуза	APP	99	Лузитано	LUS	43	Голландская упряжная	DUT	73	Шетлендские 2	SHE2	462
Арабская	ARA	615	Меренская	MER	23	Фалабелла	FAL	200	Шайр	SHI	29
Камполина	CAM	61	Миниатюрная лошадь	MIN	250	Фелл	FEL	70	Стандартbredная	STA	997
Коннемара	CON	40	Нью форест	NEW	54	Фьорд	FJO	544	Тенессийская прогулочная	TEN	23
Гронингер (местная)	GRO	27	Чистокровная английская	THO	55	Каспийская	KAS	17	Уэльская 2	WEL2	152
Хакней	HAC	141	Немецкие спортивные 1	WAR1	1354	Халфингер	HAF	65	Немецкиеспортивные3 (Европа)	WAR3	1238
Тинкер	TIN	28	Немецкие спортивные 2	WAR2	356	Исландская	ICE	134	Уэльская	WEL1	73
Ирландский коб	IRI	123	Польский коник	KON	282	Русская верховая	RVP1	166			

Таблица 2. Число аллелей на локус

Локус	АНТ4	АНТ5	ASB2	ASB17	ASB23	CA425	HMS1
Аллели	11	9	18	20	15	12	11
Локус	HMS2	HMS3	HMS6	HMS7	HTG4	HTG6	HTG7
Аллели	13	11	9	10	7	12	7
Локус	HTG10	LEX3	VHL20				
Аллели	14	14	11				

Таблица 3. Общее число аллелей

Популяция	CAM	LUS	KON	TIN	IRI	WEL1	DAR	SHI	SHE1
Число аллелей	116	110	121	109	131	134	91	89	118
Популяция	TEN	AND	FAL	FEL	CON	WAR3	MIN	STA	APP
Число аллелей	88	117	133	104	119	143	139	130	133
Популяция	ARA	FJO	HAC	THO	NEW	WAR2	LIP	SHE2	RVP
Число аллелей	124	134	105	88	137	152	106	121	122
Популяция	WEL2	WAR1	ICE	DUT	MER	GRO	HAF	KAS	
Число аллелей	145	146	124	99	94	103	92	101	

на основе одобренных в ISAG локусов: АНТ4, АНТ5, ASB2, ASB17, ASB23, CA425, HMS1, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, HTG7, HTG10, LEX3, VHL20.

При генотипировании по генам окраски методом ПЦР использовались следующие праймеры.

Для гена *MC1R* – F: GGC TGC TGG GCT CCC TCA ACT; R: TGT GGT ACC GCA GCG CAT AGA AGA.

Для гена *ASIP* – F: CAC GAC GTT GTA AAA C GA CCA AGG GGG AAA AGA CCA GAA ACA; R: GTC CCA CCC CTA CAA TGA GAA GTC.

Анализ проводили по протоколу производителя Li'cor, Lincoln, Nebraska (США).

Статистическую обработку данных фрагментного анализа осуществляли при помощи программной среды R в R-studio. Для выявления частот аллелей, аллельного богатства и приват-аллелей использовались пакеты Popgenreport и Adegnet с предварительной подготовкой данных и переводом их в формат генератор [14]. Расчет аллельного богатства проводили для подвыборки из 34 аллелей [15–17].

Филогенетические деревья были построены при помощи пакетов rgrrr и are, скачаны в формате Nexus из среды R и визуализированы с помощью iTOL ver.6 (interactive tree of life). Для расчета использовали методы UPGMA и Neighbor-Joining с бутстреп-поддержкой в 1000 повторов [14].

Анализ принципиальных компонент с их дальнейшей визуализацией проводили в пакете Plotly для двух компонент в 2D-пространстве и для трех компонент в 3D-пространстве [18].

Дифференциацию между породами (F_{st}) рассчитывали в пакете diveRsity в среде R. Для визуализации популяционно-генетической структуры использовалась программа STRUCTURE.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для локусов исследованных пород лошадей было выявлено от семи (HTG4, HTG7) до 20 ASB17 аллелей (табл. 2).

Общее число аллелей по всем 17 микросателлитным локусам для каждой выборки представлено в табл. 3 и варьируется от 88 до 152. Максимальный уровень разнообразия (152 аллеля) выявлен в популяции немецких верховых лошадей, которые представлены смешанной популяцией из нескольких пород. Наименьшее разнообразие наблюдается в популяции чистокровной верховой породы лошадей, что может быть вызвано отсутствием прилития крови других пород и небольшим относительно других выборок количеством исследованных особей ($N = 55$).

В русской верховой породе обнаружено 122 аллеля, однако это число выявлено в популяции, состоящей из 166 особей. На рис. 1 представлено соотношение числа выявленных аллелей к объему выборки. Русская верховая порода имеет промежуточное значение вместе с такими породами как стандартbredная, коннемарский пони и арабская.

Увеличение объема выборки ведет к быстрому росту числа выявленных аллелей при объеме выборки от 40 до 356 особей, дальше наблюдается выход на плато и незначительное увеличение числа

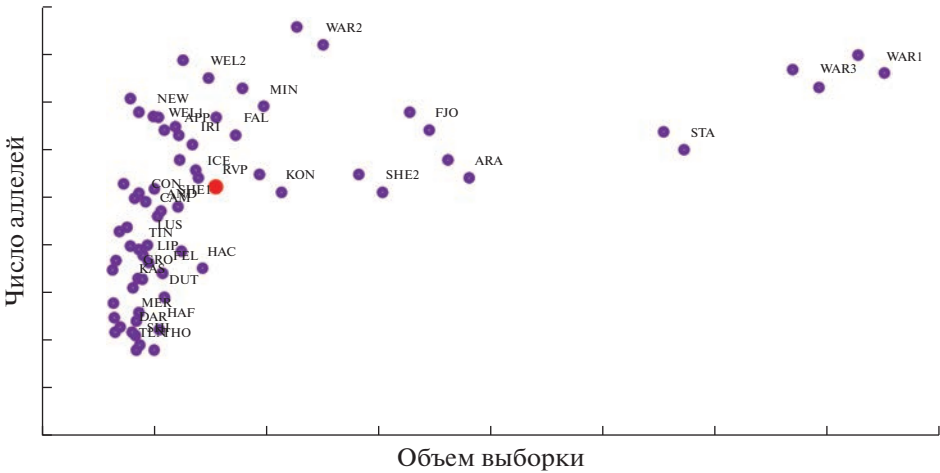


Рис. 1. Число аллелей относительно объема выборки. Красным цветом отмечена выборка русской верховой породы.

аллелей. Популяции WAR1 и WAR3 немецких верховых лошадей представлены 143 и 146 аллелями, при выборках в 1354 и 1238 лошадей. Таким образом выявленное число аллелей для русской верховой породы лошадей возможно будет выше при увеличении числа исследованных животных.

При расчете аллельного богатства, которое нивелирует различия в объеме выборок, наблюдается выравнивание по числу аллелей. Наблюдается разброс значений (табл. 4) от 4.6 аллелей (чистокровная верховая) до 6.4 (немецкая верховая).

Коэффициент аллельного богатства русской верховой занимает промежуточное значение — 5.4.

Для каждого локуса нами были получены тепловые карты (рис. 2), которые позволяют наглядно представить частоты по каждому из аллелей, приват-аллели и оценить выравнированность выборок по длинам фрагментного анализа. На тепловых картах в локусе HTG7 для выборки русской верховой породы идентифицируется приват-аллель, который встречается в популяции с высокой частотой.

Таблица 4. Аллельное богатство

Популяция	Среднее	Общее	Популяция	Среднее	Общее
CAM	5.5	93.1	APP	6.4	109.2
LUS	5.6	95.0	ARA	5.2	88.8
KON	5.5	94.0	FJO	5.7	96.4
TIN	5.7	96.5	HAC	4.8	82.0
IRI	5.8	99.2	THO	4.7	79.2
WEL1	6.3	106.3	NEW	6.6	112.9
DAR	5.0	84.4	WAR2	6.4	109.4
SHI	4.7	80.1	LIP	5.2	87.7
SHE1	5.3	90.7	SHE2	5.1	86.3
TEN	4.8	81.7	WEL2	6.4	109.1
AND	5.5	92.7	WAR1	6.0	102.1
FAL	5.3	90.3	ICE	5.7	96.3
FEL	5.2	89.2	DUT	4.8	81.6
CON	5.9	100.7	MER	5.0	85.8
WAR3	5.9	100.6	GRO	5.4	92.5
MIN	6.1	103.3	HAF	4.8	80.8
STA	5.5	93.8	KAS	5.7	96.2
			RVP1	5.5	92.9

Примечание. Среднее — среднее число аллелей на локус; общее — общее число аллелей по всем локусам.

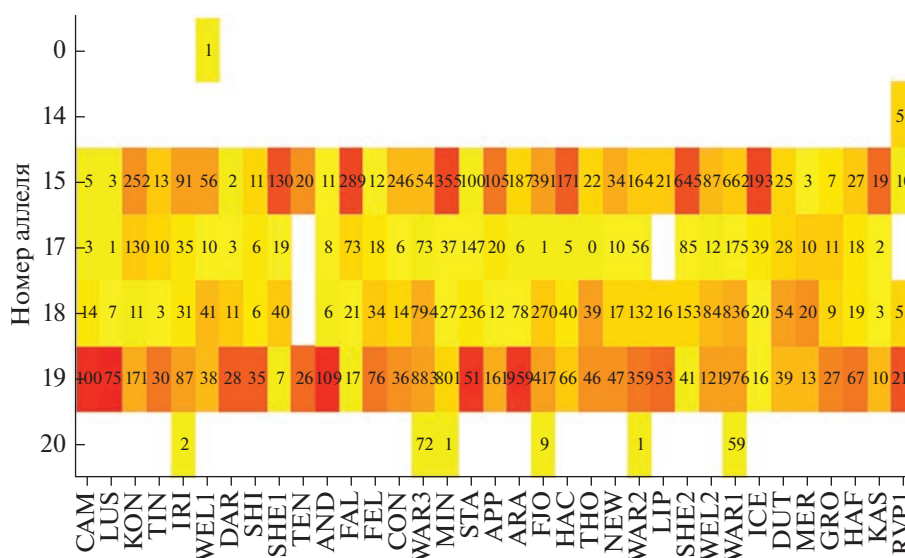


Рис. 2. Тепловая карта по локусу HTG7. Цветом от желтого к красному отмечена частота аллеля.

При филогенетическом анализе методом UPGMA (bootstrap = 1000) выделяются пять крупных клад (рис. 3), в которых русская верховая лошадь попадает в общую выборку с лошадьми немецких верховых (полукровных) пород.

Использование лошадей ведущих мировых спортивных линий в Старожиловском конном заводе служит как для расширения генеалогического разнообразия, так и для совершенствования спортивных качеств. Далее по удаленности от русских верховых следуют английские скаковые и арабские лошади, а также стандартbredная порода лошадей.

В процессе исследования был проведен анализ принципиальных компонент, дисперсия задавалась не менее 85 процентов. Были построены модели пространства для двух и трех компонент. В обоих случаях ($pc = 2$, $pc = 3$) наибольший вклад в изменчивость вносит первая компонента. Цветными точками отмечены лошади различных пород и их расположение в пространстве друг относительно друга.

В пространстве трех главных компонент (рис. 4) русская верховая (розовый цвет) полностью перекрывается немецкими спортивными породами (отмечены фиолетовым цветом) и чистокровной верховой породой лошадей (светло-серый цвет). Также наблюдается частичное перекрытие с арабской породой лошадей, отмечается близость со стандартbredной породой (темно-серый цвет). Брабансоны (бельгийская тяжеловозная) и норвежские фьорды, а также тяжеловозные породы и пони находятся на заметном отдалении.

Для двух принципиальных компонент были получены схожие результаты (рис. 5), по данным которых русская верховая, немецкие теплокров-

ные лошади и чистокровная верховая практически полностью перекрывают друг друга. Выборка стандартbredных лошадей консолидирована в пространстве, однако также находится близко к перечисленным породам. Тяжеловозные породы формируют отдельный кластер. Порода фьорд отделяется как от верховых, так и от тяжеловозных лошадей.

При молекулярно-генетическом исследовании частот аллелей и генотипов в Extension-локусе в русской верховой породе наблюдалось достоверное смещение в сторону доминантного аллеля (*E*), что ведет к появлению гнедых и вороных лошадей (табл. 5) [6, 7]. Рыжих лошадей с генотипом *ee* в популяции выявлено не было. В противоположность этому в популяции немецкой верховой породы наблюдается равновесное распределение генов и генотипов в Extension-локусе.

При сравнении фенотипов внутри гнедой масти не было обнаружено никаких различий между гомо- и гетерозиготными носителями доминантного аллеля (*E*). Среди классических гнедых лошадей ($N = 25$) с красноватой окраской покровного волоса и черным защитным волосом (гривой и хвостом) количество гомозигот составило 60%. Среди темно-гнедых ($N = 24$), у которых значительную долю покровных волос составляют темно-коричневые и черные, гомозиготы составляют 54%.

Для определения структуры популяций был использован байесовский анализ на основе метода Марковских цепей Монте-Карло (MCMC) в программе STRUCTURE (рис. 6). Для определения оптимального числа кластеров (K) была рассчитана статистика ΔK от 1 до 7. Наиболее достоверная структура продемонстрирована при $K = 3$, с разделением на следующие популяции: 1) араб-

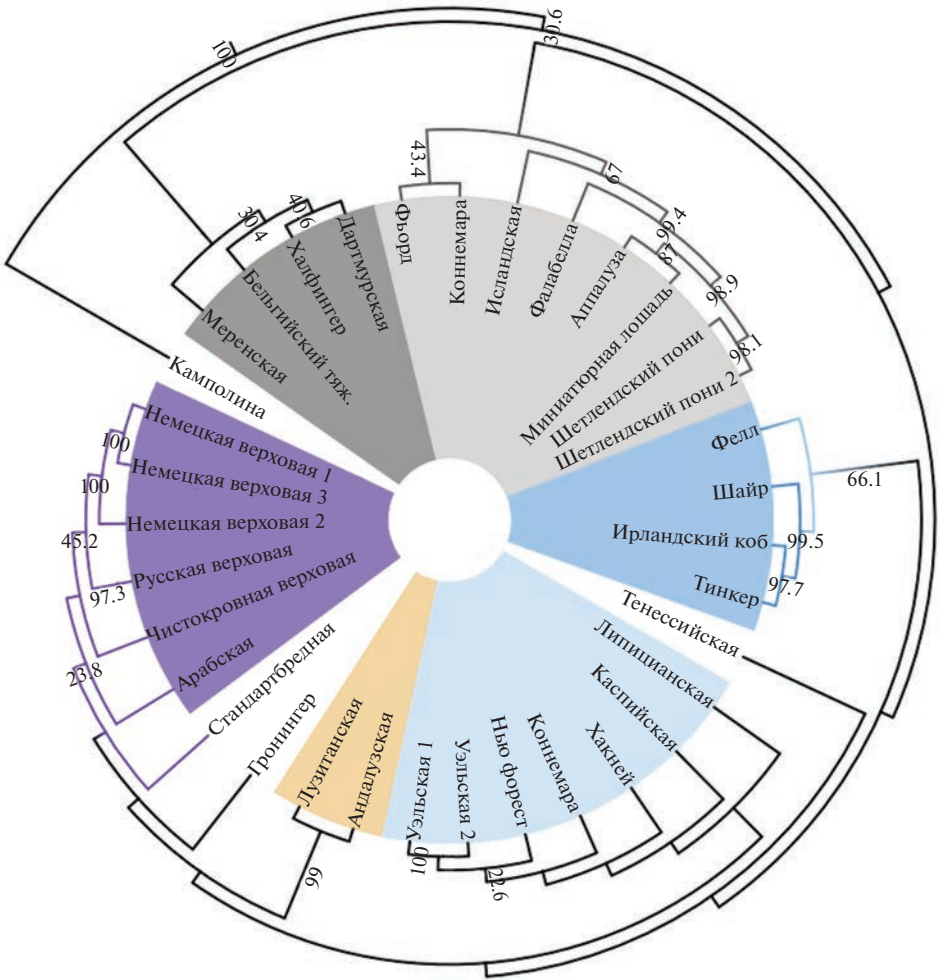


Рис. 3. Круговая кладограмма, построенная методом UPGMA. Бутстреп-поддержки = 1000 итераций.

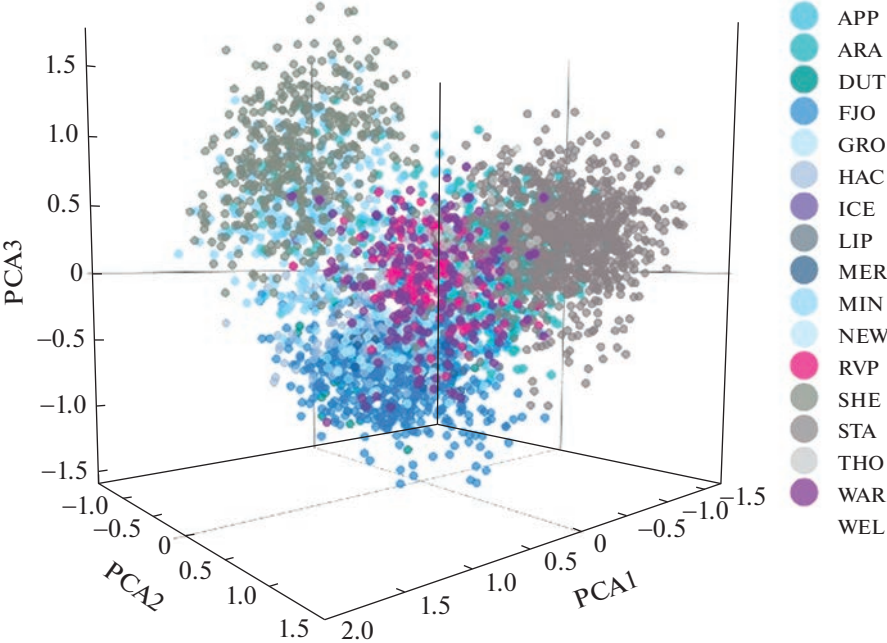


Рис. 4. Анализ принципиальных компонент в пространстве трех компонент. Розовым цветом отмечены лошади русской верховой породы.

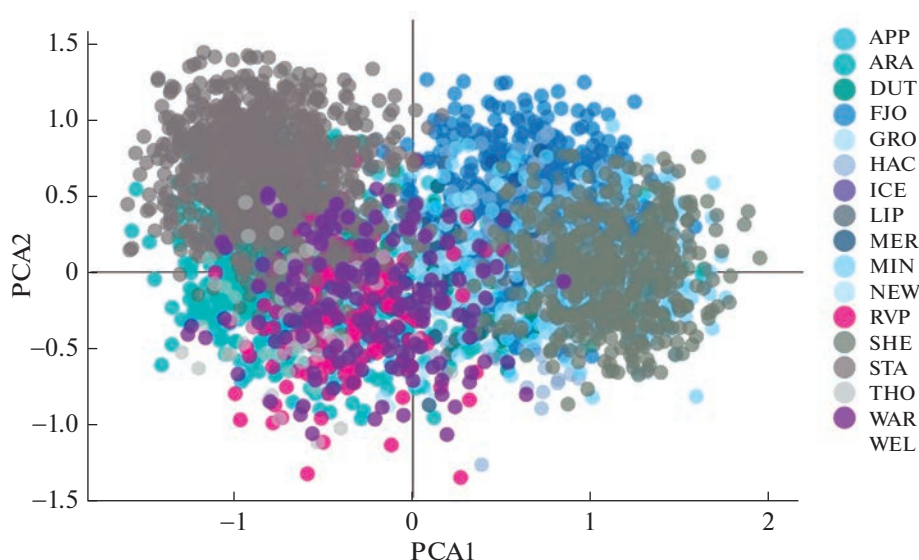


Рис. 5. Анализ принципиальных компонент в пространстве двух компонент.

ская; 2) русская верховая, ахалтекинская, чистокровная верховая; 3) немецкая верховая. При $K=5$ выделяются популяции арабской, русской верховой, ахалтекинской и английской чистокровной. Немецкая верховая представлена смесью чистокровных пород.

Анализ дифференциации между породами (F_{st}) показал наибольшие различия между всеми породами и ахалтекинской породой лошадей (0.073–0.095). Наименьшая генетическая дистанция зарегистрирована ($F_{st} = 0.22$) между немецкой и русской верховой. Различия по каждой паре пород были достоверны ($p\text{-value} < 0.001$).

Таблица 5. Результаты генотипирования русских верховых лошадей по мастям

Порода	Частота аллелей		Частота генотипов		
	<i>A</i>	<i>a</i>	<i>AA</i>	<i>Aa</i>	<i>aa</i>
Русская верховая	25.5	74.5	3.8	43.3	52.9
Немецкая верховая	58.8	41.2	41.2	35.3	23.5
	<i>C</i>	<i>c^t</i>	<i>CC</i>	<i>Cc^t</i>	<i>c^tc^t</i>
Русская верховая	91.6	8.4	83.2	16.8	0
Немецкая верховая	81.6	18.4	63.3	36.7	0
	<i>E</i>	<i>e</i>	<i>EE</i>	<i>Ee</i>	<i>ee</i>
Русская верховая	80.8	19.2	61.5	38.5	0
Немецкая верховая	48.5	51.5	26.4	44.1	29.4

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате микросателлитного анализа среды русской верховой породы лошадей по 17 локусам идентифицировано 122 аллеля при объеме выборки в 166 особей.

Среднее значение аллельного богатства в популяции русской верховой породы также довольно высоко — 5.4 аллеля. Вероятнее всего, это связано с тем, что при выведении русской верховой использовалось большое количество пород лошадей, разнообразивших ее генофонд.

В породе выявлен приват-аллель в локусе HTG7, который может служить для идентификации породной принадлежности русских верховых лошадей при сравнении с другими породами. Для определения частоты встречаемости и эксклюзивности данного аллеля для русской верховой породы требуется дополнительное сравнительное исследование микросателлитных маркеров российских пород (орловская, ахалтекинская и др.), служивших основой при формировании русской верховой породы.

Результаты исследования полиморфизма микросателлитных маркеров позволяют сделать вывод о влиянии на современный генофонд русской верховой немецких пород прежде всего благодаря использованию вводного скрещивания. В то же время селекционная работа, направленная на получение животных темных мастей, привела к смещению распределения аллелей Extension (*E*) и Agouti (*A*).

При филогенетическом анализе русские верховые лошади кластеризуются вместе с немецкими и чистокровными верховыми лошадьми как при построении филогенетических деревьев, так

Таблица 6. Дифференциация между породами (F_{st})

Породы	Арабская	Английская чистокровная	Немецкие спортивные	Русская верховая	Ахалтекинская
Арабская	0.000	0.001***	0.001***	0.001***	0.001***
Английская чистокровная	0.054	0.000	0.001***	0.001***	0.001***
Немецкие спортивные	0.036	0.026	0.000	0.001***	0.001***
Русская верховая	0.033	0.037	0.022	0.000	0.001***
Ахалтекинская	0.084	0.095	0.073	0.076	0.000

и при анализе главных компонент, что является следствием использования этих пород в селекции русской верховой породы. Стоит отметить, что в STRUCTURE русская верховая порода визуализируется как консолидированная структура, что указывает на наличие породной структуры.

Полученная кладограмма для 31 породы лошадей (рис. 3) позволила сделать следующие выводы: первой отделяется ото всех кластеров порода камполина (происхождение Бразилия), далее выявлено шесть основных кластеров. Порода Камполина отделяется от всех остальных выборок, была выведена с использованием андалузских лошадей, а также англонормандских, голштинских, клайдесдалей.

Первый кластер образовали европейские породы: меренская (Франция, Испания), бельгийский тяжеловоз (Голландия), халфингер (Австрия) и дартмурская (Англия). Халфингер и меренская породы выводились в горной местности и имеют древнейшее происхождение.

Второй кластер образовали фьордская (фьорд), коннемарский пони — аборигенная порода Ирландии, исландская лошадь и пони — фалабелла, аппалуза, миниатюрная лошадь и две популяции шетлендских пони. Таким образом кластер сформирован из аборигенных лошадей и пони севера Европы.

В третий кластер вошли — фелл, шайрская, ирландский коб и тинкер. Фелл — местная порода пони, зародившаяся на северо-западе Англии, шайрская — тяжеловозная порода лошадей из Англии, ирландский коб был сформирован как порода в Ирландии и также относится к упряжным породам. Тинкер — по ряду источников считается той же породой, что и ирландский коб, тем не менее эти две популяции были разделены в исследовании авторами (L.H.P. van de Gooretal.).

Четвертый кластер объединяет липицианскую, каспийскую породу, хакней, коннемару, нью форест и две выборки уэльских пони. Липицианская порода сформировалась в Австро-Венгерской империи на конном заводе в Липице, в настоящее время используется в испанской школе верховой езды. Каспийская порода лошадей — одна из древнейших пород, считается потомком

персидской породы лошадей. Хакней — английская упряжная порода лошадей, была выведена путем скрещивания местных лошадей с чистокровной верховой. Коннемара — коннемарский пони, местная порода Ирландии, является потомком испанских лошадей, которые были скрещены с местными кобылами. В формировании современных коннемарских пони и хакней участвовали уэльские пони, которые также попали в этот кластер. Уэльские пони зародились в Великобритании с участием породы хакней и арабских лошадей.

Пятый кластер объединяет две испанские породы — лузитанскую и андалузскую. Последняя сформировалась в испанской провинции Андалузии, предками породы были иберийские лошади (2—3 тыс. лет до н.э.). В настоящее время андалузская порода внесла свой вклад в липицианскую, фризскую и лузитанскую лошадь. Лузитанская порода, находящаяся в одном кластере с андалузской, имеет родственное с ней происхождение и также произошла от иберийской. Обе породы схожи по экстерьеру — это массивные барочные лошади, преимущественно серой масти, с высоким выходом шеи, плотным типом телосложения.

И шестой кластер формируют современные верховые породы лошадей вместе с чистокровными породами. И в немецкие породы, и в русскую верховую свой вклад внесли чистокровная верховая и арабская породы. Также в работе с русской верховой породой используются немецкие жеребцы импортного происхождения.

Таким образом данные кластеризации совпадают с известными данными о происхождении и родстве пород, кроме липицианской, которая в своем происхождении ближе к андалузской и лузитанской породам, чем к лошадям с прилитием породы уэльских пони.

Полученные данные в настоящей работе соответствуют ранее полученным дендрограммам других авторов [13], в частности кластеры с европейскими породами лошадей, однако нами уточнены место и филогенетические связи русской верховой среди разнообразия пород мира.

Благодарим всех заводчиков и владельцев русской верховой породы (В.А. Демин, Е.В. Матю-

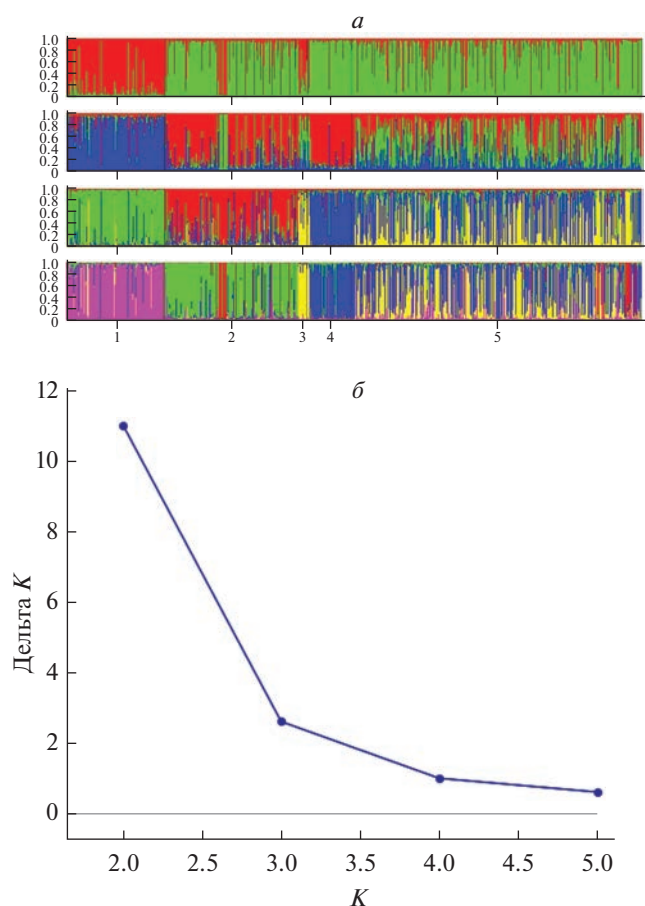


Рис. 6. Результаты анализа STRUCTURE на основе микросателлитных данных исследуемых популяций лошадей. *а* – цветовое деление столбца отражает принадлежность каждого животного к одному из заданного числа кластеров K ($K = 1-5$). Цифрами слева обозначен вклад каждой популяции в породу. Нумерация популяций: 1 – арабская, 2 – русская верховая, 3 – ахалтекинская, 4 – английская чистокровная, 5 – немецкая теплокровная, *б* – значения дельта K , рассчитанные по методу Evanno для $K = 2-5$.

шина, Н.В. Молчанов), сотрудников Кремлевского полка, РГАУ-МСХА за предоставление биологического материала для данного исследования.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИОГен РАН № 0112-2018-0003.

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. Парфенов В.А., Спицина Н., Тхинвалели Г.Г. Особенности селекционных процессов в работе с рус-

ской верховой породой лошадей // Коневодство и конный спорт. 2011. № 3. С. 5–8.

2. Храброва Л.А., Блохина Н.В. Генетический мониторинг чистокровной верховой породы лошадей по локусам микросателлитов ДНК // Генетика и разведение животных. 2018. № 3. С. 11–16.
3. Политова М.А. Работоспособность лошадей русской верховой породы в выездке в 2017–2020 гг. и факторы, ее определяющие // Коневодство и конный спорт. 2021. № 5. С. 31–33. <https://doi.org/10.25727/HS.2021.5.60372>
4. Политова М.А., Дорофеева А.В. Сравнительная характеристика методик оценки спортивной работоспособности лошадей по результатам выступлений в выездке // Изв. С.-Петербургского гос. аграр. ун-та. 2021. № 1 (62). С. 146–154.
5. Никитина Д.А. Анализ распределения по типам высшей нервной деятельности лошадей русской верховой породы Старожиловского конного завода, с учетом их происхождения // Аграрная наука. 2011. № 7. С. 26–27.
6. Райсманин М., Политова М., Вагнер Х.Й. Молекулярно-генетический анализ мастей в популяциях русской верховой и немецкой верховой пород // Abstracts 3 Intern. Iran and Russia Conf. “Agriculture and Natural Resources”. Сб. докл. М., 2002. С. 41.
7. Политова М.А., Райсманин М., Вагнер Х.Й. Влияние генотипа в локусах MC1R (Extension) и ASIP (Agouti) на работоспособность и плодовитость лошадей русской верховой породы // Докл. ТСХА. 2003. Вып. 275. С. 476–479.
8. Калинин Л.В. Изучение полиморфизма генов ASIP и MC1R у лошадей арабской породы // Генетика и разведение животных. 2020. № 2. С. 50–53.
9. Rieder S., Taourit S., Mariat D. et al. Mutations in the agouti (ASIP), the extension (MC1R), and the brown (TYRP1) loci and their association to coat color phenotypes in horses (*Equus caballus*) // Mamm. Genome. 2001. V. 12. № 6. P. 450–455. <https://doi.org/10.1007/s003350020017>
10. Воронкова В.Н. Оценка генетического разнообразия лошадей Саяно-Алтайского региона с использованием ядерных и митохондриальных ДНК маркеров: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М: ИОГен РАН, 2012. 152 с.
11. Чебуранова Е.С., Епишко О.А., Горчаков Н.А. и др. Разработка мультилокусной системы по STR-локусам для молекулярно-генетической паспортизации лошадей // Сельское хоз-во – проблемы и перспективы. 2016.
12. Калашиников В.В., Дергунова М.М., Зайцев М.А. и др. Дополнительные возможности метода ДНК-анализа в коневодстве // Farm. Animals. 2013. № 3–4. P. 72–74.
13. van de Goor L.H.P., van Haeringen W.A., Lenstra J.A. Population studies of 17 equine STR for forensic and phylogenetic analysis // Animal Genet. 2011. V. 42. № 6. P. 627–633. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2011.02194.x>

14. Adamack A.T., Gruber B. PopGenReport: Simplifying basic population genetic analyses in R // Meth. in Ecol. and Evolution. 2014. V. 5. № 4. P. 384–387. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12158>
15. El Mousadik A., Petit R.J. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree (*Argania spinosa* (L.) Skeels) endemic to Morocco // Theor. Applied Genet. 1996. V. 92. № 7. P. 832–839.
16. Foulley J.L., Ollivier L. Estimating allelic richness and its diversity // Livestock Sci. 2006. V. 101. № 1–3. P. 150–158. <https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2005.10.021>
17. Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991. 270 с.
18. Sievert C. Interactive web-based data visualization with R, plotly, and shiny. N.Y.: CRC Press, 2020. 470 p. <https://doi.org/10.1201/9780429447273>

Genetic Structure of Russian Riding Horse Breed

**E. A. Nikolaeva^{a,*}, V. N. Voronkova^a, M. A. Politova^b,
E. V. Ryabova^c, V. A. Demin^c, and Yu. A. Stolpovsky^a**

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

^bAll Russian Research Institute for Animal Breeding, Московская область, пос. Лесные Поляны, 141212 Russia

^cRussian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, 127434 Russia

*e-mail: nickolaevaelina@gmail.com

166 horses of the Russian riding breed were studied using 17 microsatellite loci recommended by ISAG. Microsatellite polymorphism data of thirty European breeds (7874 individuals) was used for comparative analysis of genetic diversity. According to the level of allelic richness, the Russian riding horse has high values – 5.4 alleles per microsatellite locus. In total, 122 alleles were found in the breed, including private 14 allele at the *HTG7* locus. The population genetic structure was revealed for the Russian riding, Arabian, Akhal-Teke, German riding and thoroughbred breeds. Clustering of horse breeds on a circular UPGMA dendrogram revealed six main clusters. The Russian riding horse forms a single group with German and thoroughbred horses in PCA. Breeds were divided into three populations in STRUCTURE program: 1) Arabian, 2) Russian Riding, Akhal-Teke, thoroughbred riding, 3) German half-breed. Analysis of differentiation between breeds using the F_{st} method showed the greatest values (differences) between all breeds with the Akhal-Teke horses. The smallest value ($F_{st} = 0.22$) between the Russian riding and German riding breed. Differences for each pair of breeds were significant (p -value < 0.001).

Keywords: horses, *Equus caballus*, microsatellite analysis, genetic diversity, Russian Riding breed.

РЕПЛИКАТИВНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИИИ GWAS-ЗНАЧИМЫХ ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ ГЕНОВ *TUFM*, *SH2B1*, *ZNF638*, *NEGR1*, *ATP2A1*, *EXOC4*, *CSE1L* С КОГНИТИВНЫМИ СПОСОБНОСТЯМИ

© 2023 г. А. В. Казанцева^{1, *}, Ю. Д. Давыдова¹, Р. Ф. Еникеева¹, З. Р. Тахирова², Р. Н. Мустафин³, М. М. Лобаскова⁴, С. Б. Малых^{4, 5}, Э. К. Хуснутдинова^{1, 2, 5}

¹Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение

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

²Уфимский университет науки и технологий, лаборатория нейрокогнитивной геномики, кафедра генетики и фундаментальной медицины, Уфа, 450076 Россия

³Башкирский государственный медицинский университет, кафедра медицинской генетики и фундаментальной медицины, Уфа, 450008 Россия

⁴Психологический институт Российской академии образования, Москва, 125009 Россия

⁵Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

*e-mail: Kazantsa@mail.ru

Поступила в редакцию 20.02.2023 г.

После доработки 11.04.2023 г.

Принята к публикации 12.04.2023 г.

К настоящему времени проведено большое количество полногеномных анализов ассоциаций (GWAS) разных аспектов когнитивного функционирования (включая интеллект, уровень образования, исполнительные функции) в европейских популяциях. Актуальным представляется репликативный анализ вовлеченности GWAS-локусов, ранее ассоциированных с фактором общего интеллекта, в формирование пространственного (3D) мышления у индивидов из России. С целью репликации ассоциации наиболее значимых GWAS-локусов с развитием пространственного мышления в российской когорте ($N = 1011$, 18–25 лет) был сформирован набор семи “топовых” SNP ($p < 10^{-13}$): rs7187776 в гене *TUFM*, rs7198606 в гене *SH2B1*, rs2287326 в гене *ZNF638*, rs12128707 в гене *NEGR1*, rs8055138 в гене *ATP2A1*, rs1362739 в гене *EXOC4*, rs6063353 в гене *CSE1L*. Обнаружены статистически значимые различия ($p < 0.05$) в распределении частот генотипов по локусам rs8055138 в гене *ATP2A1*, rs12128707 в гене *NEGR1* и rs2287326 в гене *ZNF638* между индивидами русской, татарской и удмуртской этнической принадлежности. В результате анализа генотип-средовых взаимодействий был выявлен этноспецифический характер ассоциаций: у русских возраст матери на момент рождения ребенка ($\beta_{ST} = 0.84$; $p = 0.005$), а у татар воспитание на одном или двух родных языках ($\beta_{ST} = 0.44$; $p = 0.020$) модулировали ассоциацию локуса rs2287326 в гене *ZNF638* с показателем 3D-мышления. Кроме того, “воспитание в сельской/городской местности” модулирует ассоциацию локуса rs7187776 в гене *TUFM* с 3D-показателем ($\beta_{ST} = 0.41$; $p = 0.009$). Полученные данные указывают на вовлеченность генов *ZNF638* и *TUFM*, участвующих в процессах адипогенеза, в формировании когнитивных способностей, что укладывается в представления о связи когнитивных и метаболических нарушений. Тем не менее этноспецифический характер продемонстрированных ассоциаций и различия в частотах генотипов проанализированных GWAS-локусов указывают на характерный для российской выборки паттерн ассоциированных генетических вариантов и на сложность в репликации результатов, полученных на обобщенных выборках европейского происхождения.

Ключевые слова: полногеномный анализ ассоциаций, пространственное мышление, SNP, болезнь Альцгеймера, репликация, *ZNF638*.

DOI: 10.31857/S0016675823090060, **EDN:** WULFPS

Индивидуальный уровень когнитивных способностей определяет не только успешную самореализацию человека в профессиональной деятельности, но и качество его жизни в разные возрастные периоды. Активное развитие IT-технологичного об-

щества предполагает подготовку высококвалифицированных кадров, обладающих, в первую очередь, высокими математическими способностями. Успешное развитие последних в определенной мере связано с формированием матема-

тической беглости или умения быстро и точно выполнять элементарные математические операции [1], коррелирующего с развитием пространственного (3D) мышления и пространственной памяти [1, 2]. Пространственное мышление определяется как создание, перекодировка и оперирование пространственными образами для решения практических задач [1]. Причем пространственное мышление играет значимую роль в формировании успешности не только в математических, но и в гуманитарных и естественно-научных дисциплинах [3]. Кроме того, существует значимая связь между развитым пространственным мышлением и успеваемостью в обучении, которая обнаруживается уже в школьные годы [3]. Результаты близнецовых исследований указывают на умеренную наследуемость (30–50%) уровня пространственного мышления, связанную с кумулятивным эффектом большого числа генетических локусов, которые зачастую отвечают за формирование не только пространственного интеллекта, но и других когнитивных способностей (см. обзор [4]).

Большой пласт опубликованных научных работ, направленных на изучение вовлеченности генетического компонента в развитие когнитивных способностей [5–10] и когнитивных нарушений [11, 12], позволяет выделить определенные гены/генетические варианты и онтологические процессы. В частности, наиболее активно изучаемыми в отношении особенностей когнитивного функционирования являются ген аполипопротеина Е (*APOE*) [5] и соседствующий с ним регион, включающий гены *TOMM40*, *APOC1*, *NECTIN2* [11, 12]. Кроме того, активно изучаются гены, вовлеченные в нейрогенез и регуляцию синаптической пластичности (*NGF*, *NRXN1*, *KIBRA*, *NRG1*, *BDNF*, *GRIN2B*, *SNAP25*, *SORL1*, *CLSTN2*) [5, 6, 8, 9], гены медиаторов воспаления (*CRP*, *IL1A*, *IL1B*, *TNF/LTA*, *P2RX7*) [7]. Тем не менее размер и направленность эффекта того или иного генетического локуса различаются между анализируемыми выборками в зависимости от возраста, когнитивного статуса испытуемых, популяции, половой принадлежности.

К настоящему времени проведено большое количество полногеномных анализов ассоциаций (GWAS) разных аспектов когнитивного функционирования (включая интеллект, уровень образования, исполнительные функции) в европейских популяциях [13–16]. В дополнение к имеющимся в литературе GWAS-результатам с целью систематизации данных об эффекте каждого отдельного значимого полиморфного локуса (SNP) были опубликованы метаанализы, суммирующие данные по анализу миллионов индивидов [17]. Тем не менее уникальные особенности распределения частот аллелей и генотипов в разных популяциях диктуют проведение репликативных исследований с учетом этнического ком-

понента. В настоящее время опубликованных GWAS-данных по ассоциации генетических вариантов с когнитивными показателями в этнических группах РФ не существует. Кроме того, результаты, полученные в ходе близнецовых и семейных исследований, свидетельствуют о наличии сильных генетических корреляций между различными когнитивными доменами [18], что указывает на вовлеченность одних и тех же генов в формирование различных когнитивных показателей. В этой связи интересным представляется оценка вовлеченности GWAS-локусов фактора общего интеллекта (*g*, от англ. general factor of intelligence) в формирование индивидуальных способностей к пространственному мышлению у индивидов из РФ. Помимо генетического компонента, индивидуальные вариации в уровне пространственного мышления связаны с особенностями микро- и макроокружения в онтогенезе [5].

Цель настоящего исследования – репликативный анализ ассоциаций GWAS-значимых полиморфных локусов генов *TUFM*, *SH2B1*, *ZNF638*, *NEGR1*, *ATP2A1*, *EXOC4*, *CSE1L* с развитием пространственного мышления у индивидов из РФ, в том числе в контексте генотип-средовых взаимодействий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование было проведено с использованием сформированной коллекции здоровых индивидов без семейной отягощенности психическими заболеваниями и не состоявших на учете у психиатра и нарколога ($N = 1011$, 80% из них женщин). Коллекция была подробно описана в предыдущих наших работах [5, 7]. Респонденты являлись студентами ВУЗов (возраст 18–25 лет), включая русских – 535, татар – 231, удмуртов – 160, индивидов смешанной этнической принадлежности – 85. Этническую принадлежность определяли с помощью самоопроса до трех поколений. Добровольное согласие на участие в исследовании получено от всех участников. Данное исследование было одобрено биоэтическим комитетом ИБГ УФИЦ РАН. Оценка способностей к пространственному (3D) мышлению проводилась с использованием тестовых заданий, состоящих из вопросов о вращении 3D-фигур (shape rotation), и учитывалась как число корректных ответов (психодиагностическая платформа Российской академии образования). В качестве потенциальных средовых предикторов рассматривались особенности детско-родительских отношений (стиль родительского воспитания, воспитание в полной/неполной семье, эпизоды плохого обращения в детстве), уровень доходов семьи, место воспитания, число детей в семье и порядок рождения, возраст матери и отца при рождении ребенка, вес ребенка при рождении, знание своего родного языка отлич-

ного от русского (билингвизм), наличие хронических заболеваний и табакокурения.

Нами был проведен поиск наиболее значимых полиморфных вариантов ($p < 10^{-13}$), идентифицированных в одном из последних метаанализов когнитивных способностей, в результате анализа которого был сформирован следующий набор семи “топовых” SNP: rs7187776 в гене *TUFM*, rs7198606 в гене *SH2B1*, rs2287326 в гене *ZNF638*, rs12128707 в гене *NEGR1*, rs8055138 в гене *ATP2A1*, rs1362739 в гене *EXOC4*, rs6063353 в гене *CSEIL*. Критерии для включения полиморфных локусов: наименьший уровень статистической значимости; локализация в разных белок-кодирующих генах; частота минорного аллеля (MAF, от англ. Minor Allele Frequency) в европейских популяциях более 0.05; высокая вероятность регуляторного эффекта SNP согласно базам данных CADD (Combined Annotation Dependent Depletion, <https://cadd.gs.washington.edu>) и RDB (Regulome Database, <https://regulomedb.org/regulome-search>). В базе данных CADD содержится информация о наиболее разрушительном эффекте SNP на трансляцию белка (чем выше CADD-балл, тем более пагубный эффект). В то же время RDB-балл отражает вероятность регуляторной роли SNP (более низкие баллы указывают на больший регуляторный эффект). Генотипирование генетических локусов осуществляли с помощью ПЦР в реальном времени при использовании наборов KASP (ООО “Максим Медикал”, LGC Genomics, UK) и анализа флуоресценции по конечной точке на амплификаторе CFX96 (BioRad, США).

Статистическая обработка данных включала проверку на нормальность распределения показателей пространственного мышления (*W*-тест Шапиро–Уилка, $p > 0.05$). При сравнении распределения частот встречаемости генотипов числяли показатели критерия χ^2 Пирсона (с поправкой Йетса на непрерывность) и уровня значимости. Линейный регрессионный анализ с включением 3D-показателей в качестве зависимой переменной, а генотипов изученных GWAS-локусов — в качестве предикторов использовался для выявления ассоциации каждого изученного SNP в общей группе с введением пола и этнической принадлежности как ковариат, а также в группах лиц разной этнической принадлежности. Социально-демографические факторы были включены в качестве независимой переменной в линейную регрессионную модель наряду с генотипами при проведении анализа генотип-средовых взаимодействий в каждой из этнических групп. Регрессионный анализ проводился на основании различных статистических моделей (аддитивной, доминантной, рецессивной) в программе PLINK v1.09. В случае выявления статистически-значимой модели генотип-средового взаимодействия

был проведен регрессионный анализ для определения статистически значимых различий в показателях 3D-мышления между группами, стратифицированных по средовому фактору (SPSS 23.0). Уровень статистической значимости принимался равным $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ распределения частот генотипов изученных локусов генов *TUFM*, *SH2B1*, *ZNF638*, *NEGR1*, *ATP2A1*, *EXOC4*, *CSEIL* в разных этнических группах (русские, татары, удмурты) продемонстрировал наличие статистически значимых различий ($p < 0.05$) в частоте генотипов по локусам rs8055138 в гене *ATP2A1*, rs12128707 в гене *NEGR1* и rs2287326 в гене *ZNF638* (табл. 1). При сравнении частот генотипов изученных этнических групп Волго-Уральского региона с европейскими популяциями (согласно данным 1000 Genomes Project) был отмечен схожий характер распределения этих частот между изученными этническими группами и выходцами из стран Северной и Западной Европы и финнами (представителями финно-угорской группы народов). Распределение частот аллелей и генотипов всех изученных полиморфных локусов соответствовало распределению Харди–Вайнберга ($p > 0.05$) (табл. 1, 2).

С целью репликации ассоциации полиморфных локусов генов *TUFM*, *SH2B1*, *ZNF638*, *NEGR1*, *ATP2A1*, *EXOC4*, *CSEIL* с формированием особенностей пространственного мышления был проведен линейный регрессионный анализ в общей выборке с включением этнической и половой принадлежности как ковариаты (для локусов, частоты генотипов которых не различаются между изученными этническими группами) и в этнически гомогенных подгруппах (табл. 2). В результате анализа не была подтверждена ассоциация проанализированных полиморфных локусов с показателями 3D-мышления ни в общей выборке, ни в одной из изученных этнических групп ($p > 0.05$) (табл. 2). Тем не менее среди индивидов татарской этнической принадлежности отмечена тенденция к более высокому уровню пространственного мышления у носителей генотипа rs2287326**T/T* в гене *ZNF638* по сравнению с носителями мажорного аллеля *G* ($p = 0.057$, $\beta_{ST} = 0.01$).

Проведенный анализ генотип-средовых взаимодействий, учитывающий эффект возможных социальных предикторов наряду с генетическими вариантами, продемонстрировал, что у русских возраст матери на момент рождения ребенка модулирует ассоциацию локуса rs2287326 в гене *ZNF638* с показателем 3D-мышления ($\beta_{ST} = 0.84$, $p = 0.005$) (рис. 1, *a*). У индивидов татарской этнической принадлежности было выявлено, что воспитание на одном или двух родных языках моду-

Таблица 1. Частоты генотипов изученных полиморфных локусов и различия в их распределении среди индивидов русской, татарской и удмуртской этнических принадлежностей

SNP	Генотип	Русские (<i>N</i> = 535)	Татары (<i>N</i> = 231)	Удмурты (<i>N</i> = 160)	CEU	FIN
<i>TUFM</i> rs7187776	<i>G/G</i>	0.20	0.21	0.21	0.16	0.11
	<i>A/G</i>	0.47	0.49	0.48	0.41	0.55
	<i>A/A</i>	0.34	0.30	0.31	0.42	0.34
	χ^2 (<i>p</i>)	0.9 (0.64) (русские vs. татары) 0.5 (0.76) (русские vs. удмурты) 0.1 (0.98) (татары vs. удмурты)				
<i>SH2B1</i> rs7198606	<i>G/G</i>	0.23	0.23	0.17	0.15	0.08
	<i>G/T</i>	0.53	0.51	0.54	0.42	0.57
	<i>T/T</i>	0.25	0.26	0.29	0.42	0.35
	χ^2 (<i>p</i>)	0.2 (0.92) (русские vs. татары) 2.6 (0.27) (русские vs. удмурты) 2.5 (0.29) (татары vs. удмурты)				
<i>ATP2A1</i> rs8055138	<i>T/T</i>	0.13	0.22	0.23	0.15	0.08
	<i>T/C</i>	0.49	0.49	0.39	0.42	0.57
	<i>C/C</i>	0.38	0.29	0.38	0.42	0.35
	χ^2 (<i>p</i>)	12.4 (0.002) (русские vs. татары) 9.8 (0.007) (русские vs. удмурты) 4.8 (0.09) (татары vs. удмурты)				
<i>NEGR1</i> rs12128707	<i>G/G</i>	0.09	0.07	0.09	0.05	0.06
	<i>A/G</i>	0.40	0.37	0.51	0.49	0.39
	<i>A/A</i>	0.52	0.56	0.40	0.46	0.55
	χ^2 (<i>p</i>)	1.2 (0.52) (русские vs. татары) 7.4 (0.02) (русские vs. удмурты) 9.5 (0.008) (татары vs. удмурты)				
<i>CSE1L</i> rs6063353	<i>A/A</i>	0.21	0.19	0.14	0.16	0.25
	<i>A/G</i>	0.50	0.48	0.59	0.45	0.45
	<i>G/G</i>	0.29	0.33	0.27	0.39	0.30
	χ^2 (<i>p</i>)	1.4 (0.50) (русские vs. татары) 5.1 (0.08) (русские vs. удмурты) 5.1 (0.08) (татары vs. удмурты)				
<i>EXOC4</i> rs1362739	<i>A/A</i>	0.18	0.21	0.21	0.28	0.23
	<i>A/C</i>	0.49	0.50	0.49	0.46	0.51
	<i>C/C</i>	0.33	0.28	0.30	0.26	0.26
	χ^2 (<i>p</i>)	1.9 (0.38) (русские vs. татары) 0.8 (0.67) (русские vs. удмурты) 0.2 (0.91) (татары vs. удмурты)				
<i>ZNF638</i> rs2287326	<i>T/T</i>	0.17	0.26	0.24	0.16	0.21
	<i>T/G</i>	0.46	0.52	0.53	0.48	0.58
	<i>G/G</i>	0.36	0.23	0.23	0.36	0.21
	χ^2 (<i>p</i>)	16.2 (<0.001) (русские vs. татары) 10.7 (0.005) (русские vs. удмурты) 0.1 (0.96) (татары vs. удмурты)				

Примечание. Приведены данные для некоторых европейских популяций (1000 Genomes Project): CEU – резиденты Центральной Юты, выходцы из стран Северной и Западной Европы, FIN – финны. Статистически значимые различия выделены жирным шрифтом.

Таблица 2. Результаты линейного регрессионного анализа ассоциации GWAS-локусов генов с показателями пространственного мышления в общей группе, среди индивидов русской, татарской и удмуртской этнических принадлежности

SNP	Аллели ^a	P_{HWE}	MAF _{GWAS}	β_{GWAS}	P_{GWAS}	Общая выборка			Русские			Татары			Удмурты		
						β_{ST}	p	MAF	β_{ST}	p	MAF	β_{ST}	p	MAF	β_{ST}	p	MAF
<i>TUFM</i> rs7187776	G/A	0.496	0.393	-0.08	2.4×10^{-24}	0.06	0.082	0.447	0.09	0.068	0.429	0.01	0.880	0.452	0.12	0.156	0.453
<i>SH2B1</i> rs7198606	G/T	0.157	0.381	-0.09	2.7×10^{-24}	—	—	—	-0.04	0.401	0.488	0.12	0.104	0.487	0.11	0.223	0.441
<i>ATP2A1</i> rs8055138	T/C	0.676	0.381	-0.09	2×10^{-24}	-0.02	0.552	0.409	0.01	0.810	0.375	0.02	0.712	0.467	-0.04	0.683	0.422
<i>NEGR1</i> rs12128707	G/A	0.934	0.260	0.08	4.2×10^{-18}	<0.01	0.812	0.284	0.06	0.211	0.284	-0.08	0.263	0.255	-0.05	0.568	0.343
<i>CSE1L</i> rs6063353	A/G	0.456	0.427	-0.06	9.4×10^{-17}	-0.01	0.730	0.460	-0.05	0.330	0.460	-0.04	0.567	0.431	-0.05	0.533	0.434
<i>EXOC4</i> rs1362739	A/C	0.945	0.468	0.06	1.8×10^{-14}	—	—	—	-0.05	0.283	0.428	0.08	0.221	0.465	0.03	0.750	0.456
<i>ZNF638</i> rs2287326	T/G	0.277	0.447	-0.02	2.4×10^{-13}	—	—	—	0.03	0.525	0.405	0.05	0.496	0.514	0.05	0.587	0.503
						—	—		0.07	0.175		0.01	0.057		<0.01	0.979	

Примечание. P_{GWAS} — p -value в метаанализе GWAS когнитивных показателей [17]; P_{HWE} — p -value для теста Харди–Вайнберга; β_{GWAS} — регрессионный коэффициент из метаанализа [17]; MAF — частота минорного аллеля; MAF_{GWAS} — частота минорного аллеля в метаанализе [17]; β_{ST} — стандартизованный коэффициент регрессии; p — p -value; ^a минорный/мажорный аллели. В верхней строке для каждого полиморфного варианта указаны результаты параметров для аддитивной модели, в нижней — для рецессивной модели. Прочерки отмечены в общей выборке для локусов генов *SH2B1*, *EXOC4*, *ZNF638*, в которых регрессионный анализ не проводился вследствие статистически значимых различий в частотах генотипов между изученными этническими группами.

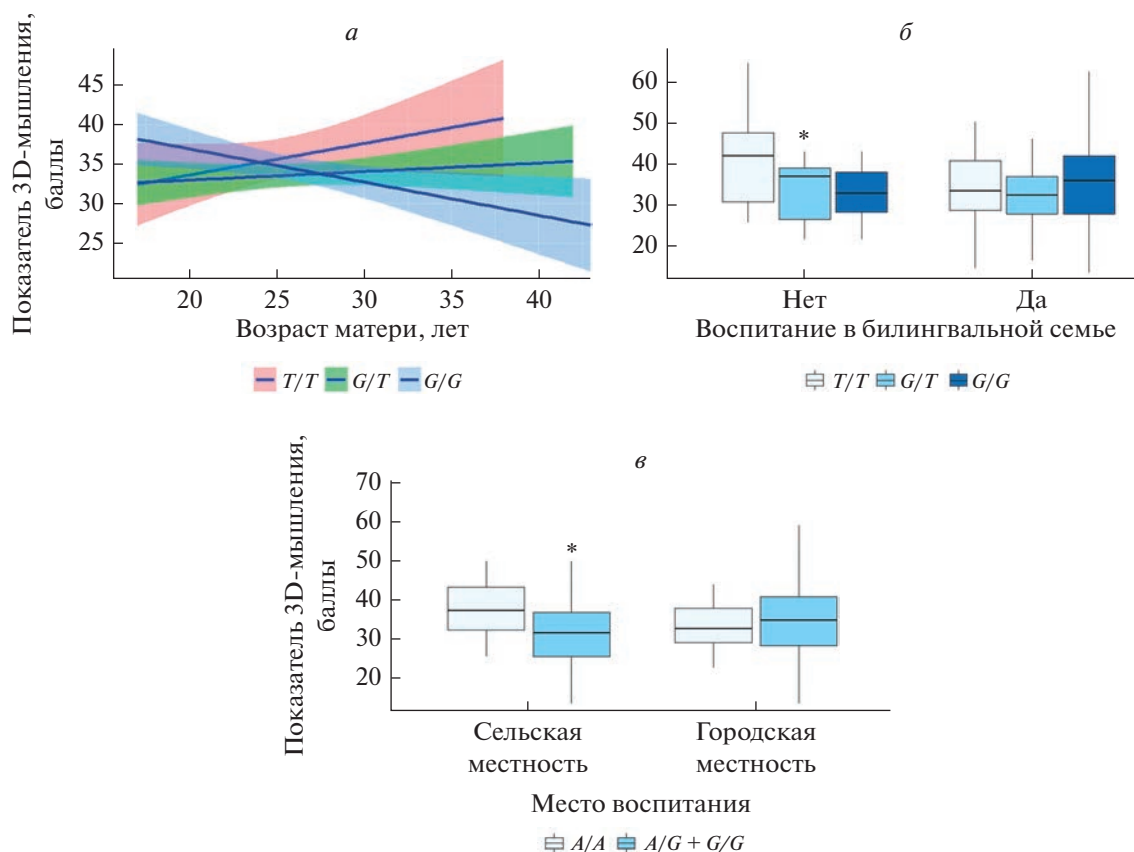


Рис. 1. Средние значения показателей пространственного мышления в зависимости от генотипов полиморфного варианта rs2287326 в гене *ZNF638* в группе индивидов русской этнической принадлежности в зависимости от возраста матери при рождении ребенка (а), в группе индивидов татарской этнической принадлежности в зависимости от воспитания в билингвальной/небилингвальной семье (б), а также полиморфного варианта rs7187776 в гене *TUFM* в группе индивидов татарской этнической принадлежности в зависимости от места воспитания (в). * Указаны статистически значимые различия между группами ($p < 0.05$).

лирует ассоциацию варианта rs2287326 с анализируемым когнитивным показателем ($\beta_{ST} = 0.44$, $p = 0.020$). Последующий стратификационный анализ, проведенный отдельно в каждой из групп, различающихся по наличию/отсутствию билингвального воспитания, продемонстрировал, что среди студентов, которые были воспитаны не в билингвальной семье, наблюдается линейная зависимость между количеством минорных аллелей rs2287326**T* и увеличением 3D-показателей ($\beta_{ST} = 0.34$, $p = 0.023$) (рис. 1,б). Кроме того, у татар по этнической принадлежности такая независимая переменная как “воспитание в сельской/городской местности” модифицировала ассоциацию аллеля rs7187776**G* в гене *TUFM* с 3D-показателем ($\beta_{ST} = 0.41$, $p = 0.009$). Дальнейший стратификационный анализ показал, что статистически значимое снижение пространственного мышления ассоциировано с наличием минорного аллеля rs7187776**G* по сравнению с генотипом rs7187776**A/A* у индивидов, воспитывавшихся в сельской местности ($\beta_{ST} = -0.30$, $p = 0.007$) (рис. 1,в).

У индивидов удмуртской этнической принадлежности не было обнаружено статистически значимых генотип-средовых взаимодействий, связанных с индивидуальными пространственными показателями.

ОБСУЖДЕНИЕ

В рамках настоящего репликативного исследования была подтверждена вовлеченность GWAS-локусов rs2287326 (в гене *ZNF638*) и rs7187776 (в гене *TUFM*) в развитие способности к пространственному мышлению у русских и татар из РФ, но с учетом влияния средового компонента. Согласно метаанализу [17] минорный аллель *T* в гене *ZNF638* ассоциирован с более низким уровнем общего интеллекта ($\beta = -0.02$, $p = 2.4 \times 10^{-13}$) в объединенной выборке европейцев. Наоборот, результаты базы данных FinnGen (<https://r8.finngen.fi>), содержащей информацию полногеномных анализов ассоциаций с различными показателями и

риском развития многофакторных заболеваний у 500 000 участников из Финляндии, указывают на сниженный риск развития деменции у носителей минорного аллеля rs2287326**T* ($\beta = -0.30$, $p = 4.1 \times 10^{-2}$). Другие GWAS также указывают на ассоциацию различных локусов в гене *ZNF638* с уровнем образования и интеллекта [14–16]. В настоящей работе был продемонстрирован дифференциальный характер ассоциации генотипов локуса rs2287326 с пространственным мышлением в зависимости от возраста матери на момент рождения ребенка (у русских) и воспитания индивида не в билингвальной семье (у татар). В частности, у русских предрасположенность к формированию лучшего пространственного мышления наблюдалась у носителей генотипа rs2287326**T/T*, воспитанных матерями старше 25–30 лет, что в определенной степени может быть связано с более осознанным материнством. Литературные данные указывают на положительную корреляцию между возрастом матери на момент рождения ребенка и когнитивными характеристиками их детей в лонгитудном контексте, включая краткосрочную память и исполнительные функции [19]. В то же время в настоящей работе носители генотипов *G/G*, русские по этнической принадлежности, воспитанные матерями старше 25–30 лет, характеризовались снижением 3D-мышления. Таким образом, возраст матери выступает в качестве фактора, модулирующего различия в уровне 3D-способностей, связанные с наличием определенного генотипа в гене *ZNF638*, причем такая зависимость является более выраженной в случае воспитания матерями более старшего возраста. Схожий паттерн ассоциации (более высокий 3D-показатель у носителей генотипа rs2287326**T/T*) наблюдался у татар, которые воспитывались только в русскоговорящей семье, в то время как такой ассоциации у татар-билингвов (свободно говорящих на татарском языке) обнаружено не было. Существуют данные о том, что билингвальное воспитание является стрессором для ребенка, оказывая отрицательное влияние на развитие специфических когнитивных способностей [20]. Таким образом, ассоциация вариантов гена *ZNF638* у индивидов русской и татарской этнической принадлежности с когнитивным показателем обнаруживается лишь в случае воспитания в условиях благоприятного средового воздействия (в нашем случае – положительного эффекта от воспитания более зрелыми матерями и отсутствия билингвального воспитания в качестве стрессора).

Ген *ZNF638* кодирует одноименный белок цинковых пальцев 638, высокоэкспрессируемый в головном мозге. Функциональные и ассоциа-

тивные исследования указывают на вовлеченность гена *ZNF638* в вариативность роста человека [21] и дифференцировку адипоцитов [22]. Недавно было продемонстрировано, что увеличение экспрессии гена *ZNF638* характерно для адипоцитов с гиперэкспрессией белка **FoxP4** (от англ. Forkhead box protein) семейства транскрипционных факторов [23]. Несмотря на то что к настоящему времени нет функциональных работ, указывающих на прямое участие белка *ZNF638* в формировании когнитивных способностей или нарушений, его вовлеченность может быть связана с непрямым взаимодействием с белками семейства FoxP, члены которого неоднократно были изучены в контексте когнитивных фенотипов. Например, изменения нуклеотидной последовательности в гетерозиготном состоянии в генах *FoxP1*, *FoxP2*, *FoxP4* связаны с нарушениями речевого развития [24], расстройствами аутистического спектра и когнитивными нарушениями [25, 26], апраксией речи [27]. Стоит отметить, что данные гены высоко экспрессируются в различных отделах головного мозга, включая префронтальную кору, гиппокамп, миндалевидный комплекс, базальные ганглии, таламус и мозжечок, и регулируют молекулярные процессы, связанные с развитием и функционированием головного мозга [28]. Манипуляции с экспрессией генов семейства FoxP в модельных животных также указывают на их связь с развитием пространственного восприятия. В частности, у мышей-нокаут по гену *FoxP1* нарушенное функционирование стриатума приводит к снижению числа правильно пройденных пространственных тестов и ухудшению распознавания объектов [25, 29].

Вторым интересным результатом, полученным нашей группой, является связь показателей 3D-мышления с промоторным вариантом rs7187776 гена *TUFM* у индивидов татарской этнической принадлежности, которая оказалась статистически значимой только у лиц, воспитывавшихся в сельской местности. Полученные нами результаты согласуются с данными метаанализа, продемонстрировавшего ассоциацию аллеля rs7187776**A* в гене *TUFM* с улучшенными когнитивными способностями в обобщенной выборке европейцев [17]. Функциональные исследования также свидетельствуют о корреляции сниженной экспрессии гена *TUFM* с развитием когнитивного дефицита и накоплением β -амиоида и β -секретазы [30]. Другие GWAS-исследования связывают мажорный аллель rs7187776**A* с меньшей окружностью бедер с коррекцией на индекс массы тела (ИМТ), в том числе отдельно у женщин [31]. Плейотропный эффект полиморф-

ного локуса rs7187776 на когнитивные способности, окружность бедер и ИМТ не удивителен, поскольку сообщается о негативной генетической корреляции между уровнем интеллекта, ИМТ ($rg = -0.11$) и окружностью талии/бедер ($rg = -0.10$) [17]. В свою очередь, двукратное снижение уровня TUFM у мышей с ожирением и увеличение уровня этого белка у особей с высокой физической активностью по сравнению с контрольной группой [32] укладываются в рамки представления о связи метаболических нарушений с развитием болезни Альцгеймера. Противоположные данные в отношении изучаемого локуса rs7187776 в гене *TUFM* были обнаружены у детей, проживающих в сельской местности в Китае [33]. Так, частота аллеля *G* локуса rs7187776 была статистически значимо выше в группе лиц с повышенным уровнем IQ по сравнению с лицами с меньшим значением этого показателя, что противоположно полученным нами данным. Такой обратный эффект может быть обусловлен различиями в частотах генотипов между лицами татарской и китайской этнических групп (0.21 для генотипа *G/G* у татар и 0.11 у китайцев Хань), а также культурными особенностями воспитания.

Ген *TUFM* кодирует митохондриальный фактор элонгации трансляции Tu, снижение уровня которого приводит к нарушению митохондриальной дыхательной цепи и повышению уровня активных форм кислорода в различных клеточных линиях [34]. Наши результаты свидетельствуют о том, что связь аллельных вариантов гена *TUFM* с уровнем 3D-показателя у татар проявляется только в благоприятных условиях воспитания (сельской местности). Ранее был показан положительный эффект наличия “озелененной” территории в ближайшем окружении с местом проживания на улучшение когнитивных показателей у детей в течение всего одного года [35], а длительное проживание в озелененной местности коррелировало с улучшением памяти вследствие увеличения объема серого вещества в префронтальной коре головного мозга [36]. С другой стороны, известно о негативном эффекте проживания в городской местности и связанным с этим воздействием мелких дисперсных частиц на снижение эффективности работы митохондрий [37]. Несмотря на то что к настоящему времени нет данных о связи полиморфного локуса rs7187776 с изменением экспрессии гена *TUFM*, наши результаты демонстрируют дифференциальный характер ассоциации генотипов локуса rs7187776 с уровнем 3D-мышления, наблюдаемый в условиях сниженной аллостатической нагрузки (в частности, воспитания в сельской местности [38]).

Проведенное нами репликативное исследование GWAS-локусов, ассоциированных с фактором общего интеллекта в европейских популяциях, выявило ассоциацию генов *ZNF638* и *TUFM* в развитии пространственного мышления в контексте генотип-средовых взаимодействий у индивидов периода ранней взрослости из РФ, татар и русских по этнической принадлежности. Интересно, что такая ассоциация обнаруживалась только в благоприятных условиях воспитания, включая воспитание более зрелыми матерями, отсутствие билингвального воспитания и воспитание в сельской местности. Тем не менее мы не смогли полностью реплицировать ассоциацию изученных полиморфных локусов в генах *TUFM*, *SH2B1*, *ZNF638*, *NEGR1*, *ATP2A1*, *EXOC4*, *CSE1L* с показателем 3D-мышления в этнических группах русских, татар и удмуртов Волго-Уральского региона. Необходимость проведения статистического анализа в каждой из этнических групп отдельно продиктована наличием различий в распределении частот генотипов локусов rs8055138 в гене *ATP2A1*, rs12128707 в гене *NEGR1* и rs2287326 в гене *ZNF638* между этническими группами. Таким образом, негативный результат может быть в определенной мере связан с различиями в распределении частот аллелей и генотипов этих SNP между индивидами изученных этнических групп и обобщенной выборкой европейского происхождения, использованной в метаанализе GWAS, средним размером проанализированных выборок этнических групп, а также различиями в анализируемых когнитивных доменах в качестве фенотипов. Тем не менее полученные данные указывают на вовлеченность генов, участвующих в процессах адипогенеза, в формирование когнитивных способностей, что укладывается в представление о связи когнитивных и метаболических нарушений. К настоящему времени число GWAS работ, анализирующих нейropsychологические и когнитивные фенотипы в российских выборках, незначительно. Тем не менее они также указывают на характерный для российской выборки паттерн ассоциированных генетических вариантов и на сложность в репликации результатов, полученных на других этнических группах [39]. Необходимы дальнейшие исследования в области генетики когнитивных способностей с использованием метода GWAS для идентификации ассоциированных генетических вариантов, уникальных для индивидов из РФ.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 17-78-30028) (проведение психологического тестирования и сбор биологических об-

разцов), мега-гранта Правительства Республики Башкортостан (соглашение 1 от 02.12.2022, генотипирование и биоинформатический анализ данных) и мега-гранта Правительства РФ (проект № 075-15-2021-595) (статистическая обработка). Образцы ДНК взяты из ЦКП “Коллекция биологических материалов человека” ИБГ УФИЦ РАН, поддержанного Программой биоресурсных коллекций ФАНО России (№ 007-030164/2).

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

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тихомирова Т.Н., Малых С.Б., Богомаз С.А. и др. Пространственное мышление и память у старшеклассников с различным уровнем математической беглости // Теоретич. и эксперим. психология. 2013. Т. 6. № 4. С. 99–109.
2. Канзафарова Р.Ф., Казанцева А.В., Хуснутдинова Э.К. Генетические и средовые аспекты наличия трудностей в обучении математике // Генетика. 2015. Т. 51. № 3. С. 281–289.
<https://doi.org/10.7868/S0016675815010038>
3. Коногорская С.А. Особенности пространственного мышления и их взаимосвязь с учебной успешностью обучающихся // Научно-педагог. обозрение. 2017. Т. 15. № 1.
<https://doi.org/10.23951/2307-6127-2017-1-142-152>
4. Тахирова З.Р., Казанцева А.В., Еникеева Р.Ф. и др. Психогенетика пространственных способностей человека // Рос. психол. журн. 2021. Т. 18. № 2. С. 67–93.
<https://doi.org/10.21702/rpj.2021.2.5>
5. Kazantseva A.V., Enikeeva R.F., Davydova Y.D. et al. The role of the KIBRA and APOE genes in developing spatial abilities in humans // Vavilov. Zh. Genet. Selektzii. 2021. V. 25. № 8. P. 839–846.
<https://doi.org/10.18699/VJ21.097>
6. Казанцева А.В., Еникеева Р.Ф., Романова А.Р. и др. Взаимосвязь стресс-обусловленного когнитивного функционирования с вариантами генов регуляции синаптической пластичности // Генетика. 2020. Т. 56. № 1. С. 98–106.
<https://doi.org/10.31857/S0016675820010063>
7. Enikeeva R.F., Kazantseva A.V., Davydova Y.D. et al. The role of inflammatory system genes in individual differences in nonverbal intelligence // Vavilov. Zh. Genet. Selektzii. 2022. V. 26. № 2. P. 179–181.
<https://doi.org/10.18699/VJGB-22-22>
8. Laukka E.J., Köhncke Y., Papenberg G. et al. Combined genetic influences on episodic memory decline in older adults without dementia // Neuropsychology. 2020. V. 34. № 6. P. 654–666.
<https://doi.org/10.1037/neu0000637>
9. Ahmetov I.I., Valeeva E.V., Yerdenova M.B. et al. KIBRA gene variant is associated with ability in chess and science // Genes (Basel). 2023. V. 14. № 1.
<https://doi.org/10.3390/genes14010204>
10. Mustafin R.N., Kazantseva A.V., Enikeeva R.F. et al. Longitudinal genetic studies of cognitive characteristics // Vavilov. Zh. Genet. Selektzii. 2020. V. 24. № 1. P. 87–95.
<https://doi.org/10.18699/VJ20.599>
11. Bocharova A., Vagaitseva K., Marusin A. et al. Association and gene-gene interactions study of late-onset Alzheimer's disease in the Russian population // Genes (Basel). 2021. V. 12. № 10.
<https://doi.org/10.3390/genes12101647>
12. Ortega-Rojas J., Arboleda-Bustos C.E., Guerrero E. et al. Genetic variants and haplotypes of TOMM40, APOE, and APOC1 are related to the age of onset of late-onset Alzheimer disease in a Colombian population // Alzheimer Dis. Assoc. Disord. 2022. V. 36. № 1. P. 29–35.
<https://doi.org/10.1097/WAD.0000000000000477>
13. Lee J.J., Wedow R., Okbay A. et al. Gene discovery and polygenic prediction from a genome-wide association study of educational attainment in 1.1 million individuals // Nat. Genet. 2018. V. 50. № 8. P. 1112–1121.
<https://doi.org/10.1038/s41588-018-0147-3>
14. Lam M., Trampush J.W., Yu J. et al. Large-scale cognitive GWAS meta-analysis reveals tissue-specific neural expression and potential neurotropic drug targets // Cell. Rep. 2017. V. 21. № 9. P. 2597–2613.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.028>
15. Lam M., Chen C.-Y., Li Z. et al. Comparative genetic architectures of schizophrenia in East Asian and European populations // Nat. Genet. 2019. V. 51. № 12. P. 1670–1678.
<https://doi.org/10.1038/s41588-019-0512-x>
16. Hill W.D., Marioni R.E., Maghzian O. et al. A combined analysis of genetically correlated traits identifies 187 loci and a role for neurogenesis and myelination in intelligence // Mol. Psychiatry. 2019. V. 24. № 2. P. 169–181.
<https://doi.org/10.1038/s41380-017-0001-5>
17. Savage J.E., Jansen P.R., Stringer S. et al. Genome-wide association meta-analysis in 269,867 individuals identifies new genetic and functional links to intelligence // Nat. Genet. 2018. V. 50. № 7. P. 912–919.
<https://doi.org/10.1038/s41588-018-0152-6>
18. Plomin R., Kovas Y. Generalist genes and learning disabilities // Psychol. Bull. 2005. V. 131. № 4. P. 592–617.
<https://doi.org/10.1037/0033-2909.131.4.592>

19. *Brouwer-Brolsma E.M., van de Rest O., Godschalk R. et al.* Associations between maternal long-chain polyunsaturated fatty acid concentrations and child cognition at 7 years of age: The MEFAB birth cohort // *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. 2017. V. 126. P. 92–97. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2017.09.012>
20. *Asnaani A., Richey J.A., Dimaite R. et al.* A cross-ethnic comparison of lifetime prevalence rates of anxiety disorders // *J. Nerv. Ment. Dis.* 2010. V. 198. № 8. P. 551–555. <https://doi.org/10.1097/NMD.0b013e3181ea169f>
21. *Hao Y., Liu X., Lu X. et al.* Genome-wide association study in Han Chinese identifies three novel loci for human height // *Hum. Genet.* 2013. V. 132. № 6. P. 681–689. <https://doi.org/10.1007/s00439-013-1280-9>
22. *Meruvu S., Hugendubler L., Mueller E.* Regulation of adipocyte differentiation by the zinc finger protein ZNF638 // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 30. P. 26516–26523. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.212506>
23. *Perie L., Verma N., Mueller E.* The forkhead box transcription factor FoxP4 regulates thermogenic programs in adipocytes // *J. Lipid Res.* 2021. V. 62. <https://doi.org/10.1016/j.jlcr.2021.100102>
24. *Snijders Blok L., Vino A., den Hoed J. et al.* Heterozygous variants that disturb the transcriptional repressor activity of FOXP4 cause a developmental disorder with speech/language delays and multiple congenital abnormalities // *Genet. Med. Off J. Am. Coll. Med. Genet.* 2021. V. 23. № 3. P. 534–542. <https://doi.org/10.1038/s41436-020-01016-6>
25. *Bacon C., Schneider M., Le Magueresse C. et al.* Brain-specific Foxp1 deletion impairs neuronal development and causes autistic-like behaviour // *Mol. Psychiatry*. 2015. V. 20. № 5. P. 632–639. <https://doi.org/10.1038/mp.2014>
26. *Hamdan F.F., Daoud H., Rochefort D. et al.* De novo mutations in *FOXP1* in cases with intellectual disability, autism, and language impairment // *Am. J. Hum. Genet.* 2010. V. 87. № 5. P. 671–678. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.09.017>
27. *Lai C.S., Fisher S.E., Hurst J.A. et al.* A forkhead-domain gene is mutated in a severe speech and language disorder // *Nature*. 2001. V. 413. № 6855. P. 519–523. <https://doi.org/10.1038/35097076>
28. *Co M., Anderson A.G., Konopka G.* FOXP transcription factors in vertebrate brain development, function, and disorders // *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 2020. V. 9. № 5. <https://doi.org/10.1002/wdev.375>
29. *Sargolini F., Rouillet P., Oliverio A., Mele A.* Effects of intra-accumbens focal administrations of glutamate antagonists on object recognition memory in mice // *Behav. Brain Res.* 2003. V. 138. № 2. P. 153–163. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(02\)00238-3](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(02)00238-3)
30. *Zhong B.-R., Zhou G.-F., Song L. et al.* TUFM is involved in Alzheimer's disease-like pathologies that are associated with ROS // *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 2021. V. 35. № 5. P. e21445. <https://doi.org/10.1096/fj.202002461R>
31. *Shungin D., Winkler T.W., Croteau-Chonka D.C. et al.* New genetic loci link adipose and insulin biology to body fat distribution // *Nature*. 2015. V. 518. № 7538. P. 187–196. <https://doi.org/10.1038/nature14132>
32. *Lee D.E., Brown J.L., Rosa M.E. et al.* Translational machinery of mitochondrial mRNA is promoted by physical activity in Western diet-induced obese mice // *Acta Physiol. (Oxf.)*. 2016. V. 218. № 3. P. 167–177. <https://doi.org/10.1111/apha.12687>
33. *Yu X., Xia L., Zhang S. et al.* Fluoride exposure and children's intelligence: Gene-environment interaction based on SNP-set, gene and pathway analysis, using a case-control design based on a cross-sectional study // *Environ. Int.* 2021. V. 155. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106681>
34. *He K., Guo X., Liu Y. et al.* TUFM downregulation induces epithelial-mesenchymal transition and invasion in lung cancer cells via a mechanism involving AMPK-GSK3 β signaling // *Cell Mol. Life Sci.* 2016. V. 73. № 10. P. 2105–2121. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2122-9>
35. *Dadvand P., Nieuwenhuijsen M.J., Esnaola M. et al.* Green spaces and cognitive development in primary schoolchildren // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2015. V. 112. № 26. P. 7937–7942. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503402112>
36. *Dadvand P., Pujol J., Macià D. et al.* The association between lifelong greenspace exposure and 3-Dimensional brain magnetic resonance imaging in Barcelona schoolchildren // *Environ. Health Perspect.* 2018. V. 126. № 2. <https://doi.org/10.1289/EHP1876>
37. *Rosa M.J., Just A.C., Guerra M.S. et al.* Identifying sensitive windows for prenatal particulate air pollution exposure and mitochondrial DNA content in cord blood // *Environ. Int.* 2017. V. 98. P. 198–203. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.11.007>
38. *Казанцева А.В., Давыдова Ю.Д., Еникеева Р.Ф. и др.* Индивидуальные вариации длины теломер у здоровых индивидов: эффект полиморфного варианта гена *TERT* и урбанизации // *Генетика*. 2022. Т. 58. № 9. С. 1074–1084. <https://doi.org/10.31857/S0016675822090107>
39. *Pinakhina D., Yermakovich D., Vergasova E. et al.* GWAS of depression in 4,520 individuals from the Russian population highlights the role of MAGI2 (SSCAM) in the gut-brain axis // *Front. Genet.* 2022. V. 13. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.972196>

Replication Study of GWAS-Associated Variants in the *TUFM*, *SH2B1*, *ZNF638*, *NEGR1*, *ATP2A1*, *EXOC4*, and *CSE1L* Genes and Cognitive Abilities

A. V. Kazantseva^{a, *}, Yu. D. Davydova^a, R. F. Enikeeva^a, Z. R. Takhirova^b, R. N. Mustafin^c,
M. M. Lobaskova^d, S. B. Malykh^{d, e}, and E. K. Khusnutdinova^{a, b, e}

^a*Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*

^b*Bashkir State University, Laboratory of Neurocognitive Genetics, Department of Genetics and Fundamental Medicine, Ufa, 450076 Russia*

^c*Bashkir State Medical University, Department of Medical Genetics and Fundamental Medicine, Ufa, 450008 Russia*

^d*Psychological Institute of Russian Academy of Education, Moscow, 125009 Russia*

^e*Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

*e-mail: Kazantsa@mail.ru

To date, a large number of genome-wide association analyses (GWAS) of cognitive abilities (i.e. intelligence, educational level, executive functions, etc.) have been conducted in European populations. A replication analysis of GWAS-associated variants of the general factor of intelligence in the development of spatial (3D) abilities in the individuals from Russia is relevant. In order to estimate the main effect of the most significant GWAS loci on spatial abilities in the Russian cohort ($N = 1011$, 18–25 years old) a set of seven “top” SNPs ($p < 10^{-13}$) was formed: *TUFM* rs7187776, *SH2B1* rs7198606, *ZNF638* rs2287326, *NEGR1* rs12128707, *ATP2A1* rs8055138, *EXOC4* rs1362739, and *CSE1L* rs6063353. Statistically significant differences ($p < 0.05$) in genotype frequencies distribution of *ATP2A1* rs8055138, *NEGR1* rs12128707, and *ZNF638* rs2287326 between Russians, Tatars, and Udmurts have been observed. As a result of analysis of genotype-by-environment interactions we revealed ethnicity-specific character of associations: in Russians maternal age at delivery ($\beta_{ST} = 0.84$, $p = 0.005$) and in Tatars bilingual/unilingual rearing ($\beta_{ST} = 0.44$, $p = 0.020$) modulated association of *ZNF638* rs2287326 with spatial abilities. Moreover, urban/rural residency in childhood modulated association of *TUFM* rs7187776 with 3D abilities ($\beta_{ST} = 0.41$, $p = 0.009$). The data obtained indicate the involvement of the *ZNF638*, *TUFM*, *SH2B1*, and *EXOC4* genes, which are responsible for adipogenesis, in the manifestation of cognitive abilities, and, therefore, confirms the relationship between cognitive and metabolic disorders. Nevertheless, ethnicity-specific character of demonstrated associations and differences in genotype frequencies of analyzed GWAS-SNPs point to the specific pattern of associated genetic loci characteristic for the Russian cohort and to the complexity of replication of data reported for the combined samples of Europeans.

Keywords: genome-wide association study, spatial abilities, SNP, Alzheimer’s disease, replication, *ZNF638*.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИСТОРИЯ РУССКИХ СТАРОЖИЛОВ АРКТИЧЕСКОГО ПОБЕРЕЖЬЯ ЯКУТИИ ИЗ с. РУССКОЕ УСТЬЕ ПО ДАННЫМ Y-ХРОМОСОМЫ И ШИРОКОГЕНОМНОГО АНАЛИЗА

© 2023 г. А. В. Соловьев¹, Т. В. Борисова¹, Г. П. Романов¹, Ф. М. Терютин^{1, 2}, В. Г. Пшеникова^{1, 2}, С. Е. Никитина³, А. Н. Алексеев^{1, 3}, Н. А. Барашков^{1, 2}, С. А. Федорова^{1, 2, *}

¹Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, Якутск, 677013 Россия

²Якутский научный центр комплексных медицинских проблем, Якутск, 677018 Россия

³Институт гуманитарных исследований и проблем малочисленных народов Севера Сибирского отделения Российской академии наук, Якутск, 677027 Россия

*e-mail: sardanaafedorova@mail.ru

Поступила в редакцию 27.03.2023 г.

После доработки 14.04.2023 г.

Принята к публикации 28.04.2023 г.

Существуют различные гипотезы относительно происхождения и времени появления русских поселений на Северо-Востоке Арктики. С целью изучения истории формирования северного старожильческого населения Якутии нами проведен анализ линий Y-хромосомы у представителей трех групп жителей с. Русское Устье, расположенного в дельте р. Индигирки (“поморы”, “казаки” и “зашиверцы”), сопоставимых с основными миграционными волнами заселения русскими арктического побережья Восточной Сибири. Впервые описаны характерные особенности генетической структуры популяции русскоустыинцев по данным широкогеномного анализа 740 тыс. SNP. Результаты исследования в большей степени свидетельствуют в пользу “поморской” гипотезы происхождения русскоустыинцев.

Ключевые слова: русские старожилы, генофонд, Y-хромосома, широкогеномный анализ.

DOI: 10.31857/S0016675823090114, **EDN:** WUXZDA

Для решения вопросов происхождения отдельных этносов помимо общепринятых археологических, лингвистических и этнографических подходов широко применяются методы молекулярной генетики. Среди современных популяций Северо-Востока России все еще остаются “белые пятна”; так, с помощью современных геномных методов исследования недостаточно охарактеризован генофонд русскоустыинцев — популяции русских, которая, вероятно, одной из первых освоила арктическое побережье Восточной Сибири и вплоть до настоящего времени, находясь в окружении соседних сибирских народов, сумела сохранить свою этническую общность, самобытную культуру и язык.

Численность жителей с. Русское Устье в 2012–2014 гг. по сведениям архива местной администрации составляла 146 человек, из них коренные местные русские — 85%, остальные 15% — жены и мужья русскоустыинцев из приезжих [1]. По данным Всероссийской переписи населения 2020 г. в селе насчитывается всего 99 человек [2]. В сравнении с архивными данными численность русскоустыинцев остается примерно на том же уровне,

что и в XVII в. [1, 3]. В отличие от соседних палеоазиатских, уральских и тунгусо-маньчжурских племен (чукчей, юкагиров, эвенов и эвенков), занимающихся кочевым оленеводством, и тюркоязычных якутов, разводящих лошадей и коров, основным трудовым занятием у русскоустыинцев на протяжении многих веков оставался промысел белого песка и рыболовство, а также ездовое собаководство.

В антропологическом портрете русскоустыинцев отмечают высокую степень метисации [4]. Известно, что численность соседних арктических племен в XVII в. была намного больше числа русских: оленных чукчей по данным ясачных переписей к моменту прихода русских насчитывалось до 2000 человек, юкагиров — от 4500 до 5000 человек [5]. Исследователи отмечают, что отдаленность от Центральной России и географическая изоляция определили взаимодействие и семейнобрачные отношения русских с соседними народами, прежде всего с юкагирами и эвенами, реже с эвенками и крайне редко с якутами [3]. Несмотря на иноязычное окружение русскоустыинцы со-

хранили уникальный старорусский язык вплоть до XXI в. [1, 3, 6].

Ранее была опубликована статья Р.И. Суверника и соавт. (2010), касающаяся изучения генетической истории русских старожилов полярного Севера, в которой был проведен анализ линий мтДНК русскоустинцев и показано преобладание в митохондриальном генофонде линий сибирского, преимущественно «юкагирского» происхождения (90.6%) [7]. Позднее был изучен состав линий Y-хромосомы у жителей с. Русское Устье, который выявил в мужском генофонде русскоустинцев доминирование линий европейского происхождения (83.4%) [8]. Анализ фамильного разнообразия свидетельствует о том, что коренные жители с. Русское Устье относят происхождение своих родов по отцовской линии к трем основным группам: «поморы», «казаки» и «зашиверцы», которые сопоставимы с тремя основными миграционными волнами заселения арктического побережья Восточной Сибири [9]. Согласно местной традиции русские старожилы устья р. Индигирки, которые позиционируют себя как поморы и казаки, относятся к «досельным», т.е. потомкам ранних основателей села предположительно в XVI–XVII вв., а «зашиверцы» — к «пришлым», т.е. появившимся позднее.

В связи с этим в настоящей работе впервые проведены анализ линий Y-хромосомы в вышеперечисленных трех группах жителей с. Русское Устье и широкогеномный анализ, с целью сравнения полученных результатов с гипотезами происхождения русских старожилов арктического побережья Якутии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для изучения генетической истории русских старожилов в ходе экспедиции 2019 г. было собрано 77 образцов венозной крови жителей с. Русское Устье Аллаиховского улуса Республики Саха (Якутия). Кроме того, на каждого участника заполнены индивидуальная анкета, опросник и составлена родословная. Определены коренные ($n = 30$) и некоренные ($n = 26$) жители с. Русское Устье, а также прямые родственники по отцовским и материнским линиям, исключена вероятность первой и второй степени родства ($n = 21$). Определен фамильный состав жителей с. Русское Устье по отцовской линии ($n = 12$), который распределен по трем основным группам: «поморы» и «казаки» (досельные), «зашиверцы» (пришлые). Все процедуры выполнены при письменном информированном согласии. Исследование было одобрено локальным комитетом по биомедицинской этике Якутского научного центра комплексных медицинских проблем, Якутск, Россия (протокол № 4 от 1 марта 2018 г.).

ДНК выделяли из лейкоцитов крови стандартным методом с использованием протеиназы К и последующей фенол-хлороформной экстракции [10]. Образцы ДНК 12 неродственных мужчин-русскоустинцев были генотипированы по маркерам гаплогрупп Y-хромосомы (C-M130, C-M216, R-M207, N-M231, Q-M242, K-M9, R1a-M420, C1-F3393, C1b-F1370, N2a1-P43, N3a3-VL29, N3a4-Z1936, N3a5*-B202) с помощью метода ПЦР в реальном времени и ПЦР–ПДРФ-анализа с использованием последовательностей праймеров, предложенных ранее в работах [11–16]. При генотипировании маркеров R1b-M343, C2'-B477, C3b-P39, N3-TAT/M46, N3a1-B211, N3a5*-F4205 были использованы оригинальные последовательности праймеров, подобранные с помощью программного обеспечения FastPCR v.6.7.58 (trial) [8]. Маркер C3-M217 [14] идентифицирован с помощью секвенирования по методу Сэнгера. При классификации линий Y-хромосомы использована номенклатура, предложенная в работе [17].

Широкогеномный анализ у 30 представителей русских старожилов арктического побережья Якутии проведен с использованием набора Illumina OmniExpress 24Kit (740 тыс. SNPs). Анализ был выполнен для аутосом 30 индивидов на предгибридизованных микроматрицах Illumina BeadChips (OmniExpress-24) на платформе чипового анализатора iScan (Illumina), согласно спецификации производителя. Для фильтрации данных широкогеномного анализа и построения популяционных сценариев полученные результаты были объединены с результатами по другим популяциям из базы данных Эстонского Биоцентра (г. Тарту, Эстония). Объединенные данные были представлены 5428 индивидами из 342 популяций мира, использованных ранее в работах [18–25], и выполнены на разных платформах: Human1M-Duo и 650k, 610k и 550k Illumina BeadChips. Лица с более чем 1.5% отсутствующих маркеров были исключены из набора данных. Сохранялись только маркеры с коэффициентом генотипа 97% и малой частотой аллелей ((MAF) >1%). Отсутствие родства первой и второй степени в нашем наборе данных было подтверждено с помощью программы King [26]. Набор маркеров был уменьшен за счет исключения SNPs в сильном неравновесии по сцеплению LD (парная генотипическая корреляция $r^2 > 0.4$) с окном в 1000 SNPs и со сдвигом окна на 150 SNPs за раз. Метод кластеризации генетических компонентов реализован на программном обеспечении ADMIXTURE [27], от двух до десяти компонентов ($K = 2$ до $K = 10$), симуляция проводилась на 100 повторях с конвергенцией между индивидами. Для построения рисунка был использован компонент $K = 8$, поскольку он наилучшим образом соответствовал нашим критериям отбора.

РЕЗУЛЬТАТЫ

*Анализ линий Y-хромосомы
в трех группах русскоустыинцев*

Анализ линий Y-хромосомы русских старожилов арктического побережья Якутии проведен у представителей трех групп: “поморы”, “казаки” и “зашиверцы”.

“Поморы”. Среди жителей с. Русское Устье, относящихся себя к потомкам поморов, обнаружены только линии гаплогруппы N3. У подавляющего большинства представителей данной группы идентифицирована линия N3a4-Z1936, которая выявлена с частотой 85.7% ($n = 6$), в то время как сестринская ей линия N3a1-B211 была выявлена с низкой частотой 14.3% ($n = 1$) (табл. 1). Данная субгаплогруппа N3a4-Z1936 распространена преимущественно в Северо-Восточной Европе [28] и отсутствует в генофонде народов Якутии и Чукотки — у юкагиров, эвенов, эвенков, чукчей и якутов [23], а также не является типичной для славянских популяций Русской равнины [29]. В работах Е.В. Балановской и соавт. было отмечено, что субгаплогруппа N3a4-Z1936 условно может быть названа “финской”, поскольку встречается с наибольшими частотами у финно-язычных народов Финляндии и Карелии (у саамов, вепсов, карелов, финнов) [29]. Однако относительно высокие частоты данной субгаплогруппы обнаружены у северных русских Архангельской и Вологодской областей, что позволяет связывать ее с древним дославянским (финно-угорским) компонентом генофонда [29, 30]. Известно, что субгаплогруппа N3a1-B211 в большей степени характерна для финно-угорских популяций удмуртов, марийцев коми-зырян и коми-пермяков [28], соседних с популяциями северных русских.

“Казаки”. У мужчины, относящего себя к потомкам казаков, была идентифицирована линия восточноевразийского происхождения, принадлежащая к гаплогруппе C3-M217 (табл. 1). Данная гаплогруппа встречается с высокими частотами в соседних с русскоустыинцами популяциях юкагиров (46%), эвенов (60%) и эвенков (54%) [23].

“Зашиверцы”. Среди представителей группы русскоустыинцев, относящихся себя к потомкам поздних поселенцев, идентифицировано самое высокое из исследованных групп разнообразие линий Y-хромосомы: R1a-M420 (25%), R1b-M343 (25%), C3-M217 (25%) и N3a4-Z1936 (25%) (табл. 1). Помимо упомянутых линий C3-M217 и N3a4-Z1936 у представителей данной группы выявлены две субгаплогруппы R1a-M420 и R1b-M343, характерные для европейской части континента, в том числе и для славянских популяций русских, украинцев, белорусов и поляков [29, 31]. В соседних с русскоустыинцами популяциях юкагиров, эвенов, эвенков и якутов эти линии выявлены в небольшом количестве, и их происхождение связы-

Таблица 1. Анализ линий Y-хромосомы у представителей трех групп русскоустыинцев

Гаплогруппа	Досельные		Пришлые
	поморы	казаки	зашиверцы
C3-M217	0	1 (100%)	1 (25%)
R1a-M420	0	0	1 (25%)
R1b-M343	0	0	1 (25%)
N3a1-B211	1 (14.3%)	0	0
N3a4-Z1936	6 (85.7%)	0	1 (25%)
Всего	7	1	4

вают с процессами метисации с русскими и, возможно, другими восточно-европейскими этносами, заселившими территорию Якутии начиная со времени вхождения в состав Российской империи в XVII в. [23].

*Реконструкция генетической истории
русскоустыинцев с помощью программного
комплекса ADMIXTURE*

Анализ ADMIXTURE в популяции русскоустыинцев в сравнении с другими популяциями мира показал, что аутосомный генофонд русских старожилов характеризуется специфической картиной, нехарактерной для большинства соседних популяций арктического побережья Якутии (чукчи, эвены, эвенки, якуты и долганы), поскольку в равной степени демонстрирует принадлежность к двум различным кластерам — европейскому и сибирскому (рис. 1). Компоненты европейского происхождения едва присутствуют у эвенков, эвенов, якутов и чукчей, но представлены в большей степени у юкагиров (рис. 1), очевидно вследствие процессов метисации с русскими. По примерно равному соотношению компонентов европейского и сибирского происхождения из соседних популяций наиболее близки к русскоустыинцам — юкагиры.

ОБСУЖДЕНИЕ

Основываясь на совокупности исторических данных, а также сведений о традиционном делении русскоустыинцев на три группы и данных геномных исследований, происхождение русских старожилов арктического побережья Якутии можно связать с несколькими волнами мигрантов.

Первая волна — новгородцы/поморы. Согласно преданиям, с. Русское Устье было основано выходцами из Великого Новгорода, бежавшими от гонений Ивана IV Грозного. Между 1565 и 1572 годами Иван Грозный проводил “опричнину” — государственную политику чрезвычайно репрессивных мер борьбы с предполагаемой изменой среди дво-

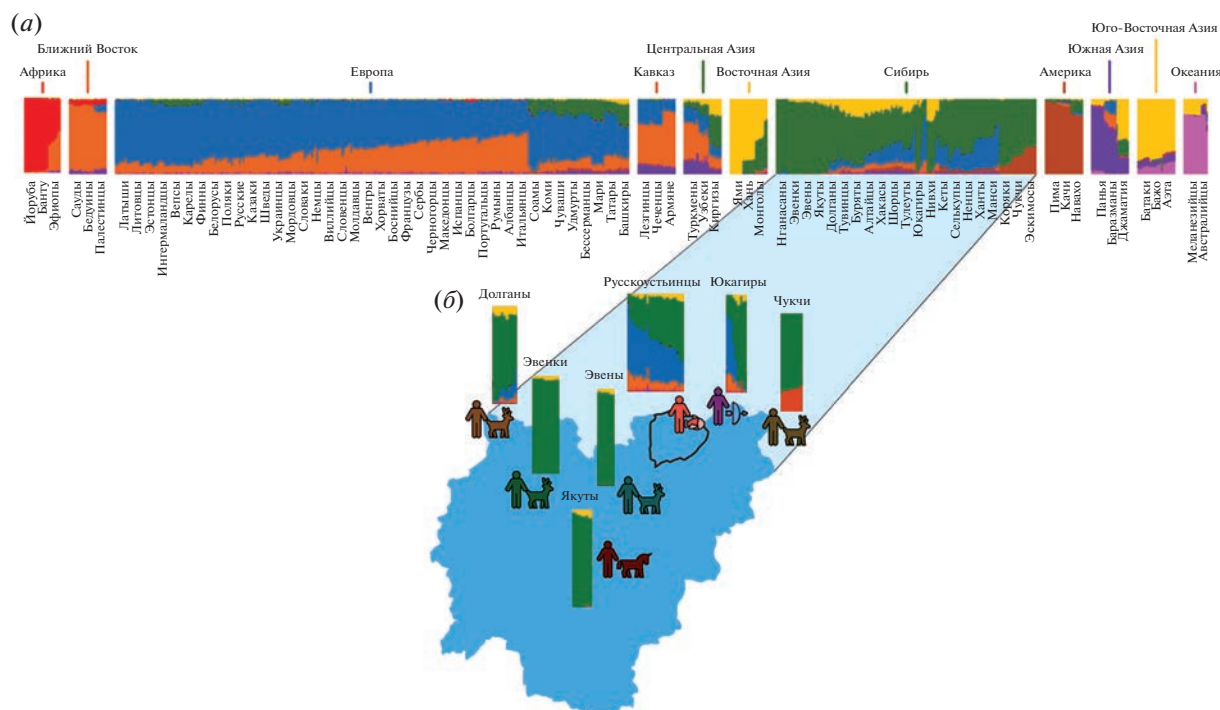


Рис. 1. Оценка генетических компонентов у 30 русскоустыинцев с использованием программы ADMIXTURE при числе предковых популяций $K = 8$. *a* – анализ ADMIXTURE популяции русскоустыинцев в сравнении с другими популяциями мира; *б* – анализ ADMIXTURE популяции русскоустыинцев в сравнении с соседними популяциями Восточной Сибири. Синим цветом выделена территория Республики Саха (Якутия), Аллаиховский район выделен контуром.

рянства. Опричина включала в себя конфискацию имущества и земель дворянства в пользу государства и печально известные массовые казни. Согласно легендам, предки русскоустыинцев приплыли на Индигирку по Северному Ледовитому океану на 14 парусниках (“кочи”) предположительно около 1570 г. Высказывалось предположение, что предки русскоустыинцев были сосланные на Север бояре [32, 33], но в то время ссылка происходила по суше с конфискацией всего имущества. Однако в преданиях русских старожилов рассказывается о больших семьях, прибывших на кочах со всем домашним скарбом и даже животными. По другой версии предками русскоустыинцев могли быть поморы, проживавшие на территории современной Архангельской области на Севере России. В пользу этой гипотезы свидетельствует обнаружение стоянки полярных моряков на восточном побережье Таймырского полуострова [34]. Известно то, что морской путь был знаком поморам уже с XV в. или даже раньше, по крайней мере еще до распространения с XVI в. типа судна “кочи”, более приспособленного для арктического плавания. Это был более сложный, но гораздо более короткий путь, чем сухопутный, и позволял исследовать не только север Западной Сибири, но даже доплыть до арктического побережья Средней и Восточной Сибири. В XVII в. значение северного морского пути уменьшилось

и о нем почти забыли, а к арктическому и тихоокеанскому побережьям стали проникать южными сухопутными путями — через Сибирь [35]. Причины переселения русских на Индигирку могли быть разными, но датировка их прихода (первая четверть XVII в.) предшествует первому приходу казаков в Восточную Сибирь в 1632 г.

Вторая волна — казаки. По официальным данным, появление первых русских на р. Индигирке связано с походом тобольского казачьего поручика Ивана Реброва, который со своим отрядом прошел морем до устья р. Индигирки “для прииску новых земель” и заложил ясачное зимовье Уяндинское (по имени местного юкагирского князя Уянды), впоследствии ставшее острогом [33]. В августе 1638 г. его отряд построил зимовье, которое впоследствии превратилось в поселение Русское Устье [3, 33, 36]. Русское Устье впервые документально упоминается в морском журнале лейтенанта Дмитрия Лаптева, участника экспедиции Витуса Беринга, в 1739–1740 гг. [37].

Третья волна — “пришлые”. Из рукописных источников известно, что в начале XIX в. население Русского Устья было пополнено жителями небольшого города Зашиверск — административного центра, расположенного выше по течению р. Индигирки [33]. Часть жителей этого города переселилась в Русское Устье из-за жесточайшей

эпидемии оспы. Зашиверск был упразднен в 1805 г. и полностью опустел к 1863 г. [38].

С другой стороны, из письменных источников известно, что с начала XVII в. началось активное освоение русскими бассейна р. Индигирка. В первые годы включения этой территории в границы Российской империи здесь шел довольно массовый приток русского населения, заинтересованного обилием пушного зверя и мамонтовой кости. По данным, собранным из таможенных документов 40-х годов XVII в., охотники-звероловы составляли 90% от общего числа русских людей, переселившихся на север Якутии в низовья рек Лены, Индигирки, Колымы, Оленека [39]. Археолог и этнограф Е.А. Строгова, исследовавшая формирование арктического русского населения по ревизским сказкам и метрическим книгам, пришла к выводу, что основой для образования постоянного русского населения на севере Якутии были не казаки, а охотники-промысловики (промышленные люди). По мнению Е.А. Строговой, подавляющее большинство мигрантов на север Якутии этого времени были выходцами из восточных районов Русского Севера и Предуралья [39]. Больше всего было выходцев из Великого Устюга (24%), остальные районы восточной части Русского Севера представлены по 4–8%, новгородцы – всего 1%. Выходцы из Центральной России составляли 5%, с западных окраин России – 1%, а из других регионов Сибири – 4% [39].

Существование второй и третьей волны заселения Русского Устья не подвергается сомнению, однако первая волна является гипотетической, поскольку не подтверждается официальными документами. Однако в пользу существования первой волны, связанной с поморами, свидетельствуют следующие наблюдения исследователей. Одним из сторонников, поддерживающих версию северного морского пути из Белого моря в море Лаптевых, был Б.О. Долгих, которым опубликована статья, где среди находок на северном острове Фаддея в 1940 г. упоминались шахматные фигурки и по обнаруженным на этом острове монетам все эти находки были отнесены к 1617–1620 годам, до прихода казаков [34, 40].

Весомый аргумент в пользу поморской версии происхождения был недавно получен в силу отличной сохранности уникального древнерусского языка в фольклоре XVI в. русскоустынцами. Язык и фольклор Русского Устья являются историческим памятником древнерусской культуры XVI–XVII вв.; некоторые исследователи относят его даже к XV в. Уникальное явление сохранившегося древнерусского диалекта впервые было освещено в литературе В.М. Зензиновым [6, 41].

Сохранение в течение длительного времени архаизмов старорусского языка и фольклора XVI в. было обусловлено пребыванием “в консервации” из-за отдаленности и глухой изоляции от генерального развития русской культуры.

Результаты анализа линий Y-хромосомы по трем группам: “поморы”, “казаки” и “зашиверцы” также указывают на вероятность существования первой волны мигрантов. Среди жителей с. Русское Устье, относящих происхождение своих родов по отцовской линии к потомкам поморов, выявлены две сестринские линии гаплогруппы N3 – N3a4-Z1936 (85.7%) и N3a1-B211 (14.3%) (табл. 1), которые отсутствуют в генофонде соседних народов Якутии и Чукотки [23], но встречаются в популяциях Русского Севера и у финноязычных народов Финляндии и Карелии [17]. Доминирующая среди потомков поморов субгаплогруппа N3a4-Z1936 считается нехарактерной для славянских популяций в целом, однако с более высокими частотами она встречается у северных русских Архангельской и Вологодской областей. Линия N3a4-Z1936 также была обнаружена у новгородцев, но с намного меньшими частотами [29].

Результаты широкогеномного анализа указывают на примерно равное соотношение европейского и сибирского компонентов в генофонде русскоустынцев (рис. 1). Из соседних популяций по соотношению генетических компонентов наиболее близки к русскоустынцам юкагиры. Ранее было установлено, что большую часть митохондриального генофонда русских старожилов полярного севера (в том числе жителей Русского Устья) составляют гаплотипы мтДНК, характерные для юкагиров [7]. Наибольшим разнообразием в этой выборке характеризовались восточно-евразийские гаплогруппы C и D. Из 14 гаплотипов, относящихся к семи гаплогруппам, были выявлены только две линии (H2a – 6.3%, U4a1 – 3.1%) западно-евразийского происхождения. При более глубоком анализе сиквенсов мтДНК было установлено, что H2a-линия русских старожилов отличалась уникальным набором мутаций в позициях: 73, 4350, 5460, 8709, представляя собой отдельный субкластер гаплогруппы H [7].

Таким образом, содержание европейского компонента русскоустынцев по линиям мтДНК незначительно и составляет 9.4% [7], тогда как по линиям Y-хромосомы – 83.4% [8], что полностью соответствует историческим данным. Этнограф Б.О. Долгих констатировал, что “на всем огромном пространстве юкагирской земли от Лены до Анадыря и у служилых, и у промышленных людей были жены юкагирки” [5]. К середине XVIII в. сформировалось смешанное потомство – особая общность, в жизни которой равнозначными домини-

нантами стали русский язык, православие, русский фольклор, а с другой стороны, свойственные аборигенам края быт охотников-рыболовов, почитание духов-хозяев окружающей природной среды, и унаследованные от предков материнского рода жизненные каноны и мифологические представления [1, 3].

Среди старожилов арктического побережья Якутии, относящих себя к потомкам поморов, зарегистрировано преобладание линии Y-хромосомы — N3a4-Z1936 (85.7%), распространенной преимущественно на северо-востоке Европы (Финляндия, Русский Север), которая отсутствует у соседних народов Восточной Сибири. По данным широкогеномного анализа, генофонд русских старожилов характеризуется специфическими особенностями, отличающими его от соседних популяций Восточной Сибири, и демонстрирует принадлежность в равной степени к двум различным кластерам — европейскому и сибирскому. По соотношению данных компонентов из соседних популяций наиболее близки к русскоустыинцам юкагиры. Результаты исследования свидетельствуют в большей степени в пользу существования первой волны поселенцев, выходцев из Русского Севера, и полностью соответствуют историческим данным, указывающим на частое заключение смешанных браков русских мужчин с женщинами-юкагирками.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (FSRG-2023-0003) “Генетические особенности населения Северо-Востока России: реконструкция генетической истории, механизмы адаптации и старения, возраст-зависимые и наследственные заболевания”, при поддержке гранта РНФ № 22-12-20036: “Русские старожилы Якутии: история и социально-культурная антропология в контексте российской государственности в Арктике”.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года 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. *Никитина С.Е.* Русские арктические старожилы Республики Саха (Якутия): проблемы сохранения уникальной культуры // Русские арктические ста-

рожины Якутии: Сб. науч. статей. Якутск: ИГИИПМНС, 2019. С. 16–33.

2. https://rosstat.gov.ru/vpn_popul, Таблица 5.
3. *Вахтин Н.Б., Головкин Е.В., Швайцлер П.В.* Русские старожилы Сибири: социальные и символические аспекты самосознания. М.: Новое изд-во, 2004. 296 с.
4. *Аксанова Г.А.* Русские старожилы р. Индигирки и р. Колымы: антропологический феномен // Русские арктические старожилы Якутии: Сб. науч. статей. Якутск: ИГИИПМНС, 2019. С. 122–159.
5. *Долгих Б.О.* Родовой и племенной состав народов Сибири в XVII веке. М.: Изд-во АН СССР, 1960. 622 с.
6. *Баширов М.Б., Строгова Е.А.* Русские в Якутии: начало “эпохи этнических контактов” // История Якутии. В 3-х томах. Новосибирск: Наука, 2020. Т. 1. С. 466–474.
7. *Сукерник Р.И., Володько Н.В., Мазунин И.О.* Генетическая история русских старожилов полярного севера Восточной Сибири по результатам анализа изменчивости мтДНК // Генетика. 2010. Т. 46. № 11. С. 1571–1579.
8. *Борисова Т.В., Соловьев А.В., Чердонова А.М. и др.* Анализ линий Y-хромосомы русских старожилов арктического побережья Якутии // Якутский мед. журн. 2022. № 3. С. 71–73. <https://doi.org/10.25789/YMJ.2022.79.19>
9. *Solovyev A.V., Borisova T.V., Cherdonova A.M. et al.* The russian old-settlers in the arctic coast of Eastern Siberia: Family name diversity in the context of their origin // Sustainability. 2021. 13. <https://doi.org/10.3390/su131910895>
10. *Mathew C.G.* The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA // Methods Mol. Biol. 1985. V. 2. P. 31–34. <https://doi.org/10.1385/0-89603-064-4:31>
11. *Underhill P.A., Passarino G., Lin A.A. et al.* The phylogeography of Y chromosome binary haplotypes and the origins of modern human populations // Annals Hum. Genet. 2001. V. 65(1). P. 43–62. <https://doi.org/10.1046/j.14691809.2001.6510043.x>
12. *Cinnioğlu C., King R., Kivisild T. et al.* Excavating Y chromosome haplotype strata in Anatolia // Hum. Genet. 2004. V. 114(2). P. 127–148. <https://doi.org/10.1007/s00439>
13. *Karafet T.M., Mendez F.L., Meilerman M.B. et al.* New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree // Genome Res. 2008. V. 18(5). P. 830–838. <https://doi.org/10.1101/gr.7172008>
14. *Hinds D.A., Stuve L.L., Nilsen G.V. et al.* Whole genome patterns of common DNA variation in three human populations // Science. 2005. V. 307. P. 1072–1079. <https://doi.org/10.1126/science.1105436>

15. *Karafet T.M., Osipova L.P., Gubina M.A. et al.* High levels of Y chromosome differentiation among native Siberian populations and the genetic signature of a boreal hunter gatherer way of life // *Hum. Biol.* 2002. V. 74. P. 761–789.
<https://doi.org/10.1353/hub.2003.0006>
16. International Society of Genetic Genealogy. Y DNA Haplogroup Tree 2019, Version: [15.73], Date: [11 July 2020], <http://www.isogg.org/tree/> [Date of access: 10.06.2021].
17. *Karmin M., Saag L., Vicente M. et al.* A recent bottleneck of Y chromosome diversity coincides with a global change in culture // *Genome Res.* 2015. V. 25. P. 459–466.
<https://doi.org/10.1101/gr.186684.114>
18. *Li C., Li M., Long J.R. et al.* Evaluating cost efficiency of SNP chips in genome-wide association studies // *Genet Epidemiol.* 2008. V. 32(5). P. 387–395.
<https://doi.org/10.1002/gepi.20312>
19. *Rasmussen M., Li Y., Lindgreen S., Pedersen J.S. et al.* Ancient human genome sequence of an extinct Paleo-Eskimo // *Nature.* 2010. V. 463. P. 757–762.
<https://doi.org/10.1038/nature08835>
20. *Behar D.M., Yunusbayev B., Metspalu M. et al.* The genome-wide structure of the Jewish people // *Nature.* 2010. V. 466(7303). P. 238–242.
<https://doi.org/10.1038/nature09103>
21. *Yunusbayev B., Metspalu M., Metspalu E. et al.* The genetic legacy of the expansion of Turkic-speaking nomads across Eurasia // *PLoS Genet.* 2015. V. 11(4).
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005068>
22. *Metspalu M., Romero I., Yunusbayev B. et al.* Shared and unique components of human population structure and genome-wide signals of positive selection in South Asia // *Am. J. Hum. Genet.* 2011. V. 89. P. 731–744.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.11.010>
23. *Fedorova S.A., Reidla M., Metspalu E. et al.* Autosomal and uniparental portraits of the native populations of Sakha (Yakutia): Implications for the peopling of Northeast Eurasia // *BMC Evol. Biol.* 2013. V. 13.
<https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-127>
24. *Raghavan M., Skoglund P., Graf K.E. et al.* Upper Palaeolithic Siberian genome reveals dual ancestry of Native Americans // *Nature.* 2014. V. 505(7481). P. 87–91.
<https://doi.org/10.1038/nature12736>
25. *Behar D.M., Metspalu M., Baran Y. et al.* No evidence from genome-wide data of a Khazar origin for the Ashkenazi Jews // *Hum. Biol.* 2013. V. 85(6). P. 859–900.
<https://doi.org/10.3378/027.085.0604>
26. *Manichaikul A., Mychaleckyj J.C., Rich S.S. et al.* Robust relationship inference in genome-wide association studies // *Bioinformatics.* 2010. V. 26(22). P. 2867–2873.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq559>
27. *Alexander D.H., Novembre J., Lange K.* Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals // *Genome Res.* 2009. V. 19. P. 1655–1664.
<https://doi.org/10.1101/gr.094052.10919648217>
28. *Ilumäe A.M., Reidla M., Chukhryaeva M. et al.* Human Y chromosome haplogroup N: A non-trivial time-resolved phylogeography that cuts across language families // *Am. J. Hum. Genet.* 2016. V. 99. P. 163–173.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.05.025>
29. *Балановская Е.В., Агджоян А.Т., Схалыхо Р.А. и др.* Генофонд Новгородцев: между Севером и Югом // *Генетика.* 2017. Т. 53. № 11. С. 1338–1348.
30. *Чухряева М.И., Павлова Е.С., Нанольских В.В. и др.* Сохранились ли следы финно-угорского влияния в генофонде русского населения Ярославской области? Свидетельства Y хромосомы // *Генетика.* 2017. Т. 53. № 3. С. 378–389.
31. *Балановский О.П.* Генофонд Европы. М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2015. 354 с.
32. *Скворцов Е.Ф.* В прибрежных тундрах Якутии: дневник астронома Ленско-Колымской экспедиции // *Тр. комиссии по изучению Якутии.* Т. 15: Ленско-Колымская экспедиция 1909 года под начальством К.А. Воллосовича. Л., 1930. С. 1–244.
33. *Алексеев А.Н.* Первые русские поселения XVII–XVIII вв. на северо-востоке Якутии. Новосибирск: Изд-во Ин-та археологии и этнографии СО РАН, 1996. 152 с.
34. *Сибирь в контексте русской модели колонизации (XVII–начало XX вв.).* Сборник научных статей. СПб.: МАЭ РАН, 2014. С. 68–123.
35. *Чикачев А.Г.* Русские на Индигирке: историко-этнографический очерк. Новосибирск, 1990. 196 с.
36. *Васильев В.Л.* К вопросу о связях севернорусских говоров с говором села Русское Устье на северо-востоке Якутии // *Сев. говор.* 2017. Т. 16. С. 63–75.
37. *Никитина С.Е.* Формирование сельского русского населения Якутии в коммуникативном пространстве Российского государства в эпоху Петра I // *Петербургский ист. журн.* 2023. № 1(37). С. 21–32.
38. *Окладников А.П., Гоголев З.В., Ащепков Е.А.* Древний Зашиверск. Древнерусский заполярный город. М.: Наука, 1977. 212 с.
39. *Строгова Е.А.* Формирование постоянного русского населения и образование этнической территории на севере Якутии в XVII–XVIII вв. // *Русские арктические старожилы Якутии: Сб. науч. статей.* Якутск: ИГИИПМНС, 2019. С. 7–15.
40. *Долгих Б.О.* Новые данные о плавании русских северным морским путем в XVII веке // *Проблемы Арктики.* 1943. Т. 2. С. 195–227.
41. *Зензинов В.М.* Старинные люди у холодного океана: Русское Устье Якутской области Верхоянского округа. М.: Типография П.П. Рябушинского, 1914. 122 с.

The Genetic History of the Russian Old Settlers of the Arctic Coast of Yakutia from the Village Russkoye Ust'ye

A. V. Solovyev^a, T. V. Borisova^a, G. P. Romanov^a, F. M. Teryutin^{a, b}, V. G. Pshennikova^{a, b}, S. E. Nikitina^c,
A. N. Alekseev^{a, c}, N. A. Barashkov^{a, b}, and S. A. Fedorova^{a, b, *}

^a*Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, 677013 Russia*

^b*Yakut Scientific Center of Complex Medical Problems, Yakutsk, 677018 Russia*

^c*Institute for Humanities Research and Problems of Indigenous Peoples of the North, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Yakutsk, 677027 Russia*

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

There are various hypotheses on the origin and time of the appearance of Russian settlements in the Arctic Ocean shores of Eastern Siberia. In order to study the history of the formation of the Russian old-settlers of Yakutia, we analyzed the lineages of the Y-chromosome in three groups of residents of the village of Russkoye Ust'ye, located in the delta of the Indigirka River ("Pomors", "Cossacks" and "Zashivertsy"), comparable with the main migration waves of settlement of Russians on the Arctic coast of Eastern Siberia. For the first time, the characteristic features of the genetic structure of the population of Russkoustinians are described by the data of a genome-wide analysis of 740,000 single nucleotide polymorphisms. The results of the study to a greater extent testify in favor of the "Pomor" hypothesis of the origin of the Russkoustinians.

Keywords: Russian old-settlers, genetic history, Y-chromosome, genome-wide analysis.

ГЕНЕТИКО-ДЕМОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПАРАМЕТРОВ ЕСТЕСТВЕННОГО ВОСПРОИЗВОДСТВА И ИНДЕКСОВ КРОУ В ЭТНИЧЕСКИХ ГРУППАХ МОСКВЫ И САНКТ-ПЕТЕРБУРГА (ПО МАТЕРИАЛАМ ВСЕРОССИЙСКОЙ ПЕРЕПИСИ НАСЕЛЕНИЯ 2010 г.)

© 2023 г. А. С. Грачева¹, *, И. Г. Удина¹, О. Л. Курбатова¹

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

*e-mail: palesa@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.04.2023 г.

После доработки 02.05.2023 г.

Принята к публикации 04.05.2023 г.

На основе анализа материалов Всероссийской переписи населения 2010 г. и демографической статистики Росстата рассчитаны генетико-демографические параметры временной и межэтнической изменчивости параметров естественного воспроизводства и параметров отбора (индексы Кроу) для наиболее многочисленных этнических групп Москвы и Санкт-Петербурга. Показано снижение компоненты отбора, обусловленной дифференциальной дорепродуктивной смертностью, до минимально возможных значений (индекс $I_m < 0.01$). В обоих мегаполисах выявлены межэтнические различия по параметрам естественного воспроизводства и компоненте отбора, обусловленной дифференциальной плодовитостью, при этом уровень рождаемости в столицах для всех этнических групп, кроме узбеков в Санкт-Петербурге, ниже, чем требуется даже для простого воспроизводства населения, а значит, и стабильного воспроизводства генофонда. Это свидетельствует о неблагоприятном характере генетико-демографических процессов у всех представленных национальностей мегаполисов. Индекс I_f варьирует в диапазоне от 0.2 до 0.5. Временная динамика среднего числа потомков и его дисперсии, а также индекса I_f , прослеженная по данным о возрастных когортах женщин 1940–1960-х гг. рождения, выражена слабо — тенденция к ослаблению отбора прослеживается не для всех изученных этнических групп. Показано, что интенсивность межгруппового отбора, обусловленного межэтническими различиями в рождаемости, в населении Петербурга возрастает от старших возрастных когорт к младшим, а в населении Москвы существенно не меняется, при этом временная динамика этого показателя, рассчитанная по материалам Всероссийской переписи населения 2002 г. для когорт 1930–1950 гг. рождения, имеет противоположную направленность. Обсуждаются генетико-демографические следствия выявленных тенденций.

Ключевые слова: индекс Кроу, дифференциальная смертность, дифференциальная плодовитость, внутригрупповой отбор, межгрупповой отбор, этнические группы, Москва, Санкт-Петербург.

DOI: 10.31857/S0016675823090059, **EDN:** WUIQEY

Естественное воспроизводство городского населения России почти всегда имело суженый характер — нетто-коэффициент воспроизводства < 1 , что свидетельствует об отсутствии стабильного воспроизводства генофонда в поколениях. При этом в популяциях с многонациональным составом — а таковыми являются, в первую очередь, мегаполисы — существуют значительные межэтнические и межконфессиональные различия в темпах естественного прироста. В терминах демографической генетики (синтез демографии и популяционной генетики) межиндивидуальные различия по числу жизнеспособных потомков трактуются как дифференциальное размножение генотипов (внутригрупповой отбор), а межгрупповые различия по среднему числу потомков —

как дифференциальный естественный прирост или дифференциальная приспособленность групп (межгрупповой отбор) [1–5].

В популяционной генетике разработан метод, позволяющий оценить интенсивность естественного отбора в популяциях человека на основе данных демографической статистики [6]. Индекс Кроу состоит из двух компонент: 1) обусловленная дифференциальной дорепродуктивной смертностью (I_m), и 2) обусловленная дифференциальной плодовитостью (I_f) [2–5].

Ранее нами был проведен анализ параметров естественного воспроизводства и индексов Кроу для населения СССР по данным Всесоюзной переписи населения СССР 1989 г. и для населения

РФ по данным Всероссийских переписей населения 2002 г. (далее **ВПН-2002**) и 2010 г. (далее **ВПН-2010**) [5]. Показано многократное снижение компоненты отбора, обусловленного дифференциальной смертностью, в масштабах страны. Временная динамика компоненты I_f демонстрирует ее снижение в большинстве этнических групп [5]. Интенсивность межгруппового отбора, приводящего к изменению этнического состава населения и к динамике генофонда популяции во времени, возрастала в масштабах СССР и уменьшалась в масштабах РФ.

По материалам ВПН-2002 для населения двух крупнейших мегаполисов России для всех этнических групп показана слабовыраженная отрицательная динамика компоненты I_f , а также интенсивности межгруппового отбора, однако число этих групп в опубликованных материалах переписи очень невелико — три для Москвы и четыре для Петербурга [4]. Это обстоятельство существенно отражается на величине межгрупповой (межэтнической) дисперсии плодовитости. Материалы ВПН-2010 содержат данные по гораздо более широкому спектру национальностей, поэтому представляется целесообразным обновить наше исследование с учетом современных и более полных данных.

Цель данного исследования — сравнительный анализ временной, внутригрупповой и межгрупповой (межэтнической) изменчивости параметров естественного воспроизводства и индексов отбора в двух крупнейших мегаполисах России — Москве и Санкт-Петербурге по материалам ВПН-2010.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На основе материалов ВПН-2010 [7] проанализированы параметры естественного воспроизводства населения и рассчитаны компоненты индекса Кроу в наиболее многочисленных этнических группах Москвы и Санкт-Петербурга. Расчет индексов Кроу проводился по формулам:

компонента отбора, обусловленная дифференциальной смертностью (I_m):

$$I_m = p_d/p_s,$$

где p_d и p_s — доля индивидуумов (соответственно) умерших и доживших до наступления репродуктивного возраста, ($p_d + p_s = 1$);

компонента, обусловленная дифференциальной плодовитостью (I_f):

$$I_f = V_k/\bar{k}^2,$$

где $\bar{k}$ — среднее число потомков, приходящееся на одну женщину с завершенным репродуктив-

ным периодом, V_k — межсеме́йная дисперсия числа потомков;

индекс тотального отбора (I_t):

$$I_t = I_m + (1/p_s) \cdot I_f [4, 5].$$

Для расчета компоненты, обусловленной дифференциальной дорепродуктивной смертностью (I_m), использованы таблицы смертности и ожидаемой продолжительности жизни населения России за 2018 г. (www.gks.ru). Для расчета компоненты, обусловленной дифференциальной плодовитостью (I_f), материалы ВПН-2010 [8], в которых имеются данные о плодовитости возрастных когорт женщин с завершенным репродуктивным периодом. Индексы I_t и их составляющие — среднее число потомков ($\bar{k}$) и его дисперсия (V_k), рассчитаны в наиболее многочисленных этнических группах для семи возрастных когорт женщин с исчерпанной плодовитостью (старше 40 лет): самая старшая возрастная когорта включала женщин, родившихся до 1940 г., а самая младшая — женщин, родившихся с 1966 по 1970 гг. Для сравнения использованы материалы ВПН-2002.

Интенсивность межгруппового отбора (I'_f), обусловленного межэтническими различиями в рождаемости, рассчитана по формуле:

$$I'_f = V_{\bar{k}}/\bar{k}^2,$$

где $\bar{k}$ — среднее число потомков по всем этническим группам, $V_{\bar{k}}$ — межгрупповая дисперсия плодовитости [4, 5].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В двух исследуемых мегаполисах наиболее многочисленными этническими группами, помимо русских, являются: украинцы, татары, армяне, азербайджанцы, евреи, белорусы, грузины и узбеки (рис. 1). В Санкт-Петербурге выше доля евреев, белорусов и узбеков, а в Москве больше татар, армян и азербайджанцев. В Санкт-Петербурге по данным ВПН-2010 доля русских, украинцев, татар, евреев и белорусов ниже, а узбеков выше по сравнению с данными ВПН-2002. В Москве по данным ВПН-2010 доля всех этнических групп, кроме русских и узбеков, ниже, чем по данным ВПН-2002.

Компонента отбора, обусловленная дифференциальной смертностью

Параметры дифференциальной смертности были рассчитаны для населения Москвы и Санкт-Петербурга в двух вариантах. В первом начало репродуктивного периода принималось равным 20 годам (соответственно p_s будет равным до-

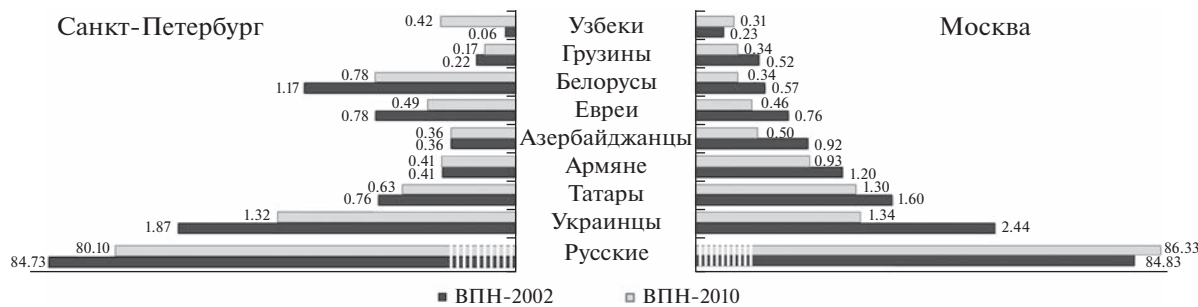


Рис. 1. Наиболее многочисленные этнические группы двух мегаполисов (в %) по данным ВПН-2002 и ВПН-2010.

ле доживших до 20 лет); во втором – 30 годам, с учетом более позднего вступления в брак и увеличения возраста деторождения в последнем поколении россиян (табл. 1). Согласно первому варианту, до 20 лет доживают почти 99% мужчин и 99% женщин в обоих мегаполисах. Компонента отбора, обусловленная дифференциальной смертностью, примерно равна $I_m = 0.01$ и в обоих мегаполисах для мужчин выше, чем для женщин. Согласно второму варианту, до 30 лет в Москве доживают 97% мужчин и 98% женщин, а в Санкт-Петербурге – 98% мужчин и 99% женщин. Компонента I_m во втором варианте расчета в обоих мегаполисах почти в два раза выше, чем в первом варианте и по-прежнему выше для мужчин, чем для женщин.

*Компонента отбора, обусловленная
дифференциальной плодовитостью.
Внутригрупповой отбор*

Временная динамика параметров дифференциальной плодовитости в девяти этнических группах Москвы и восьми этнических группах Санкт-Петербурга, рассчитанных по материалам ВПН-2010, представлена в табл. 2 и 3. Данные этих таблиц демонстрируют межэтнические (межкон-

фессиональные) различия как в рождаемости, так и во временной динамике этих показателей.

В изученных мегаполисах среднее число потомков не достигало необходимого для простого воспроизводства (2.2) у женщин следующих национальностей: русские, украинцы, белорусы, евреи, татары, армяне, грузины (в Москве). У женщин двух национальностей – азербайджанок и узбечек, среднее число потомков выше, однако достигает значения 2.2 только у узбечек Санкт-Петербурга в двух возрастных когортах (1961–1965 гг. и 1956–1960 гг. рождения).

Анализ межэтнических различий в рождаемости проведен по предпоследней из числа рассмотренных возрастных когорт женщин (1961–1965 гг. рождения, 45–49 лет на момент переписи). На рис. 2 представлено распределение женщин указанной возрастной когорты по среднему числу детей: наименьшее значение характерно для евреев обоих мегаполисов (1.389 в Москве и 1.221 в Санкт-Петербурге), следующее в порядке возрастания значение – у русских (1.396 в Москве и 1.352 в Санкт-Петербурге), далее примерно схожие значения – у украинцев, белорусов и татар, средние значения у армян и у грузин (в Москве),

Таблица 1. Параметры дифференциальной смертности в населении двух мегаполисов

Параметры	Москва			Санкт-Петербург		
	мужчины	женщины	оба пола	мужчины	женщины	оба пола
Вариант 1. Начало репродуктивного периода – 20 лет						
p_d	0.01362	0.00990	0.01177	0.01141	0.00705	0.00927
p_s	0.98638	0.99010	0.98823	0.98859	0.99295	0.99073
I_m	0.01381	0.009999	0.01191	0.01154	0.00710	0.00936
Вариант 2. Начало репродуктивного периода – 30 лет						
p_d	0.02919	0.01570	0.02237	0.02357	0.01166	0.01762
p_s	0.97081	0.98430	0.97763	0.97643	0.98834	0.98238
I_m	0.03007	0.01595	0.02288	0.02414	0.01180	0.01794

Примечание. p_d – доля умерших до наступления репродуктивного периода, p_s – доля доживших до начала репродуктивного периода, I_m – компонента отбора, обусловленная дифференциальной смертностью.

Таблица 2. Динамика компоненты отбора, обусловленной дифференциальной плодовитостью, в этнических группах г. Москвы (рассчитано по данным ВПН-2010)

Возрастная когорта, лет	Годы рождения	$\bar{k}$	V_k	I_f	Количество детей							
					0	1	2	3	4	5	6	7 и более
Русские												
40—44	1966—1970	1.335	0.731	0.410	11.39	52.25	30.49	4.59	0.78	0.16	0.10	0.24
45—49	1961—1965	1.396	0.684	0.351	8.95	50.56	34.81	4.48	0.73	0.15	0.07	0.24
50—54	1956—1960	1.455	0.686	0.324	7.98	47.08	38.89	4.83	0.73	0.17	0.08	0.24
55—59	1951—1955	1.448	0.686	0.327	8.11	47.44	38.53	4.70	0.70	0.20	0.09	0.24
60—64	1946—1950	1.393	0.664	0.342	8.92	50.31	35.59	4.06	0.64	0.17	0.08	0.22
65—69	1941—1945	1.367	0.662	0.354	9.44	51.74	33.71	4.04	0.62	0.15	0.07	0.22
70 и более	До 1940	1.427	0.780	0.383	9.35	49.24	34.16	5.44	1.10	0.31	0.12	0.27
Украинцы												
40—44	1966—1970	1.437	0.699	0.339	8.58	48.54	35.97	5.54	0.86	0.26	0.07	0.19
45—49	1961—1965	1.449	0.690	0.328	9.96	43.72	39.71	5.51	0.71	0.20	0.04	0.15
50—54	1956—1960	1.575	0.724	0.292	6.56	40.22	45.62	5.92	1.03	0.31	0.05	0.29
55—59	1951—1955	1.563	0.712	0.291	6.42	41.53	44.48	6.05	0.77	0.41	0.09	0.25
60—64	1946—1950	1.513	0.704	0.307	6.93	44.31	42.10	5.36	0.68	0.28	0.05	0.29
65—69	1941—1945	1.478	0.724	0.331	7.78	45.86	40.10	4.76	0.96	0.26	0.03	0.26
70 и более	До 1940	1.588	0.822	0.326	6.20	42.36	42.62	6.34	1.40	0.61	0.15	0.33
Татары												
40—44	1966—1970	1.521	0.841	0.364	9.05	42.17	40.37	6.38	1.38	0.23	0.11	0.32
45—49	1961—1965	1.575	0.715	0.288	7.63	38.59	45.27	6.69	1.20	0.39	0.11	0.13
50—54	1956—1960	1.640	0.808	0.300	7.60	35.12	46.78	8.37	1.24	0.55	0.09	0.25
55—59	1951—1955	1.656	0.864	0.315	7.32	35.68	45.79	8.34	2.19	0.30	0.13	0.27
60—64	1946—1950	1.570	0.816	0.331	7.74	40.59	42.75	6.58	1.42	0.56	0.12	0.24
65—69	1941—1945	1.604	0.897	0.349	7.74	39.75	42.50	6.74	1.75	1.00	0.36	0.16
70 и более	До 1940	1.812	1.440	0.439	7.41	34.99	39.93	10.88	3.57	1.75	0.60	0.87
Армяне												
40—44	1966—1970	1.827	1.022	0.306	8.00	25.67	47.54	15.71	2.06	0.54	0.08	0.40
45—49	1961—1965	1.878	1.015	0.288	7.19	24.53	47.84	16.65	2.71	0.53	0.11	0.45
50—54	1956—1960	1.878	1.031	0.292	7.05	25.04	47.74	16.13	2.71	0.77	0.12	0.44
55—59	1951—1955	1.816	1.095	0.332	8.47	27.80	44.59	14.69	2.95	0.97	0.12	0.40
60—64	1946—1950	1.774	1.071	0.340	8.84	30.62	41.48	14.57	3.11	1.04	0.10	0.25
65—69	1941—1945	1.798	1.107	0.342	7.49	33.13	39.91	13.30	4.49	1.41	0.09	0.18
70 и более	До 1940	1.915	1.462	0.399	7.41	31.95	36.56	15.29	5.85	1.74	0.55	0.66
Азербайджанцы												
40—44	1966—1970	2.098	1.117	0.254	5.41	19.40	45.13	23.31	4.63	1.74	0.14	0.24
45—49	1961—1965	2.089	1.139	0.261	5.84	20.10	44.16	22.36	5.23	1.82	0.22	0.28
50—54	1956—1960	2.087	1.393	0.320	5.91	23.48	41.38	20.07	5.50	2.83	0.33	0.50
55—59	1951—1955	2.039	1.574	0.379	7.16	29.35	33.43	18.68	6.60	3.93	0.56	0.28
60—64	1946—1950	1.952	1.973	0.518	8.96	34.58	30.63	13.54	6.67	4.38	0.00	1.25
65—69	1941—1945	1.905	1.804	0.497	9.54	35.50	29.39	12.98	8.40	3.05	0.38	0.76
70 и более	До 1940	2.176	2.320	0.490	5.67	36.25	24.54	15.91	8.63	6.78	0.99	1.23
Евреи												
40—44	1966—1970	1.383	1.029	0.538	15.07	45.05	31.44	5.94	1.55	0.34	0.17	0.43
45—49	1961—1965	1.389	0.899	0.466	12.70	47.56	32.02	5.60	1.42	0.24	0.08	0.39

Таблица 2. Окончание

Возрастная когорта, лет	Годы рождения	$\bar{k}$	V_k	I_f	Количество детей							
					0	1	2	3	4	5	6	7 и более
50–54	1956–1960	1.403	0.830	0.422	11.99	46.24	34.67	5.24	1.17	0.41	0.00	0.28
55–59	1951–1955	1.320	0.708	0.407	12.58	50.71	31.24	3.99	1.08	0.20	0.07	0.14
60–64	1946–1950	1.299	0.718	0.426	12.08	52.93	30.95	2.76	0.66	0.13	0.13	0.35
65–69	1941–1945	1.245	0.676	0.437	14.20	52.25	30.63	1.97	0.51	0.19	0.00	0.25
70 и более	До 1940	1.250	0.762	0.487	15.16	51.56	29.12	3.01	0.60	0.17	0.11	0.27
Белорусы												
40–44	1966–1970	1.388	0.691	0.359	7.70	54.00	32.90	4.22	0.68	0.12	0.06	0.31
45–49	1961–1965	1.513	0.569	0.248	6.26	43.57	44.13	5.09	0.78	0.11	0.00	0.06
50–54	1956–1960	1.590	0.635	0.251	5.45	39.16	48.85	5.19	0.82	0.26	0.04	0.22
55–59	1951–1955	1.603	0.707	0.275	5.68	39.30	47.59	5.62	0.91	0.62	0.00	0.28
60–64	1946–1950	1.505	0.584	0.258	6.20	44.44	43.89	4.32	0.91	0.06	0.00	0.18
65–69	1941–1945	1.518	0.576	0.250	6.17	43.88	43.58	5.07	0.90	0.40	0.00	0.00
70 и более	До 1940	1.571	0.743	0.301	6.44	42.18	42.80	6.49	1.35	0.35	0.16	0.22
Грузины												
40–44	1966–1970	1.572	0.934	0.378	11.52	35.33	42.14	8.27	1.65	0.70	0.19	0.19
45–49	1961–1965	1.632	0.963	0.361	10.33	33.93	42.59	10.71	1.15	0.77	0.13	0.38
50–54	1956–1960	1.656	1.064	0.388	10.61	33.73	42.03	9.33	2.63	1.20	0.24	0.24
55–59	1951–1955	1.645	1.042	0.385	10.64	35.98	37.48	11.73	2.88	1.09	0.10	0.10
60–64	1946–1950	1.638	1.112	0.414	9.10	40.96	34.93	9.96	2.95	1.35	0.62	0.12
65–69	1941–1945	1.780	1.366	0.431	8.53	36.02	35.31	13.74	4.50	0.71	0.47	0.71
70 и более	До 1940	1.851	1.588	0.463	7.32	38.38	31.57	13.87	5.19	2.47	0.43	0.77
Узбеки												
40–44	1966–1970	1.947	1.478	0.390	10.19	27.50	32.77	20.37	6.54	2.04	0.08	0.51
45–49	1961–1965	2.031	1.433	0.347	7.98	26.43	35.06	18.99	8.74	2.48	0.22	0.11
50–54	1956–1960	2.127	1.800	0.398	7.19	27.50	32.66	19.06	8.59	3.13	1.09	0.78
55–59	1951–1955	2.114	2.322	0.520	10.39	24.42	35.32	16.36	7.27	3.64	1.04	1.56
60–64	1946–1950	1.827	1.764	0.529	10.13	39.87	23.53	16.99	5.56	2.29	0.98	0.65
65–69	1941–1945	2.047	1.994	0.476	5.85	35.67	29.82	17.54	4.68	2.92	1.75	1.75
70 и более	До 1940	1.846	2.176	0.638	9.04	42.77	26.81	9.04	6.33	3.61	1.20	1.20

Примечание. Фоном выделены модальные классы распределения числа детей, $\bar{k}$ – среднее число потомков, приходящееся на одну женщину с завершённым репродуктивным периодом, V_k – межсеме́йная дисперсия числа потомков, I_f – компонента отбора, обусловленная дифференциальной плодовитостью.

наибольшие значения – у азербайджанцев и узбеков. На рис. 2 приведены также данные ВПН-2002 по некоторым национальностям: русским, украинцам, белорусам, татарам и евреям [4]. Из рисунка видно, что для этих национальностей среднее число детей существенно не изменилось за межпереписной период.

Различия в распределении горожанок разных национальностей возрастной когорты 1961–1965 гг. рождения по числу рожденных детей проиллюстрированы на рис. 3. Из рисунка видно, что у большинства этнических групп, кроме узбеков,

азербайджанцев, армян, а также у татар, белорусов и грузин Москвы – чаще всего один ребенок.

Доля инфертильных женщин (не имеющих рождений к концу репродуктивного периода) максимальна у евреев и в Москве (от 12 до 15%), и в Петербурге (от 14 до 20%). Минимальна эта цифра в Москве у белорусов (от 5 до 8% в разных возрастных когортах); в Санкт-Петербурге – у украинцев и белорусов (от 6 до 9%); у русских эта цифра варьирует: в Москве от 8 до 11% (табл. 2), в Петербурге – от 10 до 13% (табл. 3).

Рассмотрение временной динамики параметров воспроизводства и индексов Кроу показыва-

Таблица 3. Динамика компоненты отбора, обусловленной дифференциальной плодовитостью, в этнических группах г. Санкт-Петербурга рассчитано по данным ВПН-2010

Возрастная когорта, лет	Годы рождения	$\bar{k}$	V_k	I_f	Количество детей							
					0	1	2	3	4	5	6	7 и более
Русские												
40–44	1966–1970	1.259	0.667	0.421	13.30	53.97	28.13	3.71	0.52	0.14	0.07	0.16
45–49	1961–1965	1.352	0.668	0.365	10.85	50.07	34.07	4.00	0.61	0.15	0.08	0.16
50–54	1956–1960	1.431	0.701	0.342	9.61	45.90	38.70	4.59	0.69	0.23	0.08	0.20
55–59	1951–1955	1.414	0.696	0.348	9.73	47.19	37.44	4.46	0.63	0.27	0.09	0.19
60–64	1946–1950	1.347	0.646	0.356	10.66	50.43	34.38	3.60	0.49	0.20	0.08	0.15
65–69	1941–1945	1.307	0.623	0.365	11.22	52.54	32.33	3.09	0.43	0.17	0.07	0.15
70 и более	До 1940	1.324	0.678	0.387	11.39	52.19	31.26	4.03	0.68	0.20	0.09	0.16
Украинцы												
40–44	1966–1970	1.377	0.618	0.326	8.46	52.45	33.95	4.00	0.79	0.14	0.07	0.14
45–49	1961–1965	1.494	0.660	0.295	7.40	44.30	42.28	4.62	0.89	0.24	0.06	0.21
50–54	1956–1960	1.549	0.690	0.288	7.23	40.19	45.66	5.61	0.68	0.26	0.17	0.20
55–59	1951–1955	1.523	0.651	0.281	7.76	40.93	44.32	6.09	0.50	0.16	0.09	0.16
60–64	1946–1950	1.478	0.650	0.298	7.81	44.37	42.35	4.29	0.64	0.26	0.16	0.13
65–69	1941–1945	1.463	0.552	0.258	6.50	47.10	41.40	4.16	0.53	0.21	0.05	0.05
70 и более	До 1940	1.520	0.770	0.333	7.80	43.90	40.32	6.10	1.05	0.53	0.09	0.21
Белорусы												
40–44	1966–1970	1.376	0.728	0.384	8.77	52.35	34.25	3.66	0.48	0.07	0.07	0.35
45–49	1961–1965	1.463	0.599	0.280	7.86	44.22	43.35	3.79	0.32	0.18	0.18	0.09
50–54	1956–1960	1.540	0.610	0.257	6.98	39.81	47.24	5.04	0.56	0.19	0.04	0.15
55–59	1951–1955	1.502	0.622	0.276	7.37	42.07	45.56	4.01	0.56	0.22	0.00	0.22
60–64	1946–1950	1.499	0.647	0.288	6.68	44.74	43.45	3.60	0.77	0.51	0.05	0.21
65–69	1941–1945	1.429	0.583	0.285	8.24	46.40	40.94	3.82	0.26	0.09	0.17	0.09
70 и более	До 1940	1.481	0.674	0.307	7.37	46.33	39.64	5.19	0.97	0.29	0.10	0.12
Татары												
40–44	1966–1970	1.375	0.731	0.387	11.42	48.14	34.60	4.34	1.06	0.09	0.09	0.27
45–49	1961–1965	1.452	0.670	0.318	8.84	45.37	39.78	4.71	0.82	0.24	0.12	0.12
50–54	1956–1960	1.532	0.787	0.335	8.45	41.16	42.61	5.96	1.09	0.31	0.16	0.26
55–59	1951–1955	1.539	0.839	0.354	8.85	40.35	42.78	6.03	1.15	0.45	0.13	0.26
60–64	1946–1950	1.500	0.734	0.326	8.56	43.52	40.40	5.52	1.36	0.40	0.08	0.16
65–69	1941–1945	1.482	0.882	0.402	10.67	42.67	39.00	5.67	0.67	0.67	0.33	0.33
70 и более	До 1940	1.577	0.997	0.401	10.00	40.09	37.99	8.41	2.06	0.98	0.18	0.29
Евреи												
40–44	1966–1970	1.190	1.097	0.775	20.38	49.53	24.88	4.03	0.47	0.47	0.00	0.24
45–49	1961–1965	1.221	0.584	0.392	14.85	52.78	28.87	2.68	0.62	0.21	0.00	0.00
50–54	1956–1960	1.264	0.694	0.435	14.35	51.39	29.94	3.09	0.93	0.00	0.15	0.15
55–59	1951–1955	1.157	0.658	0.492	18.69	51.29	27.06	2.45	0.13	0.13	0.13	0.13
60–64	1946–1950	1.175	0.513	0.372	15.38	54.27	28.34	1.61	0.32	0.08	0.00	0.00
65–69	1941–1945	1.167	0.480	0.353	14.63	56.23	27.21	1.67	0.26	0.00	0.00	0.00
70 и более	До 1940	1.145	0.607	0.463	17.95	53.47	25.85	2.16	0.33	0.11	0.02	0.11
Узбеки												
40–44	1966–1970	2.168	1.519	0.323	8.66	20.94	31.05	28.52	7.04	3.07	0.36	0.36
45–49	1961–1965	2.224	1.837	0.371	7.23	26.51	26.75	22.89	11.81	3.13	1.45	0.24

Таблица 3. Окончание

Возрастная когорта, лет	Годы рождения	$\bar{k}$	V_k	I_f	Количество детей							
					0	1	2	3	4	5	6	7 и более
50–54	1956–1960	2.303	1.948	0.367	7.02	25.00	28.51	18.86	13.16	5.70	1.75	0.00
55–59	1951–1955	2.026	2.464	0.600	14.04	30.70	24.56	9.65	14.91	5.26	0.00	0.88
60–64	1946–1950	1.758	2.079	0.673	11.29	38.71	32.26	11.29	1.61	1.61	0.00	3.23
65–69	1941–1945	1.643	1.301	0.482	14.29	39.29	21.43	17.86	7.14	0.00	0.00	0.00
70 и более	До 1940	1.868	2.671	0.766	5.66	49.06	26.42	7.55	7.55	0.00	0.00	3.77
Армяне												
40–44	1966–1970	1.784	0.813	0.255	7.94	24.96	51.06	13.62	1.99	0.28	0.00	0.14
45–49	1961–1965	1.837	1.050	0.311	8.95	22.89	50.00	14.47	2.76	0.26	0.13	0.53
50–54	1956–1960	1.801	0.821	0.253	8.28	25.00	48.01	15.89	2.65	0.17	0.00	0.00
55–59	1951–1955	1.775	1.453	0.461	11.11	28.37	42.08	14.66	2.13	0.24	0.24	1.18
60–64	1946–1950	1.719	1.010	0.342	9.47	29.81	46.80	9.75	2.51	1.11	0.28	0.28
65–69	1941–1945	1.732	0.965	0.322	6.10	37.20	40.85	11.59	2.44	1.22	0.61	0.00
70 и более	До 1940	1.812	1.415	0.431	8.22	37.00	32.60	13.95	5.29	2.35	0.44	0.15
Азербайджанцы												
40–44	1966–1970	2.081	1.039	0.240	6.24	15.60	49.92	23.24	3.59	0.78	0.16	0.47
45–49	1961–1965	1.965	0.948	0.246	8.17	18.54	46.58	23.18	2.87	0.22	0.44	0.00
50–54	1956–1960	2.071	1.349	0.315	6.69	22.05	42.91	19.29	6.30	0.79	1.57	0.39
55–59	1951–1955	1.943	1.159	0.307	8.13	23.58	45.53	13.01	8.13	1.63	0.00	0.00
60–64	1946–1950	1.873	1.773	0.505	7.04	39.44	30.99	12.68	5.63	2.82	0.00	1.41
65–69	1941–1945	1.516	1.153	0.502	12.90	45.16	29.03	3.23	9.68	0.00	0.00	0.00
70 и более	До 1940	1.372	0.885	0.470	13.95	47.67	30.23	4.65	2.33	1.16	0.00	0.00

Примечание. Фоном выделены модальные классы распределения числа детей. Обозначения как в табл. 2.

ет, что у всех представленных национальностей временная изменчивость параметров $\bar{k}$, V_k и I_f выражена слабо. В Санкт-Петербурге у русских, украинцев, белорусов, татар и армян среднее число потомков ($\bar{k}$) колеблется примерно на одном уровне или незначительно уменьшается от женщин самой старшей когорты (более 70 лет, родившихся до 1940 г.) до когорты 1961–1965 гг. рождения (45–49 лет). У евреев, узбеков и азербайджанцев среднее число потомков у женщин более молодой когорты (45–49 лет) увеличивается (табл. 3). Значения межсемейной дисперсии числа потомков практически во всех возрастных когортах меньше среднего числа потомков, что говорит о формировании единообразия репродуктивного поведения всех этнических групп населения мегаполисов и формировании единого представления о желательном числе детей.

Значения индекса Кроу, обусловленного дифференциальной плодовитостью, у русских, украинцев, белорусов и татар варьируют в пределах 0.3–0.4, у армян и азербайджанцев – в пределах от 0.2 до 0.5. Обращают на себя внимание высокие значения этого показателя у евреев в когорте

1966–1970 гг. рождения (в Москве 0.538, в Санкт-Петербурге 0.775). Высокое значение I_f также наблюдается у старшего поколения узбеков. Тенденция к ослаблению отбора прослеживается в Москве у татар, армян, азербайджанцев, грузин и узбеков. Невысокие значения данного индекса свидетельствуют о том, что процесс ослабления отбора в отношении той его компоненты, которая обусловлена дифференциальной плодовитостью, практически прекратился.

*Компонента отбора, обусловленная
дифференциальной плодовитостью.
Межгрупповой отбор*

Отдельно в населении Москвы и Санкт-Петербурга рассмотрены параметры межгруппового отбора, обусловленного межэтническими различиями в числе потомков. В Москве минимальные значения среднего числа потомков всегда были характерны для русских и евреев; максимальные – для узбеков и азербайджанцев, при этом различия не достигали двукратной величины (табл. 4). Интенсивность межгруппового отбора (I'_f) за рас-

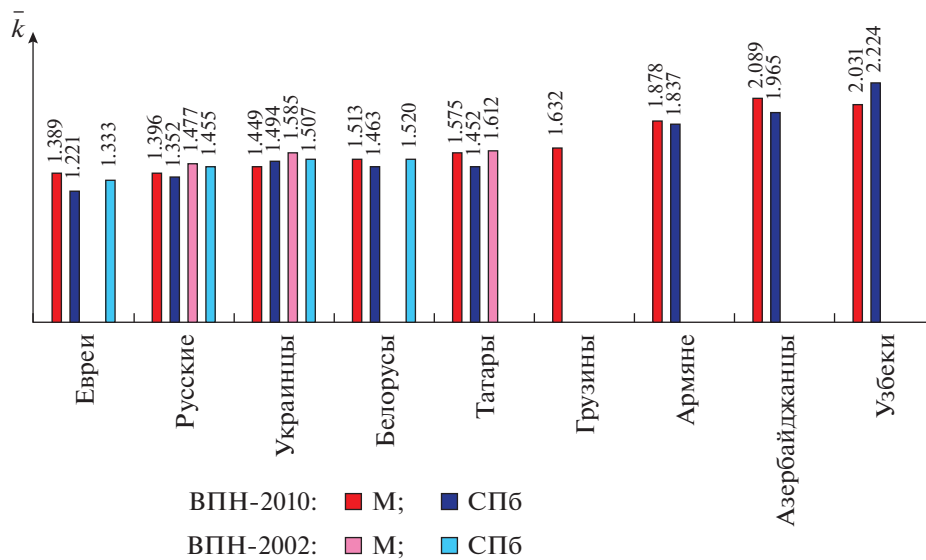


Рис. 2. Распределение женщин разных национальностей (в возрастной группе 45–49 лет) в Москве и Санкт-Петербурге по среднему числу рожденных детей.

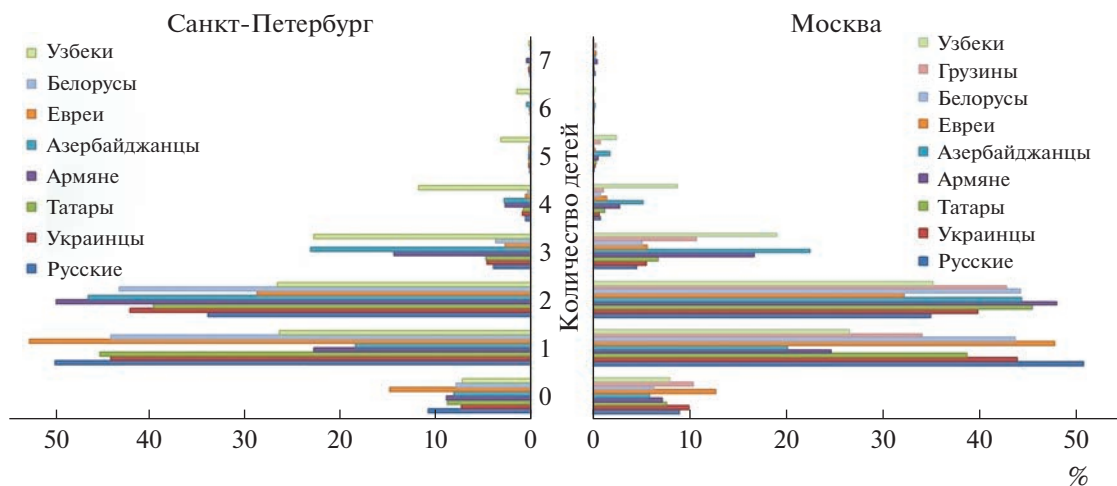


Рис. 3. Распределение женщин разных национальностей (в возрастной группе 45–49 лет) в двух мегаполисах по числу рожденных детей.

смотренный период менялась незначительно, в пределах 0.02–0.03, хотя в последних возрастных когортах несколько возросла.

В Петербурге минимальные значения среднего числа потомков всегда были характерны для евреев; максимальные — для узбеков, азербайджанцев и армян, при этом различия не достигали двукратной величины (табл. 4). Интенсивность межгруппового отбора увеличивалась от старших возрастных когорт к младшим — от 0.03 до 0.06, что выше, чем в Москве. Следует отметить, что интенсивность межгруппового отбора в обоих мегаполисах и во всех возрастных когортах на порядок меньше, чем внутригруппового.

ОБСУЖДЕНИЕ

Рассмотрена временная и межэтническая изменчивость параметров естественного воспроизводства и индексов Кроу в населении двух крупнейших мегаполисов России — Москве и Санкт-Петербурге. Было показано, что компонента отбора, обусловленная дифференциальной смертностью, в XXI в. в обоих мегаполисах снизилась до минимально возможных значений ($I_m = 0.01$). Эти значения были рассчитаны по таблицам смертности 2018 г., т.е. в “доковидную эпоху”. В 2020 и 2021 гг. смертность заметно возросла [8], однако в меньшей степени этот рост затронул до-репродуктивную часть популяции.

Таблица 4. Динамика параметров межгруппового отбора в населении двух мегаполисов

Возрастная когорта (лет)	Годы рождения	$\bar{k}_{\min}$	$\bar{k}_{\max}$	$\bar{k}$	$V_{\bar{k}}$	I'_f
Москва						
40–44	1966–1970	1.335 (русские)	2.098 (азербайджанцы)	1.612	0.077	0.030
45–49	1961–1965	1.389 (евреи)	2.089 (азербайджанцы)	1.661	0.073	0.027
50–54	1956–1960	1.403 (евреи)	2.127 (узбеки)	1.712	0.068	0.023
55–59	1951–1955	1.320 (евреи)	2.114 (узбеки)	1.689	0.068	0.024
60–64	1946–1950	1.299 (евреи)	1.952 (азербайджанцы)	1.608	0.045	0.017
65–69	1941–1945	1.245 (евреи)	2.047 (узбеки)	1.638	0.069	0.026
70 и более	До 1940	1.250 (евреи)	2.176 (азербайджанцы)	1.715	0.079	0.027
Санкт-Петербург						
40–44	1966–1970	1.190 (евреи)	2.168 (узбеки)	1.576	0.145	0.059
45–49	1961–1965	1.221 (евреи)	2.224 (узбеки)	1.626	0.119	0.045
50–54	1956–1960	1.264 (евреи)	2.303 (узбеки)	1.686	0.121	0.043
55–59	1951–1955	1.157 (евреи)	2.026 (узбеки)	1.610	0.083	0.032
60–64	1946–1950	1.175 (евреи)	1.873 (азербайджанцы)	1.544	0.053	0.022
65–69	1941–1945	1.167 (евреи)	1.732 (армяне)	1.467	0.032	0.015
70 и более	До 1940	1.145 (евреи)	1.868 (узбеки)	1.512	0.059	0.026

Примечание. $\bar{k}_{\min}$ и $\bar{k}_{\max}$ – минимальное и максимальное среднее число потомков, приходящееся на одну женщину с завершенным репродуктивным периодом, $\bar{k}$ – среднее число потомков по всем этническим группам, $V_{\bar{k}}$ – межгрупповая дисперсия плодовитости, I'_f – интенсивность межгруппового отбора.

Еще в XIX в. для городского населения России была характерна очень высокая детская смертность – более половины детей не доживало до возраста репродукции ($p_d > p_s$; $I_m > 1$). Данные табл. 5 иллюстрируют многократное – в 150 раз – снижение компоненты I_m в населении Москвы за период более полутора веков. Аналогичная динамика наблюдалась в Санкт-Петербурге. Низкие значения дорепродуктивной смертности отмечаются в XXI в. не только в мегаполисах РФ, это показано также на примере небольших городов Ростовской обл. [9]. Для сравнения: в СССР в 1920-е гг. $I_m = 0.502$, в 1930-е гг. $I_m = 0.458$, в 1950-е гг. $I_m = 0.076$; в 1960-е гг. $I_m = 0.047$; в РСФСР в 1970-е гг. $I_m = 0.042$; в 1980-е – 0.034; в РФ в 2018, 2019 гг. $I_m = 0.01$. При этом значения данного показателя в городском населении ниже, чем в сельском, а для женщин ниже, чем для мужчин [5, 10].

Столь впечатляющее снижение дорепродуктивной смертности, произошедшее за короткий промежуток времени жизни шести поколений – результат успехов здравоохранения и социального прогресса. С точки зрения демографии и медицины – это абсолютное благо. Однако, согласно теории популяционной генетики, предсказуемым следствием ослабления отбора является рост генетического груза популяции [2]. В настоящее время в популяциях с низкой дорепродуктивной

смертностью почти половина ее приходится на перинатальную смертность, в основном обусловленную генетическими причинами. При этом сохраняют свое значение отбор на пренатальных стадиях онтогенеза, который трудно поддается учету.

В условиях релаксации естественного отбора особенно актуальным становится развитие пре-

Таблица 5. Динамика компонент тотального отбора в Москве

Годы	I_m	$\bar{k}$	V_k	I_f	I_t	I_m/I_t , %
1850 ¹	1.50	4.75	15.01	0.66	3.15	48
1950 ¹	0.11	1.98	2.85	0.72	0.91	12
1975 ¹	0.05	1.03	0.39	0.37	0.44	11
1984 ¹	0.03	1.12	0.60	0.48	0.52	6
1994 ²	0.03	1.32	0.65	0.37	0.42	7
2002 ³	0.03	1.48	0.73	0.34	0.38	8
2010 ⁴	0.01	1.42	0.72	0.36	0.37	3

Примечание. ¹ – Кучер, Курбатова, 1986; ² – рассчитано на основе данных микропереписи населения Москвы 1994 г. и соответствующих таблиц смертности; ³ – рассчитано на основе данных ВПН-2002; ⁴ – рассчитано на основе данных ВПН-2010; I_t – индекс тотального отбора; остальные обозначения как в табл. 1 и 2.

диктивной медицины и широкое внедрение методов медико-генетического консультирования и вспомогательных репродуктивных технологий, в частности, пренатальной и доимплантационной диагностики наследственных дефектов, позволяющих предотвратить рождение больного ребенка и тем самым снизить частоту аномальных генов в популяции.

На примере Москвы видно, как резко изменилось репродуктивное поведение. В XIX в. москвички в среднем рожали по 4–5 детей, межсемейные различия в плодовитости были весьма значительны, создавая широкое поле для отбора. У поколений, закончивших репродукцию в XX в., среднее число детей уменьшилось более чем в четыре раза, дисперсия плодовитости — более чем в 20 раз, компонента отбора по плодовитости — почти в два раза. В начале XXI в. среднее число потомков несколько возросло, а его дисперсия и компонента I_f существенно не изменилась (табл. 5). Компонента I_f в настоящее время вносит основной вклад в индекс тотального отбора, а доля компоненты I_m составляет всего 3%, тогда как в XIX в. вклад обеих составляющих был примерно одинаков.

Анализ материалов ВПН-2010 выявил в населении Москвы и Санкт-Петербурга межэтнические различия по параметрам естественного воспроизводства и индексам Кроу, при этом уровень рождаемости в столицах для всех этнических групп, кроме узбеков в Санкт-Петербурге, ниже, чем требуется даже для простого воспроизводства населения, а значит, и стабильного воспроизводства генофонда, что свидетельствует о неблагоприятном характере генетико-демографического процесса. В Москве и в Санкт-Петербурге у русских и евреев на протяжении всего рассмотренного периода модальный класс распределения числа потомков приходится на “1”, у остальных национальностей в разных возрастных когортах — на “1” или “2” (табл. 2, 3). Происходит нивелирование межсемейных различий по числу потомков, чему способствует широкое распространение практики планирования семьи и успехи репродуктивной медицины по преодолению бесплодия. Многодетность нехарактерна для городского населения.

Обращает на себя внимание высокая доля инфертильных женщин в обеих столицах, в некоторых этнических группах доходящая до 20%. Эта категория женщин является потенциальным резервом повышения рождаемости. Возможные причины инфертильности рассмотрены нами в статье [4]. Среди них как биологические (бесплодие, невынашивание беременности), так и социально-психологические (в последнее время среди молодежи получила распространение деструктивная идеология “чайлд фри”). В любом случае может при-

существовать генетическая компонента, поэтому инфертильность является важной составляющей отбора, обусловленного дифференциальной плодовитостью.

Сравнение параметров дифференциальной плодовитости в мегаполисах с аналогичными данными, рассчитанными по материалам ВПН-2002 [4], доступно лишь для нескольких национальностей: у русских, украинцев и татар в Москве, а также у русских, украинцев, белорусов и евреев в Петербурге, по данным ВПН-2010 среднее число детей меньше, чем по данным ВПН-2002. По данным ВПН-2010 в Петербурге среднее число потомков меньше, чем в Москве у большинства этнических групп.

Временная динамика интенсивности внутригруппового отбора по данным ВПН-2010 в обоих мегаполисах выражена слабее, чем по данным ВПН-2002: очевидно значения I_f достигли минимально возможных значений, что связано с уменьшением межсемейной дисперсии плодовитости (табл. 2, 3).

Неожиданным результатом является выявленный в данной работе характер временной динамики межгруппового отбора в двух крупнейших мегаполисах РФ. Расчеты, выполненные по материалам ВПН-2010, показали постепенное возрастание интенсивности межгруппового отбора в населении Петербурга (от 0.015 до 0.059) и отсутствие выраженной динамики в населении Москвы (варьирует от 0.017 до 0.030). Такой результат принципиально отличается от наших расчетов, выполненных по результатам ВПН-2002, которые показали уменьшение интенсивности *межгруппового отбора*: в Москве она сократилась на порядок (от 0.0214 для когорт довоенных годов рождения до 0.0026 для когорты родившихся в 1958–1962 гг.); в Петербурге — в два раза (от 0.0180 до 0.0085) [4] (рис. 4). На полученный результат несомненно оказал влияние крайне ограниченный спектр национальностей для Москвы и Петербурга, по которым имеются данные в опубликованных материалах ВПН-2002, и более широкий спектр национальностей в ВПН-2010.

Ранее на основе анализа материалов ВПН-2002 и ВПН-2010 для тех же возрастных когорт женщин 32 национальностей (в 2002 г.) и 47 национальностей (в 2010 г.) было показано, что в масштабах РФ значения межгруппового отбора (I'_f) постепенно снижались (от $I'_f = 0.10$ до $I'_f = 0.03$), что обусловлено многократным снижением межгрупповой дисперсии плодовитости [4, 5]. Значения данного параметра для Москвы и Петербурга в старших возрастных когортах в несколько раз меньше, чем в среднем по России, а в когортах

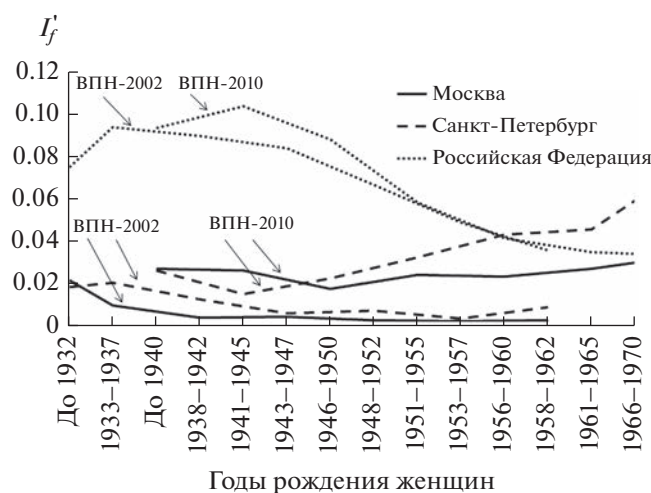


Рис. 4. Динамика интенсивности межгруппового отбора, обусловленного дифференциальной плодовитостью этнических групп (I_f'), в Москве, Санкт-Петербурге и для РФ в целом (рассчитано по материалам ВПН-2002 и ВПН-2010).

1960-х гг. рождения по данным ВПН-2010 становятся выше (в Петербурге), чем значения I_f' в масштабах РФ, или равными (в Москве) этим значениям (рис. 4).

Трудно прогнозировать дальнейшую динамику параметров межгруппового отбора в мегаполисах РФ: с одной стороны, в результате притока мигрантов этнический состав населения становится все более пестрым, мигранты в основном происходят из регионов с традиционно высокой рождаемостью. С другой стороны репродуктивное поведение мигрантов в новой этнокультурной среде со временем трансформируется в направлении сближения с коренным городским населением и, следовательно, различия в средней приспособленности этнических групп в мегаполисах могут исчезнуть.

Следует еще раз отметить, что выявленная дифференциация этнических групп по уровню рождаемости отражает не различия в их биологической приспособленности, а влияние социокультурных и демографических факторов. В Москве и Петербурге более благоприятные показатели рождаемости в мусульманских этноконфессиональных группах связаны с особенностями репродуктивного поведения (традиции многодетности, соблюдение религиозных запретов в отношении регулирования рождаемости, в особенности абортов). Впрочем, какими бы причинами ни были обусловлены межэтнические различия в темпах естественного прироста, их наличие в популяции означает, что соотношение отдельных этнических групп будет изменяться в поколениях городских жителей. Результат проявится и на уровне генофонда всей городской популяции.

Исследование проведено в рамках темы государственного задания ИОГен РАН “Исследования полиморфизма на клеточном, организменном и популяционном уровне как основа создания генетических технологий” (№ 0092-2022-0001).

Статья не содержит исследований с участием живых организмов.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cavalli-Sforza L.L., Bodmer W.F. The Genetics of Human Populations. N.Y.: Dover publications, 2013. 992 p.
2. Курбатова О.Л., Победоносцева Е.Ю. Урбанизированные популяции // Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях. Гл. 5.2 / Ред. Алтухов Ю.П. М.: Наука, 2004. С. 433–516.
3. Курбатова О.Л., Победоносцева Е.Ю., Привалова В.А. Демографическая генетика мегапопуляций: изменчивость параметров отбора // Человек в природной и культурной среде. Тр. Третьих антропологических чтений к 75-летию со дня рождения академика В.П. Алексеева. М.: Наука, 2007. С. 277–288.
4. Курбатова О.Л., Победоносцева Е.Ю. Изменчивость параметров естественного воспроизводства и индексов Кроу в этнических группах двух крупнейших мегаполисов России // Генетика. 2017. Т. 53. № 11. С. 1349–1359.
5. Грачева А.С., Победоносцева Е.Ю., Удина И.Г., Курбатова О.Л. Генетико-демографический анализ дифференциальной смертности и дифференциальной плодовитости как компонент естественного отбора (по материалам переписей населения России) // Усп. совр. биологии. 2022. Т. 142. № 5. С. 424–441.

6. Crow J.F. Some possibilities for measuring selection intensities in man // Hum. Biol. 1958. V. 30. P. 1–13.
7. https://gks.ru/free_doc/new_site/perepis2010/croc/perepis_itogi1612.htm (сайт Всероссийской переписи населения).
8. <https://rosstat.gov.ru/> (официальный сайт Росстата).
9. Кривенцова Н.В., Ельчинова Г.И., Амелина С.С., Зинченко Р.А. Репродуктивная характеристика населения Ростовской области // Мед. генетика. 2003. Т. 2. № 8. С. 380–385.
10. Тимаков В.В., Курбатова О.Л. Значение индексов потенциального отбора для населения СССР // Генетика. 1991. Т. 27. № 5. С. 928–937.

Genetic-Demographic Analysis of Natural Reproduction Parameters and Crow's Indices in Ethnic Groups of Moscow and St. Petersburg (Based on the 2010 Russia's Population Census)

A. S. Gracheva^{a, *}, I. G. Udina^a, and O. L. Kurbatova^a

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

*e-mail: palesa@yandex.ru

Based on the analysis of the materials of the 2010 All-Russia's Population Census and the demographic statistics of Rosstat Agency, the genetic-demographic parameters of temporal and interethnic variability of natural reproduction parameters and selection parameters (Crow indices) were calculated for the most numerous ethnic groups of Moscow and St. Petersburg. A decrease in the selection component due to differential prereproductive mortality was shown to decrease to the minimum possible values (index $I_m < 0.01$). In both megacities, interethnic differences were revealed in the parameters of natural reproduction and the selection component due to differential fertility, while the birth rate in both capitals for all ethnic groups, except for Uzbeks in St. Petersburg, is lower than required even for simple reproduction of the population, and hence stable reproduction of the gene pool. This indicates the unfavorable nature of the genetic and demographic processes in all the represented nationalities of the megacities. The I_f index ranges from 0.2 to 0.5. The temporal dynamics of the average number of offspring and its variance, as well as the I_f index, traced according to the data on the age cohorts of women born in the 1940s–1960s, is weakly expressed — the tendency to selection relaxation is not observed for all the studied ethnic groups. It is shown that the intensity of intergroup selection, due to interethnic differences in fertility, in the population of St. Petersburg increases from older age cohorts to younger ones, while in the population of Moscow it does not change significantly, while the temporal dynamics of this indicator, calculated on the base of the materials of the 2002 All-Russia's Population Census for cohorts born in 1930s–1950s has the opposite direction. The genetic-demographic consequences of the revealed tendencies are discussed.

Keywords: Crow's indices, differential mortality, differential fertility, intragroup selection, ethnic groups, Moscow, St. Petersburg.

КРАТКИЕ
СООБЩЕНИЯ

УДК 575.113.633.15

АНАЛИЗ МУТАЦИЙ ГЕНОВ АВТОНОМНОГО ЭМБРИО- И ЭНДОСПЕРМОГЕНЕЗА КУКУРУЗЫ

© 2023 г. Е. М. Моисеева¹, В. В. Фадеев¹, Ю. В. Красова¹, М. И. Чумаков¹, *

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, Федеральный исследовательский центр
“Саратовский научный центр Российской академии наук”, Саратов, 410049 Россия

*e-mail: chumakov_m@ibppm.ru

Поступила в редакцию 16.03.2023 г.

После доработки 19.04.2023 г.

Принята к публикации 24.04.2023 г.

Проведена сравнительная оценка мутаций генов гиногенеза и партеногенеза у различных линий кукурузы саратовской селекции. В частности секвенированы гены, контролирующие гиногенез (*Zm_Pla1*, *Zm_CenH3*, *Zm_Dmp7*) и взаимодействие мембран гамет (*Zm_Gex2*, *Zm_Gcs1*) у гаплоиндуцирующих (ЗМС-8, ЗМС-П) линий, и гены, предположительно связанные с автономным развитием эндосперма (*Zm_Chr106*, *Zm_Hdt104* и *Zm_Fie1*) у партеногенетических (АТ-1, АТ-3, АТ-4) и обычных (КМ, ГПЛ-1) линий кукурузы саратовской селекции. С помощью методов биоинформатики проведено сравнение и выявлены изменения в нуклеотидных последовательностях исследованных генов у разных линий кукурузы. На основании данных секвенирования сделан вывод о возможности использования генов *Zm_Pla1*, *Zm_Gex2* и *Zm_Fie1* для генотипирования линий и гибридов кукурузы.

Ключевые слова: гены гиногенеза и партеногенеза кукурузы, взаимодействие мембран гамет, мутации, генотипирование.

DOI: 10.31857/S0016675823090084, **EDN:** WURIET

Кукуруза (*Zea mays* L.) — одна из наиболее распространенных сельскохозяйственных культур, производство которой во втором десятилетии XXI в. в мире выросло более чем в полтора раза, а в России с 1985 по 2018 гг. сбор зерна увеличился в девять раз [1]. Саратовскими селекционерами начиная с 60–80-х гг. XX в. по настоящее время была создана уникальная коллекция линий кукурузы, включающая эффективные линии-гаплоиндукторы [2–5] и партеногенетические линии с элементами апомиксиса [6–10], которые охарактеризованы фенотипически и цитогенетически. Однако генетическая природа мутаций, возникших у гаплоиндуцирующих (ГИ) и партеногенетических (ПГ) линий саратовской селекции, пока неясна. Для разработки технологий выведения ГИ и ПГ линий кукурузы с улучшенными хозяйственно полезными признаками необходимы знания о генах, контролирующих механизмы спонтанного развития зародыша и эндосперма без оплодотворения.

К настоящему времени установлены некоторые гены (*Zm_Pla1*, *Zm_CenH3* и *Zm_Dmp7*), которые причастны к образованию гаплоидных растений в потомстве линий-гаплоиндукторов кукурузы и явлению гаплоиндукции (гиногенеза) [11]. Работа американских селекционеров по селекции

линий-ГИ у кукурузы более 60 лет назад увенчалась существенным успехом — была получена линия Stock 6, индуцирующая образование матро-клинных гаплоидов в потомстве в десятки–сотни раз чаще, чем все остальные линии [12]. В ходе последующей селекции кукурузы на базе линии Stock 6 саратовским селекционерам удалось повысить эффективность ГИ с 2 до 8–10% [2, 4]. Линия-ГИ ЗМС-8 (частота ГИ — 8%) [3] является прямым потомком линии Stock 6 [13]. Линия-ГИ ЗМС-П (частота ГИ — 10%) была получена из потомства самоопыленных гибридов линии-ГИ ЗМС-8 (материнский родитель) и линии-ГИ КМС (Коричневый маркер саратовский) — отцовский родитель [5], в Саратовском национальном исследовательском государственном университете им. Н.Г. Чернышевского (СГУ). Всего в мире к 2016 г. насчитывалось более 50 линий-ГИ, выведенных с участием линии Stock 6 [13].

Саратовскими селекционерами была получена линия кукурузы АТ-1 [6] и ее производные — линии АТ-3, АТ-4, АТТМ [10], у которых автономный (без опыления) эмбрио- и эндоспермогенез (матроклинный партеногенез) наблюдались с повышенной (6–50% и более) частотой. По данным литературы для кукурузы на молекулярно-генетическом уровне изучены некоторые гены, кото-

рые могли быть задействованы в процессе переключения с полового на апомиктический способ размножения. В частности, установлены гены, кодирующие хроматинмодифицирующие белки (ХМБ) кукурузы (*Chr106*, *Dmt102*, *Dmt103*, *Dmt105*, *Hdt104*, *Hon101*), подавление экспрессии которых коррелирует с признаками апомиксиса у гибридов кукурузы и трипсакума [11, 14].

Другой группой генов, контролирующих у кукурузы развитие эндосперма, являются гены *Fie*, сходные с генами группы *Polycomb Repressive Complex 2* (*PRC2*), регулируемыми ранние этапы в развитии дрозофилы и арабидопсиса [15]. *PRC2*, представляющий собой комплекс из белков (*FIS1/MEDEA/FIS2/MSI1*), осуществляет метилирование хроматина и может подавлять транскрипцию целевых генов [15]. В отличие от арабидопсиса, имеющего единственный ген *Fie*, у кукурузы обнаружено два *Fie*-гена (*Zm_Fie1* и *Zm_Fie2*), один из которых (*Zm_Fie2*), вероятно, является репрессором развития эндосперма [16–18].

В связи с этим возникает несколько проблем: 1) охарактеризовать уже известные гены гиногенеза и партеногенеза у образцов кукурузы саратовской селекции, используя молекулярно-генетические подходы, и использовать эти знания для развития современных технологий селекции; 2) понять природу повышенной ГИ и спонтанного (без опыления) начала развития зародыша и эндосперма у партеногенетических линий кукурузы из саратовской коллекции; 3) разработать экспресс-систему контроля генов, связанных с изменениями в развитии зародыша и эндосперма кукурузы; 4) генотипировать полученные и вновь создаваемые формы кукурузы.

Цель исследования – анализ мутаций генов, контролирующих гиногенез (*Zm_Pla1*, *Zm_CenH3*, *Zm_Dmp7*), взаимодействие мембран гамет (*Zm_Gex2*, *Zm_Gcs1*) и партеногенез (гены ХМФ и *Zm_Fie*) у линий кукурузы саратовской селекции ЗМС-П, ЗМС-8, АТ-1, АТ-3, АТ-4 и контрольных линий Коричневый маркер (КМ) и ГПЛ-1 саратовской селекции.

Для выявления мутаций мы секвенировали транскрипты вышеуказанных генов у линий кукурузы. РНК выделяли из замороженных тканей (пыльца, завязи) [19], получали кДНК согласно инструкции производителя ревертазы (Евроген, Россия). Участки кДНК исследуемых генов амплифицировали с использованием специфических праймеров (подобраны с помощью ресурса Primer-Blast) для перекрывающихся фрагментов последовательностей и набора реактивов “Tersus Plus PCR kit” (Кат. № РК121, Евроген, Россия). Затем ПЦР-продукты очищали при помощи набора Cleanup Mini (Кат. № BC023S, Евроген, Россия) и секвенировали в компаниях Евроген и Синтол (Россия). Нуклеотидные последователь-

ности генов кукурузы различных линий сравнивали друг с другом и с нуклеотидными последовательностями генов референсной линии В73 методом множественного выравнивания с использованием программы ClustalO (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>). Нуклеотидные последовательности секвенированных генов кукурузы (*Zm_Gex2*, *Zm_Chr106*, *Zm_Hdt104*, *Zm_Gcs1*, *Zm_Fie1*) представлены нами в базе данных GenBank (номера MN617022.2, OL649773.1, MW195549.1, MW441336.1, MW222955.1, OK557951.1, MW414032.1, MG029204.1, MW222954.1).

В нуклеотидных последовательностях гена *Zm_Pla1* линий ЗМС-П и ЗМС-8 обнаружены 15 однонуклеотидных замен (ОНЗ) и одна четырехнуклеотидная вставка (НВ) (табл. 1), по сравнению с нуклеотидной последовательностью гена *Zm_Pla1* референсной линии В73 [19]. У линии кукурузы Stock 6 вставка четырех нуклеотидов в четвертом экзоне гена *Pla1*, кодирующего белок фосфолипазу А, сдвигает рамку считывания, что приводит к замене 20 аминокислот, а также появлению стоп-кодона и укорочению белка [20]. Ген *Pla1*, содержащий вставку, унаследовало множество линий-гаплоиндукторов – производных Stock 6 [13], в том числе линии саратовской селекции ЗМС-П и ЗМС-8 (табл. 1).

В гене *Zm_CenH3* линии ЗМС-8 нуклеотидных замен не обнаружено, а в гене *Zm_CenH3* линии ЗМС-П обнаружена одна однонуклеотидная замена по сравнению с линией В73. В нуклеотидной последовательности гена *Zm_Gex2* линий ЗМС-П, ЗМС-8, КМ обнаружены 35, 43 и 37 ОНЗ, соответственно, и одна девятинуклеотидная вставка по сравнению с последовательностью референсной линии В73 (табл. 1).

В нуклеотидной последовательности гена *Zm_Dmp7* линии кукурузы ЗМС-8 обнаружено шесть ОНЗ, а у линии кукурузы ЗМС-П – пять ОНЗ и одна делеция из трех нуклеотидов, по сравнению с референсной линией В73. В нуклеотидной последовательности гена *Zm_Gcs1* линии КМ обнаружено три ОНЗ, а у линии ЗМС-П – четыре ОНЗ (табл. 1).

У гена *Zm_Hdt104* партеногенетической линии АТ-4 не обнаружено изменений, а у линии АТ-3 присутствуют шесть ОНЗ. В последовательности гена *Zm_Chr106* линии АТ-3 обнаружены шесть ОНЗ. У гена *Zm_Fie1* линии АТ-1 показаны десять ОНЗ, у линии АТ-3 – 3 ОНЗ и делеция из шести нуклеотидов, а у линии АТ-4 – 12 ОНЗ (табл. 1).

Таким образом, в нуклеотидных последовательностях генов *Zm_Pla1*, *Zm_Gex2*, *Zm_Fie1* кукурузы наблюдается полиморфизм, который может быть использован в целях генотипирования линий и гибридов кукурузы.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-26-00101).

Таблица 1. Анализ мутаций у генов автономного эмбрио- и эндоспермогенеза кукурузы саратовской селекции

Ген	Линии кукурузы						
	ЗМС-П	ЗМС-8	КМ	ГПЛ-1	АТ-1	АТ-3	АТ-4
<i>Gex2</i>	35 ОНЗ, 1 НВ (9 Н)	43 ОНЗ, 2 НВ	37 ОНЗ	—	—	—	—
<i>Gcs1</i>	4 ОНЗ	—	3 ОНЗ	1 ОНЗ	—	—	—
<i>Pla1</i>	15 ОНЗ, 1 НВ (4 Н)	15 ОНЗ, 1 НВ (4 Н)	—	—	—	—	—
<i>Dmp7</i>	5 ОНЗ, 1 делеция ЗН	6 ОНЗ	—	—	—	—	—
<i>CenH3</i>	1 ОНЗ	Нет ОНЗ	—	—	—	—	—
<i>Chr106</i>	—	—	—	—	—	6 ОНЗ	—
<i>Hdt104</i>	—	—	—	—	—	6 ОНЗ	Нет мутаций
<i>Fie1</i>	—	—	—	—	10 ОНЗ	3 ОНЗ, делеция 6Н	12 ОНЗ

Примечание. ОНЗ — однонуклеотидная замена, Н — нуклеотид, НВ — нуклеотидная вставка, (—) — не определяли.

Авторы признательны Р.В. Долгополову за участие в работе по выравниванию нуклеотидных последовательностей генов *Zm_Dmp7* и *Zm_CenH3*, а также Ю.В. Смолькиной, О.В. Гуторовой за предоставленные семена и пыльцу кукурузы.

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. Чумаков М.И., Гусев Ю.С., Богатырева Н.В., Соколов А.Ю. Оценка рисков распространения генетически модифицированной кукурузы с пылью при выращивании с нетрансформированными сортами (обзор) // С-хоз. биология. 2019. Т. 54. № 3. С. 426–445. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2019.3.426rus>
2. Тырнов В.С., Завалишина А.Н. Индукция высокой частоты возникновения матроклинических гаплоидов кукурузы // Докл. АН СССР. 1984. Т. 276. С. 735–738.
3. Zavalishina A.N., Tyrnov V.S. Induction of matroclinal haploidy in maize *in vivo* // Reprod. Biol. and Plant Breeding. XIII EUCARPIA Congr. L 1992. P. 221–222.
4. Еналеева Н.Х., Тырнов В.С., Селиванова Л.П., Завалишина А.Н. Одинарное оплодотворение и проблема гаплоиндукции у кукурузы // Докл. АН СССР. 1997. Т. 353. С. 405–407.
5. Гуторова О.В., Апанасова Н.В., Юдакова О.И. Создание генетически маркированных линий кукурузы с наследуемым и индуцированным типами партеногенеза // Изв. Самарского науч. центра РАН. 2016. Т. 18. № 2. С. 341–344.
6. Тырнов В.С., Еналеева Н.Х. Автономное развитие зародыша и эндосперма у кукурузы // Докл. АН СССР. 1983. Т. 272. № 3. С. 722–725.
7. Enaleeva N.Kh., Tyrnov V.S. Cytological investigation of apomixis in AT-1 plants of corn // Maize Genet. Cooperation Newsletter. 1997. V. 71. P. 74–75.
8. Апанасова Н.В., Тумовец В.В. Цитозембриологическое изучение проявления апомиксиса у кукурузы линии АТ-3 после опыления // Бюлл. ботан. сада Саратовского гос. ун-та. 2003. № 2. С. 194–197.
9. Kolesova A.Y., Tyrnov V.S. Embryological peculiarities of tetraploid parthenogenetic maize forms // Maize Genet. Cooperation Newsletter. 2012. V. 85. P. 65–66.
10. Апанасова Н.В., Гуторова О.В., Юдакова О.И., Смолькина Ю.В. Особенности строения и развития женских генеративных структур у линий кукурузы с наследуемым и индуцированным типами партеногенеза // Изв. Самарского науч. центра РАН. 2017. Т. 19. № 2 (2). С. 216–219.
11. Чумаков М.И., Мазиллов С.И. Генетический контроль геногенеза у кукурузы (обзор) // Генетика. 2022. Т. 58. № 4. С. 388–397. <https://doi.org/10.31857/S001667582204004X>
12. Coe E.H. A line of maize with high haploid frequency // Am. Naturalist. 1959. V. 59. P. 381–382. <https://doi.org/10.1086/282098>
13. Hu H., Schrag T.A., Peis R. et al. The genetic basis of haploid induction in maize identified with a novel genome-wide association method // Genetics. 2016. V. 202. P. 1267–1276. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.184234>
14. Garcia-Aguilar M., Michaud C., Leblanc O., Grimanelli D. Inactivation of a DNA methylation pathway in maize reproductive organs results in apomixis-like phenotypes // The Plant Cell. 2010. V. 22. P. 3249–3267. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.072181>
15. Mozgova I., Kohler C., Hennig L. Keeping the gate closed: Functions of the polycomb repressive complex PRC2 in development // The Plant J. 2015. V. 83. P. 121–132. <https://doi.org/10.1111/tpj.12828>
16. Danilevskaya O.N., Hermon P., Hantke S. et al. Duplicated *fie* genes in maize: Expression pattern and imprinting suggest distinct functions // Plant Cell. 2003. V. 15. P. 425–438. <https://doi.org/10.1105/tpc.006759>

17. Hermon P., Srilunchang K., Zou J. et al. Activation of the imprinted *Polycomb* group *Fie1* gene in maize endosperm requires demethylation of the maternal allele // *Plant Mol. Biol.* 2007. V. 64. P. 387–395. <https://doi.org/10.1007/s11103-007-9160-0>
18. Li S., Zhou B., Peng X. et al. *OsFie2* plays an essential role in the regulation of rice vegetative and reproductive development // *New Phytol.* 2014. V. 201. P. 66–79. <https://doi.org/10.1111/nph.12472>
19. Моисеева Е.М., Гусев Ю.С., Гуморова О.В., Чумаков М.И. Анализ генов *Hap2/Gcs1*, *Gex2* у линий кукурузы саратовской селекции // *Генетика*. 2023. Т. 59. № 3. С. 327–335. <https://doi.org/10.31857/S0016675823030098>
20. Gilles L.M., Khaled A., Laffaire J.B. et al. Loss of pollen-specific phospholipase NOT LIKE DAD triggers gynogenesis in maize // *EMBO J.* 2017. <https://doi.org/10.15252/embj.201796603>

Analysis of Mutations of the Maize Genes of Autonomous Embryo-, Endospermogenesis

E. M. Moiseeva^a, V. V. Fadeev^a, Yu. V. Krasova^a, and M. I. Chumakov^a, *

^a*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Federal Research Center “Saratov Scientific Center of the Russian Academy of Sciences”, Saratov, 410049 Russia*

*e-mail: chumakov_m@ibppm.ru

The gynogenesis and parthenogenesis genes in Saratov maize lines was evaluated. In particular, the (*Zm_Gex2*, *Zm_Gcs1*, *Zm_Pla1*, *Zm_CenH3*, *Zm_Dmp7*) genes in haploid-inducing (ZMS-8, ZMSP) and (*Zm_Chr106*, *Zm_Hdt104* and *Zm_Fie1*) genes in parthenogenetic (AT-1, AT-3, AT-4) and ordinary (KM, GPL-1) maize lines were sequenced. Using bioinformatic methods, gene sequences were compared in different maize lines and changes in nucleotide sequences were revealed. We suppose that it is possible to use *Zm_Pla1*, *Zm_Gex2*, and *Zm_Fie1* genes for maize line genotyping.

Keywords: maize gynogenesis and parthenogenesis genes, mutations, genotyping.

ВЛИЯНИЕ ДЕЛЕЦИИ В НЕКАТАЛИТИЧЕСКОМ ДОМЕНЕ GdpP НА ФЕНОТИП *Staphylococcus aureus* ПОСРЕДСТВОМ НАПРАВЛЕННОГО ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ С ПОМОЩЬЮ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas9

© 2023 г. Ю. В. Сопова^{1, 2, *}, М. Е. Велижанина^{1, 3}, Д. А. Кандина^{1, 4}, В. В. Гостев^{5, 6},
П. С. Чулкова⁵, О. С. Сулян⁵, С. В. Сидоренко^{5, 6}

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

²Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, 198504 Россия

³Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии,
Санкт-Петербург, 196608 Россия

⁴Государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
“Ленинградский государственный университет им. А.С. Пушкина”, Санкт-Петербург, 196605 Россия

⁵Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства,
Санкт-Петербург, 197022 Россия

⁶Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова,
Санкт-Петербург, 191015 Россия

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

Поступила в редакцию 22.03.2023 г.

После доработки 13.04.2023 г.

Принята к публикации 17.04.2023 г.

Высокие внутриклеточные концентрации молекул циклического ди-аденозинмонофосфата (с-di-AMP) влияют на формирование устойчивости к антибиотикам, действующих на клеточную стенку у *Staphylococcus aureus*. Накопление молекул с-di-AMP происходит вследствие мутаций в домене DHH/DHHA1 белка GdpP. Роль мутаций в других доменах GdpP до конца не изучена. В этой связи целью настоящей работы стало получение направленной делеции в геноме без сдвига рамки считывания в линкерном участке между доменами GGDEF и DHH/DHHA1 белка GdpP. Для редактирования генома использовали штамм *S. aureus* RN4220 с отсутствующей системой рестрикции-модификации. Использовали двух векторную систему с термочувствительными ориджинами репликации, плазмиды: pCN-EF2132tet с геном рекомбиназы EF2132 *Enterococcus faecalis* и pCAS9counter с геном РНК-направляемой нуклеазы Cas9 *Streptococcus pyogenes*. Штамм *S. aureus* RN4220 трансформировали вектором pCN-EF2132tet для получения рекомбинирующих компетентных клеток, а затем вводили донорный олигонуклеотид одновременно с вектором контрselection. После двух трансформаций был получен штамм с целевой делецией (90 пн), которая соответствовала 308–337 аминокислотному участку в белке GdpP. У мутантного штамма не было выявлено фенотипических изменений: ЛАГ-фаза роста, общая скорость роста, время деления клеток, морфология колоний не отличались от исходного штамма. Также сохранялась чувствительность к антибиотикам, действующим на клеточную стенку. Таким образом, мутации в GdpP в линкерном участке между GGDEF и DHH/DHHA1 не влияют на чувствительность к антибиотикам у *S. aureus*.

Ключевые слова: GdpP, *Staphylococcus aureus*, CRISPR/Cas9, геномное редактирование.

DOI: 10.31857/S0016675823090126, **EDN:** WUYBXG

Золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) является важнейшим условно-патогенным микроорганизмом, вызывающим различные инфекции у человека и животных, часто проявляет множественную устойчивость к антибиотикам, и опосредует высокую летальность [1]. Для изучения механизмов вирулентности и устойчивости к антибиотикам широко используются методы на-

правленного мутагенеза. У *S. aureus* обнаруживается несколько систем рестрикции-модификации, которые эффективно защищают геном от внешнего привнесения генетической информации [2]. Это обуславливает сложность геномного редактирования на модели *S. aureus*. В этой связи для проведения генетических исследований часто используется модельный штамм *S. aureus* RN4220

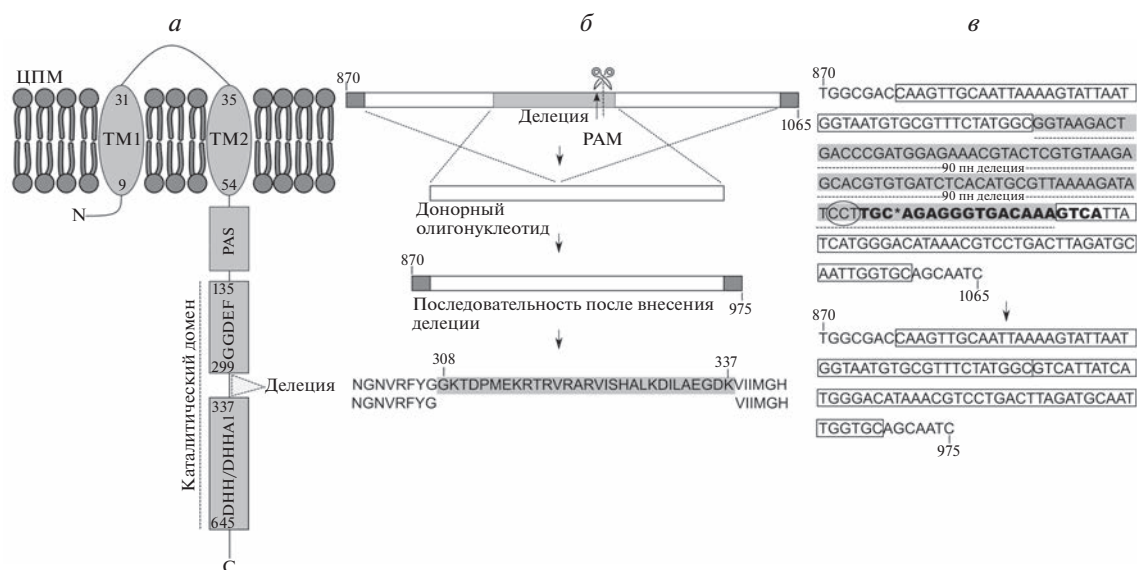


Рис. 1. Схема получения делеции. *а* — схема доменной структуры GdpP, треугольником отмечена область делеции; ЦПМ — цитоплазматическая мембрана. *б* — схема внесения делеции; ножницами отмечено место разреза нуклеазой Cas9; светлым серым цветом отмечена делеция; пунктирными линиями отмечены области идентичных последовательностей донорного олигонуклеотида. *в* — нуклеотидная последовательность гена *gdpP* с 870–1065 пн участка между кодируемыми доменами GGDEF и DHN/DHNA1. В рамках отмечена последовательность донорного праймера (90 пн); * звездочкой отмечено место разреза нуклеазой Cas9; овалом отмечена область PAM (последовательность CCT); жирным шрифтом выделена последовательность (20 пн) направляющей РНК (sgRNA). Делетированная консенсусная последовательность *gdpP* представлена фрагментом 870–975 пн. Серым цветом отмечена область делеции нуклеотидной (90 пн) и аминокислотной последовательности (30 аминокислот).

с отсутствующей системой рестрикции-модификации [3]. Штамм *S. aureus* RN4220 может выступать как генетический реципиент или как промежуточный хозяина для специфического метилирования мобильных генетических элементов в ходе генно-инженерных манипуляций. Существуют несколько подходов геномного редактирования *S. aureus*, в частности, внесение мутаций с помощью транспозонов или с помощью фаговой трансдукции [2]. Однако эти методы достаточно сложно воспроизводимы и не всегда эффективны. Недавно стал доступен новый подход — это редактирование с помощью системы CRISPR/Cas9 [4–6].

В последнее десятилетие у *S. aureus* интенсивно изучается влияние метаболизма вторичного сигнального мессенджера циклического ди-аденозинмонофосфата (**c-di-AMP**) на формирование устойчивости к антибиотикам [7]. Количество c-di-AMP регулируется в основном балансом между активностью c-di-AMP-синтазы (DacA), которая синтезирует c-di-AMP и фосфодиэстеразы GdpP, гидролизующей c-di-AMP. Установлено, что мутации в белке GdpP у *S. aureus* приводят к повышению внутриклеточных концентраций c-di-AMP, что в свою очередь, влияет на формирование устойчивости и толерантности к действию

бета-лактамовых антибиотиков. В структуре GdpP выделяют несколько доменов (рис. 1, *а*): два трансмембранных (TM1, TM2) и три внутриклеточных: PAS-домен, являющийся сенсором сигналов, GGDEF-домен, участвующий в передаче сигнала, и DHN/DHNA1, катализирующий гидролиз c-di-AMP до фосфаденилил-аденозина (pApA). Различные мутации, приводящие к устойчивости к антибиотикам, в основном локализованы в DHN/DHNA1-домене (337–645 а.к.) [8].

Ранее в ходе экспериментов по селекции устойчивости *S. aureus* разных генетических линий к бета-лактамам нами было показано, что мутации, расположенные в линкерном участке между доменами GGDEF и DHN/DHNA1 в белке GdpP, могут вносить свой вклад в формирование устойчивости [9, 10]. В этой связи целью настоящей работы стало использование системы CRISPR/Cas9 для целенаправленного внесения делеции, без сдвига рамки считывания, в участок гена *gdpP*, кодирующий этот линкерный участок, на модельном штамме *S. aureus* RN4220.

Для направленного редактирования генома штамма *S. aureus* RN4220 нами была использована система, включающая два вектора с термочувствительными ориджинами репликации. Первый вектор pCN-EF2132tet содержал ген рекомбиназы

EF2132 *Enterococcus faecalis*. Второй вектор — pCAS9counter — нес ген РНК-направляемой нуклеазы Cas9 *Streptococcus pyogenes*, вносящей двуниевые разрывы в целевую ДНК, вместе с последовательностью направляющей РНК. Направленность Cas9 на интересующий локус достигается путем клонирования олигонуклеотида длиной 20 пн в основную цепь односторонней РНК (sgRNA), который соответствует указанному локусу и находится непосредственно перед сайтом распознавания Cas9. Изначально был выбран участок, содержащий последовательность **РАМ** (protospacer adjacent motif, мотив последовательности: NGG), необходимый для связывания sgRNA с целевой мат-

рицей. После участка РАМ 20 нуклеотидов были использованы для таргетирования sgRNA. Общая схема получения делеции представлена на рис. 1,б.

На первом этапе мы трансформировали штамм *S. aureus* RN4220 вектором pCN-EF2132tet для получения рекомбинирующих компетентных клеток, а затем вводили донорный олигонуклеотид (90 пн) одновременно с вектором контрселекции. Последовательность донорного олигонуклеотида, используемого для геномного редактирования (четыре нуклеотида с 5'-конца модифицированы фосфотиоатом), представлена ниже.

5'-CAAGTTGCAATTAAAAGTATTAATGGTAATGTGCGTTTCTATGGC
GTCATTATCATGGGACATAAACGTCCTGACTTAGATGCAATTGGTGC-3'

Только клетки, подвергающиеся успешной рекомбинации, обладают иммунитетом к летальным двухцепочечным разрывам ДНК, индуцированным контрселективной плазмидой. Температура роста клеток может быть впоследствии повышена, что приводит к потере векторной системы [5].

Мы проанализировали нуклеотидную последовательность гена *gdpP* *S. aureus* и выбрали последовательность направляющей РНК и участка РАМ так, чтобы двуниевый разрыв находился в пределах участка, кодирующего 308–337 аминокислоты (рис. 1,в). Выбранную последовательность длиной 20 пн мы встроили в плазмиду pCAS9counter таким образом, чтобы она экспрессировалась в составе направляющей РНК. Для этого использовали частично комплементарные фосфорилированные олигонуклеотиды, которые образовывали дуплекс с выступающими однонитевыми концами, необходимыми для встраивания в вектор pCAS9counter по сайту рестрикции рестриктазы *BsaI*. Последовательности праймеров приведены ниже:

5'-P-AGCTCTGACTTTGTCCACCTCTGCAG-3'OH
HO3'-GACTGAAACAGTGGGAGACGTCAAAA-P5'.

Олигонуклеотидный дуплекс встраивали в вектор pCAS9counter по сайту рестрикции *BsaI*. Наличие вставки спейсера подтверждали с помощью секвенирования с использованием праймера:

5'-CGGTGCCACTTTTTCAAGTT-3'.

Плазида со вставкой спейсера, обозначенная как pCAS9counter-gdpP, была взята для дальнейших экспериментов.

Были получены электрокомпетентные клетки *S. aureus* штамма RN4220, которые были на

первом этапе трансформированы плазмидой pCN-EF2132tet, после чего были получены электрокомпетентные клетки *S. aureus*, несущие данную плазмиду. Они были трансформированы плазмидой pCAS9counter, несущей спейсер. Для инициации рекомбинации и получения делеции участка, кодирующего 308–337 аминокислоты, был использован донорный олигонуклеотид, последовательность которого была приведена ранее. После двух последовательных трансформаций плазмидами pCN-EF2132tet и pCAS9counter-gdpP было отобрано 12 трансформантов. Клетки трансформантов пассировали при 42°C в течение 18 ч для элиминации плазмид pCN-EF2132tet и pCAS9counter-gdpP. Потерю плазмид оценивали по отсутствию роста на селективных средах с антибиотиками эритромицином и хлорамфениколом. Для подтверждения наличия целевой делеции было проведено секвенирование по Сэнгеру с праймерами, фланкирующими область делеции. Один из 12 клонов содержал целевую делецию в гене *gdpP*.

Проверка мутантного фенотипа включала следующие фенотипические характеристики: культурально-морфологические параметры, определение чувствительности к антибиотикам и оценка скорости роста. Определение чувствительности к антибиотикам проводили методом серийных разведений в бульоне Мюллера–Хинтона с определением минимальной подавляющей концентрации (МПК). Оценку скорости роста осуществляли при измерении оптической плотности (при длине волны 600 нм) с интервалом 10 мин в сердечно-мозговом бульоне при культивировании в течение 15 ч в планшетном шейкер-инкубаторе. Оценку результатов кривых роста проводили в программе R

с помощью пакета Growthcurver [11]. Мутантный штамм не отличался по культуральным, морфологическим характеристикам при оценке роста на кровяном агаре. Через 24 ч он давал характерные беловато-серые колонии диаметром 3–5 мм (при культивировании более 48 ч, колонии приобретали умеренно желтоватый цвет). Скорость роста не изменялась, так время удвоения клеток составляло 28.2 ± 3 мин, по сравнению с контрольным штаммом без делеции в *gdpP* – 27.8 ± 2 мин ($p = 0.123$). ЛАГ-фаза роста также не изменялась и была одинаковой как для контрольного штамма, так и мутантного (160.5 ± 3 мин). Общая скорость роста (r) составляла 0.03 мин^{-1} для обоих штаммов. Не было выявлено изменений в чувствительности к разным антибиотикам. Так, уровень МПК к бета-лактамам антибиотикам: пенициллину, цефокситину, оксациллину, амоксициллину, меропенему, не превышал 0.25–1 мкг/мл для обоих штаммов. МПК гликопептидных и липогликопептидных антибиотиков также не изменялась. Эти данные свидетельствуют о том, что привнесенная делеция в *gdpP* не влияет на чувствительность к антибиотикам, действующим на клеточную стенку. Также не было обнаружено изменения чувствительности к антибиотикам других групп: макролидам, линкозамидам, аминогликозидам, оксазолидинонам и даптомицину.

Таким образом, использование системы CRISPR/Cas9 для геномного редактирования *S. aureus* является высокоэффективным методом и может быть использовано в генно-инженерных задачах для грамположительных бактерий. Делеция в линкерном участке между доменами GGDEF и DHH/DHHA1 белка GdpP не влияет на фенотип и чувствительность к антибиотикам у *S. aureus*.

Исследование поддержано грантом Российской государственной научной фонды 18-75-10114-П.

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. Tong S.Y., Davis J.S., Eichenberger E. et al. *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management // Clin. Microbiol. Rev. 2015. V. 28. № 3. P. 603–661. <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>
2. Monk I.R., Foster T.J. Genetic manipulation of *Staphylococcus*-breaking through the barrier // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2012. V. 2:49. P. 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00049>
3. Kreiswirth B.N., Lofdahl S., Betley M.J. et al. The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage // Nature. 1983. V. 305. № 5936. P. 709–712. <https://doi.org/10.1038/305709a0>
4. Chen W., Zhang Y., Yeo W.S. et al. Rapid and efficient genome editing in *Staphylococcus aureus* by using an engineered CRISPR/Cas9 system // J. Am. Chem. Soc. 2017. V. 139. № 10. P. 3790–3795. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b13317>
5. Penewit K., Holmes E.A., McLean K. et al. Efficient and scalable precision genome editing in *Staphylococcus aureus* through conditional recombineering and CRISPR/Cas9-mediated counterselection // mBio. 2018. V. 9. № 1. <https://doi.org/10.1128/mBio.00067-18>
6. Liu Q., Jiang Y., Shao L. et al. CRISPR/Cas9-based efficient genome editing in *Staphylococcus aureus* // Acta Biochim. Biophys. Sin (Shanghai). 2017. V. 49. № 9. P. 764–770. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmx074>
7. Yin W., Cai X., Ma H. et al. A decade of research on the second messenger c-di-AMP // FEMS Microbiol. Rev. 2020. V. 44. № 6. P. 701–724. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa019>
8. Zarrella T.M., Bai G. The many roles of the bacterial second messenger cyclic di-AMP in adapting to stress cues // J. Bacteriol. 2020. V. 203. № 1. <https://doi.org/10.1128/JB.00348-20>
9. Gostev V., Sopova J., Kalinogorskaya O. et al. In vitro cef-taroline resistance selection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* involves different genetic pathways // Microb. Drug. Resist. 2019. V. 25. № 10. P. 1401–1409. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0130>
10. Gostev V., Kalinogorskaya O., Ivanova K. et al. In vitro selection of high-level beta-lactam resistance in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* // Antibiotics (Basel). 2021. V. 10. № 6. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060637>
11. Sprouffske K., Wagner A. Growthcurver: An R package for obtaining interpretable metrics from microbial growth curves // BMC Bioinformatics. 2016. V. 17. № 172. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-1016-7>

The Influence of Deletion in the Non-Catalytic Domain of GdpP Mediated by Genome Editing with CRISPR/Cas9 on the Phenotype of *Staphylococcus aureus*

Yu. V. Sopova^{a, b, *}, M. E. Velizhanina^{a, c}, D. A. Kandina^{a, d}, V. V. Gostev^{e, f}, P. S. Chulkova^e, O. S. Sulian^e, and S. V. Sidorenko^{e, f}

^aSaint Petersburg State University, Saint Petersburg, 199034 Russia

^bSt. Petersburg Branch of the Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, 198504 Russia

^cAll-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, Pushkin, 196608 Russia

^dPushkin Leningrad State University, Pushkin, 196605 Russia

^ePediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Saint Petersburg, 197022 Russia

^fMechnikov North-Western State Medical University, Saint Petersburg, 195067 Russia

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

The high cellular level of cyclic di-adenosine monophosphate (c-di-AMP), which in turn results in resistance to cell-wall targeted antibiotics in *Staphylococcus aureus*. An increase in intracellular molecules of c-di-AMP is due to mutations in the DHH/DHHA1 domain of the GdpP protein. The influence of mutations in the other domains of GdpP has not been fully studied. The aim of this study was to obtain a targeted non-frame-shifting deletion in the GdpP protein's linker region between the GGDEF and DHH/DHHA1 domains. Restriction-modification deficient strain *S. aureus* RN4220 was used for genome editing. Two vectors with thermosensitive origins of replication were used. The first pCN-EF2132tet vector contained the *Enterococcus faecalis* EF2132 recombinase gene; the second pCAS9counter vector contained the *Streptococcus pyogenes* RNA-directed Cas9 nuclease gene. The *S. aureus* RN4220 strain was transformed with the pCN-EF2132tet vector to obtain recombining competent cells, and then a donor oligonucleotide was introduced simultaneously with the counterselection vector. A recombinant strain with a target deletion (90 bp) in GdpP (amino acids 308–337) was obtained after two sequential transformations. The mutant strain showed no changes in the phenotype: lag phase, growth rate, doubling time, and colony morphology did not differ from the progenitor strain. Susceptibility to cell-wall targeted antibiotics was the same as in the progenitor strain. Thus, mutations in the linker region between the GGDEF and DHH/DHHA1 domains of the GdpP do not affect susceptibility to antibiotics in *S. aureus*.

Keywords: GdpP, *Staphylococcus aureus*, CRISPR/Cas9, genome editing.