

# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Том 58, номер 12, 2022

---

---

## Обзорные и теоретические статьи

- Особенности структуры генофонда и генетическая история саха (якутов)  
*С. А. Федорова, Э. К. Хуснутдинова* 1349
- Современные тенденции и подходы поиска генетических детерминант старения и долголетия  
*С. С. Кунижева, В. П. Волобаев, М. Ю. Плотникова, Д. А. Куприянова, И. Л. Кузнецова, Т. В. Тяжелова, Е. И. Рогов* 1367
- 

## Генетика растений

- Климатические факторы и встречаемость аллелей локусов *Amy 1* и *Amy 2* в культуре ярового ячменя на территории бывшего СССР  
*В. П. Нецветаев, А. А. Поморцев* 1386
- Анализ генов, определяющих компактную форму растений арбуза *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai, у образцов из коллекции ВИР  
*К. В. Стрыгина, А. Г. Елацкова, Ю. А. Елацков, Г. А. Теханович, Е. К. Хлесткина* 1400
- Гомологи генов устойчивости к фитофторозу у представителей клубнеобразующих видов рода *Solanum* L.  
*А. А. Гурина, Н. В. Алпатьева, Н. А. Чалая, Н. В. Мироненко, А. В. Хютти, Е. В. Рогозина* 1418
- 

## Генетика животных

- STR-типирование европейского лося и европейской косули с использованием новых криминалистических наборов выявило различные паттерны генетической структуры двух видов оленевых в Беларуси  
*К. Рембала, Д. Э. Недзвецкая, С. А. Котова, Т. В. Забавская, В. И. Рыбакова, М. В. Холодова, И. С. Цыбовский* 1431
- 

## Генетика человека

- Гены *TMEM136* и *PPP1R12C*, дифференциально экспрессирующиеся в плаценте, ассоциированы с риском развития преэклампсии  
*Е. А. Решетников, В. А. Степанов, В. Н. Сереброва, А. В. Бочарова, Е. А. Трифонова, И. В. Пономаренко, Ю. Н. Решетникова, О. А. Ефремова, В. С. Орлова, И. В. Батлуцкая, И. Н. Сорокина, М. И. Чурносков* 1442
- Полиморфный локус rs167479 гена *RGL3* ассоциирован с риском развития преэклампсии тяжелого течения  
*М. Ю. Абрамова, И. В. Пономаренко, М. И. Чурносков* 1451
- 

## Методики

- Использование технологии KASP для изучения ассоциаций однонуклеотидных вариантов в генах *GPAD4*, *CCL3*, *DGKG*, *PPARGC1A*, *STAT1*, *TLR4* с молочной продуктивностью крупного рогатого скота  
*М. В. Модоров, А. А. Клещева, К. Р. Осинцева, И. В. Ткаченко, М. Ю. Севостьянов, Н. Н. Зезин* 1459
- 
-

---

---

# Contents

---

---

Vol. 58, No. 12, 2022

---

---

## Reviews and Theoretical Articles

- Population Genetic Structure and Genetic History of the Sakha (Yakuts)  
*S. A. Fedorova and E. K. Khusnutdinova* 1349
- Current Trends and Approaches in Search of Genetic Determinants of Aging and Longevity  
*S. S. Kunizheva, V. P. Volobaev, M. Yu. Plotnikova, D. A. Kupriyanova,  
I. L. Kuznetsova, T. V. Tyazhelova, and E. I. Rogaev* 1367
- 

## Plant Genetics

- Climatic Factors and Allele Distribution of Locus *Amy 1* and *Amy 2* in the Varieties of Spring Barley in the Territory of the Former USSR  
*V. P. Netsvetaev and A. A. Pomortsev* 1386
- Analysis of the Genes That Determine the Dwarf Form of Watermelon *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai in the VIR Collection  
*K. V. Strygina, A. G. Elatskova, Yu. A. Elatskov,  
G. A. Tekhanovich, and E. K. Khlestkina* 1400
- Homologues of *R* Genes for Late Blight Resistance among Tuberbearing Species of *Solanum* L. Genus  
*A. A. Gurina, N. V. Alpatieva, N. A. Chalaya,  
N. V. Mironenko, A. V. Khiutti, and E. V. Rogozina* 1418
- 

## Animal Genetics

- STR Typing of European Elk (Moose) and European Roe Deer with Novel Forensic Assays Reveals Contrasting Patterns of Genetic Structure of the Two Cervids in Belarus  
*K. Rebała, D. E. Nedzvetskaya, S. A. Kotova, T. V. Zabavskaya,  
V. I. Rybakova, M. V. Kholodova, and I. S. Tsybovsky* 1431
- 

## Human Genetics

- Genes *TMEM136* and *PPP1R12C* Differentially Expressed in the Placenta Are Associated with Preeclampsia  
*E. A. Reshetnikov, V. A. Stepanov, V. N. Serebrova, A. V. Bocharova, E. A. Trifonova,  
I. V. Ponomarenko, Yu. N. Reshetnikova, O. A. Efremova, V. S. Orlova,  
I. V. Batlutskaya, I. N. Sorokina, and M. I. Churnosov* 1442
- The Polymorphic Locus rs167479 of the *RGL3* Gene Is Associated with the Risk of Severe Preeclampsia  
*M. Yu. Abramova, I. V. Ponomarenko, and M. I. Churnosov* 1451
- 

## Methods

- KASP Technology Use to Study Associations of Single Nucleotide Polymorphism in *GPAD4*, *CCL3*, *DGKG*, *PPARGC1A*, *STAT1*, *TLR4* Genes with Cattle Milk Production  
*M. V. Modorov, A. A. Kleshcheva, K. R. Osintseva,  
I. V. Tkachenko, M. Yu. Sevost'yanov, and N. N. Zezin* 1459
- 
-

## ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ ГЕНОФОНДА И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИСТОРИЯ САХА (ЯКУТОВ)

© 2022 г. С. А. Федорова<sup>1, 2, \*</sup>, Э. К. Хуснутдинова<sup>1, 3</sup>

<sup>1</sup>Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, Якутск, 677013 Россия

<sup>2</sup>Якутский научный центр комплексных медицинских проблем, Якутск, 677000 Россия

<sup>3</sup>Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия

\*e-mail: sardaanafedorova@mail.ru

Поступила в редакцию 09.09.2021 г.

После доработки 30.04.2022 г.

Принята к публикации 11.05.2022 г.

В обзоре суммированы результаты молекулярно-генетических исследований структуры генофонда и генетической истории народа саха (якутов) в контексте данных по антропологии, лингвистике, истории и археологии. Описаны характерные особенности генетической структуры якутской популяции по линиям Y-хромосомы, митохондриальной ДНК и данным полногеномного анализа аутосомных локусов. Рассмотрены состав и соотношения компонентов генофонда различного происхождения и генетические взаимоотношения саха с народами Якутии и соседних регионов. Реконструкция генетической истории популяции позволила ответить на ряд вопросов, касающихся этногенеза якутов.

*Ключевые слова:* генетическая история, Y-хромосома, мтДНК, полногеномный анализ, якуты (саха).

**DOI:** 10.31857/S0016675822120037

Изучение формирования народов Сибири, генетические портреты которых имеют уникальные черты, сложившиеся при длительном развитии в условиях относительной изоляции, представляет особый интерес для специалистов в области популяционной генетики. Исследования структуры генофонда и генетических взаимоотношений саха (якутов) с другими народами Сибири были предприняты нами начиная с 2002 г. в сотрудничестве с коллегами из Эстонского биоцентра (Тарту, Эстония) и Университета Поля Сабатье (Тулуза, Франция) [1–17]. К детальному изучению генетической структуры якутского этноса одновременно с нами приступили две группы ученых: 1) из Института медицинской генетики (г. Томск) [18–20]; 2) из Института эволюционной антропологии Общества Макса Планка (Лейпциг, Германия) совместно с Институтом здоровья АН РС(Я) (Якутск, Россия) [21–27]. В обзоре приведены результаты наших исследований в сравнении с данными других групп ученых и представлениями об этногенезе якутов, предложенными ранее антропологами, лингвистами, историками и археологами.

### ЭТНОГЕНЕЗ НАРОДА САХА (ЯКУТОВ)

Саха (якуты) – тюркоязычный народ, освоивший субарктические и арктические территории

северо-востока Евразии. Общепринято считать, что формирование народа саха на территории современной Якутии происходило путем постепенного смешения тюркоязычных племен, переселившихся с южных регионов на Среднюю Лену, с местными племенами в течение длительного периода времени [28–39]. В отличие от соседних народов Восточной Сибири (тундровые юкагиры, чукчи, кочевые коряки, эвенки, эвены, долганы, нганасаны), занимающихся оленеводством, традиционным занятием для якутов является коневодство и разведение крупного рогатого скота.

По антропологическим показателям саха отличаются от других народов Арктики – юкагиров, эвенов и эвенков (байкальский антропологический тип), чукчей, эскимосов и коряков (арктический антропологический тип) и объединяются вместе с северными бурятами Иркутской области в ангаро-ленский локальный тип центральноазиатской группы североазиатских монголоидов [40, 41]. Согласно исследованиям Л.Ф. Томтосовой по антропологическим признакам с якутами наиболее сходны западные буряты, затем монголы, тункинские буряты и тувинцы [42].

В научной литературе уже давно утвердилось мнение о раннем отделении и обособлении якутского языка от основного тюркского языкового ствола. Предлагаются различные датировки этого размежевания: от II до VIII в. н. э. [30, 32, 43–47].

Известный российский тюрколог А.В. Дыбо считает, что отделение языка саха от общетюркского ствола, вероятно, произошло вскоре после начала нашей эры (примерно во II в. н. э.) [45]. Анализ основного словарного фонда якутского и древнетюркского языков, проведенный Г.Г. Левиным, позволил предположить, что расхождение якутского с древними тюркскими языками началось в IV–V вв., а окончательное отделение от языка орхоно-енисейских памятников датируется началом VIII в. [32]. Согласно расчетам А. Савельева и М. Робитс, якутская ветвь отделилась от пратюркского субстрата ~1500 лет назад [47]. Из современных тюркских языков как более близкие к якутскому рассматриваются “сибирские тюркские языки” (алтайский, хакасский, шорский, сарыг-югурский, тувинский, тофаларский) и киргизский [43–46]. По одной из более поздних лингвистических классификаций якутский язык, наряду с долганским, наиболее близок к подгруппе, включающей хакасский, тувинский, тофаларский и шорский языки [46].

Из нетюркских компонентов в якутском языке отмечается значительный вклад слов монгольского происхождения [30]. Кроме того, в языке народа саха присутствует большой пласт слов, не имеющих соответствий ни в каких современных языках [48], что позволило исследователям предположить существование неизвестного народа, оставившего заметный след в якутском языке. Эвенкийских слов, по мнению А.М. Певнова, специалиста в области документирования и сравнительно-исторического изучения тунгусо-маньчжурских языков, в якутском языке чрезвычайно мало, самодийские, кетские и юкагирские заимствования если и есть, то их и того меньше [48].

По вопросу о времени миграции тюркоязычных предков саха на север во мнениях историков и археологов имеются значительные расхождения. Г.В. Ксенофонов считал, что саха представляют собой народ смешанного происхождения, включивший в себя три волны тюркоязычных переселенцев. По его представлению, заселение предками народа саха бассейна р. Вилюй началось в конце I в. н. э., вторая волна переселилась на Вилюй и западную половину бассейна Лены из Приангарья начиная с VII–VIII вв. н. э.; наконец, последний этап переселения был вызван падением уйгурского ханства в середине IX в. и усилением монгольских племен, вытеснивших предков саха из прибайкальских степей [28]. “В эпоху возвышения монголов Чингисхана “саха”-якутов в Приангарском крае уже не было. Очевидно, якуты Тыгына переселились в пределы отдаленного Якутского округа незадолго до появления Чингисхана” [28]. А.П. Окладников предполагал два “решающих этапа” в расселении южных предков якутов на север: первый, начавшийся в раннем железном веке, заканчивается к X–XI вв., второй

этап относится к XV–XVI вв. [33]. По мнению археолога И.В. Константинова переселение предков саха с Прибайкалья произошло в XV в. в виде компактной группы, представлявшей вполне сложившуюся этническую общность [34]. А.И. Гоголев считает, что массовое переселение тюркоязычных южных предков саха на север произошло в начале II тыс. н. э. и документируется появлением в XIII в. поселений культуры “малых домов”, которую позднее сменила кулун-атахская археологическая культура XIV–XVI вв. [35]. На поселениях кулун-атахцев археологи в большом количестве находят кости крупного рогатого скота и лошадей. Однако археологические исследования последних лет показывают, что эпизодические проникновения скотоводческих групп на Олекму начались гораздо раньше – с III–IV вв. н. э. и в X–XVI вв. в бассейне Средней Лены существовала уже сложившаяся, адаптированная к местным условиям культура кочевников, успешно разводивших лошадей и крупный рогатый скот [38].

До сих пор в академической среде общепринятым является представление, что непосредственными южными тюркоязычными предками народа саха были прибайкальские курыканы [33, 34]. Впервые теория о расселении курыкан из Прибайкальской области на север, вниз по р. Лене и участие их в формировании якутской народности выдвинута А.П. Окладниковым [33]. Курыканы были самым дальним и самым северным из телеских племен, проживавших на окраине древнетюркских каганатов, отдельные упоминания о которых зафиксированы в древнетюркских и китайских летописях [33, 49]. С курыканами связывают курумчинскую культуру циркумбайкальского региона (V–XIV вв.), называемую иначе культурой “курумчинских кузнецов” из-за большого количества предметов железодельного производства, обнаруженных в их поселениях [33, 35, 49]. Помимо курумчинцев, как гипотетических южных предков народа саха позднее стали также рассматривать носителей усть-таькинской культуры Прибайкалья XII–XIV вв. [50, 51].

Долгое время среди исследователей господствовало сформированное историографией середины XIX в. мнение, что автохтонные племена, с которыми встретились южные предки якутов, были представлены предками современных юкагиров и тунгусов, хотя лингвистические данные указывают на слабое влияние эвенкийского и юкагирского языка на якутский [30–32, 48]. В настоящее время существуют иные точки зрения, согласно которым кроме указанных этносов наиболее древний аборигенный пласт в этногенезе якутов могли составлять прасамодийские и другие протоазиатские племена, этнонимы которых неизвестны [36, 38, 52]. Археолог А.Н. Алексеев считает, что в становление генофонда якутского народа значительный вклад был внесен древним

дотунгусским населением Якутии, отуреченным в конечном счете в результате миграции полиэтнических групп южных скотоводов [36, 38]. Исторические предания свидетельствуют о достаточном разнообразии аборигенного и мигрировавшего населения той эпохи [53].

Таким образом, при рассмотрении этногенеза народа саха специалистами в области гуманитарных наук недостаточно изученными являются вопросы о времени миграции тюркоязычных предков саха на север, количестве миграционных волн, соотношении пришлых и автохтонных элементов в генофонде якутов, идентификации племен, принимавших участие в сложении якутского народа и степени генетического родства с другими современными этносами Сибири. Наиболее перспективным подходом для решения некоторых из этих вопросов являются исследования в области этногеномики (популяционной геномики), позволяющие реконструировать генетическую историю этноса на основе изучения полиморфизма генома человека в различных популяциях.

#### ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ ГЕНОФОНДА ЯКУТОВ ПО ЛИНИЯМ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК И Y-ХРОМОСОМЫ

Пристальное внимание генетиков к истории якутского этноса было вызвано прежде всего уникальными особенностями генофонда, обнаруженными в 1997 г. английской исследовательницей Татьяной Зерджал [54]. Т. Зерджал впервые показано необычайно высокое содержание гаплогруппы N3 Y-хромосомы (86%) у якутов в небольшой выборке из 21 человека. В дальнейшем исследователями НИИ медицинской генетики (г. Томск) было обнаружено, что к гаплогруппе N3 относится 87% Y-хромосом мужчин из п. Чэриктэй Усть-Алданского улуса Центральной Якутии ( $n = 46$ ) [18, 19]. Доминирование гаплогруппы N3 для якутского этноса в целом было установлено в работах Б. Пакендорф (Лейпциг, Германия) и соавт. [21, 23] на расширенной выборке якутов из девяти улусов РС(Я) ( $n = 184$ ). Одновременно с Б. Пакендорф нами был проведен анализ линий Y-хромосомы коренных жителей 16 улусов РС(Я) ( $n = 216$ ), который подтвердил высокие частоты гаплогруппы N3 в центральной (86%), вилюйской (93%) и северной (71%) этногеографических группах [5]. В филогенетической сети N3-линий, построенной на основе анализа шести STR-маркеров (DYS19-DYS388-DYS390-DYS391-DYS392-DYS393), выделялся доминантный гаплотип 14-12-23-11-16-14 (Ht1), частота которого в изученной нами выборке составила 64%, что позволило распространить утверждение об эффекте основателя у мужчин п. Чэриктэй Усть-Алданского улуса, впервые высказанное В.А. Степановым в 2002 г.,

на структуру этноса в целом [5]. Частоты гаплогрупп Y-хромосомы в различных этногеографических группах якутов в сравнении с данными двух других групп ученых приведены в табл. 1 [5, 8, 20, 23]. Помимо доминирующей N3, в мужском генофонде якутов были обнаружены в меньшем количестве и другие азиатские гаплогруппы: N2 (характерна для самодийцев Западной Сибири – нганасан, ненцев, энцев), C3\* и C3c (распространены в большей степени среди тунгусоязычных народов) и C3d (обнаружена у народов Южной Сибири – бурятов, телеутов, тувинцев, сойотов, монголов, хамниган). Линии преимущественно европейского происхождения R1a1\*, R1a1a7, R1b1b2, J и I1 выявлены у якутов в небольшом количестве: их общая доля составляет от 2 до 11% в различных популяционных выборках [5, 8, 20, 23] (табл. 1).

Параллельно с изучением линий Y-хромосомы нами были проведены исследования митохондриального генофонда у коренных жителей 25 улусов РС(Я) ( $n = 191$ ) и впервые обнаружено, что спектр линий мтДНК якутов имеет достаточно высокие показатели генетического разнообразия [1]. Установлено, что более 90% мт-линий якутов относятся к азиатским гаплогруппам A, B, C, D, F, G, M7, M13a, Y, Z, остальные – к европейским кластерам H, HV1, J, T, U, W [1]. Характерной особенностью пула митохондриальной ДНК якутов является преобладание двух гаплогрупп – C и D, широко распространенных в Северной Азии. При этом ~18% якутов из центральной и вилюйской группы улусов являются потомками женщины с линией D5a2a2 [1, 5, 8]. Суммарная частота линий митохондриального генофонда якутов, совпадающих с мт-линиями тюркоязычных народов Средней Азии (казахи, киргизы и уйгуры) и монголов, составила 56%, что указывает на существование общего генетического субстрата, сложившегося до формирования этих этносов [1]. При сравнении с соседними палеоазиатскими народами северо-востока Сибири (чукчи, коряки, ительмены) было установлено, что всего три линии гаплогрупп A8 и C у якутов суммарной частотой 9% пересекаются с линиями митохондриального генофонда коряков. Таким образом, сравнительный анализ показал близкое генетическое родство саха с народами Средней Азии и монголами и дистанцированность от соседних народов Чукотки и Камчатки. При изучении генетических взаимоотношений якутов с народами Средней Азии, Южной Сибири и Камчатки Б. Пакендорф и соавт. пришли к тем же выводам [22, 23]. Частоты гаплогрупп мтДНК в трех этногеографических группах якутов в сравнении с данными двух других групп ученых приведены в табл. 2 [5, 8, 19, 20, 23].

Субпопуляции якутов отличаются низкой генетической гетерогенностью: хотя северные якуты в большей степени отличаются от централь-

**Таблица 1.** Частоты гаплогрупп Y-хромосомы у центральных (ЦЯ), вилюйских (ВЯ) и северных (СЯ) якутов

Гаплогруппа	Популяции							
	ЦЯ <sup>1</sup> <i>n</i> = 109	ЦЯ <sup>2</sup> <i>n</i> = 49	ЦЯ <sup>3</sup> <i>n</i> = 47	ЦЯ <sup>4</sup> <i>n</i> = 92	ВЯ <sup>5</sup> <i>n</i> = 56	ВЯ <sup>6</sup> <i>n</i> = 58	СЯ <sup>7</sup> <i>n</i> = 32	СЯ <sup>8</sup> <i>n</i> = 66
N3 (TAT)	89	93.9	93.6	85.9	98.2	93.1	87.5	71.2
N2 (P43)	2.8	2.0	0	2.2	0	0	0	10.6
N* (DYF155S2)	0.9	0	0	0	0	0	0	0
C3* (M217)	1.8	2.0	2.1	0	0	0	3.1	3.0
C3c (M48)	1.8	0	0	0	0	3.4	3.1	6.1
C3d (M407)	0	0	0	1.1	0	0	0	4.5
Q (P36)	0	0	0	0	0	0	3.1	0
I1 (M253)	0	0	0	2.2	0	1.7	0	0
J (12f2)	0	0	0	0	1.8	0	0	0
R1a1* (M198)	3.7	2.0	4.3	4.3	0	1.7	3.1	4.5
R1a1a7 (M458)	0	0	0	2.2	0	0	0	0
R1b1b2 (M269)	0	0	0	2.2	0	0	0	0

Примечание. <sup>1</sup> Центральные якуты Усть-Алданского улуса (п. Бээди, п. Чэриктэй, п. Дупсээ) [20]; <sup>2</sup> центральные якуты “акающие”; <sup>3</sup> центральные якуты “окающие”, пробы собраны в Намском, Таттинском, Чурапчинском, Мегино-Кангаласском, Алданском улусах [23]; <sup>4</sup> центральные якуты Амгинского, Горного, Кобяйского, Мегино-Кангаласского, Намского, Таттинского, Усть-Алданского, Хангаласского, Чурапчинского улусов [5, 8]; <sup>5</sup> вилюйские якуты Сунтарского, Нюрбинского, Вилюйского улусов [23]; <sup>6</sup> вилюйские якуты Верхневилуйского, Вилюйского, Мирнинского, Нюрбинского, Сунтарского улусов [5, 8]; <sup>7</sup> северные якуты Верхоянского улуса [23]; <sup>8</sup> северные якуты Абыйского, Верхнеколымского, Верхоянского, Жиганского, Момского, Среднеколымского, Томпонского улусов [5, 8]. Гаплогруппы азиатского происхождения выделены серым цветом. Обозначения ветвей гаплогруппы N соответствуют филогенетической номенклатуре, использованной в работе Karmin et al., 2015 [11], которая была далее преобразована в Plumäe et al., 2016 [12].

ных и вилюйских, степень межпопуляционных различий между тремя группами саха по Y-хромосоме составляет 4.1%, по мтДНК всего 0.5% [9].

На следующем этапе с целью решения вопроса о соотношении южного и автохтонного компонентов анализ линий мтДНК был проведен на расширенных выборках якутов (*n* = 423) в сравнении с соседними этносами (эвенками, эвенками и юкагирами) [5, 8]. По спектру гаплогрупп мтДНК якуты оказались более близки к эвенкам и отдалены от юкагиров и эвенов [5, 8]. С помощью более глубокого филогенетического анализа было установлено, что в отличие от автохтонов более характерными для якутов являются азиатские субкластеры C4a1c, C4a2, C5b1b, D5a2a2, G2a5, Z3, а также большее разнообразие линий европейского и ближневосточного происхождения [8]. Доля типичных для якутов субкластеров мтДНК (D5a2a2, C4a1c, C4a2, C5b1b, G2a, Z3, H20a, HV1a1a, U4d2) у центральных и вилюйских якутов составляет ~48% [8], у северных якутов, генетически более близких к автохтонам, ~38%.

К линиям, более характерным для локальных популяций, относятся C4b3a, C4b7, C5d1, Z1a, распространенные у юкагиров и эвенов, а также “корякские” A8, C4b2, C5a2a, G1b и “эвенкийские”

C4b9. К автохтонным также, очевидно, относятся линии R1b, D4b1c, A4b, C4b\*, выявленные у семи индивидов из древних погребений Якутии, датированных временем от 16.9 до 3.1 тыс. лет назад: Хайыргас, Онньес, Кердюген, Каменка, Помазкино [4, 56]. Все эти линии были, по-видимому, привнесены в митохондриальный генофонд якутского этноса в результате браков мужчин-саха с женщинами из соседних племен на территории Якутии.

Таким образом, в генетических исследованиях было установлено, что отличительной особенностью якутской популяции являются низкое разнообразие линий Y-хромосомы и высокое разнообразие линий митохондриальной ДНК. Как в мужском, так и в женском генофонде якутов наблюдаются эффекты основателя. Сравнительный анализ линий мтДНК якутов с линиями южных народов (казахи, киргизы, уйгуры, монголы) и территориально соседних этносов (эвенки, эвены, юкагиры, чукчи, коряки, ительмены) позволил нам предположить, что около половины мт-линий прибыли на современную территорию проживания народа саха вместе с южными предками, а другая половина имеет автохтонное происхождение.

**Таблица 2.** Частоты гаплогрупп митохондриальной ДНК у центральных (ЦЯ), вилюйских (ВЯ) и северных (СЯ) якутов

Гаплогруппа	Популяции							
	ЦЯ <sup>1</sup> n = 83	ЦЯ <sup>2</sup> n = 45	ЦЯ <sup>3</sup> n = 46	ЦЯ <sup>4</sup> n = 164	ВЯ <sup>5</sup> n = 32	ВЯ <sup>6</sup> n = 111	СЯ <sup>7</sup> n = 55	СЯ <sup>8</sup> n = 148
A	1.2	2.2	2.2	2.4	7.3	3.6	0	0
B	3.6	4.4	4.3	0.6	3.6	0	9.4	2.7
C	48.2	40	37	45.7	32.7	36.0	46.9	40.5
D	32.5	33.4	32.6	33.0	34.5	29.7	15.7	25.7
F	3.6	4.4	8.7	3.7	3.6	5.4	15.6	4.7
G	3.6	4.4	2.2	4.9	5.5	3.6	6.3	6.8
M	1.2	2.2	0	1.8	1.8	2.7	0	8.2
Y	0	4.4	0	1.2	0	2.7	0	0
Z	0	0	2.2	0	0	0	0	2.7
R1b	0	0	2.2	0	0	0	0	1.4
H	2.4	2.2	0	3.7	3.6	6.3	3.1	1.4
HV1	0	0	0	0	0	1.8	0	2.0
T	0	0	2.2	0.6	1.8	3.6	0	0
J	1.2	2.2	0	0.6	0	2.7	0	1.4
U	2.4	0	4.3	0.6	0	0.9	0	0.7
W	0	0	2.2	1.2	1.8	0.9	0	2.0
Н.о.	0	0	0	0	3.6	0	3.1	0

Примечание. <sup>1</sup> Якуты Усть-Алданского улуса (п. Чэриктэй) [19]; <sup>2</sup> центральные якуты “окающие”; <sup>3</sup> центральные якуты “акающие”, пробы собраны в Намском, Таттинском, Чурапчинском, Мегино-Кангаласском, Алданском улусах [23]; <sup>4</sup> центральные якуты Амгинского, Горного, Кобяйского, Мегино-Кангаласского, Намского, Таттинского, Усть-Алданского, Хангаласского, Чурапчинского улусов [5, 8]; <sup>5</sup> вилюйские якуты Сунтарского, Нюрбинского, Вилюйского улусов [23]; <sup>6</sup> вилюйские якуты Верхневилюйского, Вилюйского, Мирнинского, Нюрбинского, Сунтарского улусов [5, 8]; <sup>7</sup> северные якуты Верхоянского улуса [23]; <sup>8</sup> северные якуты Абыйского, Верхнеколымского, Верхоянского, Жиганского, Момского, Среднеколымского, Томпонского улусов [5, 8]. Гаплогруппы азиатского происхождения выделены серым цветом. Н.о. – гаплогруппы не определены. При обозначении гаплогрупп мтДНК использована номенклатура согласно <http://www.phyloftree.org/> и Van Oven, Kayser, 2009 [55].

Низкий уровень разнообразия линий Y-хромосомы, как правило, наблюдается у народов, имеющих небольшую численность [57]. Высокая частота одной N3-гаплогруппы (в среднем 83%) и, более того, одного N3-гаплотипа (Ht1, 64%) в мужском генофонде якутов – необычное явление для достаточно многочисленного этноса. По данным Всероссийской переписи 2010 г. численность якутов в РФ составляет 478085 человек [58]. К генетическим процессам, которые могут определять высокие частоты отдельных гаплотипов Y-хромосомы и мтДНК в генофонде этноса, помимо эффекта основателя также относят эффект бутылочного горлышка, который подразумевает значительное снижение численности популяции из-за неблагоприятных условий (эпидемии, войны, голод) с уменьшением уровня генетического разнообразия и преимущественного “выживания” некоторых гаплотипов. Многочисленные эпидемии и войны в истории народа саха [38, 59], таким образом, могли даже способствовать увеличению доли

N3-хромосом в генофонде популяции за счет эффекта генетического дрейфа в том случае, если в исходной малочисленной предковой популяции доминировали мужчины с гаплогруппой N3<sup>1</sup>.

Кроме этих факторов, не исключено также влияние естественного отбора отдельных линий Y-хромосомы, обуславливающих генетическое преимущество для выживания мужчин в условиях холодного климата. В пользу данного предположения свидетельствует преимущественное распространение носителей гаплогруппы N3 в северных широтах Евразийского континента [3]. Однако принимая во внимание то, что в других северных популяциях, соседних с якутами (эвенки, эвены, юкагиры, долганы), частота гаплогруппы N3 не достигает столь высоких значений (26–33%) [5, 8], мы считаем, что этот фактор не мог быть определяющим.

<sup>1</sup> Численность якутов по данным ясачной переписи составляла в конце XVII в. 28.5 тыс. человек [60].

По нашему мнению, на формирование особенностей структуры современного генофонда якутов в большей степени повлияли брачные традиции народа саха: патрилинейность якутских кланов, строгая экзогамия (выбор жены из другого рода, из отдаленного региона) и ограничения в притоке линий в мужской генофонд популяции от соседних этносов. В этнографических исследованиях отмечалось, что мужчины-якуты часто и охотно женились на тунгусках, в то время как женщины-саха редко выходили замуж за тунгусов [61]. Эта же тенденция сохраняется по настоящее время: в исследованиях А.Н. Кучер и А.Л. Даниловой при анализе структуры браков в трех улусах со смешанным национальным составом было отмечено, что мужчины-якуты чаще вступают в межнациональные браки с представителями других коренных национальностей, чем женщины-якутки [62, 63]. Проведенный нами сравнительный анализ показал, что с тунгусязычными эвенками и эвенами совпадают от 51% мт-линий у центральных якутов до 66% у северных [5], тогда как в мужском генофонде саха наблюдается низкое содержание линий, характерных для тунгусов (С\* и С3с), — от 2% у центральных якутов до 9% у северных [5, 8]. Поток генов от тунгусов к якутам, по видимому, происходил главным образом через заключение смешанных браков мужчин-саха с женщинами-тунгусками, тогда как в направлении от якутов к тунгусам перенос генов через женщин был незначителен из-за строгих национальных брачных традиций, ограничивающих браки женщин-саха с мужчинами из других этносов [61, 62].

Низкая частота линий Y-хромосомы западно-евразийского происхождения в мужском генофонде якутов также указывает на незначительный процент браков между женщинами-саха и европейцами. Общее содержание линий Y-хромосомы, имеющих недавнее, в рамках эволюционного времени, происхождение вследствие метисации с европейцами (I1, R1b1b2, R1a1a7), в изученной нами выборке составляет всего 3%. В генетико-демографических исследованиях населения административных центров пяти улусов РС(Я), проведенных А.Н. Кучер и соавт., отмечается, что по настоящее время межнациональные браки в большинстве случаев заключаются между представителями коренных национальностей Республики Саха (Якутия) — якутами, эвенами и эвенками, тогда как браки между пришлым и коренным населением не нашли широкого распространения [63, 64].

Следует также отметить значительный разрыв в показателях смертности мужчин и женщин-саха, который, по-видимому, был характерен для населения Якутии до начала XX в. По данным переписи 1926 г. смертность женщин в возрастных группах от 15–50 лет была в 1.5–2 раза выше, чем у мужчин, в возрасте от 20–29 лет — более чем в 2 раза [65] соответственно было больше мужчин,

которые женились в течение жизни несколько раз. Возможно, этот фактор в какой-то степени внес вклад в значимые различия по разнообразию линий Y-хромосомы и мтДНК в генофонде народа саха.

Помимо вышеперечисленных, нельзя также исключить вклад такого фактора, как многоженство, хотя этнографами отмечалось, что “...Фактически многоженство было доступно очень немногим и никогда не могло стать преобладающей у якутов формой брака” вследствие высоты калыма [61]. На основании изучения архивных материалов установлено, что в XIX–начале XX в. у якутов преобладала моногамная форма семьи. Для внутреннего строя якутской семьи было характерно господство патриархальных традиций, регулировавших весь уклад семейной жизни [66].

### ПРОИСХОЖДЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ N3-ЛИНИЙ (M46, TAT) Y-ХРОМОСОМЫ ЯКУТОВ

Происхождение специфических N3-линий Y-хромосомы якутов является наиболее интригующим вопросом в изучении генетической истории народа саха. На начальном этапе решение данного вопроса было крайне затруднительно, так как гаплогруппа N3 встречается по всей территории Северной Евразии, в том числе во всех популяциях Якутии [3, 5, 57, 67–69], в Средней Азии [57, 70], Скандинавии, Северном Китае, Японии [3] и на Кавказе [71, 72].

В ранних исследованиях изучение происхождения N3-линий якутов проводилось главным образом путем анализа филогенетических сетей микросателлитных STR-гаплотипов. К недостаткам данного подхода относится то, что структура филогенетической сети может сильно варьировать в зависимости от использованных для построения сети популяционных выборок и наборов STR-маркеров, что затрудняет определение наиболее близких предковых гаплотипов по отношению к “якутским”. Определение времени происхождения наименее древнего общего предка (TMRCA — time of the most recent common ancestor), в свою очередь, зависит от правильного выбора предкового гаплотипа и метода определения скорости возникновения мутаций в использованных STR-локусах. Структура сети также усложняется гомоплазией и обратными мутациями, однако этот подход до сих пор является актуальным в силу своей относительной простоты и дешевизны, а также широкого использования STR-наборов в судебной медицине.

На основании сравнения STR-линий якутов с восточными эвенками, бурятами и тувинцами учеными НИИ медицинской генетики (г. Томск) было сделано заключение, что N3-линии якутов

наиболее близки к таковым у восточных эвенков [18, 19]. Авторы предположили, что мужской генофонд якутов сложился на базе автохтонного компонента, а тюркский язык был приобретен в результате культурного доминирования тюркоязычной элиты, не оставившей значительного следа в пуле Y-хромосом. Позднее, на основе более глубокого филогенетического анализа N3-линий из 18 популяций Северной и Восточной Европы, Чукотки, Западной и Южной Сибири, и оценки времени генерации N3-линий в якутской популяции в  $4.45 \pm 1.96$  тыс. лет В.Н. Харьковым и др. было высказано мнение, что эти линии были приобретены якутами опосредованно через эвенков от еще более древних автохтонных племен (возможно, протоюкагиров или других палеоазиатских племен), проживавших ранее на территории современной Якутии и ассимилированных тунгусами [20]. Необычайно высокую частоту N3-линий в мужском генофонде якутов (89%), в отличие от эвенков (15–40%), авторы объяснили значительным увеличением численности якутов за последние века, которое привело к случайному резкому увеличению частот отдельных линий с преобладанием гаплотипа-основателя в популяции. Таким образом, при интерпретации полученных данных исследователи Института медицинской генетики (г. Томск) склонились к версии автохтонного происхождения N3-линий якутов и незначительности вклада южного тюркского компонента в генофонд современных якутов.

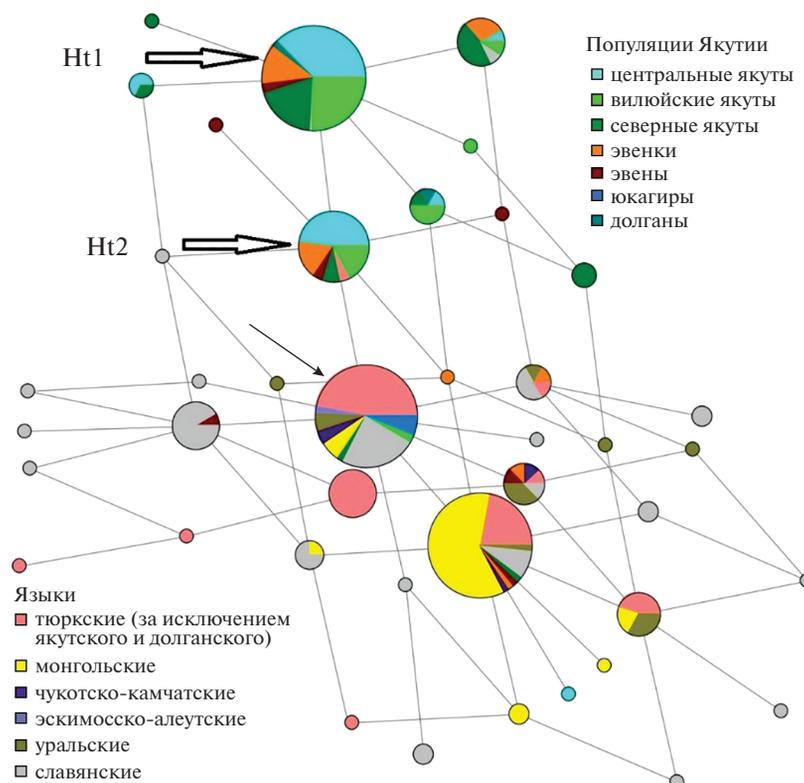
В работе Б. Пакендорф и соавт. было установлено, что в филогенетической сети STR-гаплотипов русских, латвийцев, финнов, саами, хантов, манси, карелов, марийцев, бурятов, юкагиров, западных эвенков и тувинцев N3-линии якутов образуют отдельную ветвь и перекрываются только с линиями эвенков [21, 23]. Время генерации микросателлитного разнообразия N3-гаплотипов якутов по оценке Б. Пакендорф и соавт. –  $880 \pm 440$  лет, что по утверждению авторов, соответствовало гипотезе о вытеснении якутов на север в XII в. из региона оз. Байкал под давлением монголов. С точки зрения Б. Пакендорф и соавт. полученные результаты свидетельствовали о южном происхождении якутского этноса и незначительном смешении пришлых тюркоязычных племен с автохтонными [23]. Авторы отметили загадочность происхождения N3-линий якутов, не похожих на N3-линии других исследованных ими популяций за исключением эвенков.

В наших исследованиях N3-линии якутов были рассмотрены в сравнении с 27 популяциями Южной и Западной Сибири, Северной и Восточной Европы, Чукотки и Камчатки [8]. В структуре расширенной филогенетической сети N3-линии якутов формировали отдельную ветвь, что соответствовало данным других авторов, но результаты филогенетического анализа получили другую ин-

терпретацию. Структура “якутской” N3-ветви, в которой доминировали два гаплотипа (более древний Ht2 и более “молодой” Ht1, отличающийся от первого мутацией по маркеру DYS392), по нашему мнению, свидетельствовала о двух последовательных экспансиях численности якутской популяции (рис. 1). Дивергенция более древнего гаплотипа Ht2, рассчитанная нами по скорости мутирования STR-маркеров, началась ~1600 лет назад, а гаплотипа Ht1 ~900 лет назад [8]. При этом если в IV в. в предковом племени, очевидно, доминировали мужчины с гаплотипом Ht2, то в популяции якутов, увеличение численности которой началось ~900 лет назад, существовали носители обоих доминантных гаплотипов (Ht1 и Ht2). В отличие от В.Н. Харькова и соавт. [20] мы считаем более вероятным возникновение “якутской” N3-ветви в Восточно-Саянском регионе, чем на территории современной Якутии, так как близкие к якутским STR-гаплотипы присутствуют у народов, проживающих к западу от Байкала, – тувинцев, тофаларов и сойотов.

N3-линии якутов действительно перекрываются с N3-линиями эвенков, что было показано в параллельных работах двух других групп исследователей [18–20, 23], и кроме того с N3-линиями тунгусоязычных эвенков и тюркоязычных долган [8], но основываясь на данных этнографов и на изучении брачных традиций, мы не можем согласиться с утверждением, что “мужской генофонд якутов сложился на базе локального (эвенкийского) компонента” [18–20] и считаем более вероятным обратный процесс – перенос генов от якутов к эвенкам, эвенкам и долганам.

Более поздние исследования позволили в значительной степени уточнить структуру филогенетического дерева Y-хромосомы [11, 12] и в какой-то мере прояснить вопрос о происхождении N3-линий якутов. На основе анализа полных последовательностей Y-хромосом у 94 индивидов из различных популяций Евразии в гаплогруппе N3 было выделено три ветви, каждая из которых имеет специфическое территориальное распределение: N3a имеет наиболее широкое распространение в Северной Евразии – от Скандинавии до Чукотки, N3b – в Южной Сибири и Монголии, N3c – в Японии, Китае и других регионах Восточной Азии. В свою очередь N3a разделяется на шесть субгаплогрупп (N3a1–N3a6), возникших в период ~3.3–8.3 тыс. лет назад. Субгаплогруппа N3a1 встречается у народов Волго-Уральского региона, в Южной и Западной Сибири, N3a2 – в Якутии, Южной и Западной Сибири, Средней Азии и на Кавказе, N3a3 и N3a4 – в Северо-Восточной Европе, Волго-Уральском регионе и Западной Сибири, N3a5 – на Чукотке, Камчатке, в Южной Сибири, Монголии, Средней Азии и на Кавказе, N3a6 – на Дальнем Востоке (у нанайцев).



**Рис. 1.** Филогенетическая сеть N3-гаплотипов Y-хромосомы народов Якутии и соседних регионов на основе 5 STR-маркеров [8]. Кругами обозначены микросателлитные гаплотипы, площадь круга и секторов внутри круга пропорциональна частоте гаплотипа. Доминантные “якутские” гаплотипы Ht1 и Ht2 обозначены стрелками. Черной стрелкой указан корневой гаплотип (Root).

Филогеографический анализ структуры и распространения ветвей гаплогруппы N3 показал, что линии якутов относятся к субгаплогруппе N3a2 и не являются эволюционными производными от линий, доминирующих у монголов и бурятов (N3a5-F4205), чукчей, эскимосов и коряков (N3a5-B202), нанайцев (N3a6), японцев (N3c), а также отличны от N3-линий народов Волго-Уральского региона, Западной Сибири, Восточной Европы и Скандинавии (N3a1, N3a3 и N3a4).

Субгаплогруппа N3a2, в состав которой входят линии якутов, отделилась от кластера N3a2'6 ~7.1 тыс. лет назад [11, 12]. Самая древняя ее ветвь N3a2-B508, возраст которой ~4.5 тыс. лет, включает линии индивидов из Ливанской Республики и Китая. N3a2-линии были обнаружены также у отдельных индивидов из Турции и Королевства Бутан, расположенного между Индией и КНР [73]. Единичные N3a2-линии были выявлены в популяциях сибирских татар, тувинцев, шорцев, монголов, казахов, узбеков, караногайцев, каракапачков, хантов и манси [12]. Таким образом, эта субгаплогруппа, возникшая в эпоху неолита, имеет очень широкий ареал распространения, включает представителей народов разных языковых семей и помимо Сибири, Средней Азии и

Кавказа встречается также на Ближнем Востоке и в Южной Азии.

“Якутская” ветвь субгаплогруппы N3a2 определяется маркерами M1982, M1993, M1987, M2032, M2077, M2103, M2108, M2011, M2122 и имеет относительно небольшой возраст. Время дивергенции этой ветви, обозначенной как N3a2-M1982, по данным полного секвенирования Y-хромосом четырех мужчин составило  $\sim 1.7 \pm 0.8$  тыс. лет [11, 12], что вполне соответствовало нашим расчетам, проведенным до этого на основе анализа STR-локусов ( $\sim 1.6 \pm 0.6$  тыс. лет) [5, 8]. По последним данным, доступным в настоящее время из базы <https://www.yfull.com/tree/>, “якутская” N3a2-1982-ветвь сформировалась ~2300 лет назад (95% ДИ 3000–1500 лет назад). При этом время возникновения наименее древнего общего предка, рассчитанное на основе полного секвенирования Y-хромосом 20 мужчин-саха, составляет ~1.4 тыс. лет (95% ДИ 2100–850 лет назад), что в пределах доверительного интервала соответствует полученным нами ранее значениям. Эти генетические датировки, очевидно, будут скорректированы в ближайшем будущем с увеличением количества полных секвенсов N3-M1982-хромосом, что позволит уменьшить границы доверительного интервала и определить

TMRCА с большей точностью. В период увеличения численности якутской популяции (~1.4 тыс. лет назад) N3a2-M1982-ветвь делится на две крупные подветви, определяемые мутациями M1932 и M1991. Судя по комбинациям STR у мужчин саха, опубликованным в базе данных <https://www.yfull.com/tree/>, более древний гаплотип Ht2 соотносится с подветвью M1932, а гаплотип Ht1 — с подветвью M1991. Дальнейшая дивергенция этих подветвей происходит начиная с XI в., при этом значимое вторичное увеличение численности популяции якутов с наибольшей вероятностью приходится на период 450–500 лет назад.

Таким образом, время дивергенции N3-линий якутов, рассчитанное на основе микросателлитного разнообразия STR-гаплотипов и по доступным в настоящее время данным полного секвенирования N3a2-1982-хромосом, указывает на IV–VII вв. как наиболее вероятный период первичной экспансии предковой популяции, за которым последовала вторичная экспансия в период с XI по XX в. с наиболее усиленным ростом численности якутов начиная с XVI в.

Любопытно то, что дата первой экспансии численности популяции (IV–VII вв.) соответствует времени расхождения якутского языка с древними тюркскими языками (в IV–V вв.) по Г.Г. Левину [32], А. Савельеву и М. Робитс [47] и археологическим данным, указывающим на появление скотоводческих групп в Южной Якутии в III–IV вв. [38]. Вторая дата (~900 лет назад) совпадает с предполагаемым временем миграции последней, наиболее обширной волны тюркоязычных предков якутов в бассейн Средней Лены по Г.В. Ксенофонову [28]. Основываясь на времени дивергенции гаплотипов Ht2 и Ht1, связанных с последовательными увеличениями численности популяции, нами было выдвинуто предположение, что южные предки якутов могли перекачаться на Север несколькими волнами, первая из которых произошла в период распада империи хуннов, а вторая — чуть раньше создания империи Чингисхана [14]. Косвенным подтверждением раннего обособления и переселения южных предков якутов на Север до возникновения Монгольской империи может служить тот факт, что у якутов не обнаружена так называемая “С3-линия чингизидов”, распространенная на территориях, находившихся под властью Чингисхана [8]. Следует также отметить, что по глоттохронологическим датировкам язык предков саха сформировался примерно 1500–1800 лет назад [32, 45, 47], а все сохранившееся разнообразие монгольской группы языков сложилось всего около 1000 лет назад [46] и соответственно язык саха намного древнее любого из известных современных монгольских языков. Присутствие монгольского компонента в якутском языке, таким образом, может объясняться не

столько поздними заимствованиями, сколько намного более древним его происхождением.

### ПРОИСХОЖДЕНИЕ ЗАПАДНОЕВРАЗИЙСКИХ ЛИНИЙ В ГЕНОФОНДЕ ЯКУТОВ

Проведенный нами анализ спектра линий Y-хромосомы показал, что западноевразийский компонент генофонда якутов представлен гаплогруппами I1, R1a1\*, R1a1a7, R1b1b2 [5, 8] (табл. 1). Кроме них, единичные линии гаплогруппы J были обнаружены у вилюйских якутов в исследованиях Б. Пакендорф и соавт. [23]. Общее содержание линий Y-хромосомы западноевразийского происхождения для объединенной выборки численностью 509 мужчин составляет в среднем 7% (табл. 1) [5, 8, 20, 23].

Гаплогруппа I1 предположительно возникла в Северо-Западной Европе, распространилась с максимальной частотой в странах Скандинавии и далее проникла на территории восточных славян [74]. Гаплогруппа R1b1b2 более характерна для Западной Европы и Ближнего Востока [75]. Учитывая тот факт, что у славян гаплогруппы I1 и R1b1b2 встречаются повсеместно с умеренными частотами [69, 74, 76], можно утверждать, что происхождение этих линий в генофонде якутов связано с процессами метисации с русскими и, возможно, другими восточноевропейскими этносами (украинцы, белорусы, татары), заселившими территорию Якутии начиная со времени вхождения в состав Российской империи в XVII в.

Гаплогруппа R1a1a7 распространена главным образом в популяциях Центральной, Восточной и Северной Европы [69, 77, 78]. Анализ разнообразия микросателлитов гаплогруппы R1a1a7 показал наибольшее значение в популяции поляков, что предполагает возникновение данной гаплогруппы на территории современной Польши [77]. Линии гаплогруппы R1a1a7 обнаружены нами у двух центральных и одного вилюйского якута. Происхождение этих линий в генофонде якутов, возможно, связано с событиями переселения в Якутию ссыльных поляков [79].

Что касается линии R1a1\*, которая встречается с небольшими частотами во всех изученных субпопуляциях якутов, и гаплогруппы J, обнаруженной помимо якутов у долган и эвенов, предполагается более древнее происхождение этих линий из южных регионов Алтае-Саянского нагорья. Линии R1a1\* Y-хромосомы широко распространены в популяциях Южной Сибири и Монголии — у алтайцев, хакасов, шорцев, сойотов, тувинцев, тофаларов, бурятов, уйгуров, монголов [57, 67–69], гаплогруппа J встречается у алтайцев-кижи, телеутов, уйгуров, монголов, казахов, узбеков, тувинцев [57, 67–69]. Присутствие

этих линий в генофонде народов Южной Сибири и Монголии объясняется существованием древнего потока генов с запада на восток по степному поясу Евразии. Анализ ДНК древних популяций указывает на то, что в бронзовом и железном веках европеоиды проживали в Южной Сибири, в том числе на Алтае [80–82], а индоевропейская миграция достигала даже Северо-Восточной Монголии [83].

Таким образом, содержание западноевразийских линий Y-хромосомы, имеющих недавнее, в рамках эволюционного времени, происхождение со времени вхождения территории Якутии в состав Российской империи в XVII в. (I1, R1b1b2, R1a1a7), в изученной нами выборке составляет всего 3%. Доля линий Y-хромосомы древнего европейского происхождения (R1a1\*, J), очевидно мигрировавших из Южной Сибири вместе с южными предками якутов, в среднем ~4%.

*Анализ мтДНК* показал, что западноевразийский компонент митохондриального генофонда якутов представлен единичными линиями гаплогрупп H\*, H1\*, H1a, H20a, U4d2, U5b1b1a, HV1a1a, J1c5, T2, W суммарным содержанием 9% от общей выборки ( $n = 423$ ) [5, 8]. Источником большинства этих митохондриальных линий (H\*, H1\*, H1a, U5b1b1a, T2, W) были, по-видимому, русские и, возможно, другие восточноевропейские этносы, так как они распространены у восточных славян и народов Волго-Уральского региона [84–87]. Суммарная частота этих линий у якутов составляет 6%. Из исторических данных известно, что численность женщин русской национальности в Якутии в XVII–XVIII вв. была крайне низкой [88]. Русское население в Якутии в XVII в. составляли главным образом мужчины, которые брали в жены местных женщин. Только с конца XVIII в. началось более массовое переселение в Якутскую губернию семей крестьян-земледельцев и почтовых работников, обслуживающих ямщицкие тракты [89]. Численность русского населения росла до XX в. очень медленно: по данным Первой всеобщей переписи Российской империи 1897 г., русские Якутской области составляли 30807 человек, или 11.4% от общей численности населения [90].

Меньшая часть линий митохондриального генофонда якутов (H20a, U4d2, HV1a1a, J1c5) имеет, по-видимому, более древнее происхождение, не связанное с переселением русских женщин на территорию Якутии начиная с XVIII в. Гаплогруппа J мтДНК была обнаружена в останках из якутского погребения начала XVII в. [91], задолго до миграций семей русских крестьян в Якутию в XVIII в. [89]. Происхождение линий H20a и HV1a1a у якутов также предполагает поток генов не от русских, потому что эти гаплогруппы редки (H20a) или даже отсутствуют (HV1a1a) у них [84,

85, 92–94], но распространены у южносибирских народов, а также на Кавказе, Ближнем и Среднем Востоке [94–97]. Кроме того, ГВСI-линии H20a и HV1a1a якутов в точности совпадают с гаплотипами бурят из Республики Бурятия [95]. Линия U4d2, обнаруженная нами у одного вилюйского якута, возможно, имеет западносибирское происхождение, так как U4d2-линии в большей степени характерны для народов Западной Сибири и данная ГВСI-линия (16189–16356) выявлена у нганасан и манси [98, 99]. Соответственно, общая доля митохондриальных линий древнего западноевразийского происхождения (H20a, U4d2, HV1a1a, J1c5) в генофонде якутов составляет всего ~3%.

#### СТРУКТУРА ГЕНОМА ЯКУТОВ ПО ДАННЫМ ПОЛНОГЕНОМНОГО АНАЛИЗА

Полногеномный анализ более чем 600 тыс. SNPs у 25 якутов в числе 938 человек из различных этнических групп Европы, Азии, Африки и Америки впервые был проведен в работе J.Z. Li и соавт. (2008) [100]. Результаты первого полногеномного исследования показали преобладание азиатского (>90%) и низкое содержание европейского компонента (<10%) в геноме якутов, что полностью коррелировало с данными, полученными ранее при изучении спектра линий Y-хромосомы и мтДНК [1, 5, 18–20, 23].

В 2010 г. в исследованиях генома древнего палеоэскимоса из Гренландии возрастом ~4000 лет с целью поиска генетически близких к нему индивидов из современных популяций Евразии был осуществлен анализ структуры генома других народов Якутии – эвенков, долган и юкагиров [6]. При этом было отмечено генетическое сходство саха с эвенками и глубокие отличия якутов от народов крайнего Северо-Востока Евразии (чукчей и коряков), что также коррелировало с результатами исследовательских работ, осуществленных ранее с применением гаплоидных генетических систем [1, 5, 23].

Далее для более детального изучения генетической истории заселения северо-востока Евразии нами был проведен полногеномный анализ 758 человек из 55 популяций [8]. Помимо 40 новых образцов из популяций Якутии, Южной и Западной Сибири, в выборку были включены опубликованные к тому времени данные по популяциям Европы, Азии и Америки из работы D. Li et al. (2008) [100]. При изучении генетических взаимоотношений между народами Якутии и соседних регионов были использованы РС-анализ и алгоритм ADMIXTURE, который дает количественные оценки различных генетических компонентов при определении происхождения от предполагаемого числа  $K$  предковых популяций. Установлено, что главной особенностью генома якутов является доминирование центрально-сибирского компо-

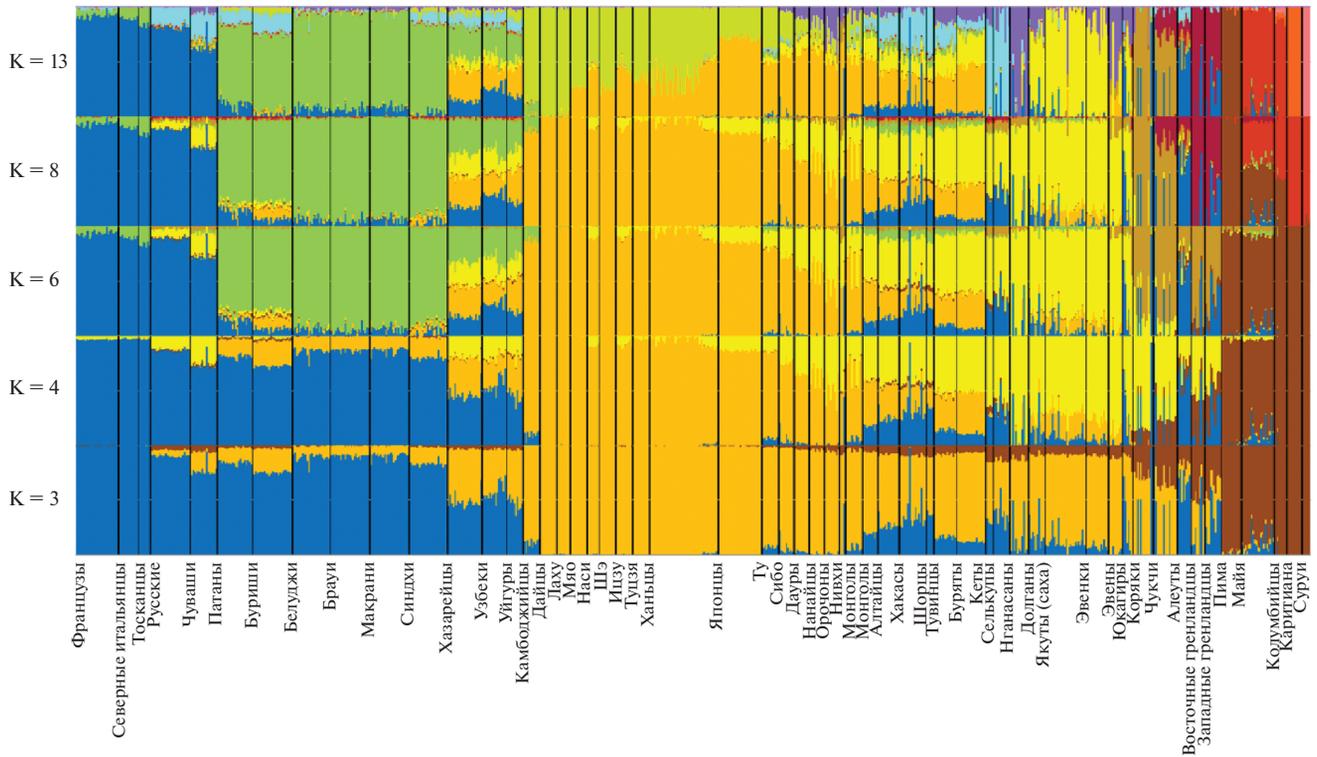


Рис. 2. Соотношение генетических компонентов у 758 индивидов из 55 популяций с использованием программы ADMIXTURE при предполагаемом числе предковых популяций  $K = 3$ ,  $K = 4$ ,  $K = 6$ ,  $K = 8$ ,  $K = 13$  [8].

нента, объединяющего их, в первую очередь, с долганами Таймыра и эвенками (рис. 2). Другие сибирские генетические компоненты, ярко представленные у народов арктической зоны Якутии и Красноярского края – эвенов, юкагиров, нганасан, кетов и селькупов, едва присутствуют у якутов. В геноме якутов также почти не выражены “палеоазиатский” компонент, общий с коряками и чукчами. Результаты исследования показали тесное генетическое родство якутов с долганами и эвенками Якутии, меньшее сходство с эвенками, юкагирами и нганасанами, отдаленность от кетов и селькупов Западной Сибири и глубокие генетические отличия от соседних палеоазиатских народов Камчатки и Чукотки (рис. 2) [8].

Генетическая близость тюркоязычных якутов и долган неудивительна: долганы – один из самых молодых этносов Сибири, который сформировался в период летописной истории в течение XVII–XIX вв., вобрав линии якутов, эвенков и русских старожилов, а также энцев и ненцев [101]. К приходу русских в Восточную Сибирь такой народности не существовало: в XVII в. по Лене, Вилюю и побережью Охотского моря были встречены лишь отдельные тунгусские роды с названием Долган. Но к концу XIX в. по данным переписи 1897 г. численность этноса составляла 2633 человек [101]. Долганский язык является древним языком якутов в период их продвижения на север

и активного взаимодействия с тунгусами, поэтому долгое время рассматривался как один из диалектов якутского [101].

Генетическое сходство якутов с эвенками, по видимому, объясняется не только процессами смешения территориально близких этносов в Якутии в течение длительного периода времени, но и происхождением из общего южносибирского генетического субстрата (причем если происхождение народа саха по генетическим данным связано с регионами западнее Байкала, то тунгусов – с территориями восточнее Байкала). Точка зрения о местонахождении прародины тунгусов к востоку от Байкала поддерживается многими учеными, в том числе археологическими, лингвистическими и генетическими исследованиями [27, 102–104]. Анализируя материалы археологических памятников Забайкалья, Приамурья и особенно среднего Амура (ныне район Благовещенска), а также Приморья, археологи пришли к выводу, что характерные для тунгусской культуры таежные черты сложились в этом регионе на границе тайги и степи [102]. Анализ “диагностической” лексики названий лиственных деревьев (в частности, ясеня и дуба), лососевых рыб, потамонимов (названия рек) и домашних животных, проведенный лингвистом А.М. Певновым, позволил предположить, что “родина языковых предков тунгусо-маньчжурских народов находилась не в

равнинных районах бассейна Среднего Амура, а в гористой местности с хвойно-широколиственными лесами” (возможно, южная часть Буреинского хребта и Малый Хинган, параллельно р. Амур) [103]. Результаты генетических исследований коррелируют с данными археологов и лингвистов: анализ структуры генома эвенков Таймыра и Подкаменной Тунгуски, а также эвенков из других этногеографических групп Якутии и Камчатки [27] свидетельствует в пользу гипотезы о местонахождении прародины тунгусов в бассейне р. Амур. С помощью комплексного подхода, объединяющего лингвистические, археологические и генетические данные, было установлено, что прародина тунгусоязычных этносов, вероятнее всего, находится на правом берегу нижнего течения р. Амур [104].

Любопытно, что у эвенков Якутии нами был обнаружен “гаплотип Чингисхана” [8], встречающийся иногда у народов, бывших под властью чингизидов [105], что указывает на относительно недавний поток генов через мужчин от монголов к эвенкам. Полученные генетические аргументы свидетельствуют в пользу гипотезы о сравнительно недавнем (в начале II тыс. н. э.) появлении тунгусов на территории Якутии, поддерживаемой А.Н. Алексеевым [36]. Масштабные экспансии тунгусов Забайкалья и тюркоязычных якутов Прибайкалья по территории Восточной Сибири в пределах последних 2000 лет, по-видимому, привели к ассимиляции и/или вытеснению древнего населения на еще более северные территории. Поэтому неудивительно, что по сравнению с эвенками Якутии народы Арктического побережья (юкагиры, эвены и нганасаны) в большей степени отличаются от саха по составу компонентов генофонда и содержанию специфических линий мтДНК и Y-хромосомы [5, 8].

Из современных народов, проживающих в соседних с Якутией регионах, по степени генетической близости к якутам оказались более близки буряты и тувинцы, а также алтайцы, монголы и хакасы [8]. Полногеномные исследования, проведенные позднее на расширенных выборках из популяций Сибири, подтвердили полученные нами данные [27, 106, 107]. При сопоставлении якутов с алтайцами, тувинцами и бурятами с помощью IBD-анализа было показано более близкое генетическое сходство якутов с бурятами [27]. С другой стороны, согласно данным M. Robbeets et al. (2021) по генетическим дистанциям к якутам более близки тюркоязычные тувинцы, чем монголоязычные буряты [104]. В отличие от вышеперечисленных народов Южной Сибири геном якутов более однороден и “обеднен” по составу компонентов, что еще раз подтверждает малочисленность предковой популяции, отделившейся от генетического субстрата, общего с южными тюркоязычными народами [8].

## ГЕОГРАФИЧЕСКОЕ РАСПОЛОЖЕНИЕ ПРАРОДИНЫ ЯКУТОВ

К настоящему времени в результате исследований древних популяций Южной Сибири и Восточной Азии получены новые сведения, касающиеся географического расположения прародины саха. В недавних исследованиях E.H.M. Wong и соавт. (2017) [108], P.V. Damgaard и соавт. (2018) [109], C. Jeong и соавт. (2020) [110], G.M. Kilinc и соавт. (2021) [56] и M. Robbeets и соавт. (2021) [104] были проанализированы геномы более чем 300 индивидов из древних погребений Южной Сибири, Монголии, Китая, Кореи и Японии, датированных в широком интервале времени — от неолита до средневековья. По полногеномным данным к современным саха оказались более близки древние индивиды глазковской культуры бронзового века из могильника Шаманка II, расположенного на южной оконечности о. Байкал (Иркутская область), а также из некоторых погребений хунну железного века, локализованных в Бурятии и Монголии, и монголов средневековья [56, 104, 109, 110]. Эти данные полностью коррелируют с результатами проведенных ранее краниологических исследований, сближающих якутов с глазковцами Приангарья и древними хунну [42].

Но при этом следует отметить, что изученные к настоящему времени древние популяции хунну отличаются от якутов по спектру линий Y-хромосомы преобладанием гаплогрупп R1a и Q [110, 111]. Частота N3-линий у древних хунну из 29 погребений, дисперсно расположенных на территории Монголии, — 3% ( $n = 29$ ) [110], из могильника Тамирын-Улан-Хошу Центральной Монголии — 8% ( $n = 25$ ) [111]. Сравнительный анализ N3-линий хунну с другими древними популяциями показал их сходство с STR-гаплотипами древних аварцев из нескольких погребений VII–VIII вв. на территории Венгрии и одного якута из погребения Сергеляхское шоссе (XV–XVI вв.). Однако по комбинации STR-маркеров N3-линии древних хунну и аварцев более близки между собой и отличаются от N3-линии средневекового конного воина-саха [111]. Стоит также подчеркнуть, что N3-линия индивида из погребения Сергеляхское шоссе ближе к корневому гаплотипу и не является филогенетически близкой к гаплотипам Ht1 и Ht2, доминирующим в якутской популяции [8, 16]. Соответственно, утверждение о прямой связи саха с хунну по отцовским линиям является преждевременным и скорее всего ошибочным.

Линии Y-хромосом охотников и рыболовов бронзового века из погребения Шаманка II, останки которых датированы периодом 4000–3800 лет назад, относятся к гаплогруппе Q [109]. Несоответствие данных по Y-хромосоме с результатами полногеномного анализа, указывающими на генетическое сходство якутов с индивидами

глазковской культуры, возможно определяется присутствием автохтонного компонента, содержание которого в геноме современных саха, по нашему предположению, составляет около 50%. К тому же следует учесть, что в палеогенетических исследованиях до сих пор не были проанализированы останки древних индивидов из могильников курумчинской и усть-талыкинской археологических культур, непосредственно связываемых с южными предками народа саха, и оценка степени генетической близости современных якутов с древними глазковцами и хунну является предварительной из-за ограниченного числа исследованных археологических культур Южной Сибири. Расширенный ДНК-анализ древних популяций Прибайкалья и Алтае-Саянского нагорья позволит в будущем более точно локализовать географическое расположение прародины саха. Результаты полногеномных исследований современных и древних популяций Сибири полностью согласуются с идеей, что предки якутов жили когда-то в непосредственной близости от предков бурят и тувинцев на берегах оз. Байкал.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно генетическим реконструкциям, в предковой популяции якутов доминировали мужчины с гаплогруппой N3a2-M1982, преимущественно одного рода (Ht1), и существовало достаточно высокое разнообразие линий женщин, среди которых преобладал род с гаплогруппой D5a2a2. На формирование особенностей структуры современного генофонда якутов, очевидно, повлияли брачные традиции народа саха — экзогамия (выбор супруги из другого рода и/или отдаленного региона), браки с женщинами из соседних автохтонных племен и ограниченность притока линий от соседних народов в мужской генофонд популяции. Сравнительный анализ линий мтДНК якутов с линиями южных народов (казахи, киргизы, уйгуры, монголы) и территориально соседних этносов (эвенки, эвены, юкагиры, чукчи, коряки, ительмены) позволяет предположить, что около половины мт-линий прибыли на современную территорию проживания народа саха вместе с южными предками, а другая половина имеет автохтонное происхождение. В отличие от других групп генетиков, преувеличивающих долю автохтонного [18, 19] или южного тюркоязычного [23] компонента, мы считаем, что их соотношение в генофонде центральных и виллюйских якутов примерно равное. У северных якутов доля автохтонного компонента несколько повышена (до ~60% по линиям мтДНК).

Содержание европейского компонента в генофонде якутов по данным всех трех генетических систем (Y-хромосома, мтДНК, полногеномный анализ SNP-маркеров) ≤10%. Генетические ис-

следования доказали двойственное происхождение этого компонента [5, 8]: часть линий была привнесена в генофонд якутов относительно недавно со времени вхождения Якутии в состав Российской империи, 3–4% линий имеют более древнее происхождение, не связанное с миграцией русскоязычного населения в Сибирь начиная с XVII в. Происхождение древних западноевразийских линий в генофонде якутского этноса, по-видимому, связано с доэтническим этапом формирования якутов как отдельного народа. Некоторые из этих линий возникли на Ближнем Востоке, мигрировали по степному евразийскому коридору через Среднюю Азию в Южную Сибирь и появились на территории Якутии, по нашему предположению, с южными тюркоязычными предками якутов [8].

Результаты генетических исследований соответствуют версиям историков о более тесном взаимодействии якутов с эвенками, чем с юкагирами, эвенами и нганасанами, и указывают на незначительность вклада соседних палеоазиатских (чукчи, коряки) и западносибирских (кеты, селькупы) племен в генофонд якутов [5, 8]. По составу генетических компонентов якуты наиболее близки к эвенкам Центральной Якутии, что обусловлено, по-видимому, как общим происхождением из древнего южносибирского генетического субстрата, так и достаточно интенсивным обменом генов между соседними народами, преимущественно через женщин. Обмен генов между соседними популяциями якутов и эвенков привел к стиранию генетических различий между ними, что особенно ярко проявляется по линиям мтДНК и результатам полногеномного анализа, в то же время отмечается высокая степень генетических различий по линиям Y-хромосомы. Из народов соседних с Якутией регионов по своим генетическим характеристикам к якутам более близки народы Южной Сибири — прежде всего буряты и тувинцы, а также алтайцы, хакасы и монголы.

Анализ географического распределения линий Y-хромосомы и мтДНК и результаты полногеномного анализа указывают на южносибирское происхождение якутов к западу от Байкала в Восточно-Саянском регионе [8, 27, 104, 109, 110], что соответствует традиционным представлениям историков, лингвистов и этнографов об этногенезе народа саха. Результаты генетических исследований в целом хорошо согласуются и с антропологическими данными, указывающими на сходство якутов с тувинцами, бурятами Иркутской области и монголами, а также на близость якутов к древним глазковцам и хунну [40–42].

Следует отметить, что время возникновения (~2300 лет назад) и дивергенции специфических “якутских” линий Y-хромосомы, по-видимому,

отражает реальные факты демографической истории популяции. Время дивергенции N3-M1982-линий якутов, рассчитанное на основе микросателлитного разнообразия и полного секвенирования Y-хромосом, указывает на первичное увеличение численности предковой популяции в IV–VII вв., за которым последовала вторичная экспансия в период с XI по XX в. с наиболее усиленным ростом численности начиная с XVI в.

На основании того, что у якутов не была обнаружена так называемая “С3-линия чингизидов” [8], ранее нами было выдвинуто предположение, что тюркоязычные предки якутов перекочевали на Север задолго до создания империи Чингисхана [14]. Это предположение подтверждается археологическими данными, полученными в последние годы. Наиболее ранние следы проникновения скотоводов на Среднюю Лену были датированы III–IV вв. Исследования археологических памятников раннего этапа кулун-атахской культуры последних лет показали, что в X–XIV вв. в бассейне Средней Лены существовала уже сложившаяся, адаптированная к местным условиям культура кочевников, успешно разводивших лошадей и крупный рогатый скот [38].

Обобщая вышеизложенное, отметим, что к настоящему времени на основе данных этногеномики (популяционной геномики) определены генетические особенности, состав компонентов генофонда и генетические взаимоотношения саха (якутов) с народами Якутии и соседних регионов. Полученные данные позволили частично реконструировать генетическую историю и ответить на ряд вопросов, касающихся этногенеза народа саха. Генетические данные подтверждают версию о местонахождении прародины тюркоязычных предков якутов к западу от Байкала в Восточно-Саянском регионе, но окончательный ответ на этот вопрос может дать в дальнейшем только сравнительный анализ древней ДНК носителей курумчинской (V–XIV вв.), усть-талькинской (XII–XIV вв.) и других археологических культур циркумбайкальского региона с линиями современных саха. Вопрос о точном времени появления “якутских” N3a2-M1982-линий на северных территориях также остается открытым, пока не будет проведен ДНК-анализ древних останков из погребений Якутии от неолита до раннего средневековья.

Из предложенных ранее гипотез по этногенезу народа саха наиболее обоснованными нам представляются версии этнографа Г.В. Ксенофонтова: колонизация Ленского края южными предками якутов с начала I тыс. н. э., существование нескольких волн миграций, переселение южных предков народа саха на Среднюю Лену до создания империи Чингис-хана, тесное взаимодействие с тунгусами [28], а также археологов А.Н. Алексеева и Р.И. Бравиной: проникновение скотоводческих групп на

Среднюю Лену в первой половине I тыс. н. э., присутствие тюркоязычных носителей кулун-атахской культуры в бассейне Средней Лены в X–XIV вв. [38] и лингвистов А.В. Дыбо, Г.Г. Левина, А.В. Савельева и М. Роббитс: отмежевание якутского языка от основного пратюркского языкового ствола в IV–V вв. [32, 47] или даже ранее — во II в. [45].

Следует подчеркнуть, что одним из центральных направлений в современной медицинской геномике является поиск полигенных шкал риска предрасположенности прежде всего к распространенным мультифакториальным, а также к редким заболеваниям. Адекватное знание генетической структуры населения имеет важное значение не только для решения вопросов происхождения и генетической истории этноса, но и является основой для молекулярной эпидемиологии наследственных и мультифакториальных болезней.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (FSRG-2020-0016) “Широкогеномные исследования генофонда коренного населения арктического побережья Якутии”, НИР ЯНЦ КМП “Изучение генетической структуры и груза наследственной патологии в популяциях Республики Саха (Якутия)”, а также при поддержке гранта РФФИ (№ 20-015-00328\_А).

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. Федорова С.А., Бермишева М.А., Виллемс Р. и др. Анализ линий митохондриальной ДНК в популяции якутов // Мол. биология. 2003. Т. 37. № 4. С. 643–653.
2. Федорова С.А., Хусаинова Р.И., Кутуев И.А. и др. Полиморфизм СТГ-повторов гена миотонин-протеинкиназы в популяциях Республики Саха (Якутия) и Средней Азии // Мол. биология. 2005. Т. 39. № 3. С. 385–393.
3. Rootsi S., Zhivotovskiy L.A., Baldovic M. et al. A counter clockwise northern route of the Y-chromosome haplogroup N from Southeast Asia towards Europe // Eur. J. Hum. Genet. 2007. V. 15. P. 204–211. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201748>
4. Федорова С.А., Степанов А.Д., Адоаян М. и др. Анализ линий древней митохондриальной ДНК в Якутии // Мол. биология. 2008. Т. 42. № 3. С. 445–453.
5. Федорова С.А. Генетические портреты народов Республики Саха (Якутия): анализ линий мито-

- хондриальной ДНК и Y-хромосомы. Якутск: Изд-во ЯНЦ СО РАН, 2008. 235 с.
6. *Rasmussen M., Li Y., Lindgreen S. et al.* Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo // *Nature*. 2010. V. 463. P. 757–762. <https://doi.org/10.1038/nature08835>
  7. *Федорова С.А.* Якуты: генетические реконструкции в сравнении с историческими // *Этногенез и культурогенез в Байкальском регионе / Под ред. Коновалова П.Б. Улан-Удэ: Изд-во БНЦ СО РАН, 2011. С. 151–176.*
  8. *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. Biology*. 2013. V. 13:127. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-127>
  9. *Федорова С.А., Барашков Н.А., Ушницкий В.В. и др.* Этнотерриториальные группы якутов: особенности генетической структуры // *Якутский мед. журн.* 2014. № 2. С. 28–31.
  10. *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): e1005068. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005068>
  11. *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>
  12. *Illumäe 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>
  13. *Zvéni gorosky V., Crubézy E., Gibert M. et al.* The genetics of kinship in remote human groups // *Forensic Sci. Int. Genet*. 2016. V. 25. P. 52–62.
  14. *Федорова С.А.* Происхождение якутов: молекулярно-генетические реконструкции в сравнении с гипотезами историков // *Якутский мед. журн.* 2017. № 3(59). С. 60–64.
  15. *Zvéni gorosky V., Nikolaeva D., Romanov G. et al.* Persistence and disappearance of traditional patrilocality: matrimonial strategies and post-nuptial residence patterns in two Eastern Siberian communities of the twenty-first century // *Sibirica*. 2019. V. 18. Issue 1. P. 53–70. <https://doi.org/10.3167/sib.2019.180104>
  16. *Zvéni gorosky V., Duchesne S., Romanova L. et al.* The genetic legacy of legendary and historical Siberian chieftains // *Communication Biology*. 2020. V. 3(1): 581. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01307-3>
  17. *Zvéni gorosky V., Sabbagh A., Gonzalez A. et al.* The limitations of kinship determinations using STR data in ill-defined populations // *Intern. J. Legal Med*. 2020. V. 134(6). P. 1981–1990. <https://doi.org/10.1007/s00414-020-02298-w>
  18. *Степанов В.А.* Этногеомика населения Северной Евразии. Томск: Печатная мануфактура, 2002. 243 с.
  19. *Пузырев В.П., Степанов В.А., Голубенко М.В. и др.* Линии мтДНК и Y-хромосомы в популяции якутов // *Генетика*. 2003. Т. 39. № 7. С. 975–981.
  20. *Харьков В.Н., Степанов В.А., Медведева О.Ф. и др.* Происхождение якутов: анализ гаплотипов Y-хромосомы // *Мол. биология*. 2008. Т. 42. № 2. С. 226–237.
  21. *Pakendorf B., Morar B., Tarskaia L.A. et al.* Y-chromosomal evidence for a strong reduction in male population size of Yakuts // *Hum. Genet*. 2002. V. 110. P. 198–200. <https://doi.org/10.1007/s00439-001-0664-4>
  22. *Pakendorf B., Wiebe V., Tarskaia L.A. et al.* Mitochondrial DNA evidence for admixed origins of Central Siberian populations // *Am. J. Phys. Anthropol*. 2003. V. 120. P. 211–224. <https://doi.org/10.1002/ajpa.10145>
  23. *Pakendorf B., Novgorodov I.N., Osakovskij V.L. et al.* Investigating the effects of prehistoric migrations in Siberia: genetic variation and the origins of Yakuts // *Hum. Genet*. 2006. V. 120. P. 334–353. <https://doi.org/10.1007/s00439-006-0213-2>
  24. *Тарская Л.А., Мелтон Ф.* Сравнительный анализ митохондриальной ДНК якутов и других монголоидных популяций // *Генетика*. 2006. Т. 42. № 12. С. 1703–1711.
  25. *Тарская Л.А., Гоголев А.И., Ельчинова Г.И. и др.* Этническая геномика якутов (народа саха). М.: Наука, 2009. 271 с.
  26. *Zlojutro M., Tarskaia L.A., Sorensen M. et al.* Coalescent simulations of Yakut mtDNA variation suggest small founding population // *Am. J. Phys. Anthropol*. 2009. V. 139(4). P. 474–482. <https://doi.org/10.1002/ajpa.21003>
  27. *Pugach I., Matveev R., Spitsyn V. et al.* The complex admixture history and recent southern origins of Siberian populations // *Mol. Biol. Evol*. 2016. V. 33(7). P. 1777–1795. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw055>
  28. *Ксенофонтов Г.В.* Ураангхай-сахалар: Очерки по древней истории якутов. Иркутск: ОГИЗ Восточносибирское областное изд-во, 1937. Т. I. 576 с.
  29. *Бетлингк О.Н.* О языке якутов. Новосибирск: Наука, 1989. 646 с.
  30. *Убрятова Е.И.* Якутский язык в его отношении к другим тюркским языкам, а также к языкам монгольским и тунгусо-маньчжурским. М.: Вост. лит-ра, 1960. 13 с.
  31. *Новгородов И.Н.* Якутско-эвенкийские языковые взаимосвязи: Дис. ... докт. филог. наук. Казань: КГУ, 2009. 582 с.
  32. *Левин Г.Г.* Исторические связи якутского языка с древними тюркскими языками VII–IX вв. (в сравнительно-сопоставительном аспекте с восточно-тюркскими и монгольскими языками). Якутск: Изд-во СВФУ, 2013. 439 с.
  33. *Окладников А.П.* История Якутской АССР. В 3-х томах. Т. 1: Якутия до присоединения к русскому государству. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1955. 432 с.
  34. *Константинов И.В.* Происхождение якутского народа и его культуры // *Якутия и ее соседи в древности*. Якутск, 1975. С. 106–173.

35. *Гоголев А.И.* Якуты: проблемы этногенеза и формирования культуры. Якутск: Национальное изд-во РС(Я), 1993. 136 с.
36. *Алексеев А.Н.* Древняя Якутия. Железный век и эпоха средневековья. Новосибирск: Изд-во ИАЭТ СО РАН, 1996. 95 с.
37. *Уиницкий В.В.* Проблема происхождения народа саха // Народ саха — от века к веку. Новосибирск: Наука, 2003. С. 39–61.
38. *Алексеев А.Н., Бравина Р.И.* Формирование якутского народа // История Якутии. Новосибирск: Изд-во Наука, 2020. Т. 1. С. 223–230.
39. *Боякова С.И.* Традиционная экономика и система жизнеобеспечения // Якуты. Саха. Серия. “Народы и культуры”. М.: Наука, 2013. С. 141–150.
40. *Левин М.Г.* Антропологические типы Сибири и Дальнего Востока // Сов. этнография. 1950. № 2. С. 53–64.
41. *Аксянова Г.А.* Антропология якутов // Якуты (Саха). Серия “Народы и культуры”. М.: Наука, 2012. С. 64–78.
42. *Томтосова Л.Ф.* Новые материалы по краниологии современных якутов // Исследования по палеоантропологии и краниологии СССР: Сб. МАЭ. Л.: Наука, 1980. Т. 36. С. 121–129.
43. *Мудрак О.А.* Классификация тюркских языков и диалектов с помощью методов глоттохронологии на основе вопросов по морфологии и исторической фонетике. Серия “Orientalia и Classica”. Вып. 23. М.: РГГУ, 2009. 186 с.
44. *Широбокова Н.Н.* Отношение якутского языка к тюркским языкам Южной Сибири. Новосибирск: Наука, 2005. 269 с.
45. *Дыбо А.В.* Хронология тюркских языков и лингвистические контакты ранних тюрков. М.: Академия, 2004. 811 с.
46. *Robbeets M., Bouckaert R.* Bayesian phylolinguistics reveals the internal structure of the Transeurasian family // J. Language Evol. 2018. V. 3(2). P. 145–162. <https://doi.org/10.1093/jole/lzy007>
47. *Savelyev A., Robbeets M.* Bayesian phylolinguistics infers the internal structure and the time-depth of the Turkic language family // J. Language Evol. 2020. V. 5(1). P. 39–53. <https://doi.org/10.1093/jole/lzz010>
48. *Певнов А.М.* Лингвистические свидетельства истории народов Якутии // История Якутии. Т. 1. Новосибирск: Наука, 2020. С. 273–280.
49. *Дашибалов Б.Б.* Археологические памятники курьян и хори. Улан-Удэ: Изд-во БНЦ СО РАН, 1995. 189 с.
50. *Николаев В.С.* Средневековые погребальные комплексы по обряду захоронения человека и коня в Предбайкалье и проблема этногенеза якутов // Этноистория и археология Северной Евразии: теория, методология и практика исследования. Иркутск; Эдмонтон: ИрГТУ, 2007. С. 156–163.
51. *Бравина Р.И., Дьяконов В.М., Николаев Е.Н. и др.* Комплексное исследование раннеякутского Сергеляхского погребения середины XV–начала XVI в. // Вестник археологии, антропологии и этнографии. 2016. № 4(35). С. 90–109.
52. *Савинов Д.Г.* Дотюркский пласт в палеоэтнографии якутов // Сибирский сборник. СПб.: МАЭ РАН, 2010. С. 68–81.
53. *Эргус Г.У.* Исторические предания и рассказы якутов: в 2 частях. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1960. Ч. 1. 322 с.
54. *Zerjal T., Dashnyam B., Pandya A. et al.* Genetic relationships of Asians and Northern Europeans, revealed by Y-chromosomal DNA analysis // Am. J. Hum. Genet. 1997. V. 60. P. 1174–1183.
55. *Van Oven M., Kayser M.* Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation // Hum. Mutat. 2009. V. 30. E386–E394. <https://doi.org/10.1002/humu.20921>
56. *Kilinc G.M., Kashuba N., Koptekin D. et al.* Human population dynamics and *Yersinia pestis* in ancient northeast Asia // Sci. Adv. 2021. V. 7. eabc4587. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc4587>
57. *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>
58. Информационные материалы об окончательных итогах Всероссийской переписи населения 2010 года [http://www.gks.ru/free\\_doc/new\\_site/perepis2010/perepis\\_itogi1612.htm](http://www.gks.ru/free_doc/new_site/perepis2010/perepis_itogi1612.htm)
59. *Dabernat H., Thèves C., Bouakaze C. et al.* Tuberculosis epidemiology and selection in an autochthonous Siberian population from the 16th–19th century // PLoS One. 2014. V. 9(2): e89877. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089877>
60. *Долгих Б.О.* Родовой и племенной состав народов Сибири в XVII веке. М.: Изд-во АН СССР, 1960. 622 с.
61. *Серошевский В.Л.* Якуты. Опыт этнографического исследования. Т. 1. Санкт-Петербург: Типография Главного Управления Уделов, 1896. 720 с.
62. *Брагина Д.Г.* Об этнической идентичности якутов в Республике Саха (Якутия) // The Scientific Heritage. 2021. № 76. P. 59–62.
63. *Кучер А.Н., Данилова А.Л., Конева Л.А., Ноговицина А.Н.* Структура браков в якутских популяциях: национальный состав и инбридинг по изонимии // Генетика. 2010. Т. 46. № 3. С. 408–416.
64. *Данилова А.Л.* Генетико-демографическое исследование народонаселения Республики Саха (Якутия): Дис. ... канд. биол. наук. Томск: НИИ медицинской генетики, 2009. 198 с.
65. *Игнатьева В.Б.* Этногеографические группы. Демография и территориальное расселение якутов // Якуты. Саха. Серия “Народы и культуры”. М.: Наука, 2013. С. 20–31.
66. *Слепцов П.А.* Семья и семейная обрядность у якутов (XIX–начало XX века): Дис. ... канд. ист. наук. Ленинград: ЛГУ, 1984. 238 с.
67. *Derenko M., Malyarchuk B., Denisova G.A. et al.* Contrasting patterns of Y-chromosome variation in South Siberian populations from Baikal and Altai-Sayan regions // Hum. Genet. 2006. V. 118(5). P. 591–604. <https://doi.org/10.1007/s00439-005-0076-y>

68. *Derenko M., Malyarchuk B., Denisova G. et al.* Y-chromosome haplogroup N dispersals from south Siberia to Europe // *J. Hum. Genet.* 2007. V. 52(9). P. 763–770.  
<https://doi.org/10.1007/s10038-007-0179-5>
69. *Харьков В.Н.* Структура и филогеография генофонда коренного населения Сибири по маркерам Y-хромосомы: Дис. ... докт. биол. наук. Томск: НИИ мед. генетики, 2012. 440 с.
70. *Wells R.S., Yuldasheva N., Ruzibakiev R. et al.* The Eurasian heartland: A continental perspective on Y-chromosome diversity // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. P. 10244–10249.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.171305098>
71. *Кутуев И.А.* Генетическая структура и молекулярная филогеография народов Кавказа. Дис. ... докт. биол. наук. Уфа, 2010. 305 с.
72. *Yunusbayev B., Metspalu M., Järve M. et al.* The Caucasus as an asymmetric semipermeable barrier to ancient human migrations // *Mol. Biol. Evol.* 2012. V. 29(1). P. 359–365.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msr221>
73. *Hallast P., Batini C., Zadik D. et al.* The Y-chromosome tree bursts into leaf: 13000 high-confidence SNPs covering the majority of known clades // *Mol. Biol. Evol.* 2015. V. 32 (3). P. 661–673.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msu327>
74. *Rootsi S., Magri C., Kivisild T. et al.* Phylogeography of Y-chromosome haplogroup I reveals distinct domains of prehistoric gene flow in Europe // *Am. J. Hum. Genet.* 2004. V. 75(1). P. 128–137.  
<https://doi.org/10.1086/422196>
75. *Semino O., Passarino G., Oefner P.J. et al.* The genetic legacy of Paleolithic *Homo sapiens* in extant Europeans: a Y-chromosome perspective // *Science.* 2000. V. 290. P. 1155–1159.  
<https://doi.org/10.1126/science.290.5494.1155>
76. *Balanovsky O., Rootsi S., Pshenichnov A. et al.* Two sources of the Russian patrilineal heritage in their Eurasian context // *Am. J. Hum. Genet.* 2008. V. 82(1). P. 236–250.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.09.019>
77. *Underhill P.A., Myres N.M., Rootsi S. et al.* Separating the post-Glacial coancestry of European and Asian Y chromosomes within haplogroup R1a // *Eur. J. Hum. Genet.* 2010. V. 18 (4). P. 479–484.  
<https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.50>
78. *Кушнеревич Е.И., Сивицкая Л.Н., Богачева А.В. и др.* Гаплогруппа R1a1a7 (M-458) Y-хромосомы современных белорусов и миграции предков славян на территории Беларуси // *Генетика популяций и эволюция.* 2011. Т. 9(1). С. 44–52.
79. *Казарян П.Л.* Итоги и задачи исследования пребывания поляков в якутской ссылке (XVII–начало XX вв.) // *Ссылные поляки в Якутии: итоги, задачи, исследование пребывания.* Сб. науч. трудов. Якутск: ИГИ АН РС(Я), 1999. С. 6–30.
80. *Keyser C., Bouakaze C., Crubézy E. et al.* Ancient DNA provides new insights into the history of south Siberian Kurgan people // *Hum. Genet.* 2009. V. 126(3). P. 395–410.  
<https://doi.org/10.1007/s00439-009-0683-0>
81. *González-Ruiz M., Santos C., Jordana X. et al.* Tracing the origin of the east-west population admixture in the Altai region (Central Asia) // *PLoS One.* 2012. V. 7(11). e48904.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048904>
82. *Pilipenko A.S., Trapezov R.O., Cherdantsev S.V. et al.* Maternal genetic features of the Iron Age Tagar population from Southern Siberia (1st millennium BC) // *PLoS One.* 2018. V. 13(9): e0204062.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204062>
83. *Kim K., Brenner C.H., Mair V.H. et al.* A western Eurasian male is found in 2000-year-old elite Xiongnu cemetery in Northeast Mongolia // *Am. J. Phys. Anthropol.* 2010. V. 142(3). P. 429–440.  
<https://doi.org/10.1002/ajpa.21242>
84. *Malyarchuk B., Grzybowski T., Derenko M. et al.* Mitochondrial DNA variability in Poles and Russians // *Ann. Hum. Genet.* 2002. V. 66. P. 261–283.  
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.06.003>
85. *Malyarchuk B., Derenko M., Grzybowski T. et al.* Differentiation of mitochondrial DNA and Y-chromosomes in Russian populations // *Hum. Biol.* 2004. V. 76. P. 877–900.  
<https://doi.org/10.1353/hub.2005.0021>
86. *Бермишева М.А., Тамбетс К., Виллемс Р., Хуснутдинова Э.К.* Разнообразие гаплогрупп митохондриальной ДНК у народов Волго-Уральского региона // *Мол. биология.* 2002. Т. 36. С. 802–812.
87. *Belyaeva O., Bermisheva M., Khrunin A. et al.* Mitochondrial DNA variations in Russian and Belorussian populations // *Hum. Biol.* 2003. V. 75. P. 647–660.  
<https://doi.org/10.1353/hub.2003.0069>
88. *Фишер И.* Сибирская история с самого открытия Сибири до завоевания сей земли Российским оружием. СПб.: Имперская Акад. наук, 1774. 632 с.
89. *Сафронов Ф.Г.* Распространение земледелия на северо-востоке Сибири в XVII–начале XX века // *Исторические связи народов Якутии с русским народом: Сб. науч. трудов.* Якутск: Якутское кн. изд-во, 1987. С. 28–39.
90. *Романов И.Г.* Формирование русского населения Якутии (1917–1941 гг.). Якутск: Изд-во ИГИ АН РС(Я), 1998. 217 с.
91. *Ricaud F.-X., Kolodetsnikov S., Keyser-Tracqui C. et al.* Molecular genetic analysis of 400-year-old human remains found in two yakut burial sites // *Am. J. Phys. Anthropol.* 2006. V. 129. P. 55–63.  
<https://doi.org/10.1002/ajpa.20195>
92. *Grzybowski T., Malyarchuk B.A., Derenko M.V. et al.* Complex interactions of the Eastern and Western Slavic populations with other European groups as revealed by mitochondrial DNA analysis // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2007. V. 1. P. 141–147.  
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2007.01.010>
93. *Morozova I., Evsyukov A., Kon'kov A. et al.* Russian ethnic history inferred from mitochondrial DNA diversity // *Am. J. Phys. Anthropol.* 2012. V. 147(3). P. 341–351.  
<https://doi.org/10.1002/ajpa.21649>
94. *Loogvali E.-L., Roostalu U., Malyarchuk B.A. et al.* Disuniting uniformity: A pied cladistic canvas of mtDNA haplogroup H in Eurasia // *Mol. Biol. Evol.* 2004.

- V. 21. P. 2012–2021.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msh209>
95. *Derenko M., Malyarchuk B., Grzybowski T. et al.* Phylogeographic analysis of mitochondrial DNA in Northern Asian populations // *Am. J. Hum. Genet.* 2007. V. 81. P. 1025–1041.  
<https://doi.org/10.1086/522933>
96. *Roostalu U., Kutuev I., Loogväli E.L. et al.* Origin and expansion of haplogroup H, the dominant human mitochondrial DNA lineage in West Eurasia: the Near Eastern and Caucasian perspective // *Mol. Biol. Evol.* 2007. V. 24(2). P. 436–448.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msl173>
97. *Behar D.M., Metspalu E., Kivisild T. et al.* Counting the founders: the matrilineal genetic ancestry of the Jewish Diaspora // *PLoS One.* 2008. V. 3(4): e2062.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002062>
98. *Derbeneva O.A., Starikovskaya E.B., Wallace D.C., Sukernik R.I.* Traces of Early Eurasians in the Mansi of Northwest Siberia revealed by mitochondrial DNA analysis // *Am. J. Hum. Genet.* 2002. V. 70. P. 1009–1014.  
<https://doi.org/10.1086/339524>
99. *Гольцова Т.В., Осипова Л.П., Жаданов С.И., Вилемс Р.* Влияние брачной миграции на генетическую структуру популяции нганасан Таймыра: генеалогический анализ по маркерам митохондриальной ДНК // *Генетика.* 2005. Т. 41. № 7. С. 954–965.
100. *Li J.Z., Absher D.M., Tang H. et al.* Worldwide human relationships inferred from genome-wide patterns of variation // *Science.* 2008. V. 319. P. 1100–1104.  
<https://doi.org/10.1126/science.1153717>
101. *Долгих Б.О.* Происхождение долган // *Сиб. этнографический сборник.* 1963. Т. 5. С. 92–141.
102. *Окладников А.П., Деревянко А.П.* Далекое прошлое Приморья и Приамурья. Владивосток: Дальневост. кн. изд-во, 1973. 440 с.
103. *Певнов А.М.* Лингвистические пути решения тунгусо-маньчжурской проблемы // *Вопр. языкознания.* 2008. № 5. С. 64–81.
104. *Robbeets M., Bouckaert R., Conte M. et al.* Triangulation supports agricultural spread of the Trans Eurasian languages // *Nature.* 2021. V. 599. P. 616–621.  
<https://doi.org/10.1038/s41586-021-04108-8>
105. *Zerjal T., Xue Y., Bertorelle G.* The genetic legacy of the Mongols // *Am. J. Hum. Genet.* 2003. V. 72(3). P. 717–721.  
<https://doi.org/10.1086/367774>
106. *Cardona A., Pagani L., Antao T. et al.* Genome-wide analysis of cold adaptation in indigenous Siberian populations // *PLoS One.* 2014. V. 9(5): e98076.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098076>
107. *Zhernakova D.V., Brukhin V., Malov S. et al.* Genome-wide sequence analyses of ethnic populations across Russia // *Genomics.* 2020. V. 112(1). P. 442–458.  
<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.03.007>
108. *Wong E.H.M., Khrunin A., Nichols L. et al.* Reconstructing genetic history of Siberian and Northeastern European populations // *Genome Res.* 2017. V. 27(1). P. 1–14.  
<https://doi.org/10.1101/gr.202945.115>
109. *Damgaard P.B., Martiniano R., Kamm J. et al.* The first horse herders and the impact of early Bronze Age steppe expansions into Asia // *Science.* 2018. V. 360(6396): eaar7711.  
<https://doi.org/10.1126/science.aar7711>
110. *Jeong C., Wang K., Wilkin S. et al.* A dynamic 6000-year genetic history of Eurasia's Eastern steppe // *Cell.* 2020. V. 183(4). P. 890–904.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.015>
111. *Keyser C., Zvenigorosky V., Gonzalez A. et al.* Genetic evidence suggests a sense of family, parity and conquest in the Xiongnu Iron Age nomads of Mongolia // *Hum. Genet.* 2020. V. 140(2). P. 349–359.  
<https://doi.org/10.1007/s00439-020-02209-4>

## Population Genetic Structure and Genetic History of the Sakha (Yakuts)

S. A. Fedorova<sup>a, b, \*</sup> and E. K. Khusnutdinova<sup>a, c</sup>

<sup>a</sup>*Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, 677013 Russia*

<sup>b</sup>*Yakut Science Center of Complex Medical Problems, Yakutsk, 677000 Russia*

<sup>c</sup>*Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*

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

The review summarizes the results of molecular genetic studies of genetic structure and genetic history of the Sakha (Yakuts) in the context of data on anthropology, linguistics, history and archaeology. The features of the genetic structure of the Yakut population by Y-chromosome lineages, mitochondrial DNA, and genome-wide SNP data are described. The composition and ratio of the components of the gene pool and the genetic relationships of the Sakha with populations of Yakutia and neighboring regions are considered. The reconstruction of genetic history of the population made it possible to answer a number of questions concerning the ethnogenesis of the Yakuts.

**Keywords:** genetic history, Y-chromosome, mtDNA, genome-wide SNP analysis, Yakuts (Sakha).

ОБЗОРНЫЕ  
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 575.1,577.24

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ И ПОДХОДЫ ПОИСКА ГЕНЕТИЧЕСКИХ  
ДЕТЕРМИНАНТ СТАРЕНИЯ И ДОЛГОЛЕТИЯ<sup>1</sup>© 2022 г. С. С. Кунижева<sup>1, 2, 3, \*</sup>, В. П. Волобаев<sup>1</sup>, М. Ю. Плотникова<sup>1, 2</sup>,  
Д. А. Куприянова<sup>1</sup>, И. Л. Кузнецова<sup>1, 3</sup>, Т. В. Тяжелова<sup>3</sup>, Е. И. Рогаев<sup>1, 2, 3, 4</sup><sup>1</sup>Научно-технологический университет “Сириус”, Научный центр генетики и наук о жизни,  
Краснодарский край, Сочи, 354340 Россия<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия<sup>3</sup>Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия<sup>4</sup>Медицинская школа Чан Массачусетского университета, департамент психиатрии, Шрусбери, 01545 США

\*e-mail: kunizheva@gmail.com

Поступила в редакцию 20.01.2022 г.

После доработки 06.07.2022 г.

Принята к публикации 07.07.2022 г.

Старение является естественным процессом угасания организма и основным аспектом, определяющим продолжительность жизни для особей, доживших до пострепродуктивного периода. Процесс старения сопровождается определенными физиологическими, иммунными и метаболическими изменениями в организме, а также развитием возрастных заболеваний. Вклад генетических факторов в продолжительность жизни человека оценивается примерно в 25–30%. Несмотря на успехи в выявлении генов и метаболических путей, которые могут участвовать в процессе увеличения продолжительности жизни у модельных организмов, остается ключевым вопрос, насколько эти данные можно экстраполировать на человека, например из-за сложности его биологических и социокультурных систем, а также из-за возможных видовых различий в продолжительности жизни и причин смертности. Новые молекулярно-генетические методы значительно расширили возможности для поиска генетических факторов продолжительности жизни человека и выявления метаболических путей старения, взаимодействия генов и факторов транскрипции, регуляции экспрессии генов на уровне транскрипции и эпигенетических модификаций. В обзоре представлены последние исследования и современные стратегии для изучения генетической основы старения человека и долголетия: изучение отдельных генов-кандидатов в генетических популяционных исследованиях, вариации, выявленные методом поиска ассоциаций GWAS, иммуногенетические отличия при старении, а также геномные исследования для выявления факторов “здоровой старости”. Понимание механизмов взаимодействия факторов, влияющих на продолжительность жизни, и возможность их регуляции могут стать основой для разработки комплексных мер по достижению здорового долголетия.

**Ключевые слова:** старение, генетические факторы долголетия, долгожители, масштабное параллельное секвенирование, модельные организмы, иммуногенетика, GWAS.

**DOI:** 10.31857/S0016675822120062

В основе современного представления о процессе старения лежит гипотеза о биологической программе, основанной на утрате функциональной стабильности на молекулярном, клеточном, тканевом и органном уровнях. Этот процесс сопровождается развитием возраст-ассоциированных заболеваний, таких как сердечно-сосудистые, заболевания опорно-двигательного аппарата, нейродегенеративные и онкологические.

Исследования биологии старения сосредоточены как на изучении первичных механизмов

старения и биологических факторов, определяющих продолжительность жизни, так и на определении биохимических путей и генетических детерминант старения и долголетия. Это важно для поиска мишеней терапевтической коррекции возраст-зависимых изменений (заболеваний), а также для разработки профилактических мер продления периода здоровой жизнедеятельности человека. На сегодняшний момент уже имеется информация о потенциальных терапевтических возможностях некоторых химических соединений, таких как метформин, рапамицин, ресвератрол и сенолитики, для продления здорового долголетия [1].

<sup>1</sup> Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0016675822120062 для авторизованных пользователей.

Предметом настоящего обзора являются современные тенденции в исследовании генетических основ старения и долголетия человека. Мы сфокусировались на работах, посвященных поиску генов-кандидатов и метаболических путей, связанных со старением и продолжительностью жизни, и выявлению генетических факторов “здоровой старости” у человека.

Отдельное внимание уделено взаимосвязи процесса старения и фенотипа долголетия с особенностями функционирования иммунной системы, что стало особенно актуально в период пандемии коронавируса COVID-19. Общеизвестно, что у лиц старших возрастных групп риск развития серьезных осложнений и смерти в результате коронавирусной инфекции значительно выше, чем у людей молодого и среднего возраста. В то же время имеются сообщения о пациентах столетнего возраста, успешно переживших инфекцию COVID-19 [2]. В связи с этим мы считаем, что будет уместно в настоящем обзоре также рассмотреть текущее состояние науки о генетических факторах функционирования иммунной системы при старении и долголетьи.

## ТЕОРИИ СТАРЕНИЯ

На продолжительность жизни и старение организмов оказывают влияние множество различных факторов. Для человека вклад генетических факторов оценивается до 30% [3]. Однако эта оценка не учитывает индивидуальности ответа индивида на факторы внешней среды, а также его социального поведения и личностных характеристик, которые в некоторой степени также определяются генетическими детерминантами. Например, было показано, что братья и сестры долгожителей, преодолевших 105-летний барьер, имеют в 35 раз больше шансов дожить до 100 лет, чем в среднем по популяции [4]. Роль генетических факторов в продолжительности жизни также хорошо иллюстрируют таксоны-экстремумы по этому показателю. Для океанического моллюска *Arctica islandica* характерно исключительное долголетие (507 лет в дикой природе) [5] и наоборот продолжительность жизни у насекомых подёнок (*Ephemeroptera*) – не более 48 ч [6]. Но почему одни живые организмы живут десятилетиями, а другие считанные дни? В попытке ответить на этот вопрос сформулировано множество гипотез [7].

Молекулярно-генетическая гипотеза, согласно которой причиной старения являются изменения генетического аппарата клетки, – одна из наиболее признанных в современной науке о старении. В свете этого современные молекулярно-генетические теории предполагают два подхода к изучению проблемы старения. Один подход рассматривает возрастные изменения генома как на-

следственно запрограммированные, другой предполагает, что старение – это результат накопления случайных мутаций. Отсюда следует, что процесс старения может являться или закономерным результатом роста и развития организма (гипотеза запрограммированного старения), или следствием накопления случайных ошибок в системе хранения и передачи генетической информации (стохастическая гипотеза или “теория накопления мутаций”). Так, гипотеза запрограммированного старения предполагает, что с возрастом происходит преднамеренное ухудшение показателей организма, поскольку ограничение продолжительности жизни приводит к эволюционным преимуществам таксона, устраняя из конкуренции за пищевые и пространственные ресурсы особей, выполнивших свою репродуктивную функцию. Антагонистическая плейотропия на сегодняшний день является наиболее общепринятой теорией эволюционного происхождения старения [8].

Теория антагонистической плейотропии предполагает, что существует эволюционно закрепленный генетически детерминированный баланс между продолжительностью жизни и фертильностью. Поддержание баланса между уровнями рождаемости и смертности необходимо для предотвращения истощения пищевых ресурсов. Антагонистическая плейотропия рассматривается как эволюционная адаптация, которая защищает долгосрочные преимущества популяции/вида от потерь в результате индивидуального отбора. Долгосрочная выгода достается только группе за счет индивидуума, что привело к отбору группы генов, которые обеспечивают преимущества при воспроизводстве потомства в молодом возрасте и ускоряют процессы, ведущие к гибели организма [9]. К примеру, у млекопитающих активность сигнальных систем mTOR и инсулин/IGF1 крайне важна на начальных этапах развития организма, но в дальнейшем приводит к ускоренному старению [10].

Эволюционная теория старения П. Медавара (“теория накопления мутаций”) объясняет старение как случайное неадаптивное явление, которое выступает побочным продуктом естественно-го эволюционного отбора [11].

Ее смысл заключается в том, что варианты генов, которые обуславливают негативный эффект на продолжительность жизни, не влияют на здоровье индивида в репродуктивном возрасте, т.е. манифестируются только в пожилом возрасте и не подвергаются отрицательному отбору. Современные молекулярно-генетические исследования подтверждают постулаты эволюционной теории, например ген *p53*, который одновременно является и супрессором опухолевого роста, и геном клеточного старения [12].

В настоящее время становится понятно, что в классическом виде эти теории не могут быть абсо-

лютны. В ряде исследований показано, что старение может развиваться как механизм адаптации к изменяющимся условиям среды для обеспечения преимущества части популяции на различных модельных организмах [13–16]. Более того, даже в одной бактериальной линии могут одновременно проявляться как физиологическое бессмертие, так и клеточное старение [17]. Таким образом, природа старения вероятно намного сложнее чем ранее предполагалось, в связи с чем требует еще более тщательного изучения.

## ОСНОВНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ СТАРЕНИЯ

К настоящему времени было идентифицировано множество процессов, приводящих к старению на клеточном уровне в тех или иных модельных системах. Среди основных механизмов выделяют: нестабильность генома, укорочение теломер, эпигенетические изменения, нарушение протеостаза, нарушение распознавания питательных веществ, митохондриальная дисфункция, накопление сенесцентных клеток, истощение пула стволовых клеток и изменение межклеточного взаимодействия [18–20]. Подробно данные о механизмах клеточного старения представлены в табл. 1 (Приложение 1).

С момента выявления и определения клеточных механизмов старения они чаще всего описывались как изолированные или отдельные. Однако появляется все больше экспериментальных данных, демонстрирующих взаимосвязь и взаимную регуляцию между большинством из этих признаков. Традиционно ключевые механизмы старения были разделены на три взаимодействующие между собой группы признаков. Первая группа — это признаки, которые, как считается, являются основными причинами повреждения клеток (к ним относятся — нестабильность генома, укорочение теломер, эпигенетические изменения, нарушение протеостаза). Вторая группа признаков — те, которые считают частью компенсаторных или антагонистических ответов на повреждение (нарушение распознавания питательных веществ, митохондриальная дисфункция, накопление сенесцентных клеток). Первоначально эти механизмы направлены на уменьшение повреждения, однако при хроническом или интенсивном воздействии приводят к повреждениям. И интегративные признаки — истощение пула стволовых клеток и изменение межклеточного взаимодействия, являющиеся финальным результатом признаков предыдущих двух групп и, в конечном итоге, ответственные за снижение функций, связанных со старением [21]. Современное представление о ключевых механизмах старения на молекулярном, клеточном, тканевом и системном уровнях подробно представлены в обзоре [20].

Однако пути старения значительно различаются среди клеток разных видов и, более того, среди различных клеток одного и того же вида. Например, фибробласты мыши экспрессируют теломеразу и имеют очень длинные теломеры, и в клеточной культуре они стареют независимо от укорочения теломер [22], а фибробласты человека “стареют” после некоторого числа клеточных делений и экспрессия теломеразы может отсрочить этот процесс [23]. В то же время “старение” клеточной культуры ткани молочной железы человека не зависит от укорочения теломер и связано с экспрессией белка p16 [18].

Оценка роли конкретных факторов, модулирующих процессы старения у человека, на которые можно будет эффективно терапевтически воздействовать для продления здорового долголетия, является одной из основных задач биологии старения, имеющей в перспективе прикладное значение. Незаменимым инструментом, позволяющим проводить исследования механизмов старения и влияющих на них факторов, являются классические модельные организмы в комбинации с организмами экстремальными по продолжительности жизни.

## МОДЕЛЬНЫЕ ЖИВОТНЫЕ

Для выявления генетических факторов и метаболических путей, лежащих в основе старения и долголетия, в качестве биологических моделей используется множество различных организмов. К преимуществам использования модельных животных можно отнести: короткую продолжительность жизни, возможности проводить широкий набор манипуляций на геномном уровне, а также небольшие финансовые затраты и невысокие этические требования. Исследования на таких далеких от человека модельных организмах, как дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*), нематодный червь (*Caenorhabditis elegans*), плодовая мушка (*Drosophila melanogaster*) и грызуны (мыши *Mus musculus* и крысы *Rattus norvegicus*), позволили определить консервативные генетические механизмы старения. Применение различных генетических подходов (например, индуцированный мутагенез, РНК-интерференция и др.) позволило сфокусировать исследования на определенных генах и эффективно искать ассоциации фенотип/генотип у полученных мутантов.

Список модельных организмов, которые используются для изучения генетики долголетия, за последние годы пополнился животными, которые отличаются аномальной продолжительностью жизни. Среди них бирюзовый киллифиш (*Nothobranchius furzeri*) — самое короткоживущее животное, которое можно содержать в неволе, а его старение демонстрирует многие характеристики старения млекопитающих. В природе *N. furzeri* живут не

более 1–1.5 лет, в аквариумах при правильном содержании могут доживать до трех лет, но в возрасте полутора лет становятся бесплодными. Короткая продолжительность жизни *N. furzeri* дает уникальную возможность для проведения лонгитюдных исследований позвоночных [24]. Напротив, такие виды как нощница Брандта (*Myotis brandtii*), гренландский кит (*Balaena mysticetus*) и африканский саванный слон (*Loxodonta africana*) являются видами с экстремальным увеличением продолжительности жизни, что может быть связано с уникальными вариациями генов репарации ДНК и генов системы поддержания стабильности генома.

Кроме того, активно обсуждается использование домашних пород собак (*Canisiliaris*) в качестве перспективной животной модели в генетических исследованиях старения, особенно учитывая, что у них естественным образом развивается когнитивное снижение, связанное с возрастом, с поведенческими и гистологическими характеристиками, очень похожими на человеческие [25].

Обширные генетические данные, полученные в исследованиях на различных модельных организмах, представлены в нескольких обзорных статьях [26–30]. В табл. 2 (Приложение 2) представлены последние данные по поиску генов и метаболических путей, влияющих на продолжительность жизни модельных организмов. Ограничение калорийности питания наряду со снижением активности сигнальных путей TOR, IIS и с увеличением активности сигнального пути AMPK, по-видимому, эволюционно консервативны в регуляции продолжительности жизни за счет ингибирования анаболических процессов и перепрограммирования метаболизма организмов различных видов. Инсулин/IGF-1-сигнальный путь стал первым, чья роль в регуляции продолжительности жизни была достоверно подтверждена для большинства модельных организмов. Также известно, что многие гены поддержания стабильности генома, в особенности гены репарации ДНК и противоопухолевой защиты широко представлены для разных видов организмов, что свидетельствует об эволюционном консерватизме генетических путей в процессах старения и долголетия. Однако также существуют виды, выработавшие индивидуальные механизмы продления жизни, например такие как увеличение копияности генов или уникальные мутации [27].

#### ПОИСК ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ ДОЛГОЛЕТИЕ У ЧЕЛОВЕКА

Всемирная организация здравоохранения провозгласила концепцию “здорового старения” глобальным приоритетом для современного общества [31]. Эта концепция обсуждается в научных кругах начиная с середины XX в. и включает

такие понятия как высокая физическая, психологическая и социальная активность здоровых людей пожилого возраста (>60 лет) [32]. В свете этого долгожителей можно рассматривать как “золотой стандарт” здорового старения. Было высказано предположение, что геном долгожителей не содержит патологических вариантов генов со значительной пенетрантностью, либо содержит про-тективные аллели от различных факторов риска окружающей среды. Поэтому долгожители могут служить естественной моделью для изучения биологических аспектов успешного старения человека [33]. Ранее термин “долгожители” относили к людям старше 90 лет, но в последнее время в большинстве исследований этим термином обозначаются люди, дожившие до 100 и более лет. Доля таких людей в развитых странах в среднем составляет ~0.01–0.025% [34]. В России численность людей старше 100 лет в 2021 г. составляла 30420 человек [35]. К “супердолгожителям” относят людей, достигших возраста 110 лет и старше. Такое исключительное долголетие встречается редко и, возможно, использует биологические механизмы, которые отличаются от тех, которые участвуют в обычном старении человека [36]. Произвольное использование возрастного порога для обозначения фенотипа “долголетие” является значимой проблемой при исследовании генетики долголетия человека [37].

К особенностям фенотипа долгожителей относят следующие признаки:

1) половой дисбаланс (гендерные различия) — распространенность долголетия среди женщин выше во всем мире, при этом соотношение мужчин и женщин обычно колеблется от 1 : 4 до 1 : 7, а среди супердолгожителей в возрасте от 110 лет соотношение мужчин и женщин составляет 1 : 9 [37];

2) семейные случаи долголетия — показано, что родители, братья и сестры и потомки долгожителей демонстрируют лучшее состояние здоровья и более высокую вероятность достижения долголетия по сравнению с контрольной группой того же возраста [4, 38];

3) клинический статус долгожителей весьма неоднородный. Так, например, процент долгожителей с хорошим физическим/когнитивным статусом колеблется в разных популяциях от 12 до 22% [39, 40].

Учитывая все это, для формирования исследовательских когорт (выборки) при проведении генетических исследований важна предварительная гериатрическая оценка клинического статуса долгожителей, что снижает излишнюю гетерогенность выборки [41]. Для этих же целей также важно проводить проверку этнической однородности выборки и долгожителей, и контрольной

группы например методом анализа главных компонент.

Использование не популяционных когорт, а семейных случаев успешного старения представляет особый интерес. К таким исследованиям относят изучение близнецов-долгожителей [4, 42, 43] и изучение семейных случаев долголетия, таких, например, как международные исследования Long Life Family Study (LLFS) [44]. Использование редких крупных когорт семей долгожителей помогает улучшить структуру генетических исследований. К ним относятся коллекции “Лейденское исследование долголетия – Leiden Longevity Study”, “Генетика здорового старения – GENA)/Mark-Age”, состоящие из долгожителей возраста 85 лет и выше, их сибсов и потомков среднего возраста европейского происхождения [45, 46]. Преимущества таких исследований в том, что потомки долгожителей, представленные как отдельная группа индивидов, предрасположенных к долголетию, могут сравниваться с их пожилыми супругами (выступающими в качестве контроля) для определения возрастных фенотипов, ассоциированных с семейным долголетием. Такая структура исследуемых выборок позволяет провести на нескольких поколениях достоверный анализ молекулярных и клинических параметров, характерных для долгожителей и членов их семей пожилого, среднего и молодого возраста.

Появление Британского биобанка (UK Biobank) [47] – ресурса, содержащего широкий спектр генетической и медицинской информации о примерно 500 тыс. человек, упростило исследования взаимосвязи между генетикой и процессом старения, и/или продолжительностью жизни, благодаря унифицированной классификации фенотипов, что необходимо для получения корректных результатов с использованием метаанализа. Подробное описание классификации фенотипов в Британском биобанке представлено в работе [48].

В настоящее время продолжают исследования по поиску и анализу генетических вариантов, связанных со старением и долголетием. Технологии масштабного параллельного секвенирования (МПС) дают полную информацию о спектре однонуклеотидных замен и малых делеций/инсерций в геномах долгожителей, обеспечивая возможность детального анализа и/или комплексных подходов к изучению генетики долгожительства.

Исследования влияния генетических вариаций на общую продолжительность жизни и, в частности, здоровое долголетие человека начались главным образом с локусов и генов-кандидатов, обнаруженных в модельных организмах [49]. Использование метода широкогеномного поиска ассоциаций (GWAS) предполагало возможность выявления новых генетических детер-

минант, связанных с долголетием у человека. GWAS исследования не основываются на предварительных знаниях о каком-либо выделенном гене или локусе, а представляют собой сравнение частоты встречаемости генетических вариантов в разных группах [50]. Целый ряд таких исследований выявил совокупность полиморфных вариантов, связанных с более длительной продолжительностью жизни в различных популяциях, но большинство из них не воспроизводилось в независимых исследованиях [51–55]. На сегодняшний день только для четырех локусов было подтверждено влияние на продолжительность жизни в разных популяциях: *APOE* (*APOE/TOMM40*) [55–58], *FOXO3A* [50, 59–61], *CDKN2B-AS1* [62, 63], локус 5q33.3 [59].

В сравнительных GWAS-исследованиях долгожителей (>90 лет и старше) с контрольной группой (младше 65 лет) наиболее достоверные ассоциации с долголетием были показаны для вариантов гена *APOE*  $\epsilon 4/\epsilon 3/\epsilon 2$ : вариант  $\epsilon 4$  реже встречается у долгожителей, тогда как вариант  $\epsilon 2$  присутствует чаще. Аполипопротеин E – продукт гена *APOE* участвует в транспортировке холестерина и других липидов в клетки; в головном мозге эта функция важна для поддержания и восстановления мембран нервных клеток и синапсов [63]. Полиморфизм гена *APOE* имеет высокую степень ассоциации с болезнью Альцгеймера (БА): установлено, что аллель  $\epsilon 4$  является достоверным генетическим фактором риска позднего начала болезни [63–66]. Также показано, что аллель  $\epsilon 4$  сопряжен с повышенным риском сердечно-сосудистых заболеваний [67]. Помимо этого в ряде исследований указывается вероятная роль гена *APOE* в процессах развития ожирения, снижения иммунитета, а также, возможно, диабета второго типа, однако эти данные еще требуют подтверждения [68]. Кроме того, некоторые исследования показали, что носители  $\epsilon 4$  и  $\epsilon 3$  вариантов гена *APOE* в среднем обладают более высокой фертильностью по сравнению с  $\epsilon 2$ -носителями. Таким образом можно предположить, что в аллельном состоянии гена *APOE*  $\epsilon 4/\epsilon 3/\epsilon 2$  заложен выбор между здоровым долголетием человека и потенциальным большим количеством потомства [68]. Также было показано, что SNP (rs2075650) находится в состоянии сильного неравновесия по сцеплению (LD) с аллелем  $\epsilon 4$  гена *APOE* и связан с риском поздней манифестации БА [69]. Интересно, что этот вариант находится в интроне гена *TOMM40*, который расположен примерно на 15 тпн выше *APOE* на хромосоме 19. Последующий анализ GWAS подтвердил связь аллелей  $\epsilon 4$  и  $\epsilon 3$  гена *APOE* с полиморфным вариантом гена *TOMM40*, поэтому в связи с долголетием рассматривают локус *APOE/TOMM40* [62].

Ген *CDKN2B-AS1* представляет собой длинную некодирующую РНК (lncRNA), которая ре-

гулирует экспрессию гена циклин-зависимого ингибитора киназы 2A (*CDKN2A*). Оба этих гена находятся в локусе *CDKN2A/B*. Полиморфные варианты в этом локусе связаны с сердечно-сосудистыми и онкологическими заболеваниями [67, 70, 71].

Ген *FOXO3A* кодирует фактор транскрипции, влияющий на целый ряд процессов клеточного метаболизма, окислительно-восстановительного потенциала клеток, пролиферации клеток, репарации ДНК, аутофагии и многих других [72–75]. В частности, он действует как триггер апоптоза посредством экспрессии генов, необходимых для гибели клеток, запускает апоптоз в отсутствие факторов выживания, включая гибель нейронов при окислительном стрессе [76, 77]. В. Willcox и соавт. (2008) [60] впервые сообщили, что генетическая изменчивость гена *FOXO3A* четко коррелирует с продолжительностью жизни человека. Было проведено исследование пяти генов-кандидатов (*ADIPOQ*, *FOXO1A*, *FOXO3A*, *SIRT1* и *COQ7*) в популяции американских долгожителей мужского пола японского происхождения (средний достигнутый возраст = 97.9 по сравнению с контрольной группой = 78.5). Для трех полиморфных вариантов (rs2764264, rs13217795 и rs2802292) в гене *FOXO3A* была установлена связь с долголетием и здоровым старением. Было показано, что гомозиготный генотип по аллелю *G* варианта rs2802292 можно считать протективным при сердечно-сосудистых заболеваниях. Этот же аллель был связан с заметно более низким уровнем инсулина и индексом НОМА (оценка модели гомеостаза) в контрольной группе [60]. С. Anselmi и соавт. (2009) [74] подтвердили связь вышеупомянутых вариантов гена *FOXO3A* с экстремальной продолжительностью жизни у мужчин долгожителей Южной Италии. Но вариант rs2802288, отсутствующий на 2 тпн от rs2802292, показал лучшую аллельную ассоциацию [74]. Эти же результаты были подтверждены в немецкой популяции, но ассоциация была значительно выше у долгожителей, чем у пожилых людей [61]. Кроме того, ассоциация вариантов в гене *FOXO3A* была воспроизведена как методом “случай–контроль”, так и “продольными” исследованиями в датской популяции (лица старшего возраста по сравнению с лицами среднего возраста). Среди 15 проанализированных SNP гена *FOXO3A* авторы обнаружили связь восьми SNP с продолжительностью жизни: четыре ранее зарегистрированных (rs13217795, rs2764264, rs479744 и rs9400239) и четыре новых SNP (rs12206094, rs13220810, rs7762395 и rs9486902) [75]. В работе F. Flachsbarth и соавт. [61] для трех вариантов (rs2802292, rs12206094 и rs4946935) было показано участие в аллель-специфичном ответе на клеточный стресс и индукцию аллель-специфичной экспрессии *FOXO3A*.

Тем не менее следует отметить, что вышеописанные выявленные варианты в генах-кандидатах

*APOE/TOMM40*, *CDKN2B-AS1* и *FOXO3A* в совокупности объясняют лишь небольшую долю наследуемости долголетия. Следовательно, необходимы новые подходы для выявления дополнительных локусов, участвующих в формировании долголетия у человека.

Примером исследований на больших хорошо структурированных когортах могут служить работы с использованием ресурса Британского биобанка. Несколькими GWAS-исследованиями использовали данные биобанка для поиска генотипов, связанных с наследуемой продолжительностью жизни, так как учитывалась и продолжительность жизни родителей, и продолжительность здоровой жизни (определяемая как количество прожитых лет в отсутствие серьезных хронических заболеваний) [76, 78]. В этих исследованиях подтвердились уже известные генетические варианты (в локусах *APOE*, *ABO*, *ZC3HC1*, *IGF2R*, *CDKN2B-AS1*, 5q33.3/*EBF1* и *FOXO3*) и обнаружены новые варианты (*ATXN2/BRAP*, *FURIN/FES*, *ZW10*, *PSORS1C3* и 13q21.31). Также были отмечены новые метаболические пути, возможно влияющие на продолжительность жизни человека: транспорт везикул, метаболизм ацилглицерина и стеролов, а также синаптическая и дендритная функции. Авторы отмечают, что идентифицированные генетические варианты, по-видимому, не лежат в основе генерализованной формы старения, независимой от болезни. То есть определенные генетические варианты, которые напрямую влияют на скорость старения человека, обнаружить не удалось. Возможно, что эффекты таких генетических вариантов были слишком малы, чтобы их можно было обнаружить в этом исследовании [54, 78].

Также в одном из недавних исследований авторы анализировали данные из Британского биобанка (UKB) и британской коллекции образцов тканей мозга (UK Brain Bank Network/UKBBN) с целью поиска ультраредких генетических вариантов (MAF < 0.2%), влияющих на продолжительность жизни (в выборке свыше 40 тыс. жителей Великобритании в возрасте от 16 до 105 лет) [79]. Был проведен анализ влияния ультраредких генетических факторов — это в основном так называемые варианты с усечением белка (Protein-truncating variants, PTV), а именно stop-gain мутации и мутации со сдвигом рамки считывания, на общую продолжительность жизни и на продолжительность здоровой жизни, т.е. период времени, прожитый до развития первого возрастного заболевания. Авторами было установлено, что мутационный груз наследуемых PTV (>6 PTV на геном) отрицательно влияет на общую продолжительность жизни и продолжительность здоровой жизни (выявлено сокращение ожидаемой продолжительности жизни в среднем на 1.3 года). В то же время влияния соматического накопления PTV на ожидаемую продолжительность жизни отме-

чено не было. Также в работе Shindyapina и соавт. [80] было выявлено, что редкие PTV-варианты могут быть связаны с развитием различных заболеваний, таких как болезни аутоиммунного спектра, рак легких и др.

Одним из вариантов современного аналитического подхода при изучении геномов долгожителей является расчет полигенного риска/балла (PRS) достижения интересующего фенотипа, в данном случае – долголетия человека. Так, в работе [76] использовали когорту здоровых долгожителей возраста более 100 лет (343) и подобранную по популяциям контрольную группу пожилых людей, состоящую из пяти когорт разного возраста ( $N = 2905$ ). Было выбрано 330 полиморфных вариантов, на основе которых был проведен расчет PRS. Так как PRS для признака, в его простейшей форме, представляет собой взвешенную сумму генотипов для панели SNP, где “веса” представляют собой предполагаемую величину генетического эффекта, в качестве “весов” авторами были использованы различные размеры эффекта (логарифм отношения шансов [ORs]), доступные в сводной статистике GWAS по наследуемому долголетию (parental longevity) [54]. Авторы считают, что эта “панель маркеров” для расчета PRS частично способна компенсировать “маскирующий эффект” аллеля *APOE-ε4*. При аннотации 330 вариантов, включенных в этот PRS, было обнаружено, что они обогащены генами, связанными с клеточной дифференцировкой, процессами развития и клеточной реакцией на стресс.

Недостаток новых достоверных генетических ассоциаций с долголетием частично объясняется отсутствием стандартизации критериев GWAS-исследований для определения групп долгожителей и групп сравнения (контроля), что затрудняет унификацию полученных результатов. Этот “недостаток” в некоторой степени исправляется использованием крупных баз данных “генотип–фенотип”. Но до сих пор генетические исследования старения и долголетия человека не были достаточно успешны в выявлении механизмов, лежащих в основе регулирования продолжительности жизни у человека. Поэтому дополнение данных GWAS-исследований более детальной информацией о последовательности ДНК, полученной с помощью технологии полногеномного секвенирования нового поколения (NGS), и изменение статистических методов анализа представляются следующим шагом вперед на современном этапе изучения долголетия и процессов старения.

Поиск генетических факторов продолжительности жизни методом GWAS в основном проводился в соответствии с гипотезой, что вероятность долголетия зависит от ряда вариантов, имеющих относительно высокую популяционную частоту. Первые попытки поиска редких вариантов ( $MAF < 5\%$ ),

определяющих продолжительность жизни, были предприняты в работах [35, 53] и включали дизайн исследования крайнего случая (фенотипа) [81]. Поиск ультраредких вариантов ( $MAF < 0.01\%$ ) был предпринят в полноэкзомном исследовании для выборки 1248 человек. В результате были выявлены новые варианты в генах *FN3KRP* и *PGP* [82].

Методы ассоциации, используемые в исследованиях GWAS, не позволяют выявить значимые редкие варианты по отдельности или предоставить инструменты для измерения их сложного эффекта, называемого бременем редких вариантов (rare variant burden). Один из способов решить эту проблему – объединить несколько вариантов в одну ковариату на основе регионов, например генов. Для этого используются следующие методы, основанные на обнаружении наличия или подсчете вариантов в гене: комбинированный многомерный и коллапса (Combined Multivariate and Collapsing/CMC), метод адаптивного коллапса на основе ядра (Kernel-Based Adaptive Collapsing/KBAC) и тест ассоциации ядра оптимизированной последовательности (Optimized Sequence Kernel Association Test/SKAT-O). Основная тенденция в работах последних лет по изучению геномов долгожителей – использование комбинаторных биоинформатических анализов и усложнение дизайна эксперимента (например, использование технологии одноклеточного секвенирования или сочетания с данными транскриптомного анализа).

Примером использования одного из таких подходов служит работа S. Shen с коллегами [83], в которой было проанализировано 19 геномов долгожителей от 100 до 116 лет. Корреляционные методы включали ассоциативный анализ, тест ассоциации ядра последовательности (SKAT-анализ) и тесты нагрузки для редких вариантов. Это исследование было проведено для вариантов с  $MAF > 1\%$ . Вместо контрольной выборки использовали информацию для населения Восточной Азии (208 индивидов) из базы данных “1000G”. SKAT-анализ представляет собой тест на связь между набором редких (или распространенных) вариантов и непрерывными/дихотомическими фенотипами на уровне набора SNP (например, гена или региона). Всего с помощью анализа SKAT в этой работе был выделен 41 ген, которые достоверно коррелировали с долголетием. Первые 10 генов были: *PABPC3*, *BAGE2*, *HLA-DRB1*, *PDE4DIP*, *PADI4*, *CHI3L2*, *MUC17*, *WARS*, *HLA-DRB5* и *SIRPB1*. Анализ распределения этих генов по метаболическим путям (с использованием баз данных MutsigDB, KEGG и Reactome) показал перепредставленность метаболических путей, связанных с иммунными и воспалительными ответами, такими как реакции интерферонов, антител и иммунитета [83].

Удачным примером использования синтетического подхода (использование ряда различных аналитических методов) к анализу данных служит работа Р. Gaagnani с коллегами [84]. В этом исследовании были секвенированы полные геномы 81 индивида старше 104 лет (средний возраст 106.6 лет) и 36 здоровых неродственных индивидов из тех же регионов Италии (средний возраст  $68.0 \pm 5.9$ ) с глубоким покрытием ( $90\times$ ). Дополнительно ДНК 333 долгожителей (средний возраст:  $100.4 \pm 1.4$ ) и 358 неродственных индивидов контрольной группы (средний возраст:  $60.7 \pm 7.2$ ) использовали для типирования по 542585 генетическим маркерам с использованием чипа CoreExomeChip v1.1 Illumina (Сан-Диего, Калифорния, США). Наиболее значимым результатом авторы считают идентификацию пяти распространенных вариантов (rs7456688, rs10257700, rs10279856, rs69685881 и rs7805969) в одной и той же области, расположенной между геном *COA1* и геном *STK17A*, и выявление гена *STK17A* как нового гена-кандидата. Следует отметить, что это часто встречаемые в европейских популяциях аллели (от 30 до 60%).

Один из этих пяти вариантов, rs10279856, может играть регуляторную роль в регионе и, возможно, имеет плейотропный эффект, поскольку он является локусом количественного признака экспрессии (eQTL) для гена *STK17A* и двух других генов (*COA1* и *BLVRA*). Анализ на основе гаплотипов идентифицировал гаплотип в локусе гена *COA1* (chr7: 43720429–43756081), сильно связанный с экстремальной продолжительностью жизни (значение  $p = 1.84 \times 10^{-8}$ ). Более того, сравнение с литературными данными [85] выявило еще один полиморфизм (rs623108) с потенциальным влиянием на экспрессию гена *STK17A*, что указывает на разные сигналы от различных полиморфных вариантов, регулирующих экспрессию генов *COA1*, *STK1A*, и *BLVRA*. При этом авторы выделяют особенности паттернов соматических мутаций у долгожителей, связывая их с более низкой мутационной нагрузкой по сравнению с контрольной группой. Суммируя, авторы определяют эффективные механизмы репарации ДНК как важнейшие составляющие здорового старения и защиты от сердечно-сосудистых заболеваний.

К настоящему времени исследования выявили до 750 генов, связанных с долголетием, которые вовлечены в различные виды жизнедеятельности, такие как рост и развитие, энергетический метаболизм, окислительный стресс, поддержание стабильности генома и когнитивных функций. В то же время только семейства генов *FOXO* показали связь с долголетием в многочисленных независимых исследованиях человека и модельных животных [56, 84, 86].

Белки семейства генов *FOXO*, которые представляют собой подсемейство транскрипцион-

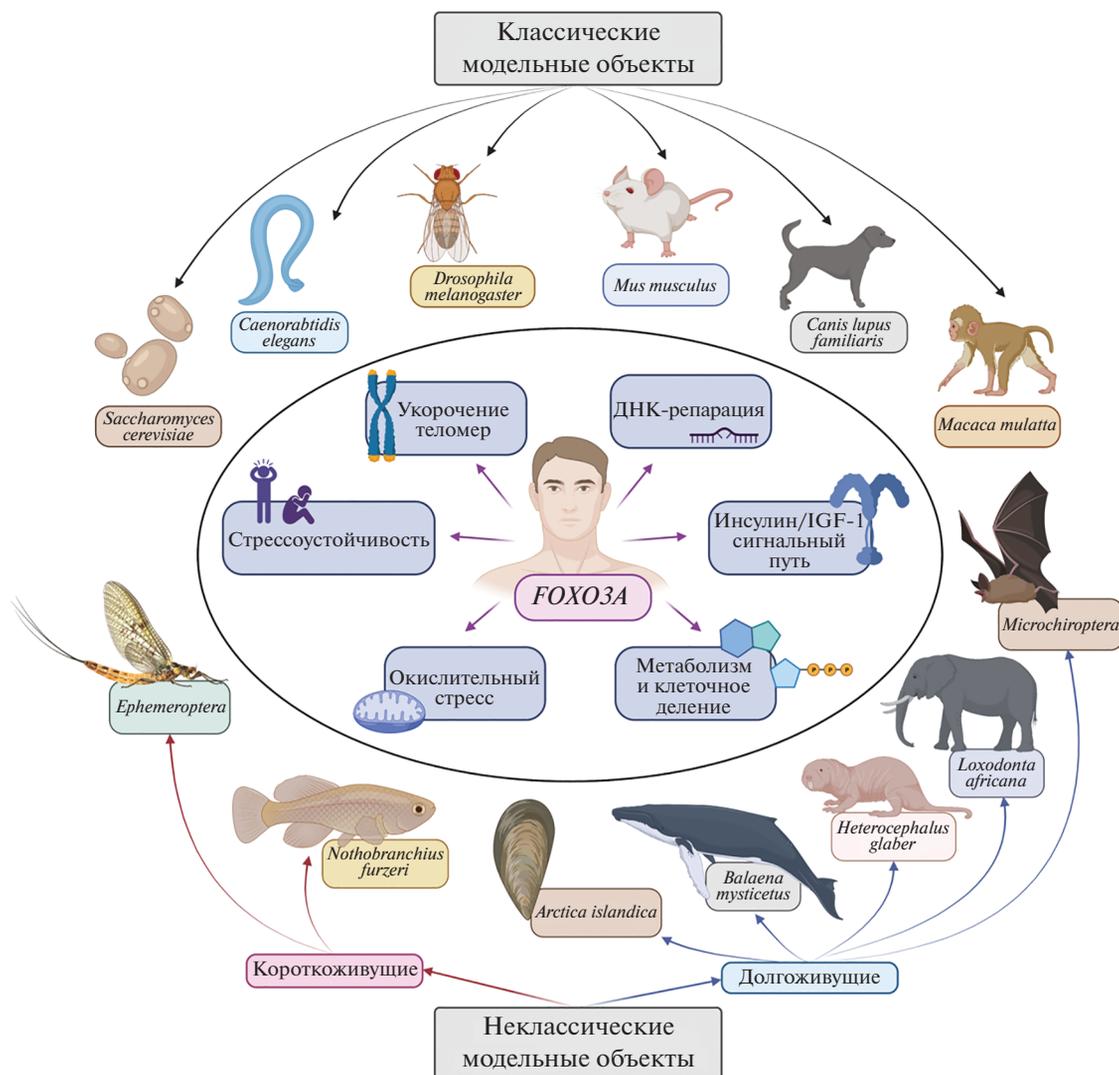
ных факторов, консервативны в организмах от *Caenorhabditis elegans* до млекопитающих и во всех случаях сохраняют свою функцию регулятора передачи сигналов инсулина и инсулиноподобного фактора роста. В то же время инсулин/IGF-1-сигнальный путь также является наиболее эволюционно консервативным путем, который модулирует продолжительность жизни модельных организмов на большом эволюционном расстоянии от *Caenorhabditis elegans* до приматов [87–89]. А отличительный признак старения – “нарушение чувствительности к питательным веществам” – был первым, для которого показано влияние этого сигнального пути у животных. Ограничение в питании – это хорошо известный фактор, который, как показано, увеличивает продолжительность жизни разных видов эукариот, от дрожжей до приматов, и точный ответ на действие такого фактора регулируется несколькими сигнальными путями: инсулином, киназой TOR, AMP-киназой, сиртуинами [88, 89]. Хочется отметить, что основной препарат с геротерапевтическим эффектом – метформин – воздействует на эти сигнальные пути, обеспечивая защиту против макромолекулярного повреждения, улучшенный ответ аутофагии и уменьшение воспаления [90, 91] (рис. 1).

Другие гены-кандидаты вовлечены в процессы регуляции клеточного цикла, рост клеток и передачу сигналов, поддержание стабильности генома и пути, связанные с эндокринной системой. Кроме того, к генам-кандидатам, которые связаны с долголетием, относят гены, связанные с метаболизмом лекарственных препаратов, гены, участвующие в фолдинге, стабилизации и деградации белков, а также гены, связанные со свертыванием и регуляцией кровообращения, и т.д. В большинстве случаев эти гены или их полиморфные сайты были подтверждены в исследованиях для различных популяций, которые обнаружили определенные гены или пути, связанные с долголетием [49, 53, 86].

Несмотря на большое количество полученных данных, нельзя поставить точку в поиске генетических детерминант, определяющих здоровое долголетие. Можно предположить, что в будущих исследованиях при анализе данных необходимо будет учитывать возможное эпистатическое взаимодействие различных полиморфных вариантов. Сложные фенотипы, по определению, зависят от большого количества генетических и экологических факторов и взаимодействия между этими факторами.

## ИММУНИТЕТ И ДОЛГОЖИТЕЛЬНОСТЬ

Старение – это многогранный процесс, в котором задействованы многочисленные молекулярные и клеточные механизмы в контексте различных систем органов. Важнейшим компонентом старе-



**Рис. 1.** Транскрипционный фактор FOXO как эволюционно консервативный регулятор сохранения равновесия, клеточного гомеостаза и стабильности генома.

ния является набор функциональных и структурных изменений в иммунной системе, которые могут проявляться как снижение способности бороться с инфекцией, снижение ответа на вакцинацию, повышенный риск метаболических и нейродегенеративных заболеваний, содержащих иммунологический компонент [92–94]. Также было показано, что ухудшение работы иммунной системы с возрастом способствует старению мозга и развитию его патологий [95]. Например, обнаружено, что возрастные изменения микроглии способствуют развитию нейродегенеративных заболеваний [96].

С современной точки зрения врожденный и адаптивный иммунитет не только зависит от старения, но и является важной частью его основных механизмов. К биомаркерам иммунного старения и патологиям, связанным с иммунным старением,

относят повышенную активность антимикробных пептидов, высокий уровень С-реактивного белка, активацию сигнальных путей TLR/NF-κB, cGAS/STING/IFN 1,3, AGEs/RAGE, активацию инфлам-масомы NLRP3, снижение уровней NK-клеток (естественные киллеры) при врожденном иммунитете, инволюцию тимуса, а также уменьшение числа наивных Т-клеток [97].

К признакам иммунного старения относят: низкий иммунный ответ из-за ограничения разнообразия Т-клеточного репертуара (TCR); накопление Т-клеток памяти в иммунном репертуаре; хроническое воспаление слабой степени, характерное при старении и называемое “inflamm-aging/возрастное воспаление”, и пока считают, что все эти изменения в основном связаны с возрастной инволюцией тимуса [98].

Инволюция тимуса – одно из критических возрастных изменений иммунной системы. Активность тимуса не прекращается полностью по крайней мере до пятидесяти лет, но генерация новых Т-клеток снижается с возрастом [94, 99]. В молодости тимус обеспечивает около 16% пула наивных Т-клеток, а остальная часть образуется в результате пролиферации [100]. У пожилых людей процент наивных Т-клеток падает ниже единицы, что заставляет иммунную систему полностью полагаться на пролиферацию уже существующих Т-клеток [94]. Таким образом, процессы уменьшения количества наивных Т-клеток и накопления дифференцированных иммунных клеток можно рассматривать как два признака старения Т-клеточной иммунной системы [92, 98].

Одним из признаков иммунного старения является постепенное увеличение циркулирующих популяций миелоидных клеток по сравнению с популяциями лимфоидных клеток [101]. В исследовании Р. Helbling и соавт. было обнаружено, что изменения в костном мозге старых мышей приводят к клональному смещению гемопоэтической стволовых клеток (ГСК) в сторону миелоидной линии. Анализ профиля транскриптом микроокружения стромы костного мозга у мышей выявил возрастную прогрессирующую гиперрегуляцию различных провоспалительных генов (включая гены *Il6* и *Il1b*) [102].

Также было обнаружено, что процессы иммунного старения связаны с изменениями в субпопуляциях миелоидных клеток, резидентных для различных тканей. Применение метода секвенирования транскриптомов отдельных клеток (scRNA-seq) выявило большую гетерогенность миелоидных клеток, присутствующих в тканях у пожилых мышей; интересно, что наиболее заметно такая гетерогенность проявлялась в ответ на воспаление [103]. Также у пожилых мышей методом scRNA-seq было обнаружено увеличение доли интерстициальных макрофагов, экспрессирующих гены хемокиновых рецепторов *Ccr2* и *Cx3cr1*, и уменьшение доли альвеолярных макрофагов [104]. В другом исследовании scRNA-seq-анализ продемонстрировал увеличение экспрессии воспалительных генов (включая экспрессию гена цитокина *Il1b*) в макрофагах, резидентных в печени (также известных как клетки Купфера) у пожилых мышей, что, вероятно, может способствовать развитию воспаления и повреждению печени [103]. Таким образом, показано, что иммунное старение у мышей связано с изменением программ транскрипции тканевых макрофагов в сторону провоспалительных фенотипов, что способствует развитию воспаления в различных тканях. Дальнейшие исследования, вероятно, будут направлены на анализ развития различных клонов макрофагов, резидентных в тканях и органах человека при старении [103, 104].

Уровень экспрессии и разнообразие В-клеточных рецепторов (BCR) также изменяются при старении [92, 105]. Неизвестно, снижается ли выработка В-клеток костным мозгом в пожилом возрасте у людей, но это явление было показано на мышах [106]. Также было показано, что как у мышей, так и у людей доля В-клеток памяти увеличивается с возрастом [107, 108].

В последнее время нашими коллегами [109] была предложена концепция выявления иммуногенетических факторов нейropsychических заболеваний, сопровождающих старение человека, с помощью глубокого анализа иммуногенетических профилей клеток адаптивной иммунной системы. Были получены иммуногенетические профили репертуара Т-клеточных рецепторов больных болезнью Альцгеймера (БА) и обнаружено, что у индивидов с БА происходят изменения ряда физико-химических свойств молекул, участвующих в Т-клеточном иммунном ответе. Полученные предварительные данные указывают на уникальность профилей репертуара Т-клеточных рецепторов у больных Альцгеймером и следовательно на их потенциальное использование в качестве биомаркеров [109]. Кроме того, были обнаружены Т-клетки со специфическими репертуарами в мозге человека; показано, что при старении в мозге происходит достоверное снижение разнообразия профилей репертуара Т-клеточных рецепторов [109].

Недавние исследования с использованием моделей трансгенных мышей показали, что иммунный ответ может иметь негативный эффект на развитие и течение болезни Альцгеймера. Авторами [110] было обнаружено, что регуляция (инактивация) В-клеток может иметь протектирующий эффект при болезни Альцгеймера на модельных мышах и положительно влиять на когнитивные функции у стареющих мышей на данной модели.

Суммируя, можно сказать, что иммунное старение человека представляет собой процесс сложного ремоделирования, при котором клонотипический иммунитет ухудшается, в то время как наследственный, врожденный иммунитет в значительной степени сохраняется [111, 112].

При этом воспаление можно рассматривать и как адаптивный процесс, поскольку оно может вызвать противовоспалительную реакцию, противодействующую возрастной провоспалительной среде. С этой точки зрения здоровые долгожители представляют собой ценную модель для изучения положительных изменений/геномных вариаций, приводящих к “аномально продуктивной” работе иммунной системы. Именно здоровые долгожители демонстрируют сложный и гетерогенный фенотип с улучшенной способностью адаптироваться и эффективным ответом иммунной системы [113].

Появляются интересные экспериментальные данные об особенностях иммунной системы долгожителей. В основном иммунофлуоресцентными и протеомными методами показано, что у долгожителей сохраняются более “молодые” иммунологические параметры и что истощение их иммунной системы менее очевидно, чем у пожилых людей [114–116]. Используя стандартные методы анализа генома здоровых долгожителей, практически невозможно получить корректные данные об особенностях иммунной системы. Прямых экспериментальных данных по анализу сложных, высоко полиморфных геномных локусов (TCR, аллотипы иммуноглобулинов, HLA), определяющих иммунитет у здоровых долгожителей, очень мало. В работе А. Пуса [117] было проведено типирование аллотипов иммуноглобулинов по маркерам IgG3 GM 23– и 23+ (замена G на A в Fc цепи  $\gamma 2$ ) методом полиморфизма длин рестриционных фрагментов (ПДРФ) для 95 долгожителей из Южной Италии. И показано, что аллотип GM3 значительно чаще представлен у долгожителей.

В работе S. Shen с коллегами [83] представлен пример использования данных секвенирования полных геномов для гаплотипирования генов главного комплекса гистосовместимости при помощи программы HLAscan. Авторы обнаружили, что ген *DRB1*, а именно гаплотипы *DRB1 \* 13: 02*, *DRB1 \* 14: 01* и *DRB1 \* 16: 02* имеют четкую корреляцию с продолжительностью жизни, но типирование указано только до второго поля. Конечно же интересно получить данные о “предпочтительности” у долгожителей HLA-гаплотипов на аминокислотном уровне (типирование до 4-го поля). Потому что уровень типирования до второго поля определяет аминокислотные различия между HLA-белками с одним и тем же антигенным пептидом.

К. Hashimoto с коллегами [118], используя комбинацию нескольких методов (секвенирование одноклеточного транскрипта мононуклеарных клеток периферической крови для семи долгожителей, анализ одноклеточного репертуара TCR обогащения CD4+ Т-клеток для двух долгожителей), показали, что у долгожителей есть уникальные характеристики циркулирующих лимфоцитов, которые могут представлять собой важную адаптивную систему для достижения исключительного долголетия за счет поддержания иммунного ответа на инфекции и болезни. Это увеличение уровня экспрессии генов *GZMA*, *GZMB*, *GZMH*, *PRF1*, *NKG7 (TIA-1)*, *GNLY*, *CD40LG*, *KLRG1*, *KLRB1* и *ITGAL (CD11A)* и уменьшение уровня экспрессии генов *CCR7*, *CD27*, *CD28* и *IL7R*. Также авторы считают, что результаты анализа репертуара одноклеточных TCR для двух долгожителей показывают, что изменение клеточного состояния CD4+ Т-клеток, по крайней мере частично, объясняется клональной экспансией из-за повторной стимуляции тем же антигеном [118].

В работе О. Британовой с коллегами [119] было проанализировано изменение репертуара TCR $\beta$  с возрастом и в частности для 23 индивидов с возрастом от 85 до 103 лет с использованием РНК, выделенной из мононуклеарных клеток периферической крови. Основными особенностями репертуара TCR $\beta$  у долгожителей авторы считают сокращение гендерных различий в динамике сокращения разнообразия, которое в среднем возрасте уменьшается быстрее у мужчин, чем у женщин, и уменьшение среднего количества вирусоспецифических (цитомегаловирус и вирус Эпштейн-Барра) клонотипов у долгожителей. Это может быть результатом либо истощения клонов специфических Т-клеток, либо возрастного отбора, благоприятствующего продолжительности жизни людей с более низким бременем CMV и EBV [120], либо более низкого клонального доминирования в специфических ответах на эти патогены [119].

Как мы уже писали выше, в период пандемии коронавируса COVID-19 появились данные о том, что долгожители столетнего возраста и старше легче переживают заболевание, чем более молодые индивиды. Например, по данным Института Роберта Коха (февраль 2021 г.) среди немецких пациентов, инфицированных SARS-CoV-2 в возрастной группе 80–89 лет, смертность составила 46.7%, тогда как для людей в возрасте 90 лет и старше – только 23.3% [121]. Предполагается, что легкая симптоматика течения инфекции у долгожителей может быть связана с аномальным воспалительным статусом [122–124]. В исследовании, в котором участвовали долгожители из Китая, было обнаружено, что полиморфизм SNP rs2069837 гена *IL6* был связан с экстремальным долголетием [55]. Ранее была отмечена связь полиморфных вариантов гена *IL6* (например, *IL-6174G/G*) с повышенным риском заболеваемости и смертностью в пожилом возрасте [125].

В настоящее время обсуждаются также и другие возможные причины, по которым долгожители легче переносят COVID-19:

– возможное влияние уникальных паттернов экспрессии редких вариантов генов, ассоциированных со здоровым долголетием [126], что могло бы объяснить хорошую способность иммунной системы долгожителей защищаться от SARS-CoV-2;

– возможный вклад эпигенетических изменений, влияющих на иммунный ответ и предположительно определяющих селективное преимущество для долгожителей. На особенности их эпигенетического статуса могли оказать влияние такие внешние факторы как две мировые войны, голод и пандемии гриппа [127, 128].

Пока исследователи находятся только в начале “большого пути” и мы видим только старт подобных работ, которые конечно же будут продолжаться

ся. Хотелось бы особо отметить, что многие текущие иммуногенетические исследования с участием долгожителей повторяют основные методологические ошибки, которые встречались в стартовых работах по анализу полных геномов долгожителей, среди них — анализ малой выборки, использование гетерогенной по возрасту группы (от 85 лет), игнорирование этнической гетерогенности.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поиск ключевых генов старения и долголетия, и изучение внутриклеточных сигнальных путей может стать основой для разработки методов диагностики и коррекции состояний, сопровождающих процесс старения, разработки терапевтических способов, повышающих продолжительность и качество жизни.

Многочисленные работы с использованием модельных организмов, изучение основных механизмов клеточного старения, крупномасштабные широко геномные ассоциативные исследования человека, генетические исследования долгожителей позволили выявить различные эволюционно-консервативные метаболические пути, сходные у различных видов организмов и человека, а также отдельные генетические локусы, влияющие на ключевые признаки старения человека и продолжительность жизни.

Значительное увеличение продолжительности жизни и неотвратимое демографическое старение человечества подталкивают исследователей все больше фокусироваться на поисках генетических детерминант “здорового старения” и долголетия. В связи с этим возникает необходимость в создании общедоступных высококачественных ресурсов с открытыми и интегрированными базами данных. В настоящее время уже существует несколько крупных ресурсов, содержащих базы данных генов-кандидатов и генетических вариантов, связанных с долголетием и старением человека: AgeFactDB, Digital Aging Atlas и AGEMAP и др. Можно отметить проект Human Aging Genomic Resources (HAGR), который представляет собой набор баз данных (GenAge, AnAge, GenDR, LongevityMap и DrugAge) и инструментов, призванных помочь исследователям изучать генетику старения человека с использованием современных подходов, таких как функциональная геномика, сетевой анализ, системная биология и эволюционный анализ [127, 129–131].

Однако большой объем уже накопленных данных при отсутствии хорошо конкретизированных выводов приводит к предположению, что исследование механизмов старения и долголетия необходимо проводить комбинаторно с разных точек зрения. Комплексный анализ данных “multi-omics” исследований (геномика, эпигеномика, тран-

скриптомика, протеомика, метаболомика и фармакогеномика), особенно с точностью разрешения до одной клетки, может обеспечить многомерный интегрированный профиль гетерогенного процесса старения с беспрецедентной детализацией. Потенциал полногеномных исследований для изучения генетической архитектуры “здорового старения” (или здорового долголетия) открывает новые возможности для поиска терапевтических мишеней, в том числе для фармакологической коррекции процессов старения, конечной целью которых является увеличение периода именно здоровой жизни человека.

Изучение генетических основ старения иммунитета (иммунного старения) становится особенно актуально в свете пандемии коронавируса. На наш взгляд, это будет стимулировать научные сообщества к проведению новых интересных исследований в таких направлениях, как:

- изучение молекулярных причин угасания иммунной системы с возрастом и слабой выживаемости при вирусных заболеваниях, и в то же время исследования феномена успешной выживаемости 100-летних пациентов с COVID-19 [2];

- изучение особенностей иммунной защиты при использовании различных типов вакцин у людей пожилого возраста и долгожителей.

Финансирование проекта осуществлялось из средств Научно-технологического университета “Сириус”.

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. *Baghdadi J.D., Brook R.H., Uslan D.Z. et al.* Association of a care bundle for early sepsis management with mortality among patients with hospital-onset or community-onset sepsis // *JAMA Inter. Med.* 2020. V. 180. № 5. P. 707–716. <https://doi.org/10.1001/JAMAINTERNMED.2020.0183>
2. *Kordowitzki P.* Centenarians and COVID-19: Is there a link between longevity and better immune defense? // *Gerontology.* Publ. online 2021. P. 1–2. <https://doi.org/10.1159/000518905>
3. *Shadyab A.H., LaCroix A.Z.* Genetic factors associated with longevity: A review of recent findings // *Ageing Res. Rev.* 2015. V. 19. P. 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.ARR.2014.10.005>
4. *Sebastiani P., Nussbaum L., Andersen S.L. et al.* Increasing sibling relative risk of survival to older and older ages and the importance of precise definitions of “aging,” “life span,” and “longevity” // *J. Gerontolo-*

- gy. Series A. 2016. V. 71. № 3. P. 340–346.  
<https://doi.org/10.1093/GERONA/GLV020>
5. Gruber H., Wessels W., Boynton P. et al. Age-related cellular changes in the long-lived bivalve *A. islandica* // Age (Dordrecht, Netherlands). 2015. V. 37. № 5.  
<https://doi.org/10.1007/S11357-015-9831-8>
  6. Johnson A.A., Shokhirev M.N., Shoshitaishvili B. Revamping the evolutionary theories of aging // Ageing Res. Rev. 2019. V. 55. P. 100947.  
<https://doi.org/10.1016/J.ARR.2019.100947>
  7. Flatt T., Partridge L. Horizons in the evolution of aging // BMC Biol. 2018. V. 16(1). P. 1–13.  
<https://doi.org/10.1186/S12915-018-0562-Z>
  8. Kirkwood T.B.L., Melov S. On the programmed/non-programmed nature of ageing within the life history // Current Biol. 2011. V. 21. № 18. P. R701–R707.  
<https://doi.org/10.1016/J.CUB.2011.07.020>
  9. Mitteldorf J. What is antagonistic pleiotropy? // Biochemistry (Moscow). 2019. V. 84. № 12. P. 1458–1468.  
<https://doi.org/10.1134/S0006297919120058>
  10. Anisimov V.N. Conservative growth hormone/IGF-1 and mTOR signaling pathways as a target for aging and cancer prevention: do we really have an antiaging drug // Interdisciplinary Topics Gerontol. 2015. V. 40. P. 177–188.  
<https://doi.org/10.1159/000364982>
  11. Clark W.R. Reflections on an unsolved problem of biology: the evolution of senescence and death // Adv. Gerontol. 2004. V. 14. P. 7–20.
  12. Wu D., Prives C. Relevance of the p53-MDM2 axis to aging // Cell Death and Differentiation. 2018. V. 25. № 1. P. 169–179.  
<https://doi.org/10.1038/CDD.2017.187>
  13. Shokhirev M.N., Johnson A.A. Effects of extrinsic mortality on the evolution of aging: a stochastic modeling approach // PLoS One. 2014. V. 9. № 1. P. 86602.  
<https://doi.org/10.1371/J.PONE.0086602>
  14. Austad S.N., Hoffman J.M. Is antagonistic pleiotropy ubiquitous in aging biology? // Evolution, Med., Public Health. 2018. V. 2018. № 1. P. 287–294.  
<https://doi.org/10.1093/EMPH/EOY033>
  15. Grandison R.C., Piper M.D.W., Partridge L. Amino-acid imbalance explains extension of lifespan by dietary restriction in *Drosophila* // Nature. 2009. V. 462. № 7276. P. 1061–1064.  
<https://doi.org/10.1038/nature08619>
  16. Frenk S., Pizza G., Walker R.V., Houseley J. Aging yeast gain a competitive advantage on non-optimal carbon sources // Aging Cell. 2017. V. 16. № 3. P. 602–604.  
<https://doi.org/10.1111/ACEL.12582>
  17. Proenca A.M., Rang C.U., Buetz C. et al. Age structure landscapes emerge from the equilibrium between aging and rejuvenation in bacterial populations // Nat. Communications. 2018. V. 9. № 1. P. 1–11.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-06154-9>
  18. Stampfer M.R., la Barge M.A., Garbe J.C. An integrated human mammary epithelial cell culture system for studying carcinogenesis and aging // Cell Mol. Biol. Breast Cancer. 2013. P. 323–361.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-62703-634-4\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-634-4_15)
  19. Declerck K., Vanden Bergh W. Back to the future: Epigenetic clock plasticity towards healthy aging // Mechanisms Ageing and Development. 2018. V. 174. P. 18–29.  
<https://doi.org/10.1016/J.MAD.2018.01.002>
  20. Proshkina E.N., Solovov I.A., Shaposhnikov M.V., Moskalev A.A. Key molecular mechanisms of aging, biomarkers, and potential interventions // Molekuliarnaia Biologiia. 2020. V. 54. № 6. P. 883–921.  
<https://doi.org/10.31857/S0026898420060099>
  21. López-Otín C., Blasco M.A., Partridge L. et al. The hallmarks of aging // Cell. 2013. V. 153. № 6. P. 1194–1217.  
<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.05.039>
  22. Banito A., Lowe S.W. A new development in senescence // Cell. 2013. V. 155. № 5. P. 977.  
<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.10.050>
  23. Yamashita S., Ogawa K., Ikei T. et al. SIRT1 prevents replicative senescence of normal human umbilical cord fibroblast through potentiating the transcription of human telomerase reverse transcriptase gene // Biochem. Biophys. Res. Communications. 2012. V. 417. № 1. P. 630–634.  
<https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2011.12.021>
  24. Platzer M., Englert C. *Nothobranchius furzeri*: A model for aging research and more // Trends Genet. 2016. V. 32. № 9. P. 543–552.  
<https://doi.org/10.1016/J.TIG.2016.06.006>
  25. Sándor S., Kubinyi E. Genetic pathways of aging and their relevance in the dog as a natural model of human aging // Frontiers Genet. 2019. V. 10. P. 948.  
<https://doi.org/10.3389/FGENE.2019.00948/PDF>
  26. Taormina G., Ferrante F., Vieni S. et al. Longevity: lesson from model organisms // Genes. 2019. V. 10. № 7.  
<https://doi.org/10.3390/GENES10070518>
  27. Tian X., Seluanov A., Gorbunova V. Molecular mechanisms determining lifespan in short- and long-lived species // Trends Endocrinol. Metabolism: TEM. 2017. V. 28. № 10. P. 722–734.  
<https://doi.org/10.1016/J.TEM.2017.07.004>
  28. Berryman D.E., Christiansen J.S., Johannsson G. et al. Role of the GH/IGF-1 axis in lifespan and healthspan: lessons from animal models // Growth Hormone & IGF Res. 2008. V. 18. № 6. P. 455–471.  
<https://doi.org/10.1016/J.GHIR.2008.05.005>
  29. Москалев А.А., Прошкина Е.Н., Белый А.А., Соловьев И.А. Генетика старения и долголетия // Вавил. журн. генетики и селекции. 2016. Т. 20. № 4. С. 426–440.  
<https://doi.org/10.18699/VJ16.171>
  30. Riera C.E., Merkwirth C., de Magalhaes Filho C.D., Dillin A. Signaling networks determining life span // Annual Review Biochem. 2016. V. 85. P. 35–64.  
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-060815-014451>
  31. Lindmeier C. “Ageing well” must be a global priority // Accessed January 17, 2022. <https://www.who.int/ru/news/item/06-11-2014-ageing-well-must-be-a-global-priority>
  32. Rowe J.W., Kahn R.L. Successful aging // Gerontologist. 1997. V. 37(4). P. 433–440.  
<https://doi.org/10.1093/GERONT/37.4.433>
  33. Franceschi C., Valensin S., Bonafè M. et al. The network and the remodeling theories of aging: Historical background and new perspectives // Exp. Gerontolo-

- gy. 2000. V. 35(6–7). P. 879–896.  
[https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(00\)00172-8](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(00)00172-8)
34. *Heshmati H.M.* The centenarians: An emerging population // *Update Geriatrics*. Publ. online, 2021.  
<https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.96327>
  35. Информационно-аналитические материалы // Accessed January 17, 2022. <https://rosstat.gov.ru/compendium/document/13284>
  36. *Sebastiani P., Riva A., Montano M. et al.* Whole genome sequences of a male and female supercentenarian, ages greater than 114 years // *Frontiers Genet.* 2012. V. 2. P. 90.  
<https://doi.org/10.3389/FGENE.2011.00090>
  37. *Treaster S., Karasik D., Harris M.P.* Footprints in the sand: Deep taxonomic comparisons in vertebrate genomics to unveil the genetic programs of human longevity // *Frontiers Genet.* 2021. V. 12. P. 925.  
<https://doi.org/10.3389/FGENE.2021.678073/BIBTEX>
  38. *Andersen S.L., Sebastiani P., Dworkis D.A. et al.* Health span approximates life span among many supercentenarians: compression of morbidity at the approximate limit of life span // *J. Gerontology. Series A.* 2012. V. 67. № 4. P. 395–405.  
<https://doi.org/10.1093/GERONA/GLR223>
  39. *Newman A.B., Glynn N.W., Taylor C.A. et al.* Health and function of participants in the long life family study: A comparison with other cohorts // *Aging.* 2011. V. 3. № 1. P. 63–76.  
<https://doi.org/10.18632/AGING.100242>
  40. *Andersen-Ranberg K., Schroll M., Jeune B.* Healthy centenarians do not exist, but autonomous centenarians do: A population-based study of morbidity among Danish centenarians // *J. Am. Geriatrics Soc.* 2001. V. 49. № 7. P. 900–908.  
<https://doi.org/10.1046/J.1532-5415.2001.49180.X>
  41. *Gondo Y., Hirose N., Arai Y. et al.* Functional status of centenarians in Tokyo, Japan: developing better phenotypes of exceptional longevity // *J. Gerontology. Series A.* 2006. V. 61. № 3. P. 305–310.  
<https://doi.org/10.1093/GERONA/61.3.305>
  42. *van den Berg A.E.* From green space to green prescriptions: Challenges and opportunities for research and practice // *Frontiers Psychol.* 2017. V. 8. P. 268.  
<https://doi.org/10.3389/FPSYG.2017.00268/BIBTEX>
  43. *Skytthe A., Pedersen N.L., Kaprio J. et al.* Longevity studies in genomEUtwin // *Twin Res. and Human Genet.* 2003. V. 6. № 5. P. 448–454.  
<https://doi.org/10.1375/TWIN.6.5.448>
  44. *Sebastiani P., Sun F.X., Andersen S.L. et al.* Families enriched for exceptional longevity also have increased health-span: Findings from the long life family study // *Frontiers Public Health.* 2013. V. 1(SEP). P. 38.  
<https://doi.org/10.3389/FPUBH.2013.00038/ABSTRACT>
  45. *Schoenmaker M., de Craen A.J.M., de Meijer P.H.E.M. et al.* Evidence of genetic enrichment for exceptional survival using a family approach: the Leiden Longevity Study // *Eur. J. Human Genet.: EJHG.* 2006. V. 14. № 1. P. 79–84.  
<https://doi.org/10.1038/SJ.EJHG.5201508>
  46. *Franceschi C., Bezrukov V., Blanché H. et al.* Genetics of healthy aging in Europe: the EU-integrated project GEHA (Genetics of Healthy Aging) // *Annals N.Y. Acad. Sci.* 2007. V. 1100. P. 21–45.  
<https://doi.org/10.1196/ANNALS.1395.003>
  47. UK Biobank // Accessed January 17, 2022.  
<https://www.ukbiobank.ac.uk/>
  48. *Bycroft C., Freeman C., Petkova D. et al.* The UK Biobank resource with deep phenotyping and genomic data // *Nature.* 2018. V. 562. № 7726. P. 203–209.  
<https://doi.org/10.1038/S41586-018-0579-Z>
  49. *Singh P.P., Demmitt B.A., Nath R.D., Brunet A.* The genetics of aging: A vertebrate perspective // *Cell.* 2019. V. 177. № 1. P. 200–220.  
<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2019.02.038>
  50. *Tam V., Patel N., Turcotte M. et al.* Benefits and limitations of genome-wide association studies // *Nat. Reviews Genet.* 2019. V. 20. № 8. P. 467–484.  
<https://doi.org/10.1038/S41576-019-0127-1>
  51. *Broer L., Buchman A.S., Deelen J. et al.* GWAS of longevity in CHARGE consortium confirms APOE and FOXO3 candidacy // *J. Gerontology. Series A. Biol.* 2015. V. 70. № 1. P. 110–118.  
<https://doi.org/10.1093/GERONA/GLU166>
  52. *Sebastiani P., Gurinovich A., Bae H. et al.* Four genome-wide association studies identify new extreme longevity variants // *J. Gerontology. Series A.* 2017. V. 72. № 11. P. 1453–1464.  
<https://doi.org/10.1093/GERONA/GLX027>
  53. *Deelen J., Evans D.S., Arking D.E. et al.* A meta-analysis of genome-wide association studies identifies multiple longevity genes // *Nat. Communications.* 2019. V. 10. № 1. P. 3669.  
<https://doi.org/10.1038/S41467-019-11558-2>
  54. *Timmers P.R.H.J., Mounier N., Lall K. et al.* Genomics of 1 million parent lifespans implicates novel pathways and common diseases and distinguishes survival chances // *eLife.* 2019. V. 8. P. 1–40.  
<https://doi.org/10.7554/ELIFE.39856>
  55. *Zeng Y., Nie C., Min J. et al.* Novel loci and pathways significantly associated with longevity // *Sci. Reports.* 2016. V. 6. № 1. P. 1–13.  
<https://doi.org/10.1038/srep21243>
  56. *Schächter F., Faure-Delanef L., Guénot F. et al.* Genetic associations with human longevity at the APOE and ACE loci // *Nat. Genet.* 1994. V. 6. № 1. P. 29–32.  
<https://doi.org/10.1038/NG0194-29>
  57. *Nebel A., Kleindorp R., Caliebe A. et al.* A genome-wide association study confirms APOE as the major gene influencing survival in long-lived individuals // *Mechan. Ageing and Development.* 2011. V. 132. № 6–7. P. 324–330.  
<https://doi.org/10.1016/J.MAD.2011.06.008>
  58. *Sebastiani P., Solovieff N., DeWan A.T. et al.* Genetic signatures of exceptional longevity in humans // *PLoS One.* 2012. V. 7(1). P. 29848.  
<https://doi.org/10.1371/J.PONE.0029848>
  59. *Fortney K., Dobriban E., Garagnani P. et al.* Genome-wide scan informed by age-related disease identifies loci for exceptional human longevity // *PLoS Genet.* 2015. V. 11. № 12. P. 1005728.  
<https://doi.org/10.1371/J.PGEN.1005728>
  60. *Willcox B.J., Donlon T.A., He Q. et al.* FOXO3A genotype is strongly associated with human longevity // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. № 37.

- P. 13987–13992.  
<https://doi.org/10.1073/PNAS.0801030105>
61. *Flachsbart F., Caliebe A., Kleindorp R. et al.* Association of FOXO3A variation with human longevity confirmed in German centenarians // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. № 8. P. 2700–2705.  
<https://doi.org/10.1073/PNAS.0809594106>
  62. *Deelen J., Beekman M., Uh H.W. et al.* Genome-wide association meta-analysis of human longevity identifies a novel locus conferring survival beyond 90 years of age // *Human Mol. Genet.* 2014. V. 23. № 16. P. 4420–4432.  
<https://doi.org/10.1093/HMG/DDU139>
  63. *Grigorenko A.P., Rogaev E.I.* Molecular basics of Alzheimer's disease // *Mol. Biol. (Mosk)*. 2007. V. 41. № 2. P. 331–345.
  64. *Jansen I.E., Savage J.E., Watanabe K. et al.* Genome-wide meta-analysis identifies new loci and functional pathways influencing Alzheimer's disease risk // *Nat. Genet.* 2019. V. 51. № 3. P. 404–413.  
<https://doi.org/10.1038/S41588-018-0311-9>
  65. *Nazarian A., Yashin A.I., Kulminski A.M.* Genome-wide analysis of genetic predisposition to Alzheimer's disease and related sex disparities // *Alzheimer's Research & Therapy*. 2019. V. 11. № 1. P. 1–21.  
<https://doi.org/10.1186/S13195-018-0458-8>
  66. *Belloy M.E., Napolioni V., Greicius M.D.* A quarter century of APOE and Alzheimer's disease: Progress to date and the path forward // *Neuron*. 2019. V. 101. № 5. P. 820–838.  
<https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2019.01.056/AT-TACHMENT/94962C95-67CC-4051-B978-EB6CC-1549F9F/MMC1.PDF>
  67. *Nikpay M., Goel A., Won H.H. et al.* A comprehensive 1000 Genomes-based genome-wide association meta-analysis of coronary artery disease // *Nat. Genet.* 2015. V. 47. № 10. P. 1121–1130.  
<https://doi.org/10.1038/NG.3396>
  68. *Martínez-Martínez A.B., Torres-Perez E., Devanney N. et al.* Beyond the CNS: The many peripheral roles of APOE // *Neurobiol. Disease*. 2020. V. 138. P. 104809.  
<https://doi.org/10.1016/J.NBD.2020.104809>
  69. *Yu C.E., Seltman H., Peskind E.R. et al.* Comprehensive analysis of APOE and selected proximate markers for late-onset Alzheimer's disease: Patterns of linkage disequilibrium and disease/marker association // *Genomics*. 2007. V. 89. № 6. P. 655–665.  
<https://doi.org/10.1016/J.YGENO.2007.02.002>
  70. *Michailidou K., Lindström S., Dennis J. et al.* Association analysis identifies 65 new breast cancer risk loci // *Nature*. 2017. V. 551. № 7678. P. 92–94.  
<https://doi.org/10.1038/NATURE24284>
  71. *Schumacher F.R., al Olama A.A., Berndt S.I. et al.* Association analyses of more than 140,000 men identify 63 new prostate cancer susceptibility loci // *Nat. Genet.* 2018. V. 50. № 7. P. 928–936.  
<https://doi.org/10.1038/S41588-018-0142-8>
  72. *Lehtinen M.K., Yuan Z., Boag P.R. et al.* A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span // *Cell*. 2006. V. 125. № 5. P. 987–1001.  
<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.03.046/AT-TACHMENT/AFB5FB68-86C5-49B3-A311-F9E8-A52E81DE/MMC1.PDF>
  73. *Fasano C., Disciglio V., Bertora S. et al.* FOXO3a from the nucleus to the mitochondria: A round trip in cellular stress response // *Cells*. 2019. V. 8. № 9. P. 1110.  
<https://doi.org/10.3390/CELLS8091110>
  74. *Anselmi C.V., Malovini A., Roncarati R. et al.* Association of the FOXO3A locus with extreme longevity in a southern Italian centenarian study // *Rejuvenation Res.* 2009. V. 12. № 2. P. 95–103.  
<https://doi.org/10.1089/REJ.2008.0827>
  75. *Soerensen M., Nygaard M., Dato S. et al.* Association study of FOXO3A SNPs and aging phenotypes in Danish oldest-old individuals // *Aging Cell*. 2015. V. 14. № 1. P. 60–66.  
<https://doi.org/10.1111/ACEL.12295>
  76. *Tesi N., van der Lee S.J., Hulsman M. et al.* Polygenic risk score of longevity predicts longer survival across an age continuum // *J. Gerontology. Series A*. 2021. V. 76. № 5. P. 750–759.  
<https://doi.org/10.1093/GERONA/GLAA289>
  77. *Pilling L.C., Kuo C.L., Sicinski K. et al.* Human longevity: 25 genetic loci associated in 389,166 UK biobank participants // *Aging*. 2017. V. 9. № 12. P. 2504–2520.  
<https://doi.org/10.18632/AGING.101334>
  78. *Zenin A., Tsepilov Y., Sharapov S. et al.* Identification of 12 genetic loci associated with human healthspan // *Communications Biol.* 2019. V. 2. № 1. P. 1–11.  
<https://doi.org/10.1038/s42003-019-0290-0>
  79. *Deboever C., Tanigawa Y., Lindholm M.E. et al.* Medical relevance of protein-truncating variants across 337,205 individuals in the UK Biobank study // *Nat. Communications*. 2018. V. 9. № 1. P. 1–10.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-03910-9>
  80. *Shindyapina A.V., Zenin A.A., Tarkhov A.E. et al.* Germline burden of rare damaging variants negatively affects human healthspan and lifespan // *eLife*. 2020. V. 9. P. 53449.  
<https://doi.org/10.7554/ELIFE.53449>
  81. *Ye K., Beekman M., Lameijer E.W. et al.* Aging as accelerated accumulation of somatic variants: whole-genome sequencing of centenarian and middle-aged monozygotic twin pairs // *Twin Res. Human Genet.* 2013. V. 16. № 6. P. 1026–1032.  
<https://doi.org/10.1017/THG.2013.73>
  82. *Torres G.G., Nygaard M., Caliebe A. et al.* Exome-wide association study identifies FN3KRP and PGP as new candidate longevity genes // *J. Gerontology. Series A*. 2021. V. 76. № 5. P. 786–795.  
<https://doi.org/10.1093/GERONA/GLAB023>
  83. *Shen S., Li C., Xiao L. et al.* Whole-genome sequencing of Chinese centenarians reveals important genetic variants in aging WGS of centenarian for genetic analysis of aging // *Hum. Genomics*. 2020. V. 14. № 1. P. 1–7.  
<https://doi.org/10.1186/S40246-020-00271-7/FIGURES/2>
  84. *Garagnani P., Marquis J., Delledonne M. et al.* Whole-genome sequencing analysis of semi-supercentenarians // *eLife*. 2021. V. 10. P. 57849.  
<https://doi.org/10.7554/ELIFE.57849>

85. *Giuliani C., Sazzini M., Pirazzini C. et al.* Impact of demography and population dynamics on the genetic architecture of human longevity // *Aging*. 2018. V. 10. № 8. P. 1947–1963.  
<https://doi.org/10.18632/AGING.101515>
86. *Melzer D., Pilling L.C., Ferrucci L.* The genetics of human ageing // *Nat. Rev. Genet.* 2019. V. 21. № 2. P. 88–101.  
<https://doi.org/10.1038/s41576-019-0183-6>
87. *Kimura K.D., Tissenbaum H.A., Liu Y., Ruvkun G.* daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans* // *Science (N.Y.)*. 1997. V. 277. № 5328. P. 942–946.  
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.277.5328.942>
88. *Kenyon C., Hase S.* Andragogy and heutigogy in postgraduate work // *Meeting the Challenges of Change in Postgraduate Higher Education*. London. Continuum Press, 2010.
89. *Mercken E.M., Crosby S.D., Lamming D.W. et al.* Calorie restriction in humans inhibits the PI3K/AKT pathway and induces a younger transcription profile // *Aging Cell*. 2013. V. 12. № 4. P. 645–651.  
<https://doi.org/10.1111/ACEL.12088>
90. *Kenyon C.* The plasticity of aging: Insights from long-lived mutants // *Cell*. 2005. V. 120. № 4. P. 449–460.  
<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2005.02.002>
91. *Gui T., Burgering B.M.T., Burgering B.M.T., Gui T.* FOXOs: masters of the equilibrium // *FEBS J. Publ. online*. 2021.  
<https://doi.org/10.1111/FEBS.16221>
92. *Calabrese E.J., Agathokleous E., Kapoor R. et al.* Metformin-enhances resilience via hormesis // *Ageing Res. Rev.* 2021. V. 71.  
<https://doi.org/10.1016/J.ARR.2021.101418>
93. *Kulkarni A.S., Gubbi S., Barzilai N.* Benefits of metformin in attenuating the hallmarks of aging // *Cell Metabolism*. 2020. V. 32. № 1. P. 15–30.  
<https://doi.org/10.1016/J.CMET.2020.04.001>
94. *Bulut O., Kilic G., Domínguez-Andrés J.* Immune memory in aging: A wide perspective covering microbiota, brain, metabolism, and epigenetics // *Clin. Rev. Allergy & Immunol.* 2021. V. 1. P. 1–31.  
<https://doi.org/10.1007/S12016-021-08905-X>
95. *Ziv Y., Ron N., Butovsky O. et al.* Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood // *Nat. Neuroscience*. 2006. V. 9. № 2. P. 268–275.  
<https://doi.org/10.1038/nn1629>
96. *Prinz M., Jung S., Priller J.* Microglia biology: One century of evolving concepts // *Cell*. 2019. V. 179. № 2. P. 292–311.  
<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2019.08.053>
97. *Moskalev A., Stambler I., Caruso C.* Innate and adaptive immunity in aging and longevity: the foundation of resilience // *Aging and Disease*. 2020. V. 11. № 6. P. 1363–1373.  
<https://doi.org/10.14336/AD.2020.0603>
98. *Thomas R., Wang W., Su D.M.* Contributions of age-related thymic involution to immunosenescence and inflammaging // *Immunity & Ageing*. 2020. V. 17. № 1. P. 1–17.  
<https://doi.org/10.1186/S12979-020-0173-8>
99. *Thome J.J.C., Grinshpun B., Kumar B.V. et al.* Longterm maintenance of human naive T cells through in situ homeostasis in lymphoid tissue sites // *Sci. Immunology*. 2016. V. 1. № 6. P. 6506.  
<https://doi.org/10.1126/SCIIMMUNOL.AAH6506>
100. *Goronzy J.J., Weyand C.M.* Successful and maladaptive T cell aging // *Immunity*. 2017. V. 46. № 3. P. 364–378.  
<https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2017.03.010>
101. *Geiger H., de Haan G., Carolina Florian M.* The ageing haematopoietic stem cell compartment // *Nat. Rev. Immunology*. 2013. V. 13. № 5. P. 376–389.  
<https://doi.org/10.1038/NRI3433>
102. *Helbling P.M., Piñeiro-Yáñez E., Gerosa R. et al.* Global transcriptomic profiling of the bone marrow stromal microenvironment during postnatal development, aging, and inflammation // *Cell Reports*. 2019. V. 29. № 10. P. 3313–3330. e4.  
<https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2019.11.004>
103. *Almanzar N., Antony J., Baghel A.S. et al.* A single-cell transcriptomic atlas characterizes ageing tissues in the mouse // *Nature*. 2020. V. 583. № 7817. P. 590–595.  
<https://doi.org/10.1038/S41586-020-2496-1>
104. *Bian Z., Gong Y., Huang T. et al.* Deciphering human macrophage development at single-cell resolution // *Nature*. 2020. V. 582. № 7813. P. 571–576.  
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2316-7>
105. *Tabibian-Keissar H., Hazanov L., Schiby G. et al.* Aging affects B-cell antigen receptor repertoire diversity in primary and secondary lymphoid tissues // *Eur. J. Immunology*. 2016. V. 46. № 2. P. 480–492.  
<https://doi.org/10.1002/EJI.201545586>
106. *Cancro M.P.* B cells and aging: Gauging the interplay of generative, selective, and homeostatic events // *Immunol. Reviews*. 2005. V. 205. № 1. P. 48–59.  
<https://doi.org/10.1111/J.0105-2896.2005.00272.X>
107. *Williams G.T., Jolly C.J., Köhler J., Neuberger M.S.* The contribution of somatic hypermutation to the diversity of serum immunoglobulin: dramatic increase with age // *Immunity*. 2000. V. 13. № 3. P. 409–417.  
[https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)00040-6](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)00040-6)
108. *Macallan D.C., Wallace D.L., Zhang V. et al.* B-cell kinetics in humans: Rapid turnover of peripheral blood memory cells // *Blood*. 2005. V. 105. № 9. P. 3633–3640.  
<https://doi.org/10.1182/BLOOD-2004-09-3740>
109. *Aliseychik M., Patrikeev A., Gusev F. et al.* Dissection of the human T-cell receptor  $\gamma$  gene repertoire in the brain and peripheral blood identifies age- and Alzheimer's disease-associated clonotype profiles // *Frontiers Immunol.* 2020. V. 11. P. 12.  
<https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.00012/BIBTEX>
110. *Kim K., Wang X., Ragonnaud E. et al.* Therapeutic B-cell depletion reverses progression of Alzheimer's disease // *Nat. Communications*. 2021. V. 12. № 1. P. 1–11.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-22479-4>

111. *Elyahu Y., Hekselman I., Eizenberg-Magar I. et al.* Aging promotes reorganization of the CD4 T cell landscape toward extreme regulatory and effector phenotypes // *Sci. Adv.* 2019. V. 5. № 8. P. 8330. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw8330>
112. *Mogilenko D.A., Shchukina I., Artyomov M.N.* Immune ageing at single-cell resolution // *Nat. Rev. Immunology.* 2021. Publ. online. 2021. P. 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00646-4>
113. *Santoro A., Bientinesi E., Monti D.* Immunosenescence and inflammaging in the aging process: age-related diseases or longevity? // *Ageing Res. Rev.* 2021. V. 71. <https://doi.org/10.1016/J.ARR.2021.101422>
114. *Santos-Lozano A., Valenzuela P.L., Llaveró F. et al.* Successful aging: Insights from proteome analyses of healthy centenarians // *Aging.* 2020. V. 12. № 4. P. 3502–3515. <https://doi.org/10.18632/AGING.102826>
115. *Rubino G., Bulati M., Aiello A. et al.* Sicilian centenarian offspring are more resistant to immune ageing // *Aging Clin. Exp. Research.* 2018. V. 31. № 1. P. 125–133. <https://doi.org/10.1007/S40520-018-0936-7>
116. *Bucci L., Ostan R., Giampieri E. et al.* Immune parameters identify Italian centenarians with a longer five-year survival independent of their health and functional status // *Exp. Gerontology.* 2014. V. 54. P. 14–20. <https://doi.org/10.1016/J.EXGER.2014.01.023>
117. *Puca A.A., Ferrario A., Maciag A. et al.* Association of immunoglobulin GM allotypes with longevity in long-living individuals from Southern Italy // *Immunity and Ageing.* 2018. V. 15. № 1. P. 1–6. <https://doi.org/10.1186/S12979-018-0134-7/TABLES/4>
118. *Hashimoto K., Kouno T., Ikawa T. et al.* Single-cell transcriptomics reveals expansion of cytotoxic CD4 T cells in supercentenarians // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2019. V. 116. № 48. P. 24242–24251. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1907883116/-/DC-SUPPLEMENTAL>
119. *Britanova O.V., Shugay M., Merzlyak E.M. et al.* Dynamics of individual T cell repertoires: from cord blood to centenarians // *J. Immunology.* 2016. V. 196. № 12. P. 5005–5013. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1600005/-/DC-SUPPLEMENTAL>
120. *Fulop T., Larbi A., Dupuis G. et al.* Immunosenescence and inflamm-aging as two sides of the same coin: Friends or Foes? // *Frontiers in Immunol.* 2018. V. 8. P. 1960. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.01960/BIBTEX>
121. Coronavirus – Todesfälle in Deutschland nach alter // Statista. Accessed January 17, 2022. <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/1104173/umfrage/todesfaelle-aufgrund-des-coronavirus-in-deutschland-nach-geschlecht/>
122. *Franceschi C., Garagnani P., Parini P. et al.* Inflammaging: A new immune-metabolic viewpoint for age-related diseases // *Nat. Rev. Endocrinology.* 2018. V. 14. № 10. P. 576–590. <https://doi.org/10.1038/S41574-018-0059-4>
123. *Lio D., Scola L., Giarratana R.M. et al.* SARS CoV2 infection \_The longevity study perspectives // *Ageing Res. Rev.* 2021. V. 67. <https://doi.org/10.1016/J.ARR.2021.101299>
124. *Abbatecola A.M., Antonelli-Incalzi R.* COVID-19 spiraling of frailty in older Italian patients // *J. Nutrition, Health & Aging.* 2020. V. 24. № 5. P. 453–455. <https://doi.org/10.1007/S12603-020-1357-9>
125. *di Bona D., Vasto S., Capurso C. et al.* Effect of interleukin-6 polymorphisms on human longevity: A systematic review and meta-analysis // *Ageing Res. Rev.* 2009. V. 8. № 1. P. 36–42. <https://doi.org/10.1016/J.ARR.2008.09.001>
126. *Hook M., Roy S., Williams E.G. et al.* Genetic cartography of longevity in humans and mice: Current landscape and horizons // *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Mol. Basis Disease.* 2018. V. 1864. № 9. P. 2718–2732. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2018.01.026>
127. *Scola L., Giarratana R.M., Torre S. et al.* On the road to accurate biomarkers for cardiometabolic diseases by integrating precision and gender medicine approaches // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 23. <https://doi.org/10.3390/IJMS20236015>
128. *Balistreri C.R.* Anti-inflamm-aging and/or anti-age-related disease emerging treatments: A historical alchemy or revolutionary effective procedures? // *Mediators Inflammation.* 2018. V. 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/3705389>
129. *Liu G.H., Bao Y., Qu J. et al.* Aging Atlas: A multi-omics database for aging biology // *Nucl. Acids Res.* 2021. V. 49. № 1. P. D825–D830. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA894>
130. *Hühne R., Thalheim T., Sühnel J.* AgeFactDB – the JenAge ageing factor database – towards data integration in ageing research // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. № 1. P. D892–6. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1073>
131. *Craig T., Smelick C., Takymy P. et al.* The digital ageing atlas: Integrating the diversity of age-related changes into a unified resource // *Nucl. Acids Res.* 2015. V. 43. № 1. P. D873–D878. <https://doi.org/10.1093/nar/gku843>
132. *Li Z., Zhang Z., Ren Y. et al.* Aging and age-related diseases: From mechanisms to therapeutic strategies // *Biogerontology.* 2021. V. 22(2). P. 165–187. <https://doi.org/10.1007/S10522-021-09910-5>
133. *Ibáñez-Cabellos J.S., Seco-Cervera M., Picher-Latorre C. et al.* Acute depletion of telomerase components DKC1 and NOP10 induces oxidative stress and disrupts ribosomal biogenesis via NPM1 and activation of the P53 pathway // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Research.* 2020. V. 1867(12). <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2020.118845>
134. *Carrillo J., González A., Manguán-García C. et al.* p53 pathway activation by telomere attrition in X-DC primary fibroblasts occurs in the absence of ribosome biogenesis failure and as a consequence of DNA damage // *Clin. Transl. Oncol.* 2014. V. 16(6). P. 529–538. <https://doi.org/10.1007/S12094-013-1112-3>

135. Forsberg K.J., Reyes A., Wang B. et al. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens // *Science*. 2012. V. 337(6098). P. 1107–1111. [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1220761/SUPPL\\_FILE/FORSBERG-SOM.REVISION.1.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1220761/SUPPL_FILE/FORSBERG-SOM.REVISION.1.PDF)
136. Faggioli F., Wang T., Vijg J., Montagna C. Chromosome-specific accumulation of aneuploidy in the aging mouse brain // *Human Mol. Genet.* 2012. V. 21(24). P. 5246–5253. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDS375>
137. Laurie C.C., Laurie C.A., Rice K. et al. Detectable clonal mosaicism from birth to old age and its relationship to cancer // *Nat. Genet.* 2012. V. 44(6). P. 642–650. <https://doi.org/10.1038/ng.2271>
138. Goulielmaki E., Ioannidou A., Tsekrekou M. et al. Tissue-infiltrating macrophages mediate an exosome-based metabolic reprogramming upon DNA damage // *Nat. Communications*. 2020. V. 11(1). P. 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13894-9>
139. Kim H.N., Chang J., Shao L. et al. DNA damage and senescence in osteoprogenitors expressing *Osx1* may cause their decrease with age // *Aging Cell*. 2017. V. 16(4). P. 693–703. <https://doi.org/10.1111/ACEL.12597>
140. Shanbhag N.M., Evans M.D., Mao W. et al. Early neuronal accumulation of DNA double strand breaks in Alzheimer's disease // *Acta Neuropathol. Communications*. 2019. V. 7(1). P. 1–18. <https://doi.org/10.1186/S40478-019-0723-5>
141. Milholland B., Dong X., Zhang L. et al. Differences between germline and somatic mutation rates in humans and mice // *Nat. Communications*. 2017. V. 8(1). P. 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms15183>
142. Vijg J., Suh Y. Genome instability and aging // *Annual Rev. Physiology*. 2013. V. 75. P. 645–668. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHYSIOL-030212-183715>
143. Yu G., Hyun S. Proteostasis-associated aging: lessons from a *Drosophila* model // *Genes & Genomics*. 2021. V. 43(1). <https://doi.org/10.1007/S13258-020-01012-9>
144. Goodell M.A., Rando T.A. Stem cells and healthy aging // *Science (N.Y.)*. 2015. V. 350(6265). P. 1199–1204. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAB3388>
145. Sturm Á., Ivics Z., Vellai T. The mechanism of ageing: Primary role of transposable elements in genome disintegration // *Cell. Mol. Life Sciences: CMLS*. 2015. V. 72(10). P. 1839–1847. <https://doi.org/10.1007/S00018-015-1896-0>
146. Pomatto L.C.D., Davies K.J.A. Adaptive homeostasis and the free radical theory of ageing // *Free Radical Biol. & Med.* 2018. V. 124. P. 420–430. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2018.06.016>
147. Saul D., Kosinsky R.L. Epigenetics of aging and aging-associated diseases // *Intern. J. Mol. Sciences*. 2021. V. 22(1). P. 1–25. <https://doi.org/10.3390/IJMS22010401>
148. di Micco R., Krizhanovsky V., Baker D., d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence in ageing: From mechanisms to therapeutic opportunities // *Nat. Rev. Mol. Cell Biology*. 2020. V. 22(2). P. 75–95. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00314-w>
149. Salminen A., Kauppinen A., Hiltunen M., Kaarniranta K. Krebs cycle intermediates regulate DNA and histone methylation: epigenetic impact on the aging process // *Ageing Res. Rev.* 2014. V. 16(1). P. 45–65. <https://doi.org/10.1016/J.ARR.2014.05.004>
150. Fontana L., Partridge L., Longo V.D. Extending healthy life span—from yeast to humans // *Science (N.Y.)*. 2010. V. 328(5976). P. 321–326. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1172539>
151. Raucci A., Vinci M.C., Rysz J. et al. Ageing, age-related cardiovascular risk and the beneficial role of natural components intake // *Intern. J. Mol. Sciences*. 2021. V. 23(1). P. 183. <https://doi.org/10.3390/IJMS23010183>
152. Fernandes S.A., Demetriades C. The multifaceted role of nutrient sensing and mTORC1 signaling in physiology and aging // *Frontiers Aging*. 2021. V. 2. P. 38. <https://doi.org/10.3389/FRAGI.2021.707372>
153. González A., Hall M.N., Lin S.C., Hardie D.G. AMPK and TOR: The yin and yang of cellular nutrient sensing and growth control // *Cell Metabolism*. 2020. V. 31(3). P. 472–492. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2020.01.015>
154. Pignatti C., D'adamo S., Stefanelli C. et al. Nutrients and pathways that regulate health span and life span // *Geriatrics (Basel, Switzerland)*. 2020. V. 5(4). P. 1–28. <https://doi.org/10.3390/GERIATRICS5040095>
155. Johnson S.C. Nutrient sensing, signaling and ageing: The role of IGF-1 and mTOR in ageing and age-related disease // *Sub-cell. Biochemistry*. 2018. V. 90. P. 49–97. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-2835-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-981-13-2835-0_3)
156. Deprez M.A., Eskes E., Winderickx J., Wilms T. The TORC1-Sch9 pathway as a crucial mediator of chronological lifespan in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *FEMS Yeast Research*. 2018. V. 18(5). P. 48. <https://doi.org/10.1093/FEMSYR/FOY048>
157. Kumar S., Dietrich N., Kornfeld K. Angiotensin Converting Enzyme (ACE) inhibitor extends *Caenorhabditis elegans* life span // *PLoS Genetics*. 2016. V. 12(2). P. e1005866. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1005866>
158. Müthel S., Tursun B. Epigenetic chaperoning of aging // *Aging*. 2020. V. 12(2). P. 1044–1046. <https://doi.org/10.18632/AGING.102808>
159. Mitchell S.J., Scheibye-Knudsen M., Longo D.L., de Cabo R. Animal models of aging research: Implications for human aging and age-related diseases // *Annual Rev. Animal Biosciences*. 2015. V. 3. P. 283–303. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ANIMAL-022114-110829>

## Current Trends and Approaches in Search of Genetic Determinants of Aging and Longevity

S. S. Kunizheva<sup>a, b, c, \*</sup>, V. P. Volobaev<sup>a</sup>, M. Yu. Plotnikova<sup>a, b</sup>, D. A. Kupriyanova<sup>a</sup>,  
I. L. Kuznetsova<sup>a, c</sup>, T. V. Tyazhelova<sup>c</sup>, and E. I. Rogaev<sup>a, b, c, d</sup>

<sup>a</sup>*Sirius University of Science and Technology, Center for Genetics and Life Science, Sochi, 354340 Russia*

<sup>b</sup>*Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

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

<sup>d</sup>*UMass Chan Medical School, Department of Psychiatry, Shrewsbury, MA 01545 USA*

\**e-mail: kunizheva@gmail.com*

Aging is a natural process of extinction of the organism and the main aspect determining the life expectancy for individuals who have survived to the post-productive period. Aging is accompanied by a host of physiological, immune and metabolic changes in the body, as well as the development of age-related diseases. It is estimated that about 25–30 percent of the variation in human lifespan is determined by genetics. Extensive research in model organisms has identified a few genes and conserved genetic pathways that affect longevity. The key question remains to what extent these data can be extrapolated for humans. New genetic technology have significantly expanded the possibilities for searching for genetic factors of human life expectancy, metabolic pathways of aging, interaction of genes and transcription factors, regulation of gene expression at the level of transcription and epigenetic modifications. The present review provides an overview of the modern research and current strategies for genetic basis of human aging and longevity: by both candidate-gene studies and GWAS approaches, some of the immunogenetics aspects of aging, as well as genomic studies to identify factors of “healthy aging”. Understanding the genetic mechanisms that underlie aging and the possibility of their regulation will serve as the basis for the development of comprehensive measures to achieve healthy longevity.

**Keywords:** aging, genetic factors of longevity, centenarians, NGS, model organisms, immunogenetics, GWAS.

## КЛИМАТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ И ВСТРЕЧАЕМОСТЬ АЛЛЕЛЕЙ ЛОКУСОВ *Amy 1* И *Amy 2* В КУЛЬТУРЕ ЯРОВОГО ЯЧМЕНЯ НА ТЕРРИТОРИИ БЫВШЕГО СССР

© 2022 г. В. П. Нецветаев<sup>1, \*</sup>, А. А. Поморцев<sup>2, \*\*</sup>

<sup>1</sup>Белгородский федеральный аграрный научный центр Российской академии наук, Белгород, 308001 Россия

<sup>2</sup>Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

\*e-mail: v.netsvetaev@yandex.ru

\*\*e-mail: pomortsev@vigg.ru

Поступила в редакцию 02.12.2021 г.

После доработки 09.02.2022 г.

Принята к публикации 22.02.2022 г.

Изоферменты альфа-амилазы у ячменя контролируются локусами *Amy 1* и *Amy 2*, расположенными в хромосомах 6 и 1 (=6Н и 7Н) соответственно. Анализ сортов ярового ячменя, возделывавшихся на территории бывшего СССР до 1993 г., показал распространение среди них 11 аллелей по локусу *Amy 1* и четыре аллеля по *Amy 2*. Встречаемость их носила не случайный характер. Наибольшее распространение имели аллели *Amy 1.1* и *Amy 2.1*. Сочетание данных аллелей у сортов составило  $44.6 \pm 2.9\%$ . Следующие по величинам встречаемости были сочетания *Amy 1.5* с *Amy 2.1*, составившие  $10.9 \pm 2.2\%$  и *Amy 1.4* с *Amy 2.1* –  $10.4 \pm 2.1\%$ . Исследовалось распространение аллелей локусов *Amy 1* и *Amy 2* у сортов, районированных по 25 провинциям СССР, отличающихся климатическими характеристиками. Установлено, что аллели *Amy 1.1* и *Amy 1.3* показали положительную связь с повышенными температурами, но отрицательную с влагообеспеченностью. Напротив, аллели *Amy 1.4* и *Amy 1.6* продемонстрировали отрицательную реакцию на высокую температуру, но положительную на влагообеспеченность. Анализ распространения аллелей локуса *Amy 2* показал, что с аридными условиями внешней среды связан аллель *Amy 2.2*. Аллель *Amy 2.1*, наоборот, приурочен к регионам с хорошей влагообеспеченностью и без экстремальных высоких температур. Континентальность не играла значительной роли в распространении аллелей данных локусов. В результате, в направлении с севера на юг встречаемость аллеля *Amy 1.1* увеличивалась. Так, если в северных широтах европейской части она составляла 27–31%, то в степных южных районах частота аллеля *Amy 1.1* увеличивалась до 78–85%. В направлении с запада на восток такой четкой динамики не прослеживалось. Во встречаемости аллеля *Amy 1.2* обнаружена аналогичная картина. Распространение аллеля *Amy 2.1* уменьшалось с севера на юг. Наоборот, частота другого аллеля – *Amy 2.2* в этом направлении среди районированных сортов ярового ячменя увеличивалась с 7–12 до 15–38%. Характерно, что аллель *Amy 1.1* обуславливает устойчивость к повышенным температурным значениям и недостатку влаги, а аллель *Amy 2.1* – способствует положительному ответу на хорошую влагообеспеченность при отсутствии экстремальных высоких температур. Сочетание данных генетических факторов обуславливает наибольшее распространение по территории возделывания ярового ячменя.

**Ключевые слова:** яровой ячмень, изоферменты альфа-амилазы, климатические факторы, частоты аллелей, распространение по регионам.

**DOI:** 10.31857/S0016675822120098

Территория бывшего СССР, составлявшая шестую часть суши, характеризуется значительным разнообразием климатических параметров. В связи с этим, распространение отдельных сортов культурных растений ограничено по территории, оно основано на районировании их по регионам. Зная генетическую структуру каждого сорта, климатические особенности района их возделывания можно оценить динамику распространения тех или иных аллелей локусов, контролирующих от-

дельные ферменты. Это дает возможность определить, какие компоненты климата определяют отбор наследственных вариантов, обуславливающих адаптацию генотипа к условиям внешней среды. Данный подход, реализованный ранее при исследовании бета-амилазы [1] показал, что повышенная активность этого фермента характерна для форм, лучше адаптированных к аридным условиям среды. Характерно, что амилазная активность зависит от типа изоферментов бета-

амилазы и вариантного состава гордеинов [2]. Соответственно, была установлена геногеография распространения аллелей бета-амилазного локуса *Amy 1* в культуре ярового ячменя [3]. Учитывая функциональную близость бета- и альфа-амилаз исследовали характер распространения аллелей альфа-амилазных локусов *Amy 1* и *Amy 2* у ячменя а также значение отдельных климатических показателей как факторов, влияющих на адаптацию к тем или иным условиям среды.

Используя дополненные пшенично-ячменные линии и изофокусирование этого фермента, А.Н.Д. Brownand и J.V. Jacobsen [4] показали, что за  $\alpha$ -амилазу I ответственна хромосома 1, а за  $\alpha$ -амилазу II – хромосома 6 ячменя. Ранее [5] было установлено положение локуса *Amy 1* на хромосоме 6 ячменя относительно генов *o* и  $x_n$ . На обобщенной генетической карте хромосомы 6Н [6] представлено место ориентации данного локуса к известным генетическим факторам. Последующее исследование [7] уточнило положение локуса *Amy 1* в этой группе сцепления. Он расположен в длинном плече хромосомы 6 на расстоянии  $18.9 \pm 4.9\%$  рекомбинации от гена *sex 1* дистально. Второй локус *Amy 2* ориентирован относительно молекулярных маркеров в длинном плече хромосомы 1 вблизи центромеры [8]. Он показал независимое наследование с локусом *Est 5*, но показал сцепление величиной  $21.9 \pm 8.7\%$  рекомбинации с геном *n* в длинном плече хромосомы 1 [9].

Настоящая работа посвящена исследованию закономерностей распространения аллелей локусов, контролирующих альфа-амилазу в сортах ячменя, допущенных к использованию на территории бывшего СССР, и роль факторов среды, способствующих закреплению определенных генотипов ярового ячменя на исследуемой территории.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С целью изучения закономерностей распространения аллелей альфа-амилазных локусов исследовали более 200 сортов ярового ячменя, районированных по территории бывшего СССР с 1929 по 1993 гг. В качестве территориальных единиц наблюдения нами были приняты 25 природно-сельскохозяйственных провинций (далее – провинции), входящих в систему природно-сельскохозяйственного районирования территории страны [10]. Природно-сельскохозяйственная провинция представляла собой часть зоны, характеризующейся биологически важными особенностями почвенного покрова, связанными с макроклиматом и его режимом в годовом цикле. Провинции различались величинами гидротермического и пищевого режима почв и по основным агроклиматическим показателям (континентальность климата, тепло- и влагообеспеченность вегетационного периода и т.д.).

Состав сортов в пределах провинции определяли по каталогам районированных сортов сельскохозяйственных культур Государственной комиссии по сортоиспытанию. Если сорт был районирован в нескольких провинциях, то он учитывался в каждой из них. Частоты рассчитывались из условий: сумма частот всех аллелей одного локуса в провинции равнялась 1. Если сорта имели по одному аллелю, то их количество составляло число наблюдений. Ошибки оценки частот генов определяли в зависимости от того, сколько аллелей имеет исследуемый генетический фактор. Для диаллельного распределения использовали известные формулы, описанные П.Ф. Рокицким [11]. При множественном аллелизме пользовались формулами, предложенными Ч. Ли [12]. Расчет доли вкладов климатических факторов во встречаемость аллелей вычисляли на основе известных статистических зависимостей [13].

Зерно, предназначенное для электрофоретического анализа  $\alpha$ -амилазы, проращивали в темноте при 20°C в течение 5–7 суток. Для экстракции фермента проросшую зерновку освобождали от пленок, помещали в толстостенную стеклянную пробирку, заливали раствором, содержащим 0.2% хлористого кальция с 20%-ной сахарозой и 0.03% бромфенолового синего. После измельчения эндосперма палочкой из стекла или нержавеющей стали, суспензию настаивали 1 ч при комнатной температуре. После центрифугирования надосадочную жидкость использовали для электрофореза. Электрофоретическое разделение  $\alpha$ -амилаз и выявление его изоферментного состава проводили по прописи В.П. Нецветаева [14]. Для инактивации  $\beta$ -амилазы в гель вводили 5 М мочевины. Для оценки сцепления использовали тест  $\chi^2$  [15].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Перечень сортов ярового ячменя и их аллельный состав по локусам *Amy 1* и *Amy 2* представлен в табл. 1. Как видно, среди представленного набора сортов наиболее часто встречались аллели *Amy 1.1* (48.0%) и *Amy 2.1* (86.1%) данных локусов. Характерно, что сочетание этих аллелей также доминировало и составляло 44.6%. Остальные аллели и их сочетания встречались значительно реже. Изоферментный состав альфа-амилазы некоторых сортов ячменя представлен на рис. 1. Обобщенная схема изображения зимотипов, контролируемых локусами *Amy 1* и *Amy 2*, представлена на рис. 2.

Если допустить, что сочетания аллелей локусов *Amy 1* и *Amy 2* носят случайный характер, то встречаемость генотипов, несущих сочетания аллелей *Amy 1.1 Amy 2.1 : Amy 1.1 Amy 2.? : Amy 1.?*

Таблица 1. Встречаемость аллелей локусов *Amy* у ярового ячменя

Сорта	Аллели локусов		Встречаемость, <i>n</i> / <i>%</i>
	<i>Amy</i> 1	<i>Amy</i> 2	
Аг-Арпа, Амурский местн. (6488 СНИИС), Армавирский 593 (к-16856), Белорусский 18, Верхняцкий 8 (к-17265), Винер, Викинг, Вятский 6040 (к-15747), Ганна Педигри (к-17046), Деснянский 8, Джорджи, Докучаевский 1 (к-22018), Донецкий 4, Донецкий 591 (к-16067), Донецкий 8, Донецкий 9, Дружба, Енисей, Зефир, Золотой, Кедр, Кинельский 5, Красноярский 80, Красноярский 1, Круглик (к-13031), Крымский 17 (к-14896), Крымский 301 (к-16957), Кубанец (к-16860), Кучесевский (к-16944), Лениноканский 6151, Медикум 46, Медикум 8995, Минский, Московский 121, Московский 3, Надя, Нарын 27, Новоомский, Носовский 9, Нутанс 106, Нутанс 115, Нутанс 187, Нутанс 244, Нутанс 27, Нутанс 3228, Нутанс 45, Нутанс 518, Нутанс 778, Нутанс 8/71, Нутанс 970, Нюрбинский, Одесский 18, Одесский 14, Одесский 69, Одесский 82, Олимпиаец, Омский 11464 (к-18033), Омский 13709, Омский 80, Онохойский 566 (к-16626), Паллидум 32, Паллидум 43 (к-11834), Паллидум 45 (к-11856), Полярный 14, Примус 2, Прекоцеус 143 (к-734), Прикумский 14, Прикумский 22, Рассвет, Ростовский 27, Славутич, Спартан 2, Субмедикум 199 (к-16953), Таловский, Торх, Уманский (к-16889), Фаворит, Харьковский 306, Целинный 5, Червонец (Красноярск), Черкасский 240, Черноморец, Algerian, CarlsbergII, DoubletxxxHORDq, Durani, Goldfoil, Hanna, LongGlumes, Manchuria	1	1	90/44.6 ± 3.5
Зерноградский 73, Краснодарский 35, Одесский 36, Одесский 70, Паллидум 394, Первенец (ВСГИ)	1	2	6/2.9 ± 1.2
Оренбургский 35	1	3	1/0.5 ± 0.5
Казанский 6/4 (к-16877), Каскал, Носовский 2 (к-19016), Носовский 6 (к-19828), Одесский 100, Приморский 89, Роланд (ГДР), Сувенир, Темп, Уманский (32-28), Харьковский 70, Цивильский, Черниговский 7	2	1	13/6.4 ± 1.7
Омский 10664 (к-16634)	2	2	1/0.5 ± 0.5
Харьковский 67	2	3	1/0.5 ± 0.5
Белогорский, ДжауБапуст (к-16638), Днепровский 425, Зазерский 85, Комбайнер, Нахчиванданы (к-13248), Невский, Устимовский	3	1	8/4.0 ± 1.4
Донецкий 650, Донецкий 6, Узбекский	3	2	3/1.4 ± 0.8
Одесский 111, Треби (к-11835)	3	3	2/1.0 ± 0.7
Айхал, Ауксиняя III, Ахалтесли местн. (к-17828), Вайрогс (к-16903), Винницкий 3 (к-21784), Ганна Лоосдорфская (к-16483), Дзинтарс (к-16897), Домен, Заларинец, Красноуфимский 95, Лиман (=Ильмен), Майя (к-16904), Малахит, Неван, Неполегающий, Паллидум 18, Приишимский, Север 1, Торос, Isagia, Miina	4	1	21/10.4 ± 2.1
Байшешек, Пирка	4	2	2/1.0 ± 0.7
Отра, Северный, Тамми	4	3	3/1.4 ± 0.8
Ауксиняя II, Вальтицкий (к-17042), Викинг, Винницкий 7, Винницкий 128 (к-21785), Гинтариняя, Данубия Аккермана (к-11885), Дворан, Домен (к-19009), Жодинский 5, Зерноградский 86, Ида, Йыгева (к-18070), Каштички (к-17039), Криничный, Медикум 85, Московский 2, Немчиновский (к-19379), Обской, Триумф, Харьковский 74, Esme	5	1	22/10.9 ± 2.2
Харджау местн. (к-16905)	5	2	1/0.5 ± 0.5
Днепровский 435	5	3	1/0.5 ± 0.5

Таблица 1. Окончание

Сорта	Аллели локусов		Встречаемость, n/%
	<i>Amy 1</i>	<i>Amy 2</i>	
Анталец, Вестник, Грушевский (к-11858), Европеум 353/133, Ильмен, Луч, Отличник 5, Сысольский 95, Тоомас, Vairogs	6	1	10/4.9 ± 1.5
Варде, Приекульский 1	6	2	2/1.0 ± 0.7
Тулунский 283 (к-17030)	6	3	1/0.5 ± 0.5
Агул 2, Безенчукский, Джюгай (к-16928), Нарымчанин, Уссурийский 8 (к-18334), ClubMariout (к-15422)	7	1	6/3.0 ± 1.2
ДжауСафедак (д. 1), ДжауСафедак (д. 10)	7	4	2/1.0 ± 0.7
Боратинский	9	1	1/0.5 ± 0.5
ДжауКабутак (д. 8)	10	4	1/0.5 ± 0.5
ДжауКабутак (д. 12)	11	4	1/0.5 ± 0.5
Агул, Альза, Амурский местн. (к-17033), Одесский 9	12	1	3/1.4 ± 0.8

Таблица 2. Оценка встречаемости сочетаний аллелей локусов *Amy 1* и *Amy 2* среди районированных сортов ярового ячменя

Сочетания аллелей локусов <i>Amy</i> , количество сортов				Выборка	$\chi^2_{1:1:1}$	$\chi^2_L$
<i>Amy 1.1 Amy 2.1</i>	<i>Amy 1.1 Amy 2.?</i>	<i>Amy 1.?</i> <i>Amy 2.1</i>	<i>Amy 1.?</i> <i>Amy 2.?</i>			
90	7	84	21	202	107.82	1.98

*Amy 2.1 : Amy 1. ? Amy 2. ?* должно быть близко к соотношению 1 : 1 : 1. Фактическая численность данных сочетаний составила 90 : 7 : 84 : 21 (табл. 2). Полученные оценки  $\chi^2$  свидетельствует о том, что представленная встречаемость не связана со сцеплением ( $\chi^2_L = 1.98, P > 0.10$ ). Это подтверждает данные по локализации указанных генетических факторов в разных хромосомах. В то же время, представленное значение  $\chi^2_{1:1:1}$  свидетельствует о неслучайном сочетании аллелей в изученных сортах. Следовательно полученная диспропорция в

численности приведенных сочетаний аллелей может быть связана с избирательностью отбора в процессе селекции определенных генотипов.

В связи с этим исследовали распространение выявленных наследственных вариантов альфа-амилазы среди сортов, возделывавшихся на определенной территории. Результаты представлены в табл. 3. Из таблицы видно, что в целом, независимо от зон возделывания, в культуре ярового ячменя наиболее широко распространен аллель *Amy 1.1*. В то же время частота его в разных географических регионах варьировала от 27% (провинции

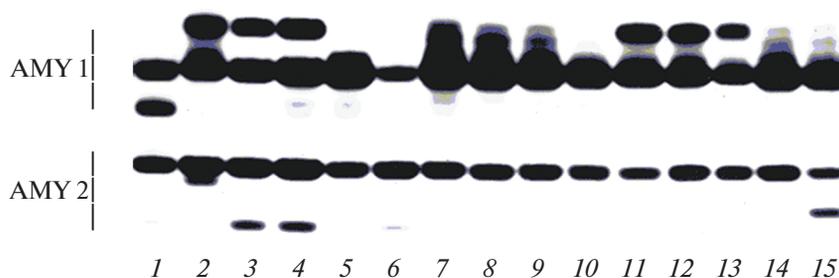


Рис. 1. Зимограммы  $\alpha$ -амилаз отдельных зерен различных образцов ярового ячменя и аллели, контролируемые эти изоферменты: 1 – *Amy 1*, 2 – *Amy 1.9* и *Amy 2.3*, 3 – *Amy 1.5* и *Amy 2.1*, 4 – *Amy 1.5* и *Amy 2.1*, 5 – *Amy 1.7*, 6 – *Amy 1.6* и *Amy 2.1*, 7 – *Amy 1.1*, 8 – *Amy 1.1*, 9 – *Amy 1.1*, 10 – *Amy 1.7*, 11 – *Amy 1.9*, 12 – *Amy 1.9*, 13 – *Amy 1.9*, 14 – *Amy 1.1*, 15 – *Amy 1.1* и *Amy 2.2*.

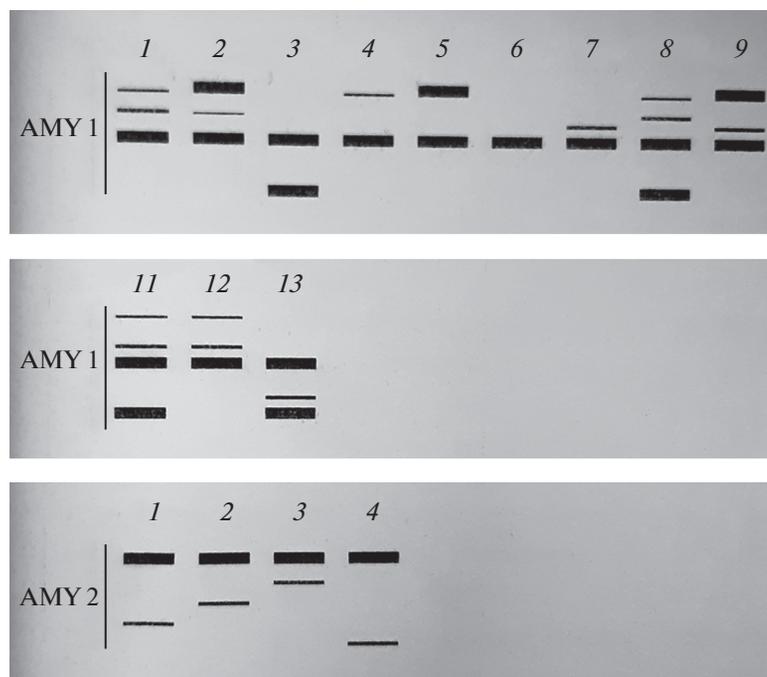


Рис. 2. Схема типов зимограмм альфа-амилазы, выявленных при исследовании ярового ячменя.

4-1 Прибалтийская, 4-7 Дальневосточно-Амуро-Уссурийская) до 100% (провинция 7-3 Заволжская). Различия существенны ( $t = 4.61, p > 0.99$ ). Характерно, что в направлении с севера на юг встречаемость данного аллеля увеличивалась. Так, если в северных широтах европейской части она составляла 27–31%, то в степных южных районах частота аллеля *Amy 1.1* увеличивалась до 78–85% (провинции 7-2 Манычской-Донская, 7-1 Южно-Украинская). Подобная закономерность наблюдалась и в азиатской части рассматриваемой территории. В направлении с запада на восток такой четкой динамики не прослеживалось. В отношении распространения аллеля *Amy 1.2* обнаружена аналогичная картина. Так, в более северных широтах (провинции 4-4 Западно-Сибирская, 4-1 Прибалтийская, 3-1 Европейская) частота фактора *Amy 1.2* выражалась величинами в 0–5%, в то время как в южных регионах (провинции 7-1 Южно-Украинская, 6-2 Предкавказская) встречаемость его колебалась в пределах 15–17%. Оценка климатических параметров, обуславливающих адаптивную ценность указанных аллелей в изученных географических регионах, показана в табл. 4. Как видно, встречаемость аллеля *Amy 1.1* как и *Amy 1.2* не существенно связана с континентальностью климата, то же характерно и для других аллелей данного локуса. В то же время, если частота фактора *Amy 1.1* показала отрицательную корреляцию с влажностью климата, то встречаемость аллеля *Amy 1.2* положительно коррелировала с этим показателем (табл. 4). Характерно, что в

отличие от фактора *Amy 1.1*, на распространение аллеля *Amy 1.2* не влияла температура окружающей среды. Встречаемость аллеля *Amy 1.3* положительно коррелировала с температурой и имела тенденцию к концентрации в южных широтах. Это сходно с реакцией на этот показатель такого фактора как *Amy 1.1*. Влияние других климатических характеристик регионов на отбор в пользу *Amy 1.3* незначителен. Совсем другой была реакция на внешнюю среду носителей аллелей *Amy 1.4* и *Amy 1.6*. Встречаемость их была отрицательно связана с температурой, но показала положительную корреляцию с влажностью климата и имела тенденцию к сосредоточению в северных широтах.

Оценка доли вкладов трех климатических факторов в коэффициент детерминации частот аллелей локуса *Amy 1* представлена в табл. 5.

Представленные данные подтверждают и дополняют результаты табл. 4. Так, распространение аллелей *Amy 1.1* и *Amy 1.4* связано с температурными показателями и влажностью, которые дают близкий, но значимый вклад в вариацию встречаемости этих наследственных факторов. В то же время, динамика частоты аллеля *Amy 1.2* определяется только обеспеченностью влагой. На распространение аллелей *Amy 1.3* и *Amy 1.6* прежде всего влияют температурные условия внешней среды.

По локусу *Amy 2* в культуре ярового ячменя выявлено три аллеля. Наиболее широко распространен аллель *Amy 2.1*, частота которого варьировала от 56% (провинция 8-1 Прикаспийская) до 100%

**Таблица 3.** Встречаемость аллелей локусов *Amy* у ярового ячменя в некоторых природно-сельскохозяйственных провинциях бывшего СССР

Провинция	Изучено возделываемых сортов	Аллель	Встречаемость аллеля, %	
3-1 Европейская – избыточно влажная, недостаточно обеспеченная теплом	21	<i>Amy 1.1</i>	30.9 ± 7.1	
		<i>Amy 1.2</i>	4.8 ± 3.3	
		<i>Amy 1.3</i>	4.8 ± 3.3	
		<i>Amy 1.4</i>	40.4 ± 7.4	
		<i>Amy 1.5</i>	4.8 ± 3.3	
		<i>Amy 1.6</i>	14.3 ± 5.4	
	21	<i>Amy 2.1</i>	76.2 ± 10.6	
		<i>Amy 2.2</i>	11.9 ± 5.2	
		<i>Amy 2.3</i>	11.9 ± 5.2	
	4-1 Прибалтийская – избыточно влажная, ниже среднего обеспеченная теплом	28	<i>Amy 1.1</i>	26.7 ± 5.9
			<i>Amy 1.2</i>	3.6 ± 2.5
			<i>Amy 1.3</i>	12.5 ± 4.4
			<i>Amy 1.4</i>	35.7 ± 6.4
<i>Amy 1.5</i>			5.4 ± 3.0	
<i>Amy 1.6</i>			7.1 ± 3.4	
<i>Amy 1.7</i>			3.6 ± 2.5	
<i>Amy 1.12</i>			3.6 ± 2.5	
<i>Amy 1.13</i>			1.8 ± 1.8	
28		<i>Amy 2.1</i>	89.3 ± 9.4	
		<i>Amy 2.2</i>	7.1 ± 3.5	
		<i>Amy 2.3</i>	3.6 ± 2.5	
4-2 Белорусская – избыточно влажная и влажная, ниже среднего обеспеченная теплом		25	<i>Amy 1.1</i>	46.0 ± 7.0
	<i>Amy 1.2</i>		22.0 ± 5.9	
	<i>Amy 1.3</i>		4.0 ± 2.8	
	<i>Amy 1.4</i>		10.0 ± 4.2	
	<i>Amy 1.5</i>		8.0 ± 3.8	
	<i>Amy 1.7</i>		2.0 ± 2.0	
	<i>Amy 1.9</i>		4.0 ± 2.8	
	<i>Amy 1.12</i>		4.0 ± 2.8	
	25	<i>Amy 2.1</i>	100.0 ± 10.0	
	4-3 Средне-Русская – избыточно влажная, ниже среднего обеспеченная теплом	32	<i>Amy 1.1</i>	29.7 ± 5.8
<i>Amy 1.2</i>			6.3 ± 3.1	
<i>Amy 1.3</i>			6.3 ± 3.1	
<i>Amy 1.4</i>			26.5 ± 5.6	
<i>Amy 1.5</i>			15.6 ± 4.6	
<i>Amy 1.6</i>			12.5 ± 4.2	
<i>Amy 1.12</i>			3.1 ± 2.2	
32		<i>Amy 2.1</i>	85.9 ± 8.9	
		<i>Amy 2.2</i>	10.9 ± 4.1	
		<i>Amy 2.3</i>	3.2 ± 2.3	

Таблица 3. Продолжение

Провинция	Изучено возделываемых сортов	Аллель	Встречаемость аллеля, %	
4-4 Западно-Сибирская – влажная, недостаточно и ниже среднего обеспе- ченная теплом	15	<i>Amy 1.1</i>	60.0 ± 8.9	
		<i>Amy 1.4</i>	13.3 ± 6.2	
		<i>Amy 1.6</i>	20.0 ± 7.3	
		<i>Amy 1.7</i>	6.7 ± 4.6	
	15	<i>Amy 2.1</i>	93.3 ± 12.9	
		<i>Amy 2.2</i>	6.7 ± 4.6	
4-7 Дальневосточно-Амуро-Уссурий- ская – влажная, средне обеспеченная теплом	15	<i>Amy 1.1</i>	26.7 ± 8.1	
		<i>Amy 1.2</i>	20.0 ± 7.3	
		<i>Amy 1.4</i>	26.6 ± 8.1	
		<i>Amy 1.6</i>	6.7 ± 4.6	
		<i>Amy 1.7</i>	13.3 ± 6.2	
		<i>Amy 1.12</i>	6.7 ± 4.6	
	15	<i>Amy 2.1</i>	100.0 ± 12.9	
5-1 Украинская – полувлажная и влажная (зап. часть), средне обеспеченная теплом	32	<i>Amy 1.1</i>	53.1 ± 6.2	
		<i>Amy 1.2</i>	20.3 ± 5.0	
		<i>Amy 1.3</i>	1.6 ± 1.6	
		<i>Amy 1.4</i>	7.8 ± 3.4	
		<i>Amy 1.5</i>	9.4 ± 3.6	
		<i>Amy 1.6</i>	4.7 ± 2.6	
		<i>Amy 1.9</i>	3.1 ± 2.2	
	32	<i>Amy 2.1</i>	100.0 ± 8.8	
	5-2 Средне-Русская – полувлажная и влажная (сев.-зап. часть), средне обеспеченная теплом	40	<i>Amy 1.1</i>	52.5 ± 5.6
			<i>Amy 1.2</i>	21.2 ± 4.6
<i>Amy 1.4</i>			11.2 ± 3.5	
<i>Amy 1.5</i>			6.3 ± 2.7	
<i>Amy 1.6</i>			6.3 ± 2.7	
<i>Amy 1.7</i>			2.5 ± 1.8	
40		<i>Amy 2.1</i>	95.0 ± 7.9	
		<i>Amy 2.2</i>	5.0 ± 2.5	
5-3 Предуральская – полувлажная, ниже среднего и средне обеспеченная теплом	29	<i>Amy 1.1</i>	55.2 ± 6.5	
		<i>Amy 1.2</i>	13.8 ± 4.5	
		<i>Amy 1.4</i>	13.8 ± 4.5	
		<i>Amy 1.5</i>	3.4 ± 2.4	
		<i>Amy 1.6</i>	10.4 ± 4.0	
		<i>Amy 1.7</i>	3.4 ± 2.4	
	29	<i>Amy 2.1</i>	86.2 ± 9.2	
		<i>Amy 2.2</i>	10.3 ± 4.1	
<i>Amy 2.3</i>		3.5 ± 2.4		

Таблица 3. Продолжение

Провинция	Изучено возделываемых сортов	Аллель	Встречаемость аллеля, %	
5-4 Западно-Сибирская – полувлажная и полузасушливая, ниже среднего обеспеченная теплом	22	<i>Amy 1.1</i>	59.2 ± 7.4	
		<i>Amy 1.2</i>	4.5 ± 3.1	
		<i>Amy 1.4</i>	18.2 ± 5.8	
		<i>Amy 1.5</i>	4.5 ± 3.1	
		<i>Amy 1.6</i>	9.1 ± 4.3	
		<i>Amy 1.7</i>	4.5 ± 3.1	
	22	<i>Amy 2.1</i>	90.9 ± 10.6	
		<i>Amy 2.2</i>	9.1 ± 4.4	
	5-5 Предалтайская – полувлажная и влажная (сев. Восток), ниже среднего обеспеченная теплом	15	<i>Amy 1.1</i>	53.3 ± 9.7
			<i>Amy 1.2</i>	20.0 ± 7.3
			<i>Amy 1.4</i>	13.3 ± 6.2
			<i>Amy 1.5</i>	6.7 ± 4.6
<i>Amy 1.6</i>			6.7 ± 4.6	
15		<i>Amy 2.1</i>	93.3 ± 12.9	
		<i>Amy 2.2</i>	6.7 ± 4.6	
6-1 Украинская – полузасушливая, выше среднего обеспеченная теплом		23	<i>Amy 1.1</i>	69.6 ± 6.8
			<i>Amy 1.2</i>	10.9 ± 4.6
			<i>Amy 1.3</i>	10.9 ± 4.6
	<i>Amy 1.6</i>		4.3 ± 3.0	
	<i>Amy 1.12</i>		4.3 ± 3.0	
	23	<i>Amy 2.1</i>	89.1 ± 10.4	
		<i>Amy 2.2</i>	8.7 ± 4.3	
		<i>Amy 2.3</i>	2.2 ± 2.2	
	6-2 Предкавказская – полузасушливая и полувлажная, выше среднего и повышено обеспеченная теплом	21	<i>Amy 1.1</i>	61.9 ± 7.5
			<i>Amy 1.2</i>	16.7 ± 5.8
<i>Amy 1.3</i>			16.7 ± 5.8	
<i>Amy 1.5</i>			4.7 ± 3.3	
21		<i>Amy 2.1</i>	59.5 ± 9.9	
		<i>Amy 2.2</i>	38.1 ± 8.6	
		<i>Amy 2.3</i>	2.4 ± 2.4	
6-3 Южно-Русская – полузасушливая, средне и выше среднего обеспеченная теплом	26	<i>Amy 1.1</i>	75.0 ± 6.0	
		<i>Amy 1.2</i>	11.5 ± 4.4	
		<i>Amy 1.3</i>	7.7 ± 3.7	
		<i>Amy 1.5</i>	5.8 ± 3.2	
	26	<i>Amy 2.1</i>	75.0 ± 9.5	
		<i>Amy 2.2</i>	23.1 ± 6.3	
		<i>Amy 2.3</i>	1.9 ± 1.9	

Таблица 3. Продолжение

Провинция	Изучено возделываемых сортов	Аллель	Встречаемость аллеля, %
6-4 Заволжская – полужасушливая и засушливая, средне обеспеченная теплом	13	<i>Amy 1.1</i> <i>Amy 1.7</i>	92.3 ± 19.6 7.7 ± 5.3
	13	<i>Amy 2.1</i> <i>Amy 2.2</i> <i>Amy 2.3</i>	84.6 ± 13.7 7.7 ± 5.3 7.7 ± 5.3
6-5 Казахская – полужасушливая и засушливая, средне и ниже среднего обеспеченная теплом	19	<i>Amy 1.1</i> <i>Amy 1.2</i> <i>Amy 1.3</i> <i>Amy 1.4</i> <i>Amy 1.5</i> <i>Amy 1.6</i>	63.1 ± 7.8 15.7 ± 5.9 5.3 ± 3.6 5.3 ± 3.6 5.3 ± 3.6 5.3 ± 3.6
	19	<i>Amy 2.1</i> <i>Amy 2.2</i> <i>Amy 2.3</i>	73.7 ± 11.1 21.1 ± 7.0 5.2 ± 3.7
6-6 Предалтайская – полужасушливая и засушливая, ниже среднего обеспеченная теплом	14	<i>Amy 1.1</i> <i>Amy 1.2</i> <i>Amy 1.4</i> <i>Amy 1.5</i> <i>Amy 1.6</i>	50.0 ± 9.5 21.5 ± 7.8 14.3 ± 6.6 7.1 ± 4.9 7.1 ± 4.9
	14	<i>Amy 2.1</i> <i>Amy 2.2</i>	92.9 ± 13.3 7.1 ± 4.9
6-7 Восточно-Сибирская – полужасушливая и засушливая, ниже среднего обеспеченная теплом	14	<i>Amy 1.1</i> <i>Amy 1.2</i> <i>Amy 1.4</i>	57.1 ± 9.4 14.3 ± 6.6 28.6 ± 8.5
	14	<i>Amy 2.1</i> <i>Amy 2.2</i> <i>Amy 2.3</i>	92.8 ± 13.3 3.6 ± 3.6 3.6 ± 3.6
7-1 Южно-Украинская – засушливая, выше среднего и повышенно обеспеченная теплом	13	<i>Amy 1.1</i> <i>Amy 1.3</i>	84.6 ± 13.7 15.4 ± 7.4
	13	<i>Amy 2.1</i> <i>Amy 2.2</i>	84.6 ± 13.7 15.4 ± 7.4
7-2 Маньчжоу-Донская – очень засушливая, выше среднего и повышенно обеспеченная теплом	20	<i>Amy 1.1</i> <i>Amy 1.2</i> <i>Amy 1.3</i>	77.5 ± 6.6 7.5 ± 4.2 15.0 ± 5.6
	20	<i>Amy 2.1</i> <i>Amy 2.2</i> <i>Amy 2.3</i>	62.5 ± 10.4 35.0 ± 8.5 2.5 ± 2.5

Таблица 3. Окончание

Провинция	Изучено возделываемых сортов	Аллель	Встречаемость аллеля, %	
7-3 Заволжская – очень засушливая, выше среднего обеспеченная теплом	11	<i>Amy 1.1</i>	100.0 ± 15.1	
	11	<i>Amy 2.1</i>	59.1 ± 13.8	
		<i>Amy 2.2</i>	36.4 ± 11.6	
		<i>Amy 2.3</i>	4.5 ± 4.5	
7-4 Казахстанско-Алтайская – очень засушливая, средне обеспеченная теплом	12	<i>Amy 1.1</i>	66.8 ± 9.6	
		<i>Amy 1.2</i>	8.3 ± 5.6	
		<i>Amy 1.3</i>	8.3 ± 5.6	
		<i>Amy 1.5</i>	8.3 ± 5.6	
		<i>Amy 1.6</i>	8.3 ± 5.6	
	12	<i>Amy 2.1</i>	87.5 ± 14.6	
		<i>Amy 2.2</i>	12.5 ± 7.0	
	8-1 Прикаспийская – полусухая и сухая, выше среднего и повышенно обеспеченная теплом	16	<i>Amy 1.1</i>	87.4 ± 5.9
			<i>Amy 1.2</i>	6.3 ± 4.3
			<i>Amy 1.3</i>	6.3 ± 4.3
16		<i>Amy 2.1</i>	56.3 ± 11.2	
		<i>Amy 2.2</i>	40.6 ± 10.1	
		<i>Amy 2.3</i>	3.1 ± 3.1	
8-2 Центрально-Казахстанская – полу- сухая и сухая, средне и повышенно обеспеченная теплом	8	<i>Amy 1.1</i>	75.0 ± 10.8	
		<i>Amy 1.3</i>	12.5 ± 8.3	
		<i>Amy 1.6</i>	12.5 ± 8.3	
	8	<i>Amy 2.1</i>	87.5 ± 17.5	
		<i>Amy 2.2</i>	12.5 ± 8.6	
	10-1 Южно-Казахстанская предгор- ная – полусухая, выше среднего и повышенно обеспеченная теплом	12	<i>Amy 1.1</i>	66.7 ± 9.6
<i>Amy 1.2</i>			16.7 ± 7.6	
<i>Amy 1.3</i>			12.5 ± 6.8	
<i>Amy 1.13</i>			4.1 ± 4.0	
12		<i>Amy 2.1</i>	91.7 ± 14.4	
		<i>Amy 2.2</i>	8.3 ± 5.8	

(провинции 4-2 Белорусская, 5-1 Украинская, Дальневосточно-Амуро-Уссурийская). В направлении с севера на юг наблюдалась тенденция в сторону уменьшения встречаемости данного аллеля (табл. 3). Наоборот, частота другого аллеля – *Amy 2.2*, в этом направлении среди районированных сортов ярового ячменя увеличивалась с 7–12% (провинции 4-4 Западно-Сибирская, 4-1 Прибалтийская, 3-1 Европейская) до 15–38% (провинции 7-1 Южно-Украинская, 7-2 Маньчско-Донская, 6-2 Предкавказская). Частота фактора *Amy 2.3* имела тенденцию к уменьшению с севера на юг в яровой культуре.

С запада на восток частота аллеля *Amy 2.1* уменьшалась, достигая минимальной величины в Прикаспийском регионе (56.3 ± 11.2%). При дальнейшем продвижении на восток фактор *Amy 2.1* имел тенденцию к увеличению встречаемости до 100.0 ± 12.9% в Дальневосточном регионе (табл. 3). Другой аллель – *Amy 2.2*, наоборот, в направлении с запада на восток увеличивал свою частоту среди районированных сортов до 40.6 ± 10.1% в Прикаспийской провинции с последующей динамикой в сторону уменьшения (при дальнейшем продвижении на восток) до 0 (провинция 4-7 Дальневосточно-Амуро-Уссурийская). Аллель

**Таблица 4.** Коэффициенты корреляции между частотами встречаемости аллелей локуса *Amy 1* и климатическими показателями региона (25 географических провинций)

Показатель	Аллель	Коэфф. корреляции	Уровень вероятности
Континентальность	<i>Amy 1.1</i>	0.3026	0.8585
	<i>Amy 1.2</i>	0.0641	0.2393
	<i>Amy 1.3</i>	-0.2982	0.8523
	<i>Amy 1.4</i>	-0.1718	0.5884
	<i>Amy 1.6</i>	-0.0914	0.3361
Сумма эффективных температур (>10°C)	<i>Amy 1.1</i>	0.6181	0.9990
	<i>Amy 1.2</i>	0.029	0.0108
	<i>Amy 1.3</i>	0.6064	0.9987
	<i>Amy 1.4</i>	-0.7924	0.9999
	<i>Amy 1.6</i>	-0.7003	0.9998
Среднегодовое количество осадков	<i>Amy 1.1</i>	-0.7979	0.9999
	<i>Amy 1.2</i>	0.3989	0.9518
	<i>Amy 1.3</i>	-0.6064	0.9987
	<i>Amy 1.4</i>	0.5902	0.9981
	<i>Amy 1.6</i>	0.2827	0.8291
# Влагообеспеченность	<i>Amy 1.1</i>	-0.8374	0.9999
	<i>Amy 1.2</i>	0.2025	0.6683
	<i>Amy 1.3</i>	-0.3159	0.8760
	<i>Amy 1.4</i>	0.7722	0.9999
	<i>Amy 1.6</i>	0.5202	0.9923
Средняя температура июля	<i>Amy 1.1</i>	0.7298	0.9999
	<i>Amy 1.2</i>	-0.1210	0.4354
	<i>Amy 1.3</i>	0.5271	0.9932
	<i>Amy 1.4</i>	-0.8519	0.9999
	<i>Amy 1.6</i>	-0.5761	0.9974

# – отношение количества осадков в год к испаряемости.

*Amy 2.3* не обнаружил четкой закономерности в своем распространении.

Оценка климатических параметров, обуславливающих адаптивную ценность аллелей локуса *Amy 2* в изученных географических регионах, показана в табл. 6.

Как видно, встречаемость всех аллелей локуса *Amy 2* не была связана с континентальностью климата. В то же время, распространение аллеля *Amy 2.1* отрицательно корректировало с температурой, но положительно с влагообеспеченностью. Напротив, встречаемость фактора *Amy 2.2* показала положительную связь с температурными параметрами среды и отрицательную с количеством осадков и влагообеспеченностью региона. Распространение аллеля *Amy 2.3* не было сопряжено

с изученными климатическими характеристиками данной территории.

Доли вклада трех климатических факторов в формировании успешной адаптации аллелей локуса *Amy 2* к агро-климатическим условиям территории показаны в табл. 7. Как видно, распространению аллеля *Amy 2.1* в наибольшей степени способствует влажность климата, температура имеет меньшую значимость в адаптации к внешним условиям среды. Континентальность климата занимала третье место по влиянию на распространение этого генетического фактора. Характерно, что температурные параметры имеют первостепенное значение для распространения другого аллеля – *Amy 2.2*. Влажность в данном случае играла вторичную роль. Континентальность климата не

**Таблица 5.** Доля вкладов трех климатических факторов в коэффициент детерминации частот аллелей локуса *Amy 1*, обусловленный этими факторами (25 географических провинций)

Аллель	Коэффициент детерминации	Фактическое значение <i>F</i>	Уровень значимости	Климатические показатели	Доля вклада, %
<i>Amy 1.1</i>	0.9699	258.36	>0.9999	Континентальность	11.5
				Сумма эффективных <i>t°</i>	47.5
				Среднегод. кол-во осадков	41.0
Критерий оценки значимости доли вкладов					1.3
<i>Amy 1.2</i>	0.6919	18.63	>0.9999	Континентальность	2.9
				Сумма эффективных <i>t°</i>	0.0
				Среднегод. кол-во осадков	97.1
Критерий оценки значимости доли вкладов					16.2
<i>Amy 1.3</i>	0.6914	18.59	>0.9999	Континентальность	17.6
				Сумма эффективных <i>t°</i>	80.1
				Среднегод. кол-во осадков	2.3
Критерий оценки значимости доли вкладов					16.2
<i>Amy 1.4</i>	0.7856	29.99	>0.9999	Континентальность	4.8
				Сумма эффективных <i>t°</i>	48.5
				Среднегод. кол-во осадков	46.7
Критерий оценки значимости доли вкладов					10.6
<i>Amy 1.6</i>	0.6195	13.69	>0.9999	Континентальность	6.3
				Сумма эффективных <i>t°</i>	66.8
				Среднегод. кол-во осадков	26.9
Критерий оценки значимости доли вкладов					21.1

оказала влияния на встречаемость этого генетического фактора. Его вклад в детерминацию распространения аллеля *Amy 2.3* оказался несущественным.

Таким образом, распространение аллелей локусов, контролируемых изоферментный состав альфа-амилазы в культуре ярового ячменя носит не случайный характер. Основными климатическими факторами, определяющими адаптивность генотипов ярового ячменя по этому ферменту, являются температура и влагообеспеченность региона. Аллели *Amy 1.1* и *Amy 1.3* показали положительную связь с повышенными температурами, но отрицательную с влагообеспеченностью. Напротив, аллели *Amy 1.4* и *Amy 1.6* продемонстрировали отрицательную реакцию на высокую температуру, но положительную на влагообеспеченность. Анализ реакции распространения аллелей локуса *Amy 2* показал, что с аридными условиями внешней среды связан аллель *Amy 2.2*. Аллель *Amy 2.1*, наоборот, приурочен к регионам с хорошей влагообеспеченностью и без экстремальных высоких температур.

Исходя из полученных данных можно ожидать, что генотипы *Amy 1.1*; *2.2* должны быть распространены в наиболее аридных условиях среды. В то же время, генотипы с таким сочетанием аллелей составили лишь 2.9% (6 сортов, табл. 1). Альтернативное сочетание этих генетических факторов, *Amy 1.2*; *2.1*, встретилось у 6.4% сортов (табл. 1). Следовательно, крайние варианты наследственности для адаптации к внешним условиям среды менее предпочтительны, чем “компромиссные”. Так, наиболее часто встречались генотипы *Amy 1.1*; *2.1*, частота которых среди районированных сортов ярового ячменя составила 44.6% (табл. 1). В данном случае, аллель *Amy 1.1* обуславливает устойчивость к повышенным температурам и недостатку влаги, а аллель *Amy 2.1* способствует положительному ответу на хорошую влагообеспеченность и при отсутствии экстремально высоких температур. Полученные данные можно использовать и учитывать при планировании гибридизации ярового ячменя в процессе селекции.

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

**Таблица 6.** Коэффициенты корреляции между частотами аллелей локуса *Amy 2* и климатическими показателями региона (25 географических провинций)

Климатический показатель	Аллель	Коэффициент корреляции	Уровень вероятности
Показатель континентальности	<i>Amy 2.1</i>	-0.0710	0.2640
	<i>Amy 2.2</i>	0.1152	0.4164
	<i>Amy 2.3</i>	-0.1580	0.5494
Сумма эффективных температур (>10°C)	<i>Amy 2.1</i>	-0.3824	0.9408
	<i>Amy 2.2</i>	0.4783	0.9844
	<i>Amy 2.3</i>	-0.2635	0.7968
Среднегодовое количество осадков	<i>Amy 2.1</i>	0.3874	0.9443
	<i>Amy 2.2</i>	-0.4168	0.9618
	<i>Amy 2.3</i>	-0.0131	0.0495
# Влагообеспеченность	<i>Amy 2.1</i>	0.4278	0.9671
	<i>Amy 2.2</i>	-0.4962	0.9884
	<i>Amy 2.3</i>	0.1340	0.4768
Средняя температура июля	<i>Amy 2.1</i>	-0.4501	0.9760
	<i>Amy 2.2</i>	0.5506	0.9957
	<i>Amy 2.3</i>	-0.2590	0.7888

# – отношение количества осадков в год к испаряемости.

**Таблица 7.** Доля вкладов трех климатических факторов в коэффициент детерминации частот аллелей локуса *Amy 1*, обусловленный этими факторами (25 географических провинций)

Аллель	Коэффициент детерминации	Фактическое значение <i>F</i>	Уровень значимости	Климатические показатели	Доля вклада, %
<i>Amy 2.1</i>	0.9717	176.38	>0.9999	Континентальность	9.6
				Сумма эффективных <i>t°</i>	15.6
				Среднегод. кол-во осадков	74.8
Критерий оценки значимости доли вкладов					1.3
<i>Amy 2.2</i>	0.6690	16.83	>0.9999	Континентальность	1.1
				Сумма эффективных <i>t°</i>	62.5
				Среднегод. кол-во осадков	36.4
Критерий оценки значимости доли вкладов					17.7
<i>Amy 2.3</i>	0.2930	3.98	=0.7070	Континентальность	58.5
				Сумма эффективных <i>t°</i>	35.7
				Среднегод. кол-во осадков	5.8
Критерий оценки значимости доли вкладов					57.0

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ahokas H., Naskali L.* Geographic variation of  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase,  $\beta$ -glucanase, pullulanase and chitinase activity in germinating *H. spontaneum* barley from Israel and Jordan // *Genetica*. 1990. V. 82. P. 73–80.
- Чапля А.Э., Нецветов В.П.* Зв'язок генотипічної мінливості бета-амілазного локусу *Bmy 1* та кількісних ознак продуктивності і пивоварності ярого ячменю (*Hordeum vulgare*) // *Доповіди Національної академії наук України*. 1999. № 10. С. 196–203.
- Нецветов В.П., Поморцев А.А., Чапля А.Е.* Селективная ценность и геогеография аллелей бета-амилазного локуса *Bmy 1* у ячменя // *Генетика*. 2000. Т. 36. № 1. С. 62–70.
- Brown A.H.D., Jacobsen J.V.* Genetic basis and natural variation of  $\alpha$ -amylase isozymes in barley // *Genet. Res. Camb.* 1982. V. 40. P. 315–324.

5. *Nielsen G., Frydenberg O.* Linkage between the loci *Amy 1* ( $\alpha$ -amylase), *o* (orange lemma) and  $x_n$  (xantha seedling) // *Barley Genet. Newslwttter.* 1974. V. 4. P. 53–54.
6. *Sogaard B., von Wettstein-Knowles P.* Barley: Genes and chromosomes // *Carlsberg Res. Communication.* 1987. V. 52. № 2. P. 123–196.
7. *Нецветаев В.П.* Анализ сцепления генов, контролирующих качественные признаки растений ячменя на хромосоме 6 // *Генетика.* 2021. Т. 57. № 2. С. 179–184.  
<https://doi.org/10.31857/S0016675821020077>
8. *Kleinhofs A., Kilian A., Kudrna D.* The NABGMP Step-toe  $\times$  Morex mapping progress report // *Barley Genet. Newslwttter.* 1993. V. 23. P. 79–83.
9. *Нецветаев В.П., Нецветаева О.В.* Генетический контроль альфа-амилазы у ячменя / Актуальные пробл. бот. и методики преподавания биологии (Матер. 2-й Междунар. научно-практ. конф. 24–26 сентября 2007 г.). Белгород, 2007. С. 226–233.
10. Природно-сельскохозяйственное районирование земельного фонда СССР / Под ред. Егорова В.В. М.: Колос, 1975. 62 с.
11. *Рокицкий П.Ф.* Введение в статистическую генетику. Минск: Вышэйшая школа, 1974. 442 с.
12. *Ли Ч.* Введение в популяционную генетику. М.: Мир, 1978. 555 с.
13. *Корн Г., Корн Т.* Справочник по матем. для науч. работников и инженеров. М.: Наука, 1968. 720 с.
14. *Нецветаев В.П.* Расположение  $\beta$ -амилазного локуса (*Vmy 1*) в хромосоме 4 ячменя // *Цитол. и генетика.* 1993. Т. 27. № 5. С. 74–78.
15. *Persson G.* An attempt to find suitable genetic markers for dense ear loci in barley I // *Hereditas.* 1969. V. 62. № 3. P. 25–96.

## Climatic Factors and Allele Distribution of Locus *Amy 1* and *Amy 2* in the Varieties of Spring Barley in the Territory of the Former USSR

V. P. Netsvetaev<sup>a, \*</sup> and A. A. Pomortsev<sup>b, \*\*</sup>

<sup>a</sup>*Belgorod Federal Agrarian Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Belgorod, 308001 Russia*

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

\*e-mail: [v.netsvetaev@yandex.ru](mailto:v.netsvetaev@yandex.ru)

\*\*e-mail: [pomortsev@vigg.ru](mailto:pomortsev@vigg.ru)

The alpha-amylase isozymes in barley are controlled by the *Amy 1* and *Amy 2* loci located on chromosomes 6 and 1 (=6H and 7H), respectively. Analysis of spring barley varieties cultivated in the territory of the former USSR until 1993 showed the distribution among them of 11 alleles at the *Amy 1* locus and 4 alleles for another factor – *Amy 2*. Their occurrence was not accidental. The most prevalent alleles were *Amy 1.1* and *Amy 2.1*. The combination of these alleles in varieties was  $44.6 \pm 2.9\%$ . The next most common were combinations of *Amy 1.5* with *Amy 2.1*, which amounted to  $10.9 \pm 2.2\%$  and *Amy 1.4* with *Amy 2.1* –  $10.4 \pm 2.1\%$ . The allele distribution of the *Amy 1* and *Amy 2* loci in varieties zoned in 25 provinces of the USSR, differing in climatic characteristics, was studied. It was found that the alleles *Amy 1.1* and *Amy 1.3* showed a positive relationship with hot temperatures, but negative with well moisture. In contrast, the alleles *Amy 1.4*, and *Amy 1.6* showed negative response to heat, but positive to moisture availability. Analysis of the distribution reaction of alleles of another locus *Amy 2* showed that the *Amy 2.2* allele is associated with arid environmental conditions. Allele *Amy 2.1*, on the contrary, is confined to regions with good moisture supply and without extreme high temperatures. Continentality did not play a significant role in the distribution of alleles of these loci. As a result, in the direction from North to South, the occurrence of the *Amy 1.1* allele increased. So, if in the northern latitudes of the European part it was 27–31%, then in the southern steppe regions the frequency of the *Amy 1.1* allele increased to 78–85%. No such clear dynamics was traced in the direction from West to East. A similar pattern was found in the occurrence of the *Amy 1.2* allele. With regard to the distribution of the *Amy 2.1* allele in the direction from North to South, a tendency towards a decrease in the occurrence of this hereditary factor was observed. On the contrary, the frequency of another allele, *Amy 2.2*, in this direction among the zoned varieties of spring barley increased from 7–12 to 15–38%. Characteristically, the *Amy 1.1* allele causes resistance to high temperature values and a lack of moisture, while the *Amy 2.1* allele, from another locus, contributes to a positive response to good moisture availability in the absence of extreme high temperatures. The combination of these genetic factors determines its greatest distribution over the territory of spring barley cultivation.

**Keywords:** spring barley, alpha-amylase isozymes, climatic factors, allele frequencies, regional distribution.

УДК 575.113.15:582.982

АНАЛИЗ ГЕНОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ КОМПАКТНУЮ ФОРМУ  
РАСТЕНИЙ АРБУЗА *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai,  
У ОБРАЗЦОВ ИЗ КОЛЛЕКЦИИ ВИР© 2022 г. К. В. Стрыгина<sup>1</sup>, \*, А. Г. Елацкова<sup>1</sup>, Ю. А. Елацков<sup>1</sup>, Г. А. Теханович<sup>1</sup>, Е. К. Хлесткина<sup>1</sup><sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений  
им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, 190000 Россия

\*e-mail: k.strygina@vir.nw.ru

Поступила в редакцию 04.12.2021 г.

После доработки 15.03.2022 г.

Принята к публикации 12.04.2022 г.

Компактная форма растений арбуза, определяемая признаками кустовости и короткоплетистости, имеет важное экономическое значение, определяя рациональное использование посевных площадей за счет высокой плотности посадки и возможность механизированной обработки и уборки. В связи с этим изучение генов, определяющих малый габитус растений арбуза, является важной задачей для ускорения селекции этой культуры. Цель данной работы – изучение известных и поиск новых генов компактности растений арбуза *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai на основе анализа уникальной коллекции бахчевых культур ВИР им. Н.И. Вавилова и селекционных форм селекции Кубанской опытной станции ВИР. В результате у всех кустовых и ультракустовых генотипов, кроме двух образцов из Азербайджана, выявлена известная мутация гена *dw-1* (кодирует АВС-транспортер). Компактная форма этих двух образцов, как удалось установить, не связана и с другими известными генами, *dsh* (кодирует гиббереллин-20-оксидазу) и *df* (кодирует гиббереллин-3β-гидроксилазу), или их копиями, *df2* и *dsh2*, выявленными в настоящем исследовании. Таким образом, в коллекции бахчевых культур ВИР содержатся источники потенциально новых генов, определяющих кустовую форму арбуза.

**Ключевые слова:** *Citrullus*, Cucurbitaceae, дупликация генов, компактность, кустовость, короткоплетистость, молекулярные маркеры.

**DOI:** 10.31857/S001667582212013X

Бахчевые культуры (семейство Cucurbitaceae Juss.) известны своими крупными, отличающимися по окраске и морфологии плодами. Наиболее экономически важные культуры данного семейства – кабачок, тыква (*Cucurbita* L.), огурец, дыня (*Cucumis* L.) и арбуз (*Citrullus* Schrad. ex Eckl. & Zeyh.). Представители пяти дополнительных родов (*Momordica* L., *Lagenaria* Ser., *Benincasa* Savi, *Luffa* Mill. и *Trichosanthes* L.) являются второстепенными культурами с глобальной точки зрения, важными для мелкого фермерского производства в Восточной, Южной и Юго-Восточной Азии.

Компактность растений бахчевых культур так же как и короткостебельность многих других культур (зерновых и др.) – важные признаки, благодаря которым можно повышать урожайность на единицу площади. Компактные кустовые или короткоплетистые растения обеспечивают более высокую плотность посадки [1]. Короткостебельные формы зерновых культур обеспечивают более высокую урожайность за счет устойчивости к полеганию благодаря так называемым генам “зе-

ленной революции”: *semi-dwarf 1 (sd1)* у риса *Oryza sativa* L. и *Reduced height-1 (Rht-D1 и Rht-B1)* у пшеницы *Triticum aestivum* L. [2, 3]. Короткостебельность/короткоплетистость связана с мутациями в генах биосинтеза растительных гормонов (или с генами, связанными с ответом на них), которые регулируют удлинение и/или деление клеток [3–7].

К сегодняшнему моменту в семействе Cucurbitaceae идентифицирован ряд генов, обуславливающих компактную форму растений. Некоторые из этих генов были картированы и расшифрованы. У тыквы мускатной *C. moschata* Duchesne и тыквы твердокорой *C. pepo* L. кустовость контролируется неохарактеризованными генами *Bu* [8–12]. У тыквы крупноплодной *C. maxima* Duchesne ex Lam. известны три QTL в группах сцепления 1, 3 и 4, отвечающие за формирование компактного растения. В основном из этих трех локусов, *qCmB2*, в качестве гена-кандидата предложен ген, кодирующий гиббереллин-20-оксидазу, *Cma\_004516* [13].

У дыни *C. melo* L. известно четыре основных гена, определяющих компактную форму: *si-1*, *si-2*, *si-3* и *mdw1 (slb)* [11, 14–17]. Длина междоузлий у растений *si-2* и *si-3* короче, чем у мутантов *si-1*, но растения менее компактны. У растений *si-2* короткими являются только первые междоузлия. Длина междоузлий у мутантов *si-3* короче, чем у растений дикого типа, на всех стадиях развития. Гены *si* пока еще не картированы, их продукты не описаны. Ген *mdw1 (slb)* картирован в хромосоме 7 в участке, содержащем ряд генов, включая ген цитоксиноксидазы (*СКХ*) – возможный кандидат для *mdw1* [14].

У огурца *C. sativus* L. известно шесть генов, отвечающих за компактную форму взрослого растения: *dwarf (Csdw)*, *compact (cp)*, *cp-1*, *supercompact-1 (scp-1)*, *scp-2* и *short internode (si)* [18–24]. Ген *cp* был картирован в дистальной части хромосомы 4, в которой содержится ген цитоксиноксидазы *СКХ*, являющийся кандидатом. Ген *Cullin 1* является кандидатом для *cp-1*, а *scp-1* и *scp-2*, как выяснилось, кодируют цитохром P450 (*CsCYP85A1*) и стероид 5-альфа-редуктазу (*CsDET2*); эти три гена участвуют в пути биосинтеза brassinosterоидов [19, 20, 25, 26]. Кроме того, было установлено, что усеченный белок гена *CsaVBF1* (семейства F-box) связан с мутацией *si* огурца, а *CLAVATA1*-подобный ген, *CsCLAVATA1*, считается кандидатом для локуса *Csdw* [23, 24].

В геноме арбуза *C. lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai известно пять генов *dwarf (dw)*, из которых гены *dw-1* и *dw-1s* являются аллельными вариантами, а *dw-2*, *dw-3* и предположительно *dw-4* – независимыми [27–30]. Отмечается, что короткоплетистость у арбуза наследуется как моногенный рецессивный признак и контролируется геном *short vine (shv)* [29]. В 2018 г. благодаря естественной мутации в линии “1911” у арбуза был выявлен еще один ген *dsh*, который проявился в образце с мелкими плодами и короткими междоузлиями. Ген *dsh* был картирован в хромосоме 7, в качестве кандидата был обозначен ген *Cla010726*, кодирующий продукт, сходный с ферментом гиббереллин-20-оксидазой [31, 32]. В 2019 г. ген *dw-1* был картирован в хромосоме 9. Среди шести генов, находящихся в кандидатной области, один ген *Cla010337*, кодирующий АТФ-связывающий каскадный транспортер, был обозначен как ген-кандидат [33, 34]. Кроме того, изучение 165 контрастных по архитектонике форм показало, что ген *dw-1* являлся основной причиной компактности растений у образцов арбуза разного происхождения [33]. Компактность связана с однонуклеотидной делецией, поэтому ген *dw-1* – хорошая мишень для геномного редактирования с целью получения компактных форм арбуза. Также независимыми группами исследователей в хромосоме 9 был выявлен ген *Cla015407*, обозначенный как *df (Claf)*, кодирующий гиббереллин-3β-гидроксила-

зу [35–38]. Влияние данных мутаций на урожайность сортов арбуза и на качество продукции не исследовалось. Таким образом, благодаря успехам в секвенировании генома арбуза можно ожидать открытий новых генов, обуславливающих изменение растения с плетистой формы на кустовую, кроме упомянутых трех.

Цель настоящей работы – анализ известных генов компактности растений арбуза *C. lanatus* *dw-1*, *df* и *dsh* и поиск новых на основе анализа уникальной коллекции бахчевых культур ВИР им. Н.И. Вавилова и селекционных форм селекции Кубанской опытной станции ВИР.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Растительный материал, выделение ДНК и РНК, синтез кДНК*

Объектом исследования были растения *C. lanatus* коллекции бахчевых культур ВИР им. Н.И. Вавилова и гибриды, полученные на Кубанской ОС ВИР (табл. 1). Выращивание растений для выделения ДНК проводилось в полевых условиях Кубанской ОС ВИР в 2020 г. Суммарная ДНК выделялась из зеленых листьев взрослых растений с использованием набора DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) согласно методике производителя. Для выделения РНК семена арбуза проращивались при 12-часовом световом дне при 20°C на светоустановке. Выделение РНК из стеблей проводилось через 63 дня после посева семян в грунт в трех биологических повторностях (по два растения на повторность). РНК была выделена с использованием набора RNeasy Mini Kit (QIAGEN) и обработана RNase-free DNase set (QIAGEN). По матрице РНК была синтезирована одноцепочечная кДНК с использованием ОТ-М-MuLV-RH (Биолабмикс) в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1 мг РНК-матрицы. Все процедуры выполнялись согласно протоколам производителей используемых наборов.

### *Идентификация и анализ копий генов dw-1, df, dsh*

Идентификация генов, гомологичных известным генам арбуза *dw-1 (Cla010337)*, *df (Cla015407)* и *dsh (Cla010726)*, проводилась в базе данных геномов Cucurbitaceae (<http://cucurbitgenomics.org/>) при использовании алгоритма BLASTN. Выявленные гены представлены в табл. 2. Структура неаннотированных генов предсказывалась при использовании программы FGENESH+. Аннотация функциональных доменов осуществлялась с помощью InterPro. Построение модели белка *dsh* осуществлялось в программе SWISS-MODEL, в качестве модели использовался белок 6lsv.1 (Crystal structure of JOX2 in complex with 2OG, Fe, and JA). Для построения множественного выравнивания использовалась программа Multalin. Филогене-

**Таблица 1.** Список образцов арбуза коллекции ВИР, использованных в настоящем исследовании. Образцы, выделенные серым фоном, использовались для изучения уровня экспрессии генов

№ п/п	Каталожный номер	Происхождение	Название образца	Фенотип	
				стебель	цвет листьев
1	К-4128	США	Charleston Gray 133	Плетистый	Зеленый
2	К-5382	Россия	Ранний Кубани	Короткоплетистый	»
3	К-2578	»	Красавчик	Плетистый	»
4	К-5090	»	Ольгинский	»	»
5	К-5426	»	Благодатный	»	»
6	К-5429	»	Сюрприз	Короткоплетистый	»
7	—	»	Лидер	»	»
8	К-5427	»	Любимчик	Плетистый	»
9	К-5428	»	Святослав	Кустовой	»
10	К-5430	»	Родник	Плетистый	»
11	К-5402	»	Подарок Солнца	Короткоплетистый	Желто-зеленый мозаичный
12	К-5425	»	Черный Принц	Плетистый	Зеленый
13	—	»	Адам	»	»
14	—	»	Солярис	»	Желто-зеленый мозаичный
15	К-3414	Украина	Мелитопольский 60	»	Зеленый
16	К-5136	США	Royal Jubely	»	Желто-зеленый мозаичный
17	К-4857	КОС ВИР	Целебный	»	Зеленый
18	К-137	США	Klekley's Sweet	»	»
19	—	КОС ВИР	ЦЛ 552	»	»
20	—	»	ЦЛ 752	»	»
21	—	»	КРЛ 694	Кустовой	»
22	—	»	ЦЛ 638/14	Плетистый	»
23	—	»	КРЛ 730	Короткоплетистый	Желто-зеленый мозаичный
24	—	»	F12 ЦЛ 752 × Ольгинский	Кустовой	Зеленый
25	—	»	»	Кустовой	»
26	—	»	»	Плетистый	»
27	—	»	»	»	»
28	—	»	»	»	»
29	—	»	»	Короткоплетистый	»
30	—	»	»	Кустовой	»
31	—	»	»	»	»
32	—	»	»	»	»
33	—	»	F7 ЦЛ 752 × Ольгинский	Плетистый	»
34	—	»	F9 ЦЛ 752 × Ольгинский	»	»
35	—	»	КРЛ 694	Короткоплетистый	»
36	—	»	F12 ЦЛ 752 × Волжанин	Плетистый	»
37	—	»	»	»	»
38	—	»	F9 ЦЛ 752 × Ольгинский	»	Желто-зеленый мозаичный

Таблица 1. Окончание

№ п/п	Каталожный номер	Происхождение	Название образца	Фенотип	
				стебель	цвет листьев
39	—	КОС ВИР	F13 Святослав × Подарок Солнца	Кустовой	Желто-зеленый мозаичный
40	К-3848	США	Congo	Плетистый	Зеленый
41	»	»	»	»	»
42	К-5373	»	Sweet Treat	Ультракустовой	»
43	»	»	»	Плетистый	»
44	»	»	»	Ультракустовой	Зеленоватый
45	»	»	»	Плетистый	Зеленый
46	К-4039	Азербайджан	Местный	Короткоплетистый	Зеленоватый
47	»	»	»	Кустовой	Зеленый
48	»	»	»	Короткоплетистый	»
49	»	»	»	Кустовой	»
50	К-5131	США	Bush Charleston Gray	»	Зеленоватый
51	—	КОС ВИР	F13 ЦЛ 752 × Ольгинский	»	Зеленый

нетический анализ осуществлялся в программе MEGA X при использовании метода Maximum likelihood на основании кодирующих последовательностей генов с бутстреп-поддержкой 1000; на полученных изображениях показаны данные значений бутстрэпа  $\geq 70\%$ .

#### Дизайн праймеров, ПЦР, количественная ПЦР

Дизайн праймеров был выполнен с использованием Oligo Primer Analysis Software v.7 (табл. 3). Амплификация ДНК проводилась в 20 мкл ПЦР-смеси, содержащей 50 нг ДНК-матрицы, по 10 пг каждого праймера, 0.25 мМ каждого dNTP, 1 × реакционного буфера, 15 мМ MgCl<sub>2</sub> и 1 U Taq-полимеразы (Синтол), при следующих условиях: 95°C 1.5 мин; 35 циклов 95°C 30 с, 50–60°C 30 с, 72°C 1 мин; 72°C 5 мин. Количественная ПЦР была проведена на кДНК в реакционной смеси объемом 15 мкл при использовании набора реагентов SYBR Green I (Синтол) и системы CFX96 Touch (Bio-Rad) при следующих условиях: 50°C 10 мин; 95°C 5 мин; 50 циклов 95°C 10 с, 60°C 30 с. Показания для построения кривых плавления продуктов ПЦР снимались при 95°C 10 с; 65°C 5 с; 95°C 50 с. Графики зависимости порогового цикла от исходной концентрации матриц строились на основе трех последовательных 3-кратных разведений. Для стандартизации количества кДНК матрицы проводилась количественная ОТ-ПЦР с праймерами к референсному гену *C. lanatus Clathrin adaptor complex subunit (CICAC)* [39]. Каждый образец запускался в трех технических повторностях. Различия между генотипами были проверены

с помощью *T*-теста, при котором значение  $p \leq 0.05$  считалось значимым.

#### Гидролиз продуктов ПЦР, электрофорез, секвенирование

Гидролиз продуктов ПЦР был проведен эндонуклеазой рестрикции *EcoRI* (Сибэнзим). Электрофорез проводился в агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Изображение геля получалось с помощью прибора Molecular Imager Gel Doc XR System (BioRad) с использованием УФ-излучения. Выделение ДНК из геля проводили с помощью набора для очистки ДНК diaGene (Диаэм). Выделенные фрагменты ДНК секвенировали с использованием реактива BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) и генетического анализатора 3500 (Applied Biosystems). Результаты секвенирования обрабатывались в программе UGENE. Полученные последовательности были размещены в GenBank (NCBI) под номерами OM401277–OM401308.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

#### Анализ аллельного состояния генов *dw-1*, *df* и *dsh*

Zhu et al. [33] продемонстрировали, что нефункциональный аллель гена *dw-1* является наиболее частой причиной появления карликового фенотипа арбуза. Авторы также предложили два различных типа молекулярных маркеров, направленных на идентификацию мутантного и аллеля дикого типа: 1) маркер Indell, фланкирующий делецию в интроне гена, ассоциированную с карликовым фенотипом, и 2) маркер dCAPS3, основан-

**Таблица 2.** Список гомологичных последовательностей генов, выявленных в исследовании на основании последовательностей генов *dw-1*, *df* и *dsh* арбуза, в базе данных геномов Cucurbitaceae (<http://cucurbitgenomics.org/>). Серым фоном обозначены аннотированные в настоящем исследовании последовательности

Ген <i>C. lanatus</i>	Вид	Название образца	Последовательность	Локализация в геноме	Описание
<i>dw-1</i> (Cla010337, Cla97C09G179710)	<i>C. lanatus</i>	97103 (v2)	Cla97C09G179710	Cla97Chr09:33248469..33254809 (+)	ABC transporter B family member 19
		Charleston Gray	CICG09G018320	CG_Chr09:35331134..35338351 (+)	»
<i>L. siceraria</i>	<i>L. siceraria</i>	USVL1VR-Ls	Lsi02G014910	Chr02:20679307..20686179 (+)	Multidrug resistance ABC transporter ATP-binding and permease protein
		Wax gourd	Bhi06G000344	Chr6:8912006..8918888 (+)	ABC transporter B family protein
<i>B. hispida</i>	<i>B. hispida</i>	Chinese Long (v3)	CsaV3_5G037960	Chr5:30108267..30115095 (-)	»
		Gy14 (v2)	CsGy5G028210	Chr5:31935937..31942837 (-)	ABC transporter B family member 19
<i>C. sativus</i>	<i>C. sativus</i>	PI 183967	CSP105G28850	Chr5:27240346..27247058 (-)	Lipid A export ATP-binding/permease protein msba
		DHL92 (v3.6.1)	MELO3C021982	Chr09:2244766..2251632 (+)	ABC transporter B family protein
<i>C. melo</i>	<i>C. melo</i>	Rimu	CmaCh15G002770	Chr03:18058108..18058505 (-)	»
		Rifu	CmoCh04G028900	Cmo_Chr04:20570027..20575914 (-)	ATP-binding cassette transporter
<i>C. maxima</i>	<i>C. maxima</i>	Rimu	CmaCh04G027610	Cma_Chr04:18563539..18569742 (-)	Lipid A export ATP-binding/permease protein msba
		Rifu	CmoCh15G002920	Cmo_Chr15:1372725..1379019 (+)	»
<i>C. moschata</i>	<i>C. moschata</i>	Rimu	CmaCh04G027610	Cma_Chr04:18563539..18569742 (-)	ATP-binding cassette transporter
		Rifu	CmoCh15G002920	Cmo_Chr15:1372725..1379019 (+)	Multidrug resistance ABC transporter ATP-binding and permease protein
<i>C. pepo</i>	<i>C. pepo</i>	Zucchini	Cp4.1LG13g08370	Cp4.1LG13:7948987..7956776 (-)	Lipid A export ATP-binding/permease protein msba
		Zucchini	Cp4.1LG01g22940	Cp4.1LG01:19956958..19964623 (-)	ABC transporter B family protein

Таблица 2. Продолжение

Ген <i>C. lanatus</i>	Вид	Название образца	Последовательность	Локализация в геноме	Описание
<i>dw-1</i> (Cla010337, Cla97C09G179710)	<i>C. argyrosperma</i>	Silver-seed gourd	Carg04387	Cucurbita_argyrosperma_scaffold_007	ABC transporter B family protein
			Carg02255	Cucurbita_argyrosperma_scaffold_032	ABC transporter B family member 19
<i>df</i> (Cla015407, Cla97C09G164590)	<i>C. lanatus</i>	97103 (v2)	Cla97C09G164590	Cla97Chr09:2119445..2120701 (+)	Gibberellin 3-beta-dioxygenase 1-like
			Cla97C09G164580	Cla97Chr09:2088858..2090591 (+)	»
<i>L. siceraria</i>	Charleston Gray		CICG09G002420	CG_Chr09:2217620..2219353 (+)	Gibberellin 3-beta L-hydroxylase
			CICG09G002450	CG_Chr09:2251701..2253314 (+)	»
			Lsi02G027550	Chr02:33766399..33768094 (-)	»
			Lsi02G027560	Chr02:33802265..33805308 (-)	Gibberellin 3-beta-hydroxylase
<i>B. hispida</i>	Wax gourd		Bhi09G000068	Chr9:1592538..1594505 (-)	Gibberellin 3-beta-dioxygenase 1-like
			Bhi09G000070	Chr9:1647297..1647887 (-)	Gibberellin 3-beta-dioxygenase 2-1
			Bhi09G000067	Chr9:1579477..1580813 (+)	Gibberellin 3-beta-dioxygenase
<i>C. sativus</i>	Chinese Long (v3)		Bhi09G000069 (в Bhi09G000068)	Chr9:1593660..1594004 (+)	Unknown protein
			CsaV3_7G032870 (NCBI FR720085)	Chr7:20688063..20689463 (-)	Gibberellin 3-beta-dioxygenase 1-like
			CsaV3_7G032900 (NCBI NM_001280696)	Chr7:20713927..20715207 (-)	»
			CsaV3_7G032880 (NCBI MK433203)	Chr7:20705253..20706866 (-)	»
			CsGy7G019280	Chr7:21903314..21904735 (-)	»
			CsGy7G019320	Chr7:21929206..21930486 (-)	»
			CsGy7G019290	Chr7:21920567..21922180 (-)	»

Таблица 2. Продолжение

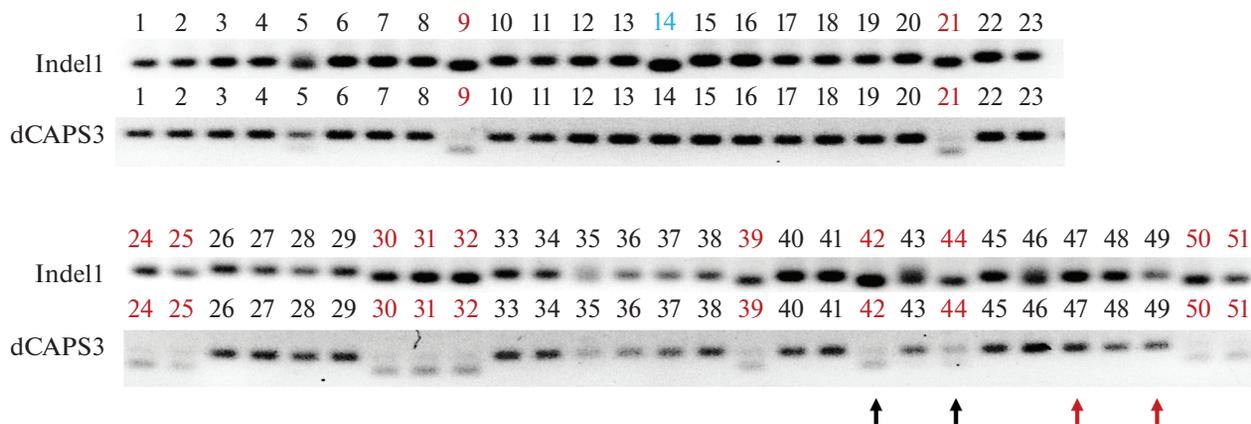
Ген <i>C. lanatus</i>	Вид	Название образца	Последовательность	Локализация в геноме	Описание
<i>df</i> (Cla015407, Cla97C09G164590)	<i>C. sativus</i>	PI 183967 (wild cucumber)	CSPI07G21030	Chr7:18010033..18011300 (-)	Gibberellin 3-beta-hydroxylase
			CSPI07G21040	Chr7:18027267..18037094 (-)	»
<i>C. melo</i>	DHL92 (v3.6.1)		MELO3C023378	Chr01:34777271..34778731 (-)	Gibberellin 3-beta-dioxygenase 1-like
			MELO3C023375	Chr01:34813832..34815725 (-)	»
			—	Region in chr01 34803145 to 34802534	—
<i>C. maxima</i>	Rimu		CmaCh08G006320 (NCBI AJ302040)	Cma_Chr08:3573502..3574908 (+)	Gibberellin 3-beta-hydroxylase
			CmaCh17G008310 (NCBI AJ006453)	Cma_Chr17:6527065..6528927 (+)	»
<i>C. moschata</i>	Rifu		CmoCh08G006170	Cmo_Chr08:3778589..3779817 (+)	»
			CmoCh17G008010	Cmo_Chr17:7674873..7676851 (+)	»
<i>C. pepo</i>	Zucchini		Cp4.1LG17g08980	Cp4.1LG17:4952161..4953544 (-)	»
			Cp4.1LG12g07890	Cp4.1LG12:6749201..6751027 (+)	»
<i>C. argyrosperma</i>	Silver-seed gourd		Carg23157	Cucurbita_argyrosperma_scaf- fold_194:202055..203342 (+)	Gibberellin 3-oxidase
			—	Region in Cucurbita_argyrosperma_s- caffold_029 833417 to 833954	—

Таблица 2. Окончание

Ген <i>C. lanatus</i>	Вид	Название образца	Последовательность	Локализация в геноме	Описание	
<i>dsh</i> (Cla010726, Cla97C07G143880)	<i>C. lanatus</i>	97103 (v2)	Cla97C07G143880	Cla97Chr07:31385311..31387981 (-)	Gibberellin 2-beta-dioxygenase 8	
		Charleston Gray	Cla97C09G170450	Cla97Chr09:6844481..6846371 (+)	»	
	<i>L. siceraria</i>	USVL1VR-Ls		CICG07G016880	CG_Chr07:33412201..33414994 (-)	2-Oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein LENGTH=324
				CICG09G007850	CG_Chr09:7173838..7178119 (+)	»
<i>B. hispida</i>	Wax gourd		Bhi01G002032	Chr1:64479937..64484521 (-)	Gibberellin 2-beta-dioxygenase	
			BhiUN281G14	Contig281:522408..525386 (+)	Gibberellin 3-beta-dioxygenase	
			Bhi09G000978	Chr9:28762801..28764982 (+)	Gibberellin 2-beta-dioxygenase 1	
			Bhi09G000975	Chr9:28741111..28741777 (+)	»	
<i>C. sativus</i>	Chinese Long (v3)		CsaV3_4G004090	Chr4:2517519..2519186 (-)	Gibberellin 2-beta-dioxygenase 8	
			CsGy4G003950	Chr4:2515408..2517091 (-)	Gibberellin 2-beta-dioxygenase 8	
		PI 183967	CSPI04G04030	Chr4:2554662..2556152 (-)	2-Oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	
<i>C. melo</i>	DHL92 (v3.6.1)		MELO3C032832	Chr07:26056883..26058365 (+)	Gibberellin 2-beta-dioxygenase 8	
				-	-	
				-	-	
<i>C. pepo</i>	Zucchini		Cp4.1LG12g10360	Cp4.1LG12:9440006..9445293 (-)	2-Oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	
				-	-	
<i>C. argyrosperma</i>	Silver-seed gourd			-	-	

Таблица 3. Последовательности ПЦР-праймеров, использованных в настоящей работе для анализа генов карликовости арбуза

Ген	Прямой праймер (5' → 3')	Обратный праймер (5' → 3')	Цель	Ссылка
<i>dw-1</i>	TGATGCTCGCAGGТААААТА	ATCCCACTTCATTCCTCAAA	Маркер Indel1	[34]
	ТАТГСТТАТАСТСТСАСТГГААТТ	ТТААСАТТГСАГССАААААТАГ	Маркер dCAPS3	[34]
	ТТГТТГТСТТТГГТТТАСТГ	ААТГАТТСАССАССТСТААТГ	Количественная ОТ-ПЦР	[34]
<i>df</i>	ATGGGAAGCATCAAAAТААССГА	ССТТССГГАССАТАСГТТТАГ	Секвенирование	—
	АСССГАТТСТТТСССТТСТТС	САГССТТССАСАТАГАССТСТТС	»	—
	ГССТСАСГАСТАСГТТСААТА	GGТААAGCGGTGGTTGAGTT	»	—
	GAGTCTATGTGGAAGGCTGATG	ТТААССТАСТТТААСССТGGCTGT	»	—
	ГССТСАСГАСТАСГТТСААТА	САГССТТССАСАТАГАССТСТТС	Количественная ОТ-ПЦР	—
<i>dsh</i>	ATGTCAGAAGAATCATCGAТГА	ТААСССТААГТССГГАГСА	Секвенирование	—
	СТАССАГТГАТGGACATGGATТАТ	GTGCTTТССААААСГТТСТАТТ	»	—
	СГАСТТАGGGTТТАСГГААСАА	ССТСГТАТТТССТТТСТССААСА	»	—
	ССТСГАААСТССААСГААГАА	ТСАТТСТАСААТТССГГСАААТТС	»	—
	СГАСТТАGGGTТТАСГГААС	GCTCTCAAAAATТАТСТССА	Количественная ОТ-ПЦР	[32]
<i>df2</i>	ATGTCATCAAAAГААТGGATAGATG	АССАСТСТАСССТССАААСТ	Секвенирование	—
	СГАССГАСГАСТГТТАСТТ	АССАСТСТАСССТССАААСТ	»	—
	GCCCAAACTTCTCTGCTTCT	СТССАГТАСААСАААТАGGGT	»	—
	GGTAGAGTGGTСAGATТГААТТА	АТТГСТССААСССТССАТААА	»	—
	GAGGCGAGTGGTТТГАТГАТА	ТТАТАТТССАГТААААТСТТТААГТGTG	»	—
<i>dsh2</i>	ССААСТСААССАССАСТТА	СТССАГТАСААСАААТАGGGT	Количественная ОТ-ПЦР	—
	ATGGCCCACTCCCAAAAATG	СТТСАГАССАТАСГСТТАГ	Секвенирование	—
	СТССАСАТТСССГАСААСАА	ССТТССАТАТАГАССТСТАААС	»	—
	GAGTCTATGTGGAAGGCTGATG	ТТАГССТАСТТТСАСССТGGCTATG	»	—
	GAGACGAAGCGGAAAСТГАА	ТGAGCAATAGCAGAAГССAGAG	Количественная ОТ-ПЦР	—



**Рис. 1.** Анализ аллельного полиморфизма гена *dw-1* среди образцов арбуза коллекции ВИР с маркерами Indell и dCAPS3. Список образцов приведен в табл. 1. Ожидаемая длина фрагментов при скрининге с маркером Indell: нормальный аллель 171 пн, мутантный аллель 166 пн. Ожидаемая длина фрагментов при скрининге с маркером dCAPS3: нормальный аллель 121 пн, мутантный аллель 91 + 29 пн. Красным цветом обозначены номера карликовых образцов – мутантов по *dw-1*, синим цветом обозначен ложноположительный результат при скрининге с маркером Indell, черными стрелками обозначены ультракустовые образцы, красными стрелками обозначены кустовые образцы – мутанты по *dw-1*.

ный на амплификации и гидролизе эндонуклеазой *EcoRI* несинонимичной замены в кодирующей части гена [33]. Для анализа аллельного состояния гена *dw-1* в сформированной выборке из коллекции ВИР, которая была представлена 12 кустовыми, двумя ультракустовыми, девятью короткоплетистыми и 28 плетистыми образцами (табл. 1), мы использовали оба типа молекулярных маркеров.

В результате нами было замечено, что маркеры Indell дали ложноположительный результат с плетистым образцом № 14 (сорт Солярис) (рис. 1). Остальные результаты анализа с обоими маркерами подтверждали друг друга. Мутантный аллель гена *dw-1* был выявлен у двух ультракустовых и десяти кустовых фенотипов (рис. 1). Оставшиеся два кустовых фенотипа № 47 и 49, представленный образцом Азербайджан местный (К-4039), вероятно, являются мутантами по другому гену.

Кустовые фенотипы № 47 и 49 (образец Азербайджан местный, К-4039) и родственные им короткоплетистые № 46 и 48 были взяты для анализа других генов карликовости *df* и *dsh*. В данную выборку также попали ультракустовые формы № 42 и 44 и родственные им плетистые № 43 и 45 (сорт Sweet Treat, К-5373), поскольку по нашему предположению данные образцы являются мутантами не только по гену *dw-1*, но и по другому гену, в результате чего у них проявился такой фенотип (табл. 1).

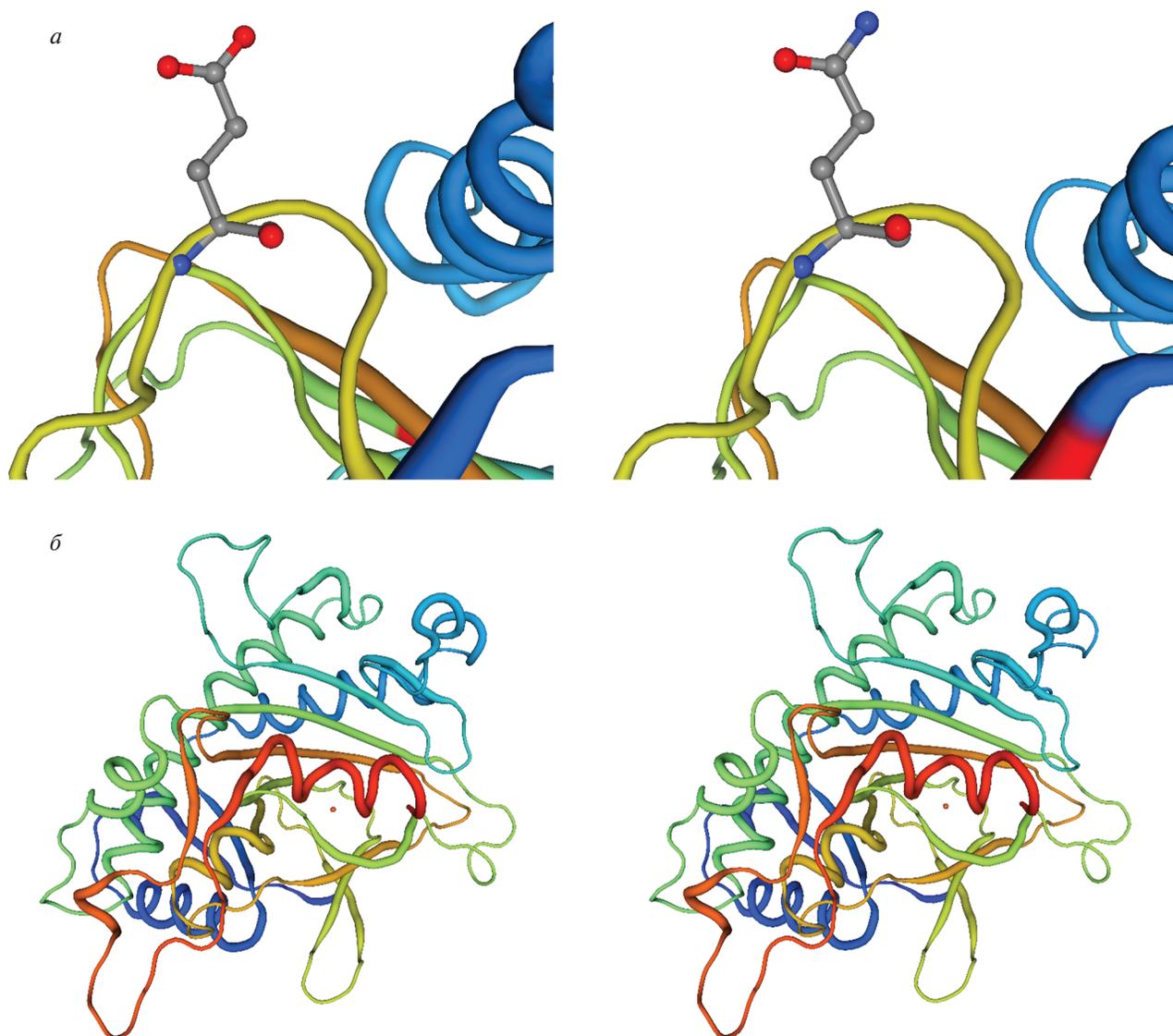
В результате секвенирования кодирующей части гена *df* и интрона мутаций не было выявлено ни в одном анализируемом образце. В гене *dsh* нам удалось обнаружить одну несинонимичную замену во втором экзоне во всех образцах по сравнению с референсным сортом Charleston Gray,

приводящую к замене глутаминовой кислоты (E) на глутамин (Q) (рис. 2) в положении 223. Однако каких-то существенных изменений в структуре белка эта замена не вызвала. Остальные выявленные мутации являлись однонуклеотидными инсерциями и делециями в интроне гена, не приводящими к изменению предсказанного белкового продукта. Таким образом, необходимо было расширить поиск генов-кандидатов для потенциально нового гена кустовости, характерного для К-4039.

#### Поиск потенциальных новых генов-кандидатов, отвечающих за формирование кустового фенотипа арбуза

Далее нами был проведен поиск ортологичных и паралогичных копий генов *dw-1*, *df* и *dsh* в геномах представителей семейства Cucurbitaceae, секвенированных к настоящему моменту.

***dw-1*.** В результате проведенного анализа для гена *dw-1* было установлено, что в семействе Cucurbitaceae у образцов, принадлежащих к трибе Cucurbitae (тыква крупноплодная *C. maxima*, тыква мускатная *C. moschata*), а также у дыни *C. melo* имеется дополнительная копия данного гена, а у тыквы обыкновенной *C. pepo* и тыквы серебристосемянной *C. argyrosperma* К. Koch – две копии гена *dw-1* (табл. 2). На основании выявленных последовательностей был проведен филогенетический анализ, демонстрирующий, что дупликация *dw-1* произошла у общего предка Cucurbitae (рис. 3, синий цвет). Дополнительные копии гена *dw-1* в геноме *C. melo*, *C. pepo* и *C. argyrosperma* образовались в результате независимых актов дупликации. У арбуза дополнительная копия гена не была обнаружена.



**Рис. 2.** Предсказанная структура белка dsh. *а* – изменение аминокислотного остатка глутаминовая кислота (E) на глутамин (Q) в положении 223 у проанализированных образцов арбуза по сравнению с референсным сортом Charleston Gray, *б* – сохранение предсказанной структуры белка dsh у проанализированных образцов арбуза по сравнению с референсным сортом Charleston Gray. Список образцов приведен в тексте статьи.

**df.** Нам удалось выявить в геномах представителей Cucurbitaceae от двух до трех копий гена *df*, причем данные дубликации происходили на разных этапах эволюции семейства (табл. 2, рис. 4). Группа 1, в которую входит ген *df* (рис. 4, зеленый фон), представлена одним геном у всех изученных видов, кроме восковой тыквы *B. hispida* (Thunb.) Cogn. В ее геноме произошла дополнительная дубликация. Кроме того, при поиске гомологичных последовательностей в геноме *B. hispida* удалось также обнаружить четвертую аннотированную последовательность Bhi09G000068, которая лежит внутри Bhi09G000069 (табл. 2).

Вторая группа генов, обозначенная нами как *df-2* (рис. 4, красный фон), образовалась в резуль-

тате дубликации *df-1* у предка Benincaseae. При этом в роду *Cucumis* произошла дополнительная дубликация гена, которая сохранилась у всех проанализированных генотипов (включая неаннотированную последовательность в хромосоме 1 в геноме *C. melo*), кроме *C. sativus* PI 183967 (табл. 2).

К третьей группе генов, обозначенной как *df-3* (рис. 4, синий фон), принадлежат последовательности, обнаруженные только в роду *Cucurbita*, включая неаннотированную последовательность в скаффолде 029 *C. argyrosperma*. Данная клада, вероятно, образовалась в результате дубликации у предка Cucurbitaeae.

Таким образом, в результате поиска по гомологии и анализу последовательностей нам уда-

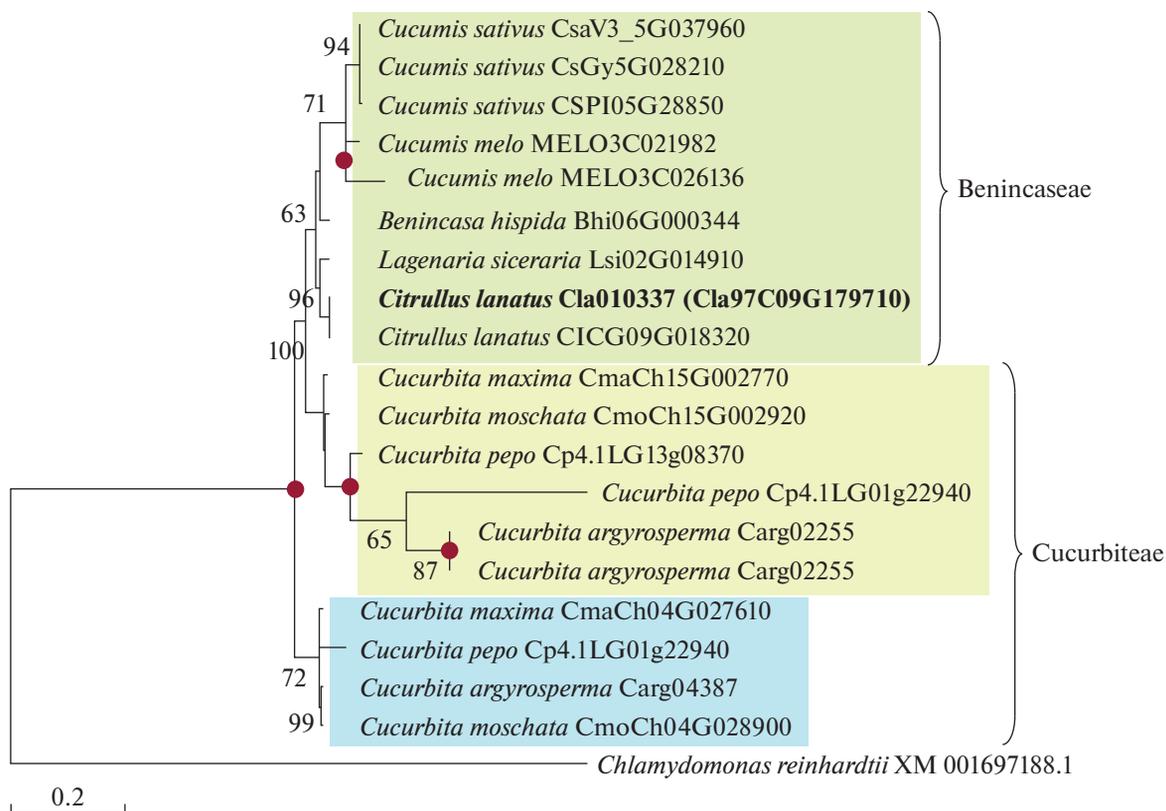


Рис. 3. Анализ филогенетического сходства генов *dw-1* (CDS). Жирным шрифтом выделен ген *dw-1* арбуза. Зеленым и синим фоном выделены разные группы генов. Красными кругами обозначены выявленные акты дупликации генов.

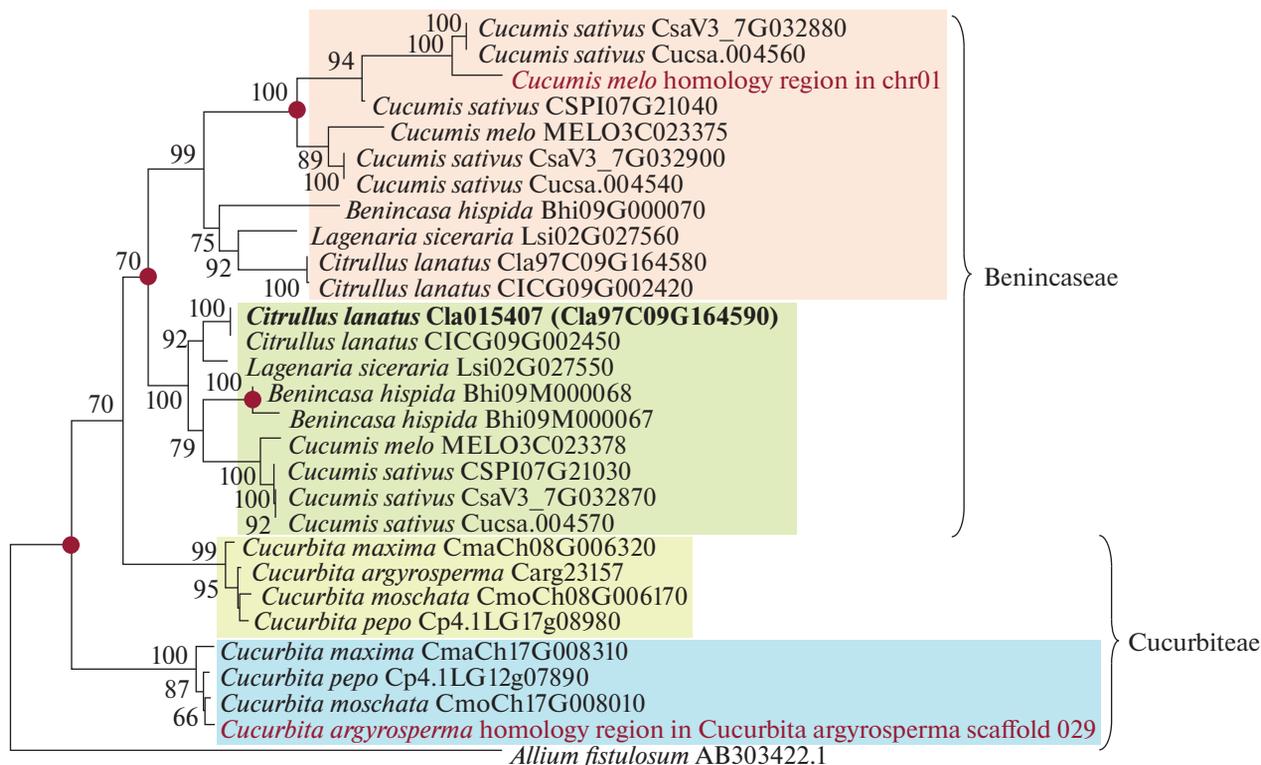


Рис. 4. Анализ филогенетического сходства генов *df* (CDS). Жирным шрифтом выделен ген *df* арбуза. Красным, зеленым и синим фоном выделены разные группы генов. Красными кругами обозначены выявленные акты дупликации генов.

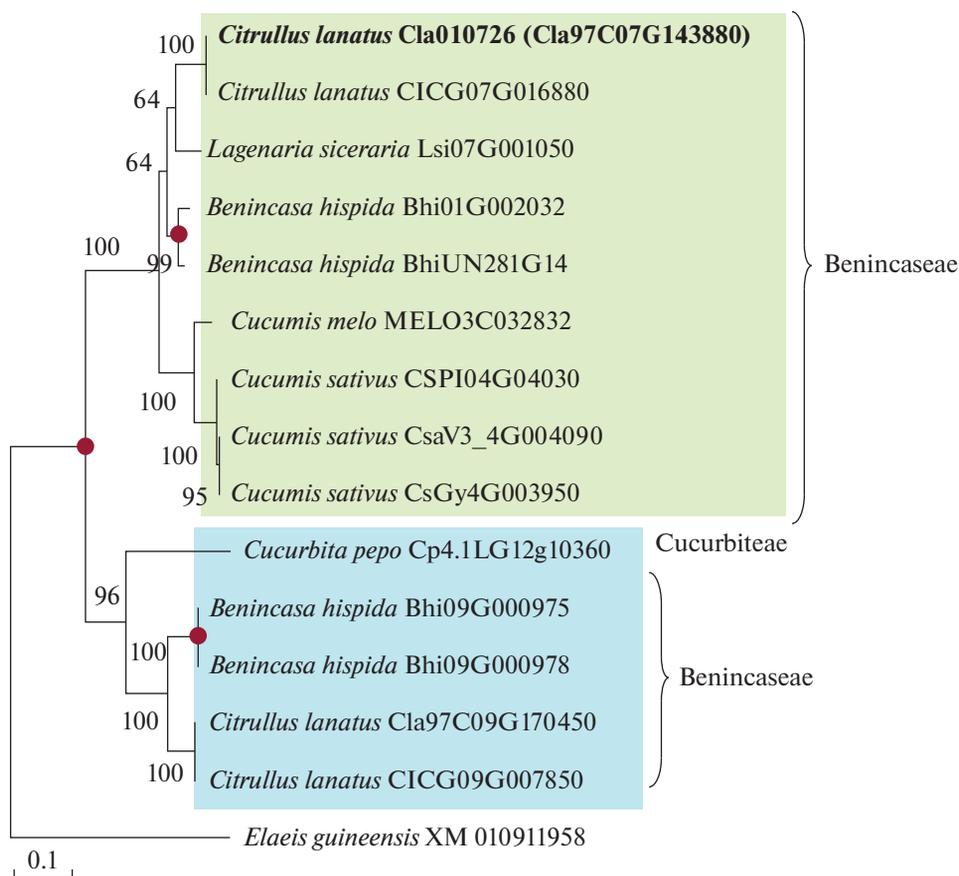


Рис. 5. Анализ филогенетического сходства генов *dsh* (CDS). Жирным шрифтом выделен ген *dsh* арбуза. Зеленым и синим фоном выделены разные группы генов. Красными кругами обозначены выявленные акты дупликации генов.

лось выявить дополнительную копию гена *df* арбуза, которую мы обозначили *df2*.

***dsh***. В результате поиска по гомологии нам удалось выявить дополнительные копии гена *dsh* только у тыквы обыкновенной *C. pepo*, арбуза *C. lanatus* и восковой тыквы *B. hispida*. Причем у *B. hispida* данный ген дублировался дважды в обеих кладах. Вероятнее всего, дупликация данного гена возникла на ранних этапах эволюции семейства Cucurbitaceae, однако не сохранилась в геномах остальных представителей семейства (рис. 5). Таким образом, нам удалось выявить в геноме арбуза дополнительную копию гена *dsh*, которую мы обозначили как *dsh2*.

#### Анализ аллельного состояния и уровня экспрессии выявленных генов

Выявленные гены *df2* (гиббереллин-2 $\beta$ -диоксигеназа) и *dsh2* (гиббереллин-3 $\beta$ -гидроксилаза) обладают двухэкзонной структурой, как и их гомологичные копии *df* и *dsh*; в каждом из них сохранены ключевые домены PF03171 (2OG-Fe(II) oxygenase superfamily) и PF14226 (non-haem dioxygenase in morphine synthesis N-terminal). С помо-

щью разработанных праймеров было осуществлено секвенирование последовательностей данных генов в геномах образцов Азербайджан местный и Sweet Treat, однако каких-либо изменений в кодирующих частях генов выявлено не было. Вероятно, данные гены также не являются причиной проявления кустового фенотипа растений.

На следующем этапе был проведен анализ относительного уровня экспрессии данных генов в сравнении с *dw-1*, *df* и *dsh* в стеблях и листьях следующих образцов: Charleston Gray 133 (плетистый), Родник (плетистый), Азербайджан местный (короткоплетистый) и Святослав (кустовой) (табл. 1, серый фон).

Было установлено, что экспрессия *dw-1*, *df*, *dsh* и *df2* значимо выше в стеблях растений, чем в листьях (рис. 6). Активность генов *dw-1* и *df* оказалась значимо ниже в стеблях образцов Азербайджан местный (короткоплетистый) и Святослав (кустовой) по сравнению с плетистыми сортами Charleston Gray 133 и Родник. Ген *dsh* экспрессировался слабее всего в кустовом сорте Святослав. Также его экспрессия была значимо ниже в сорте Родник. Экспрессия генов *df2* и *dsh2* находится на низком уровне во всех проанализированных об-

разцах, экспрессия в стеблях у разных форм не различается (рис. 6). Таким образом, гены *df2* и *dsh2*, вероятно, являются функционально активными, однако мы предполагаем, что они не вносят вклад в изменчивость по такому признаку, как длина стебля.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время селекция бахчевых культур является одним из важных направлений развития сельского хозяйства. При этом наиболее удобными для механизированных обработок и уборки плодов являются сорта бахчевых культур с малым габитусом растения: кустовые и плетистые [40].

Несмотря на то что геном арбуза *C. lanatus* секвенирован [41, 42], к настоящему моменту известны функции только небольшого числа генов, контролируемых хозяйственно ценные признаки [42–49]. Таким образом, в настоящее время актуальной задачей генетики арбуза является выявление эффективных генетических источников и доноров для создания новых сортов, а также идентификация в геноме данных доноров ценных для селекции генов-кандидатов.

К сегодняшнему моменту известны последовательности только трех генов компактности растений арбуза, различающихся по фенотипическому проявлению: *dw-1*, *df* и *dsh* [31, 33, 35, 36]. В настоящей работе был проведен скрининг выборки образцов арбуза из уникальной коллекции ВИР для выявления аллельного состояния этих известных генов. Нам удалось при помощи диагностических маркеров подтвердить, что все кустовые (и ультракустовые), но не короткоплетистые образцы арбуза коллекции ВИР и селекционные образцы Кубанской опытной станции ВИР, изученные в настоящей работе, являются носителями мутантного (нефункционального) аллеля гена *dw-1* (рис. 1). Ранее при использовании данных источников признака кустовости отбор велся только по фенотипическим маркерам [1, 50]. В отличие от мутантов по другим генам карликовости у мутантов по гену *dw-1* наблюдается неравномерное укорочение междоузлий и гофрированность листа. В дальнейшем для отбора селекционного материала на более ранних стадиях развития из двух известных маркеров [33] можно рекомендовать маркер dCAPS3 как наиболее подходящий, так как другой маркер, Indell, давал ложноположительный результат.

Тем не менее в коллекции нам удалось обнаружить кустовые образцы, в которых гены *dw-1*, *df* и *dsh*, а также выявленные в настоящей работе копии данных генов *df2* и *dsh2*, не утратили свою функциональность, что было подтверждено анализом структуры данных генов и их относительного уровня экспрессии. Это свидетельствует о

том, что в коллекции бахчевых культур ВИР сохранились источники нового гена карликовости.

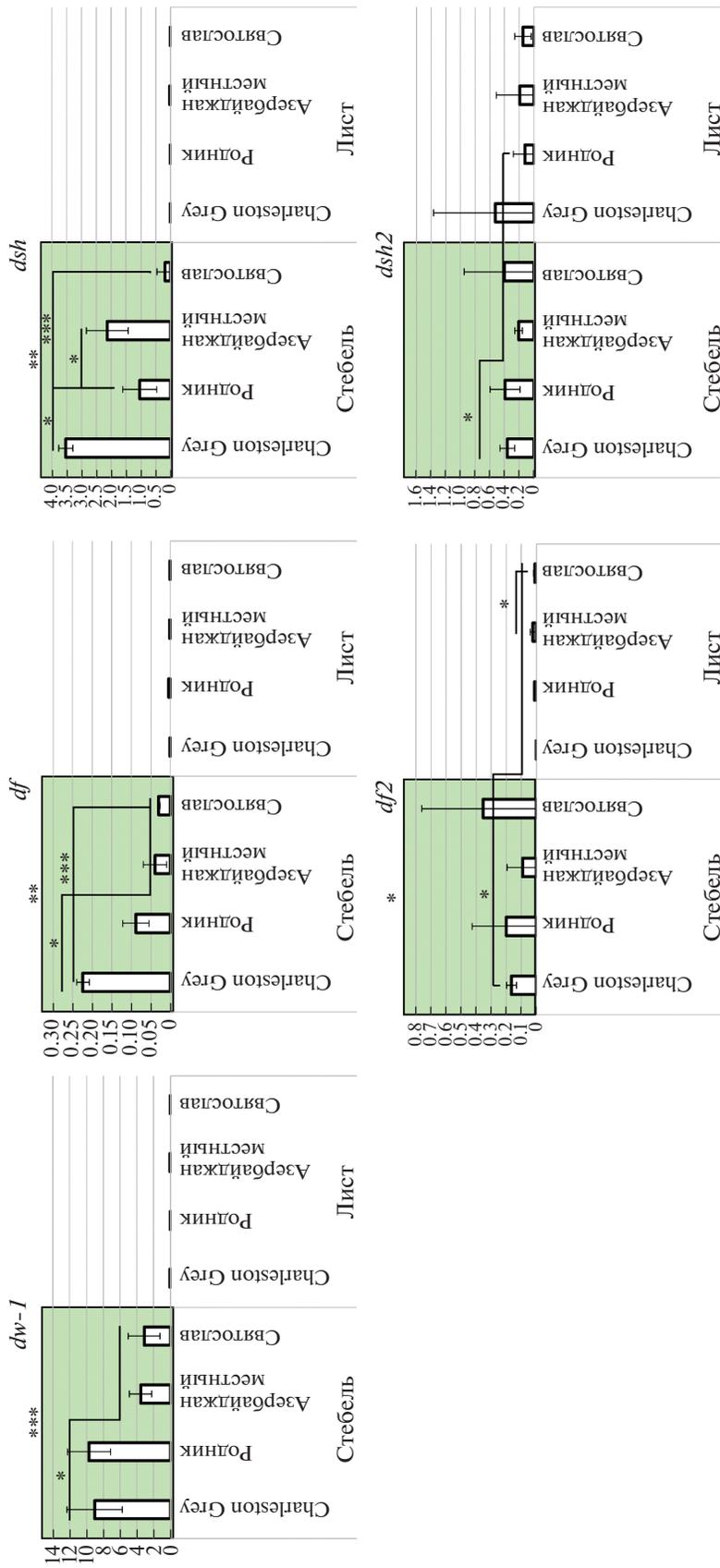
Интересным является фенотипическое проявление мутантов по новому гену карликовости арбуза в популяции Азербайджан местный (К-4039). У кустовых фенотипов изменяется не только габитус, но и окраска листьев – с зеленой на зеленоватую. При этом такая окраска не характерна для плетистых и короткоплетистых форм в данной популяции. Возможно, ген карликовости является сцепленным с геном зеленоватой окраски листьев, поскольку схожий цвет листьев был замечен нами также у другого образца Bush Charleston Gray (К-5131), являющегося мутантом по гену *dw-1* (рис. 1).

В настоящей работе мы также обнаружили два ультракустовых фенотипа в популяции Sweet Treat (К-5373) (табл. 1). Данные растения отличаются нехарактерным для *dw-1* ультракомпактным габитусом и ультрагофрированным листом с зеленоватой окраской. Мы предположили, что данные растения могут являться мутантами не только по гену *dw-1*, но и по новому гену карликовости и гену зеленоватой окраски листьев.

Подобный фенотип известен для дыни *C. melo* L., у которой ген желтовато-зеленоватой окраски листьев *uv* сцеплен с геном компактности *si-1*, в результате чего мутанты по *uv* и *si-1* отличаются суперкомпактной формой с измененной окраской листьев [17].

Кроме того, у огурца *C. sativus* известны гены *v-1* и *v-2* (*Virescent Leaf*). Ген *v-1* был картирован в хромосоме 6, где ген *CsaCNGCs*, который кодирует управляемый циклическими нуклеотидами ионный канал, является единственным геном-кандидатом [51]. Ген *v-2* идентифицирован в линии 104Y, в которой семядольные и пять настоящих листьев были желтовато-зеленоватого цвета [52]. Также данная линия характеризовалась замедленным ростом, задержкой цветения и карликовостью. Однако в отличие от выявленных в настоящем исследовании мутантов арбуза желтовато-зеленоватые настоящие листья постепенно становились зелеными с повышенным содержанием хлорофилла. В качестве наиболее вероятного гена-кандидата желтовато-зеленоватого листа у огурца был предложен ген в хромосоме 3, кодирующий белок F-box, вовлеченный в биосинтез ауксина, что, в свою очередь, приводит к нарушению процесса регуляции биосинтеза хлорофилла [52].

Таким образом, выявление в коллекции ВИР новых источников кустовости дает начало исследованиям, заключающимся в идентификации и анализе генов-кандидатов карликовости и зеленоватой окраски листьев. Одновременно представляет интерес природа короткоплетистости. Такие формы не имеют мутации loss-of-function в кодирующей части гена *dw-1* в отличие от кустовых форм, но так же, как и у кустовых форм, экс-



**Рис. 6.** Относительный уровень экспрессии генов *dw-1*, *df*, *dsh* и их копий *df2* и *dsh2* в стеблях и листьях образцов арбуза коллекции ВИР. Планки погрешности отражают стандартную ошибку. Статистическая значимость определялась *t*-тестом. Различия статистически значимы между образцами: \* при  $p \leq 0.05$ , \*\* при  $p \leq 0.01$ , \*\*\* при  $p \leq 0.001$ .

прессия гена *dw-1* в стебле у короткоплетистых снижена в сравнении с плетистыми формами. То же самое наблюдается для гена *df*, но не *dsh*. У последнего экспрессия снижена только в стебле кустовых форм. Эти сведения намечают поиск гена-кандидата для короткоплетистости в последовательностях, связанных с регуляцией *dw-1* и *df*, но не *dsh*.

В настоящей работе нами был проведен скрининг выборки образцов арбуза коллекции бахчевых культур ВИР им. Н.И. Вавилова для выявления аллельного состояния известных генов, определяющих компактную форму растений арбуза, *dw-1*, *df* и *dsh*. Все кустовые сорта и линии арбуза коллекции ВИР, кроме двух кустовых образцов популяции Азербайджан местный, являются носителями нефункционального аллеля гена *dw-1*. В геномах данных образцов в генах *dw-1*, *df* и *dsh* и их копиях, как и *dw-1*, не были выявлены значимые мутации, которые могли бы отразиться на функциональности генов. Кроме того, мы обнаружили два ультракустовых мутанта по *dw-1* в популяции Sweet Treat, которые отличаются нехарактерным ультракомпактным габитусом, ультрагофрированным листом и зеленоватой окраской. Это свидетельствует о том, что в коллекции бахчевых культур ВИР содержатся источники новых генов, определяющих компактную форму.

Коллектив благодарит Анастасию Янышевскую (студент ЛГУ) за техническую помощь.

Определение доноров гена *dw-1* в коллекции арбуза ВИР с помощью ДНК-маркеров выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования России в рамках соглашения № 075-15-2020-911 от 16.11.2020 о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня “Агротехнологии будущего”. Поиск новых генов кустовости арбуза выполнен в рамках темы НИР 0481-2019-0001/0481-2022-0007.

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. Tekhanovich G.A., Elatskova A.G., Elatskova Y.A. Genetic sources for breeding bushy and short-vine watermelon cultivars // Proc. Appl. Bot. Genet. Breed. 2019. V. 180. № 2. P. 89–94. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2019-2-89-94>
2. Peng J., Richards D.E., Hartley N.M. et al. ‘Green revolution’ genes encode mutant gibberellin response modulators // Nature. 1999. V. 400. № 6741. P. 256–261. <https://doi.org/10.1038/22307>
3. Spielmeyer W., Ellis M.H., Chandler P.M. Semidwarf (sd-1), “green revolution” rice, contains a defective gibberellin 20-oxidase gene // Proc. Natl Acad. Sci. 2002. V. 99. № 13. P. 9043–9048. <https://doi.org/10.1073/pnas.132266399>
4. Multani D.S., Briggs S.P., Chamberlin M.A. et al. Loss of an MDR transporter in compact stalks of maize br2 and sorghum dw3 mutants // Science. 2003. V. 302. № 5642. P. 81–84. <https://doi.org/10.1126/science.1086072>
5. Nomura T., Jager C.E., Kitasaka Y. et al. Brassinosteroid deficiency due to truncated steroid 5  $\alpha$ -reductase causes dwarfism in the lk mutant of pea // Plant Physiol. 2004. V. 135. № 4. P. 2220–2229. <https://doi.org/10.1104/pp.104.043786>
6. Pearce S., Saville R., Vaughan S.P. et al. Molecular characterization of Rht-1 dwarfing genes in hexaploid wheat // Plant Physiol. 2011. V. 157. № 4. P. 1820–1831. <https://doi.org/10.1104/pp.111.183657>
7. Pearce S., Saville R., Vaughan S.P. et al. A cytochrome P450, OsDSS1, is involved in growth and drought stress responses in rice (*Oryza sativa* L.) // Plant Mol. Biol. 2015. V. 88. № 1–2. P. 85–99. <https://doi.org/10.1007/s11003-015-0310-5>
8. Shifriss O. Developmental reversal of dominance in *Cucurbita pepo* // Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 1947. V. 50. P. 330–346.
9. Denna D.W., Munger H.M. Morphology of the bush and vine habits and the allelism of the bush genes in *Cucurbita maxima* and *C. pepo* squash // Proc. Amer. Soc. Hort. 1963. V. 82. P. 370–377.
10. Robinson R.W., Munger H.M., Whitaker T.W., Bohn G.W. Genes of the Cucurbitaceae // Hortscience. 1976. V. 11. № 6. P. 554–568.
11. Paris H.S., Brown R.N. The genes of pumpkin and squash // HortScience. 2005. V. 40. № 6. P. 1620–1630. <https://doi.org/10.21273/hortsci.40.6.1620>
12. Wang S., Li H., Zhang Z. et al. Comparative mapping of the dwarf gene Bu from tropical pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne) // Hort. Sin. 2011. V. 38. № 1. P. 95–100.
13. Zhang G., Ren Y., Sun H. et al. A high-density genetic map for anchoring genome sequences and identifying QTLs associated with dwarf vine in pumpkin (*Cucurbita maxima* Duch.) // BMC Genomics. 2015. V. 16. № 1. P. 1101. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2312-8>
14. Hwang J., Oh J., Kim Z. et al. Fine genetic mapping of a locus controlling short internode length in melon (*Cucumis melo* L.) // Mol. Breed. 2014. V. 34. № 3. P. 949–961. <https://doi.org/10.1007/s11032-014-0088-1>
15. Knavel D.E. Inheritance of a short-internode mutant of ‘Mainstream’ muskmelon // HortScience. 1990. V. 25. № 10. P. 1274–1275. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.25.10.1274>
16. Fukino N., Ohara T., Sugiyama M. et al. Mapping of a gene that confers short lateral branching (slb) in melon

- (*Cucumis melo* L.) // *Euphytica*. 2012. V. 187. № 1. P. 133–143.  
<https://doi.org/10.1007/S10681-012-0667-3/FIGURES/4>
17. Pitrat M. Linkage Groups in *Cucumis melo* L. // *J. Hered.* 1991. V. 82. № 5. P. 406–411.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111112>
  18. Xin M., Qin Z., Wang L. et al. Genetic identification of a dwarf mutant in cucumber (*Cucumis sativus* L.) // *Afr. J. Biotechnol.* 2012. V. 11. № 20. P. 4493–4498.  
<https://doi.org/10.5897/AJB11.968>
  19. Hou S., Niu H., Tao Q. et al. A mutant in the CsDET2 gene leads to a systemic brassinosteroid deficiency and super compact phenotype in cucumber (*Cucumis sativus* L.) // *Theor. Appl. Genet.* 2017. V. 130. № 8. P. 1693–1703.  
<https://doi.org/10.1007/s00122-017-2919-z>
  20. Wang H., Li W., Qin Y. et al. The cytochrome P450 gene CsCYP85A1 is a putative candidate for super compact-1 (Scp-1) plant architecture mutation in cucumber (*Cucumis sativus* L.) // *Front. Plant Sci.* 2017. V. 8. P. 1–13.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00266>
  21. Kauffman C.S., Lower R.L. Inheritance of an extreme dwarf plant type in the cucumber // *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 1976. V. 101(2). P. 150–151.
  22. Kubicki B., Soltysiak U., Korzeniewska A. Induced mutation in cucumber (*Cucumis sativus* L.) V. Compact type of growth // *Genet. Pol.* 1986. V. 27. P. 3–4.
  23. Lin T., Wang S., Zhong Y. et al. A truncated F-box protein confers the dwarfism in cucumber // *J. Genet. Genomics.* 2016. V. 43. № 4. P. 223–226.  
<https://doi.org/10.1016/j.jgg.2016.01.007>
  24. Xu L., Wang C., Cao W. et al. CLAVATA1-type receptor-like kinase CsCLAVATA1 is a putative candidate gene for dwarf mutation in cucumber // *Mol. Genet. Genomics.* 2018. V. 293. № 6. P. 1393–1405.  
<https://doi.org/10.1007/s00438-018-1467-9>
  25. Li Y., Yang L., Pathak M. et al. Fine genetic mapping of cp: a recessive gene for compact (dwarf) plant architecture in cucumber, *Cucumis sativus* L. // *Theor. Appl. Genet.* 2011. V. 123. № 6. P. 973–983.  
<https://doi.org/10.1007/s00122-011-1640-6>
  26. Van der Linden L. Marker for compact growth in cucumber. Patent WO/2017/042272. 2018.
  27. Liu P.B.W., Loy J.B. Inheritance and morphology of two dwarf mutants in watermelon // *Amer. Soc. Hort. Sci. J.* 1972. P. 745–748.
  28. Mohr H.C., Sandhu M.S. Inheritance and morphological traits of a double recessive dwarf in watermelon, *Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf. // *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 1975. V. 100(2). P. 135–137.
  29. Dyutin K.E., Afanasyeva E.A. Inheritance of the short vine trait in watermelon // *Cytol. Genet.* 1987. V. 21. № 3. P. 227–229.
  30. Hexun H., Xiaoqi Z., Zhencheng W. et al. Inheritance of male-sterility and dwarfism in watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. and Nakai] // *Sci. Hortic (Amsterdam)*. 1998. V. 74. № 3. P. 175–181.  
[https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(97\)00102-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(97)00102-7)
  31. Dong W., Wu D., Li G. et al. Next-generation sequencing from bulked segregant analysis identifies a dwarfism gene in watermelon // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 2908.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-21293-1>
  32. Dong W., Wu D., Wang C. et al. Characterization of the molecular mechanism underlying the dwarfism of dsh mutant watermelon plants // *Plant Sci.* 2021. V. 313. P. 111074.  
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.111074>
  33. Zhu H., Zhang M., Sun S. et al. A single nucleotide deletion in an ABC transporter gene leads to a dwarf phenotype in watermelon // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. P. 1–13.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01399>
  34. Cho Y., Lee S., Park J. et al. Identification of a candidate gene controlling semi-dwarfism in watermelon, *Citrullus lanatus*, using a combination of genetic linkage mapping and QTL-seq // *Hortic. Environ. Biotechnol.* 2021. V. 62. № 3. P. 447–459.  
<https://doi.org/10.1007/S13580-020-00330-X/TABLES/3>
  35. Gebremeskel H., Dou J., Li B. et al. Molecular mapping and candidate gene analysis for GA3 responsive short internode in watermelon (*Citrullus lanatus*) // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 21. № 1. P. 290.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21010290>
  36. Wei C., Zhu C., Yang L. et al. A point mutation resulting in a 13 bp deletion in the coding sequence of Cldf leads to a GA-deficient dwarf phenotype in watermelon // *Hortic. Res.* 2019. V. 6. № 1. P. 132.  
<https://doi.org/10.1038/s41438-019-0213-8>
  37. Zhang T., Liu J., Amanullah S. et al. Fine mapping of Cla015407 controlling plant height in watermelon // *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 2021. V. 146. № 3. P. 196–205.  
<https://doi.org/10.21273/JASHS04934-20>
  38. Sun Y., Zhang H., Fan M. et al. A mutation in the intron splice acceptor site of a GA3ox gene confers dwarf architecture in watermelon (*Citrullus lanatus* L.) // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. P. 14915.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-71861-7>
  39. Kong Q., Yuan J., Gao L. et al. Evaluation of appropriate reference genes for gene expression normalization during watermelon fruit development // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 6. P. e0130865.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130865>
  40. Теханович Г.А., Елацкова А.Г., Елацков Ю.А. Роль мировой коллекции бахчевых культур ВИР в селекции // *Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции.* 2012. Т. 169. С. 289–294.
  41. Guo S., Zhang J., Sun H. et al. The draft genome of watermelon (*Citrullus lanatus*) and resequencing of 20 diverse accessions // *Nat. Genet.* 2013. V. 45. № 1. P. 51–58.  
<https://doi.org/10.1038/ng.2470>
  42. Guo S., Zhao S., Sun H. et al. Resequencing of 414 cultivated and wild watermelon accessions identifies selection for fruit quality traits // *Nat. Genet.* 2019. V. 51. № 11. P. 1616–1623.  
<https://doi.org/10.1038/s41588-019-0518-4>
  43. Dou J., Zhao S., Lu X. et al. Genetic mapping reveals a candidate gene (CIFS1) for fruit shape in watermelon (*Citrullus lanatus* L.) // *Theor. Appl. Genet.* 2018. V. 131. № 4. P. 947–958.  
<https://doi.org/10.1007/s00122-018-3050-5>
  44. Legendre R., Kuzy J., McGregor C. Markers for selection of three alleles of CISUN25-26-27a (Cla011257) asso-

- ciated with fruit shape in watermelon // *Mol. Breed.* 2020. V. 40. № 2. P. 19.  
<https://doi.org/10.1007/s11032-020-1104-2>
45. Tian S., Jiang L., Gao Q. et al. Efficient CRISPR/Cas9-based gene knockout in watermelon // *Plant Cell Rep.* 2017. V. 36. № 3. P. 399–406.  
<https://doi.org/10.1007/s00299-016-2089-5>
46. Wang Y., Wang J., Guo S. et al. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of ClBG1 decreased seed size and promoted seed germination in watermelon // *Hortic. Res.* 2021. V. 8. № 1. P. 70.  
<https://doi.org/10.1038/s41438-021-00506-1>
47. Tian S., Jiang L., Cui X. et al. Engineering herbicide-resistant watermelon variety through CRISPR/Cas9-mediated base-editing // *Plant Cell Rep.* 2018. V. 37. № 9. P. 1353–1356.  
<https://doi.org/10.1007/s00299-018-2299-0>
48. Zhang J., Guo S., Ji G. et al. A unique chromosome translocation disrupting CIWIP1 leads to gynocy in watermelon // *Plant J.* 2020. V. 101. № 2. P. 265–277.  
<https://doi.org/10.1111/tpj.14537>
49. Zhang M., Liu Q., Yang X. et al. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of Clpsk1 in watermelon to confer resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* // *Plant Cell Rep.* 2020. V. 39. № 5. P. 589–595.  
<https://doi.org/10.1007/s00299-020-02516-0>
50. Теханович Г.А., Елацкова А.Г., Елацков Ю.А. Новые источники генетической коллекции бахчевых культур // Науч. обеспечение производства сельскохозяйственных культур в современных условиях. 2016. P. 198–203.
51. Miao H., Zhang S., Wang M. et al. Fine mapping of virescent leaf gene v-1 in cucumber (*Cucumis sativus* L.) // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. V. 17. № 10. P. 1602.  
<https://doi.org/10.3390/ijms17101602>
52. Zhang K., Li Y., Zhu W. et al. Fine mapping and transcriptome analysis of virescent leaf gene v-2 in cucumber (*Cucumis sativus* L.) // *Front. Plant Sci.* 2020. V. 11. P. 1458.  
<https://doi.org/10.3389/FPLS.2020.570817/BIBTEX>

## Analysis of the Genes That Determine the Dwarf Form of Watermelon *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai in the VIR Collection

K. V. Strygina<sup>a, \*</sup>, A. G. Elatskova<sup>a</sup>, Yu. A. Elatskov<sup>a</sup>, G. A. Tekhanovich<sup>a</sup>, and E. K. Khlestkina<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Vavilov Research Institute of Plant Industry, Saint Petersburg, 190000 Russia

\*e-mail: k.strygina@vir.nw.ru

The dwarf watermelon forms, determined by bushiness and semi-bushiness, are of great economic importance, determining the rational use of sown areas due to the high planting density and the possibility of mechanized processing and harvesting. In this regard, the study of genes that determine the small habitus of watermelon plants is an important task for accelerating the selection. The aim of this work was to analyze the known and search for new dwarf genes of watermelon *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai by analyzing the unique VIR collection of melon crops and selection forms of the Kuban experimental station of VIR. As a result, the known mutation in the *dw-1* gene (ABC transporter) was revealed in all bush and ultra-bush genotypes, except for two samples from Azerbaijan. The dwarfism of these two samples was not associated with other known genes, *dsh* (gibberellin 20-oxidase) and *df* (gibberellin 3 $\beta$ -hydroxylase), or their copies identified in the present study *df2* and *dsh2*. Thus, the VIR collection of melon crops contains potentially new genes that determine the dwarfism of watermelon.

**Keywords:** *Citrullus*, Cucurbitaceae, gene duplication, dwarf, molecular markers, short vine.

ГОМОЛОГИ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К ФИТОФТОРОЗУ  
У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ КЛУБНЕОБРАЗУЮЩИХ ВИДОВ РОДА *Solanum* L.<sup>1</sup>© 2022 г. А. А. Гурина<sup>1</sup>, \*, Н. В. Алпатьева<sup>1</sup>, Н. А. Чалая<sup>1</sup>,  
Н. В. Мироненко<sup>2</sup>, А. В. Хютти<sup>2</sup>, Е. В. Рогозина<sup>1</sup><sup>1</sup>Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова,  
Санкт-Петербург, 190000 Россия<sup>2</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений,  
Санкт-Петербург, Пушкин, 196608 Россия

\*e-mail: a.gurina@vir.nw.ru

Поступила в редакцию 16.06.2022 г.

После доработки 27.06.2022 г.

Принята к публикации 28.06.2022 г.

Возбудитель фитофтороза, оомицет *Phytophthora infestans* Mont de Bary, обладает высокой степенью изменчивости, в результате чего новые расы патогена способны преодолеть устойчивость длительное время возделываемых сортов картофеля. Примитивные культурные виды картофеля относятся к первичному генофонду, представители которого легко скрещиваются с *Solanum tuberosum* L., и их использование для селекции перспективно. Цель исследования – идентификация генотипов диких и примитивных культурных видов картофеля ВИР, несущих *Rpi*-гены. Впервые образцы примитивных культурных и диких видов картофеля (105 генотипов из коллекции ВИР) проанализированы на устойчивость к фитофторозу и наличие у них SCAR-маркеров *Rpi*-генов (*RB/blb1*, *Rpi-blb2*, *R2-like*, *Rpi-vnt1.3*). У культурного вида *S. stenotomum* subsp. *stenotomum* обнаружена высокая (0.71) частота одного из двух маркерных фрагментов гена *RB/blb1* (*Rpi-sto1*), исходно охарактеризованного у дикого североамериканского вида *S. bulbocastanum*, который относится к третичному генофонду видов картофеля. У видов *S. phureja* и *S. stenotomum* subsp. *goniocalyx* обнаружена высокая (0.71–0.88) частота маркера гена *Rpi-vnt1.3*, исходно охарактеризованного у дикого южноамериканского вида *S. venturii*. Впервые у примитивных видов картофеля охарактеризованы последовательности фрагментов – предполагаемых гомологов генов *Rpi-vnt1* и *RB/blb1*. У представителей *S. ajanhuiri*, *S. stenotomum* и *S. phureja* обнаружены три варианта нуклеотидных последовательностей, гомологичных *Rpi-vnt1.3*. Сделано предположение о возможной роли обнаруженного полиморфизма маркерных фрагментов *Rpi-vnt1.3* в обеспечении устойчивости примитивных культурных видов к фитофторозу.

**Ключевые слова:** *Rpi*-гены, SCAR-маркеры, *Phytophthora infestans*, примитивные виды картофеля.

**DOI:** 10.31857/S0016675822120049

Фитофтороз (возбудитель *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) – одно из наиболее вредоносных заболеваний картофеля. Вспышка этого заболевания была причиной Ирландского голода в середине XIX в. [1]. Наиболее эффективным методом борьбы с этим заболеванием является возделывание устойчивых сортов. Такие сорта создаются в результате интрогрессии генов устойчивости (*Rpi*) путем межвидовой гибридизации и последующего отбора. К настоящему времени у картофеля известно более 20 генов устойчивости к фитофторозу. В практической селекции в основном используют образцы с *Rpi*-генами, источниками которых являются дикие виды картофеля из Се-

верной и Центральной Америки – *S. bulbocastanum* Dunal, *S. demissum* Lindl., *S. stoloniferum* Schlttdl. [2]. Гены устойчивости также обнаружены и в других диких видах: североамериканских *S. cardiophyllum* Lindl. и *S. pinnatisectum* Dunal и южноамериканских *S. berthaultii* Hawkes, *S. mochiquense* Ochoa и *S. venturii* Hawkes & Hjert. и др. [3]. Для *P. infestans* характерна высокая внутривидовая генетическая вариабельность изолятов [4], которая фенотипически проявляется в виде образования новых (более вирулентных, агрессивных) рас патогена. По причине интенсивного расообразовательного процесса невозможно получить стабильно устойчивые сорта картофеля, и для эффективного проведения селекции по этому признаку требуются новые, ранее не используемые гены устойчивости. Источниками новых генов

<sup>1</sup> Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0016675822120049 для авторизованных пользователей.

устойчивости могут стать устойчивые примитивные культурные виды, являющиеся представителями первичного генофонда, что значительно облегчает процесс интрогрессии генов, ввиду отсутствия биологических барьеров для скрещивания [5].

Геном возбудителя фитофтороза секвенирован [6, 7]. С помощью молекулярно-генетических подходов достигнут заметный прогресс в изучении популяций *P. infestans*, молекулярных механизмов взаимодействия хозяина и патогена, генетического контроля вирулентности возбудителя и устойчивости хозяина [8]. Однако до настоящего времени нет единого мнения о том, где находится центр происхождения возбудителя фитофтороза картофеля: в центральной Мексике или южноамериканских Андах [9]. Примечательно, что оба возможных центра происхождения *P. infestans* расположены в пределах территорий, обозначенных как центры разнообразия клубнеобразующих видов секции *Petota Dumort.* рода *Solanum L.* — родичей возделываемого картофеля. В Южной Америке наибольшее видовое разнообразие диких и культурных картофелей выявлено на территории Перу, вторичный центр биоразнообразия картофелей находится на территории Мексики [10].

Клубнеобразующие виды рода *Solanum* занимают протяженный ареал, простирающийся от 38° с.ш. до 41° ю.ш., произрастают в широком диапазоне вертикальной зональности — от 0 до 5000 м над уровнем моря [10]. В пределах этой территории определены четыре центра возникновения фитофтороустойчивых форм у диких и культурных видов картофеля [11]. Изучение генетического контроля признака устойчивости к фитофторозу у видов картофеля, сформировавшихся в разных частях общего ареала секции *Petota*, является важным этапом на пути познания их филогении, установления их родственных связей. Сравнительный анализ *Rpi*-генов, выявление степени их структурного сходства позволит приблизиться к пониманию путей эволюции генетических детерминант устойчивости растений к патогену *P. infestans*. Секвенирование генома удвоенного моноплоида — клона *S. phureja* DM1-3 516 R44 [12] и его изучение активизировало интерес к группе культурных видов картофеля (ландрасам, возделываемым коренным населением в различных районах Анд). В референсной последовательности генома в результате биоинформатического поиска обнаружено 435 NBS-LRR генов (Nucleotide binding site, leucine rich repeats). К этому семейству относятся все основные *R*-гены растений, являющиеся ключевыми в обеспечении устойчивости растений к патогенам разной природы [13]. Методами классической генетики у межвидового гибрида *S. stenotomum* × *S. phureja* выявлен ген *Rpi-phu1*, локализованный на хромосоме 9. Ген *Rpi-phu1* отличается широким спектром действия, обеспечивая устойчивость как листьев, так

и клубней к фитофторозу [14, 15]. У дикого картофеля из Аргентины *S. venturii* в том же локусе хромосомы 9 идентифицирован ген устойчивости к фитофторозу *Rpi-vnt1.1* (и аллельные варианты *Rpi-vnt1.2* и *Rpi-vnt1.3*), который является гомологом гена *Tm-2<sup>2</sup>*, обеспечивающего устойчивость томата (*S. lycopersicum L.*) к вирусу мозаики томата [16]. Белки, кодируемые *Rpi-vnt1.1* и *Rpi-vnt1.3*, имеют 73% идентичности аминокислотной последовательности с белком гена *Tm-2<sup>2</sup>* [17]. Устойчивость к широкому спектру штаммов *P. infestans* обеспечивают гены дикого мексиканского вида *S. bulbocastanum*: *RB/blb1* [18], *Rpi-blb2* [19, 20] и *Rpi-blb3* [21]. В референсной последовательности DM1-3 516 R44 показана кластерная организация генов устойчивости: в том числе гомологи гена *Rpi-vnt1* на хромосоме 9, гена *Rpi-blb2* на хромосоме 6 и наиболее представительный (55 *R*-генов) кластер на хромосоме 4 [13]. Большое семейство генов, расположенных на хромосоме 4 и обеспечивающих защиту от фитофтороза, включает *R2*, *R2-like*, *Rpi-abpt*, *Rpi-blb3*, *Rpi-edn1.1*, *Rpi-hjt1.1*, *Rpi-hjt1.2*, *Rpi-hjt1.3*, *Rpi-snk1.1*, *Rpi-snk1.2* [22].

Разнообразие примитивных культурных видов картофеля, обусловленное их возделыванием в сильно различающихся климатических условиях [23], позволяет предположить наличие других, ранее неизвестных генов устойчивости к различным заболеваниям, в том числе к фитофторозу. В частности, по исследованиям Gabriel с соавт. у *S. phureja* фитофтороустойчивые образцы встречаются довольно часто, что подводит исследователей к необходимости более широкого изучения этой группы [24].

Цель данного исследования — идентификация генотипов, несущих гены устойчивости к фитофторозу (*Rpi*-гены), среди примитивных культурных видов, а также ранее не охарактеризованных образцов диких видов картофеля в коллекции ВИР. Поскольку спектр известных *Rpi*-генов чрезвычайно широк, для исследований были выбраны внутригенные SCAR-маркеры тех генов, гомологи которых ранее были обнаружены среди примитивных культурных видов и наиболее близких к культурным, диких видов картофеля [14, 25]. В первую очередь речь идет о генах *RB/blb1*, *Rpi-blb2* и *Rpi-vnt1*, у которых при биоинформатическом анализе были выявлены гомологичные последовательности референсного генома картофеля [13, 26].

Впервые проведен скрининг представительной выборки культурных и диких клубнеобразующих видов рода *Solanum L.* из южноамериканского и североамериканского центров биоразнообразия. Среди группы примитивных культурных видов картофеля было показано наличие маркеров всех исследованных генов устойчивости, кроме *R2-like*. Сопоставление данных о присутствии SCAR-маркеров и полиморфизме их последовательностей с

результатами лабораторного заражения картофеля фитопфторозом позволило предположить какие из изученных генов могут принимать участие в формировании устойчивости и выявить образцы, устойчивость которых не обусловлена ни одним из исследованных генов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили образцы диплоидных примитивных культурных видов: *S. ajanhuiri* Juz. & Bukasov, *S. stenotomum* subsp. *goniocalyx* (Juz. & Bukasov) Hawkes, *S. stenotomum* subsp. *stenotomum* и *S. phureja*, а также образцы трех североамериканских и восьми южноамериканских диких видов картофеля из коллекции ВИР (Приложение 1). Для удобства сравнения с литературными источниками видовая принадлежность коллекционных образцов представлена в соответствии с наиболее распространенной систематикой секции *Petota* Dumort. рода *Solanum* L., принадлежащей J. Hawkes [27]. Всего исследованы 105 генотипов клубнеобразующих видов рода *Solanum*. Большинство (75 генотипов) относятся к группе примитивных культурных видов, 13 относятся к трем североамериканским диким видам (*S. brachystotrichum*, *S. lesteri* и *S. bulbocastanum*), а оставшиеся 17 — представители восьми диких южноамериканских видов картофеля. Исследованные генотипы дикорастущих видов получены из семян коллекционных образцов и сохраняются в виде клонов путем получения клубней у оранжерейных растений. Культурные виды поддерживаем путем получения клубневой репродукции в поле.

Культурные виды впервые проанализированы на устойчивость к фитопфторозу и наличие ДНК-маркеров *R*-генов. Включенные в опыт образцы диких видов ранее не были оценены на устойчивость к фитопфторозу, но были задействованы в других исследованиях, в частности скрининге на устойчивость к золотистой картофельной нематоде [28].

### *Лабораторная оценка устойчивости к фитопфторозу*

Растения выращивали в теплице в пластиковых горшках объемом 500 см<sup>3</sup> (по одному клубню в каждый горшок). Для оценки взято по 5 долей листьев срединной формации от растений в возрасте более 60 дней после посадки в двукратной биологической повторности.

Лабораторный скрининг образцов картофеля на устойчивость к фитопфторозу проводили по стандартной методике [29]. Для заражения использовался инокулюм на основе изолята MP1841, полученного из Института селекции и акклиматизации растений, Млохов, Польша (IHAR-Мло-

chow). Изолят содержит все 11 генов вирулентности (1.2.3.4.5.6.7.8.9.10.11). Инокулюм выдерживался в течение 30 мин при температуре 10–12°C для стимуляции выхода зооспор. Концентрация спорангиев в инокулюме соответствовала 50000 ед./мл. Листья выкладывались на увлажненную фильтровальную бумагу абаксимальной стороной вниз, между центральной и боковыми жилками наносилось по 30 мкл инокулюма. Через сутки после инокуляции листья переворачивали абаксимальной стороной вверх. В течение всего периода инокуляции поддерживались постоянные условия в климатическом боксе: 16°C [30]. Степень поражения оценивалась на шестые сутки после заражения по 9-балльной шкале [31]: образцы с оценкой от 1 до 3 баллов (поражение более 25% площади поверхности зараженного листа) считались восприимчивыми (S) к фитопфторозу, от 4 до 6 (от 5 до 25%) — среднеустойчивыми (MR) (умеренно восприимчивыми), а от 7 до 9 (менее 5%) — устойчивыми (R). Опыт проводили в двукратной повторности и устойчивость оценивали по усредненным значениям в обеих повторностях. Контролем в эксперименте служили сорта Невский (восприимчивый) и Сударыня (устойчивый).

### *Скрининг примитивных и диких видов картофеля с помощью SCAR-маркеров генов устойчивости RB/blb1, Rpi-blb2, R2-like и Rpi-vnt1.3*

ДНК выделяли из молодых листьев картофеля в двукратной повторности с использованием СТАВ-буфера по протоколу Гавриленко и соавт. [32]. Фрагменты предполагаемых гомологов генов устойчивости у примитивных видов амплифицировали с помощью специфичных для SCAR-маркеров праймеров Rpi-blb1, Rpi-sto1, Rpi-blb2, R2-like и Rpi-vnt1.3 по протоколам, предложенным авторами (табл. 1) с использованием Таq-полимеразы (Диалат, Москва).

Продукты ПЦР визуализировали в 1.7%-ном агарозном геле, окрашивали бромистым этидием и документировали в системе BioDocII (Biometra GmbH, Германия).

### *Секвенирование фрагментов предполагаемых гомологов Rpi-vnt1 и RB/blb1 у примитивных видов картофеля*

У семи образцов примитивных культурных видов (к-9911, к-3558, к-9345, к-8873, к-17618, к-9301 и к-1120), контрастных по устойчивости к патогену, секвенировали фрагменты, полученные с помощью праймеров Rpi-vnt1.3. У двух образцов *S. stenotomum* subsp. *stenotomum* к-7366 и к-10478, восприимчивых к фитопфторозу, секвенировали фрагменты, полученные с помощью праймеров Rpi-sto1 и Rpi-blb1. Предварительно ампликоны обоих типов выделяли из ПЦР-смеси с помощью набора Cleanup

Таблица 1. Используемые в исследовании SCAR-маркеры генов *Rpi*

Ген	Маркер	Длина фрагмента, н	Последовательность праймеров	t°C отжига	Источник
<i>RB/blb1</i>	Rpi-sto1	890	F-accaaggccacaagattctc R-cctgcgggtcggtaataca	65	[33]
	Rpi-blb1	820	F-aacctgtatggcagtgcatg R-gtcagaaaaggcactcgtg	62	[34]
<i>Rpi-blb2</i>	Rpi-blb2	976	F-ggactgggtaacgacaatcc R-atttatggctgcagaggacc	55	[34]
<i>R2-like</i>	R2 area 1/2	1137	F-aagatcaagtggtaaaggctgatg R-atctttctagcttccaagatcacg	60	[35]
<i>Rpi-vnt1.3</i>	Rpi-vnt1.3	611	F-ccttcctcatcctcacatttag R-gcatgccaaactattgaacaac	58	[17]

Standard, затем лигировали в pAL-TA вектор согласно протоколу фирмы “Евроген” (<http://evrogen.ru/kit-user-manuals/pAL-TA.pdf>). Для трансформации использовали штамм DH5 $\alpha$  *E. coli*. Подробно протокол представлен в методических указаниях ВИР [36]. Два фрагмента каждого образца секвенировали в двух направлениях с использованием оборудования ЦКП “Геномные технологии, протеомика и клеточная биология” ФГБНУ ВНИИСХМ на приборе ABI 3500xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Выравнивание полученных последовательностей и их анализ проводили с помощью программы MEGA version 11 [37]. Идентифицировали фрагменты по степени сходства с последовательностями, депонированными в международной базе нуклеотидных последовательностей NCBI GenBank и в поисковой системе BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Нуклеотидные последовательности были депонированы в базу данных GenBank под номерами: для последовательностей гена *Rpi-vnt1.3* — ON322726—ON322739, для последовательностей гена *RB/blb1* — ON515750.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Среди образцов каждого культурного вида картофеля были обнаружены устойчивые (среднеустойчивые) к фитофторозу генотипы (рис. 1), что подтверждает перспективность изучения этой группы генофонда *Solanum*. Среди изученных образцов североамериканских диких видов у представителей *S. brachyotrichum* (Bitt.) Rydb. не было генотипов, устойчивых к фитофторозу, среди других видов устойчивые формы были обнаружены (рис. 2). Среди южноамериканских диких видов лишь некоторые генотипы *S. doddsii* Corell и *S. leptophyes* Bitter были среднеустойчивыми, изученные генотипы всех остальных видов восприимчивы к фитофторозу.

Встречаемость SCAR-маркеров генов *RB/blb1*, *Rpi-blb2*, *R2-like* и *Rpi-vnt1.3* у культурных и диких видов картофеля оказалась различной (рис. 1, 2). Наиболее заметны различия в распределении маркеров у североамериканских диких и примитивных культурных видов картофеля. В связи с небольшим числом образцов, изученных у южноамериканских диких видов картофеля, они представлены на рис. 2 в виде объединенной группы. Выявлена специфичность распределения SCAR-маркеров у представителей разных видов картофеля. Маркер R2 area 1/2 гена *R2-like* есть у всех изученных североамериканских диких видов, тогда как среди изученных южноамериканских видов он выявлен только у двух образцов дикого вида *S. doddsii*, а у культурных видов и вообще отсутствовал. Противоположная картина характерна для маркера Rpi-blb2: он обнаружен у представителей южноамериканских диких и культурных видов (*S. alandiae*, *S. doddsii*, *S. kurtzianum*, *S. sparsipilum*, *S. yungasense*, *S. ajanhuirii* и *S. stenotomum* subsp. *goniocalyx*) и отсутствовал у исследованных образцов из Северной Америки (рис. 1, 2). Маркер Rpi-vnt1.3 обнаружен у южноамериканских видов картофеля: с высокой частотой (0.71–0.88) у культурных видов *S. phureja* и *S. stenotomum* subsp. *goniocalyx*, обнаружен также у диких видов *S. doddsii*, *S. kurtzianum*, *S. neocardenasii*, *S. spegazzinii*, но найден только у единственного представителя североамериканских видов — образца *S. brachyotrichum*. Маркер Rpi-sto1 встречается у всех примитивных культурных видов картофеля, в том числе с высокой частотой (0.55–0.71) у образцов двух подвидов *S. stenotomum*, но из всех исследованных диких видов найден только у единственного образца *S. bulbocastanum*.

В пределах группы примитивных культурных видов наблюдаются значительные отличия по частоте двух маркеров гена *RB/blb1*. Маркер Rpi-sto1, обнаруженный у всех образцов примитивных видов, наиболее часто встречается у *S. stenotomum*

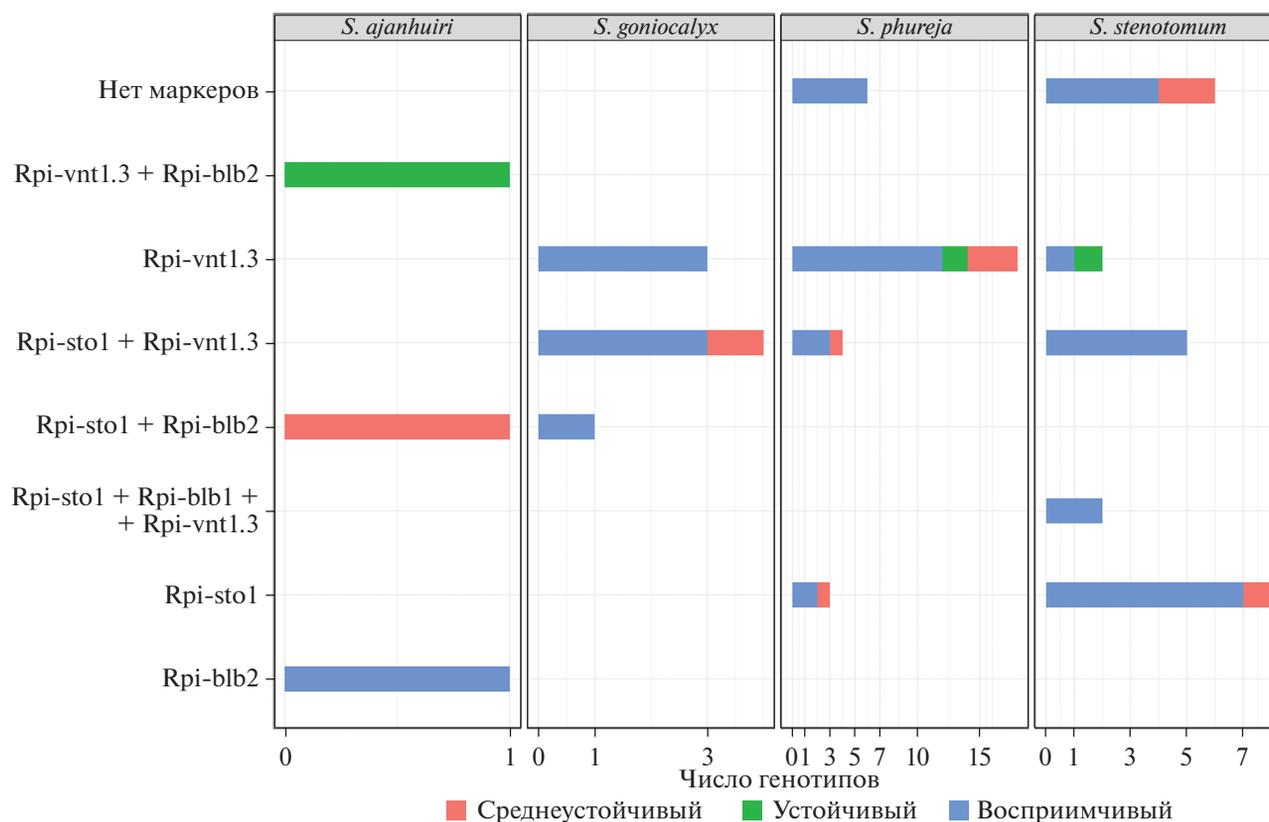


Рис. 1. Схема, демонстрирующая распределение маркеров среди различающихся по уровню устойчивости образцов примитивных культурных видов картофеля.

subsp. *stenotomum* и крайне редко у *S. phureja*; второй маркер — Rpi-blb1 обнаружен только у двух генотипов *S. stenotomum* subsp. *stenotomum* (рис. 1). Маркер Rpi-blb2 обнаружен у представителей двух других видов — *S. ajanhuiri* и *S. stenotomum* subsp. *goniocalyx* (рис. 1).

У *S. phureja* обнаружены два устойчивых (к-8873, к-17618) и пять среднеустойчивых (к-9345, к-11547, к-16896, к-19321, к-23516) к фитофторозу генотипов (табл. 2). Оба устойчивых образца имеют перуанское происхождение, четыре из пяти среднеустойчивых — колумбийское, еще один среднеустойчивый образец получен в Англии путем скрещивания образцов из Боливии и Колумбии. Образцы *S. phureja* из Боливии и Эквадора оказались неустойчивыми к фитофторозу. Корреляции между наличием маркеров и показателями устойчивости исследованных образцов *S. phureja* не обнаружено. Фрагмент Rpi-vnt1.3 был амплифицирован у образцов устойчивых, среднеустойчивых и восприимчивых к фитофторозу (рис. 1). У двух среднеустойчивых образцов *S. phureja* (к-11547, к-23516) также обнаружен один из двух маркеров гена *RB/blb1* — Rpi-sto1.

У *S. stenotomum* subsp. *stenotomum* выявлен один устойчивый (к-11020) и три среднеустойчивых

(к-8354; к-9278; к-17486) генотипа. Три из них имеют перуанское происхождение, один среднеустойчивый (к-9278) получен в Англии путем скрещивания двух образцов из Боливии. У двух среднеустойчивых образцов этого вида не обнаружено ни одного из использованных маркеров. Единственный устойчивый генотип *S. stenotomum* subsp. *stenotomum* (к-11020) так же, как и образцы *S. phureja*, обладает маркером Rpi-vnt1.3. У среднеустойчивого образца к-8354 обнаружен маркерный фрагмент Rpi-sto1, разработанный на coiled-coil домен (CC) гена *RB/blb1*, но отсутствует Rpi-blb1 — специфичный маркер для LRR-домена (leucine-rich repeat) того же гена [2]. В то же время два восприимчивых генотипа *S. stenotomum* subsp. *stenotomum* (к-7366 и к-10478) имеют оба маркера гена *RB/blb1* и маркер Rpi-vnt1.3 (рис. 1).

Изученные генотипы *S. ajanhuiri* различаются по реакции на заражение патогеном, но у каждого обнаружен маркер Rpi-blb2. Кроме того, у устойчивого *S. ajanhuiri* к-9900 обнаружен SCAR-маркер Rpi-vnt1.3, а у среднеустойчивого *S. ajanhuiri* к-9911 — Rpi-sto1 (рис. 1). Среди изученных образцов *S. stenotomum* subsp. *goniocalyx* выявлен только один среднеустойчивый генотип (к-9922), у которого обнаружены маркеры — Rpi-sto1 и Rpi-vnt1.3.

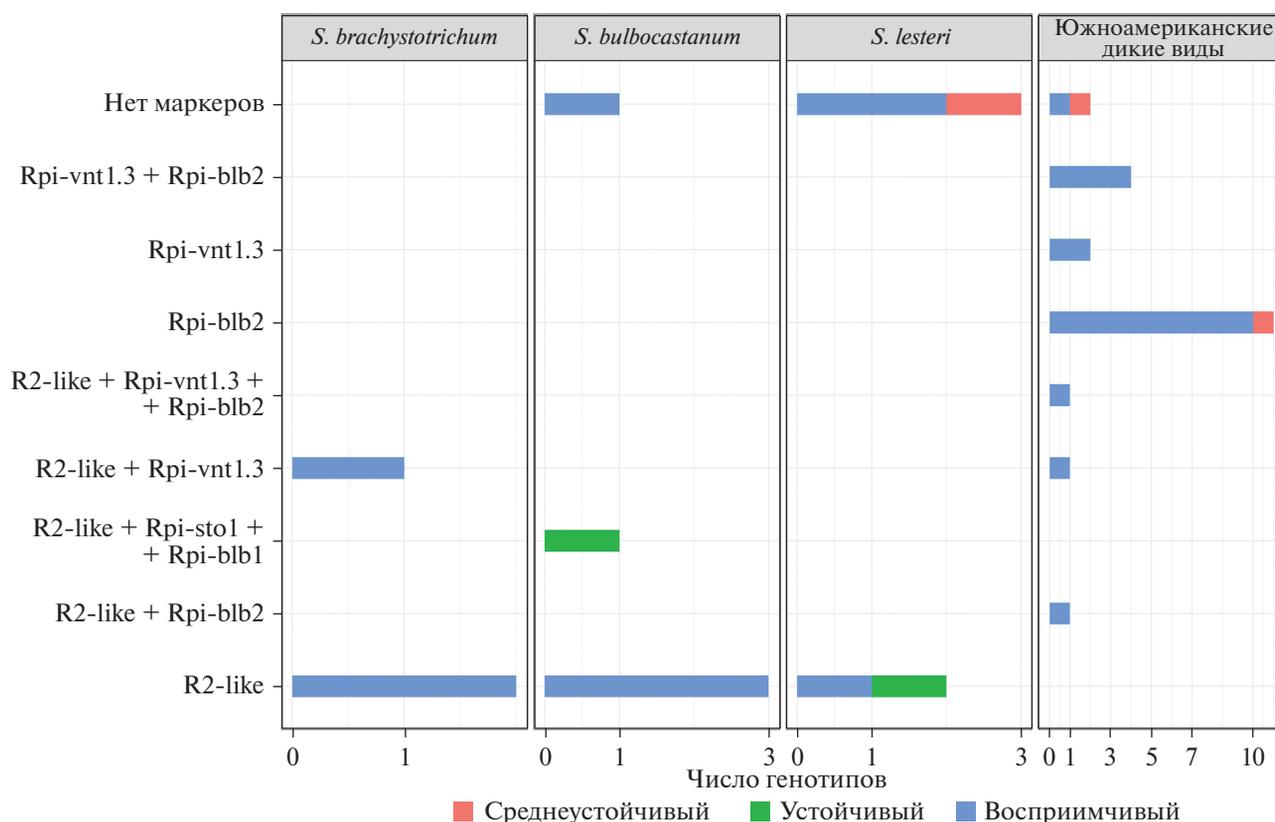


Рис. 2. Схема, демонстрирующая распределение маркеров среди различающихся по уровню устойчивости образцов диких видов картофеля.

Среди представителей диких южноамериканских видов картофеля выявлены два среднеустойчивых генотипа – *S. doddsii* (κ-19817) и *S. leptophyes* (κ-5764). У *S. doddsii* присутствует лишь один SCAR-маркер – Rpi-blb2, а у *S. leptophyes* маркеры не обнаружены.

Среди образцов диких североамериканских видов картофеля *S. bulbocastanum* и *S. lesteri* обнаружены один среднеустойчивый и два устойчивых генотипа. Все образцы *S. brachystotrichum* были восприимчивы к фитофторозу. У двух генотипов *S. bulbocastanum* κ-24868 и трех генотипов *S. lesteri* κ-24475 (в том числе одного среднеустойчивого) не обнаружено ни одного из исследованных маркеров. У устойчивого образца *S. bulbocastanum* обнаружены оба маркера гена *RB/blb1*, а также маркер гена *R2-like*. Можно предположить, что именно ген *RB/blb1* обеспечивает устойчивость этого генотипа *S. bulbocastanum* к фитофторозу, поскольку среди всех диких видов это единственный образец, обладающий обоими маркерными фрагментами гена.

У контрастных по устойчивости образцов примитивных культурных видов были изучены нуклеотидные последовательности ампликонов, полученных с использованием праймеров Rpi-sto1, Rpi-blb1 и Rpi-vnt1.3.

Нуклеотидная последовательность фрагмента Rpi-sto1 у образца *S. stenotomum* subsp. *stenotomum* κ-10478 (GenBank: ON515750) в значительной степени сходна с референсной последовательностью СС-домена (coiled-coil) гена *RB/blb1* у *S. stoloniferum* (GenBank: EU884421.1), представленной в информационно-поисковой базе BLAST. Обнаружены восемь SNP в области экзона и достаточно крупная делеция (в районе между позициями 574 и 629 референсного гена) в некодирующей области (рис. 3). В то же время гомологии между нуклеотидной последовательностью другого ампликона, полученного с использованием праймеров Rpi-blb1, и референсной последовательностью LRR-домена гена *RB/blb1* (GenBank: EU884421.1) не обнаружено.

С использованием пары праймеров Rpi-vnt1.3 у большинства образцов примитивных видов были амплифицированы фрагменты ожидаемой длины около 600 пн. Выборочно фрагменты, амплифицированные у семи генотипов культурных видов, контрастных по устойчивости к фитофторозу, были выделены, клонированы и секвенированы (см. Материалы и методы). Полученные нами фрагменты представлены на рис. 4.

Таблица 2. Характеристика устойчивых и среднеустойчивых образцов

Вид	Происхождение образца	Номер коллекционного образца	Фенотип по устойчивости к фитофторозу	SCAR-маркеры
Примитивные культурные виды				
<i>S. ajanhuirii</i>	Боливия	к-9900	MR	Rpi-sto1, Rpi-blb2
<i>S. ajanhuirii</i>	Боливия	к-9911-2	R	Rpi-blb2, Rpi-vnt1.3
<i>S. stenotomum</i> subsp. <i>goniocalyx</i>	Боливия	к-9922	MR	Rpi-sto1, Rpi-vnt1.3
<i>S. phureja</i>	Великобритания (Bol × Col)	к-9345	MR	Rpi-vnt1.3
<i>S. phureja</i>	Колумбия	к-11547	MR	Rpi-sto1, Rpi-vnt1.3
<i>S. phureja</i>	Колумбия	к-16896	MR	Rpi-vnt1.3
<i>S. phureja</i>	Колумбия	к-19321	MR	Rpi-vnt1.3
<i>S. phureja</i>	Колумбия	к-23516	MR	Rpi-sto1, Rpi-vnt1.3
<i>S. phureja</i>	Перу	к-8873	R	Rpi-vnt1.3
<i>S. phureja</i>	Перу	к-17618	R	Rpi-vnt1.3
<i>S. stenotomum</i> subsp. <i>stenotomum</i>	Великобритания (Bol × Bol)	к-9278	MR	Не обнаружено
<i>S. stenotomum</i> subsp. <i>stenotomum</i>	Перу	к-8354	MR	Rpi-sto1
<i>S. stenotomum</i> subsp. <i>stenotomum</i>	Перу	к-11020	R	Rpi-vnt1.3
<i>S. stenotomum</i> subsp. <i>stenotomum</i>	Перу	к-17486	MR	Не обнаружено
Южноамериканские дикие виды картофеля				
<i>S. doddssii</i>	Боливия	к-19817	MR	Rpi-blb2
<i>S. leptophyes</i>	Великобритания	к-5764	MR	Не обнаружено
Североамериканские дикие виды картофеля				
<i>S. lesteri</i>	Мексика	к-24475-gt1	MR	Не обнаружено
<i>S. lesteri</i>	Мексика	к-24475-gt5	R	R2-area 1/2
<i>S. bulbocastanum</i>	Гватемала	к-24866	R	R2-area 1/2, Rpi-sto1, Rpi-blb1

Полученные последовательности имеют сходство с фрагментами генов *Rpi-vnt1.1* (GenBank: FJ423044), *Rpi-vnt1.2* (GenBank: FJ423045) и *Rpi-vnt1.3* (GenBank: FJ423046.1) вида *S. venturii* [16, 17] и псевдогенами типа *Rpi-vnt1* у *S. phureja* (GU338337.1) и *S. stenotomum* (GU338321.1, GU338322.1 и GU338323.1) [39]. Также выявлено сходство с фрагментом гена, кодирующего RPP13-подобный белок в полногеномной последовательности удвоенного моноплоида DM1–3 516 R44 (GenBank: XM\_015315064.1).

Всего было обнаружено три варианта последовательностей, степень сходства которых с референсной последовательностью гена *Rpi-vnt1.3* (FJ423046.1) составляет 90.2, 97.7 и 94.9%. Первый вариант найден только у устойчивых к фитофторозу образцов: к-9911 *S. ajanhuirii* (GenBank: ON322726, ON322727), к-9345 (GenBank: ON322730,

ON322731), к-8873 (GenBank: ON322733) и к-17618 (GenBank: ON322735) *S. phureja*, к-11020 (GenBank: ON322739) *S. stenotomum* subsp. *stenotomum*. По сравнению с референсной последовательностью гена *Rpi-vnt1.3* в исследуемом фрагменте обнаружено 52 SNP, среди которых 22 транзиции: двенадцать G ↔ A и десять T ↔ C, а также 30 трансверсий: одиннадцать A ↔ T, четыре T ↔ G, семь G ↔ C и восемь A ↔ C. 28 нуклеотидных замен привели к замене аминокислот. Второй вариант последовательности фрагмента гена *Rpi-vnt1.1* найден только у одного ампликона устойчивого образца к-11020 *S. stenotomum* subsp. *stenotomum* (GenBank: ON322738) и он отличался от аналогичного фрагмента в последовательности FJ423046.1 21 SNP, среди которых 10 транзиций (пять G ↔ A и пять T ↔ C) и 11 трансверсий (три A ↔ T, две T ↔ G, пять G ↔ C и одна A ↔ C). 14

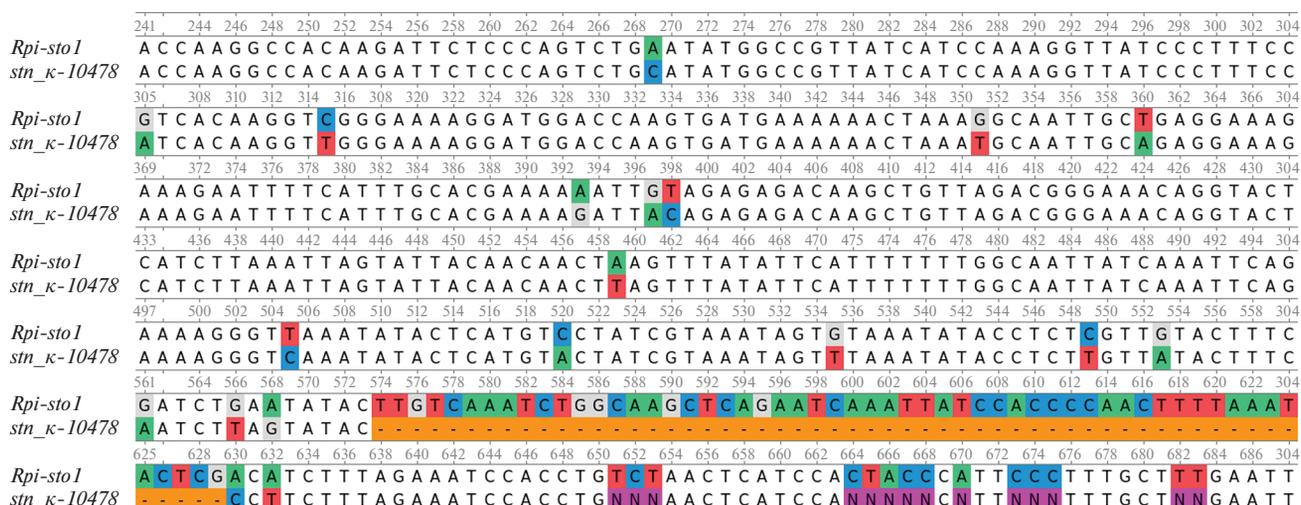


Рис. 3. Вываривание нуклеотидной последовательности фрагмента *Rpi-sto1* у образца *S. stenotomum* subsp. *stenotomum* κ-10478 (GenBank: ON515750) и фрагмента СС-домена референсной последовательности гена *RB/blb1* у *S. stoloniferum* (GenBank: EU884421.1). Сокращенные названия видов для рис. 3–5 приведены согласно Z. Huaman, R. Ross, 1985 [38].

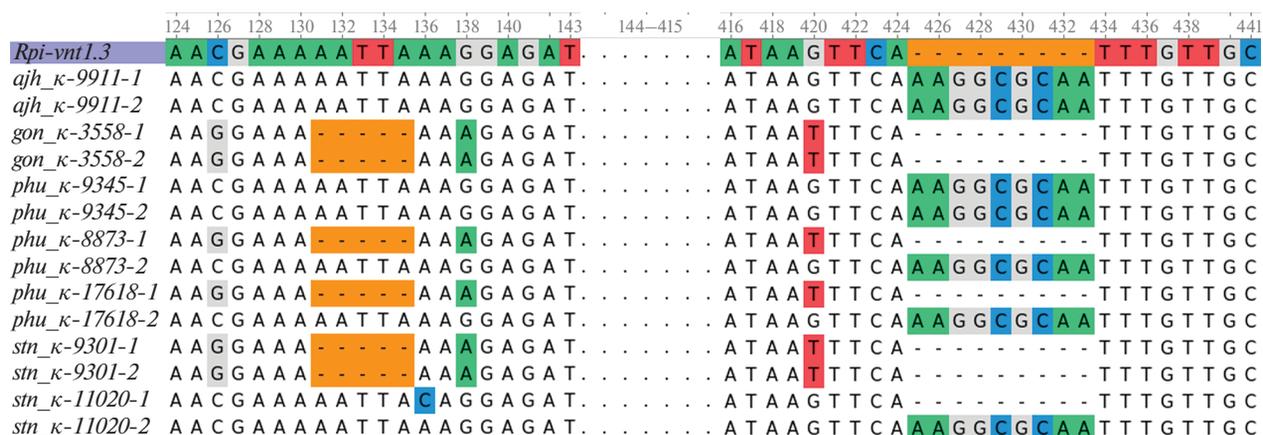


Рис. 4. Вываривание нуклеотидных последовательностей фрагмента СС-домена гомологов гена устойчивости *Rpi-vnt1.3* у клонов культурных видов: *S. ajanhuiri* (κ-9911) (GenBank: ON322726, ON322727), *S. stenotomum* subsp. *goniocalyx* (κ-3558) (GenBank: ON322728, ON322729), *S. phureja* (κ-9345) (GenBank: ON322730, ON322731), κ-8873 (GenBank: ON322732, ON322733), κ-17618 (GenBank: ON322734, ON322735) и *S. stenotomum* subsp. *stenotomum* (κ-9301) (GenBank: ON322736, ON322737), κ-11020 (GenBank: ON322738, ON322739). Нумерация нуклеотидов соответствует референсной последовательности гена *Rpi-vnt1.3* (GenBank: FJ423046.1).

нуклеотидных замен оказались смысловыми. Несмотря на существенные различия, оба найденных нами варианта имеют традиционную для СС-домена структуру, в значительной степени сходную с доменом гена *Rpi-vnt1.3*. Известно, что аминокислотные последовательности СС-доменов включают повторы из семи аминокислот (гептады), причем в положениях 1 и 4 располагаются гидрофобные, а в положениях 5 и 7 — полярные аминокислотные остатки [40]. Предполагаемые аминокислотные последовательности, найденные у устойчивых к патогену образцов, имеют ту же структуру. Смысловых замен в ключевых точках гептад не обнаружено (рис. 5).

Третий вариант фрагмента гена *Rpi-vnt1.1* встречался как у устойчивых, так и восприимчивых образцов и является фрагментом псевдогена, так как имеет делецию размером в 5 нуклеотидов в СС-доме, что приводит к сдвигу рамки считывания и, следовательно, к образованию стоп-кодона (рис. 4).

## ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам фитопатологического скрининга 71 коллекционного образца примитивных клубнеобразующих видов *S. ajanhuiri*, *S. stenotomum* subsp. *goniocalyx*, *S. stenotomum* subsp. *stenotomum* и

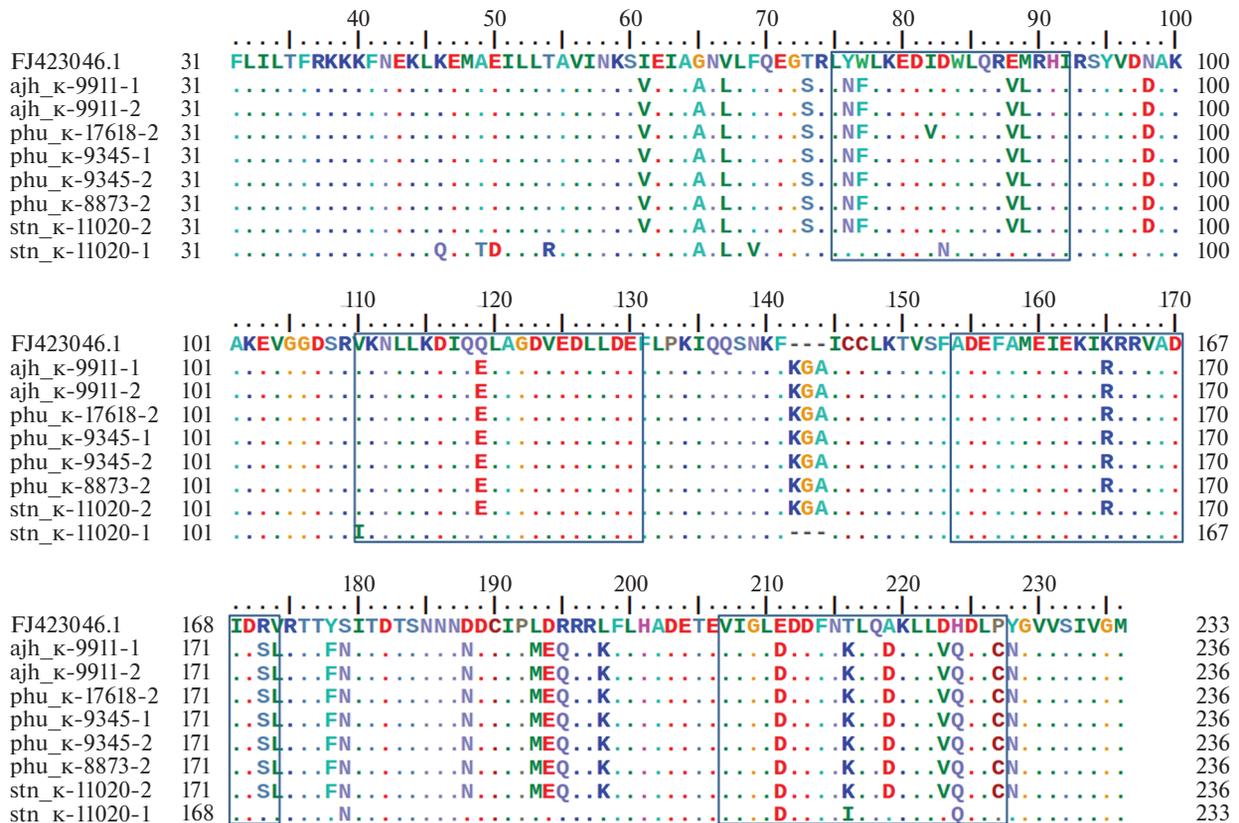


Рис. 5. Выравнивание предполагаемых белковых последовательностей фрагментов coiled-coil (CC) домена Rpi-vnt1.3 (ACJ66594.1) и предполагаемых гомологичных белковых последовательностей изученных образцов видов *S. ajanhuiri* (к-9911) (GenBank: ON322726, ON322727), *S. phureja* (к-8873 (GenBank: ON322733), к-9345 (GenBank: ON3227230, ON322731) и к-17618 (GenBank: ON322735)) и *S. stenotomum* subsp. *stenotomum* (к-11020 (GenBank: ON322739, ON322738)). Предполагаемые coiled-coil домены выделены рамками. Нумерация аминокислот соответствует последовательности Rpi-vnt1.3 (ACJ66596.1).

*S. phureja* с использованием в качестве инокулюма изолята *P. infestans* MP1841 выделено 14 устойчивых и среднеустойчивых образцов. В целом частота устойчивых и среднеустойчивых генотипов в выборке соответствует опубликованным данным об устойчивости к фитофторозу образцов *S. phureja* [24] и других примитивных видов [11].

При помощи SCAR-маркеров *Rpi*-генов, гомологи которых были ранее идентифицированы у удвоенного моноплоида, клона *S. phureja* DM1-3 516 R44 [13, 26], мы проанализировали присутствие маркерных фрагментов этих генов и их изменчивость у образцов *S. phureja* и близкородственных культурных видов картофеля. Проанализирована связь устойчивости к фитофторозу представителей диких и культурных видов картофеля с наличием фрагментов генов *RB/blb1*, *Rpi-blb2* и *Rpi-vnt1.3*, обеспечивающих защиту от фитофтороза у *S. bulbocastanum* и *S. venturii* [15–20]. Какой-либо связи между присутствием/отсутствием ампликонов SCAR-маркеров *Rpi*-генов и устойчивостью культурных видов картофеля к патогену *P. infestans* не выявлено.

Маркерный фрагмент гена *R2-like* не амплифицировался ни у одного из образцов примитивных видов, в то время как среди образцов североамериканских диких видов картофеля он был найден в большинстве образцов. Изначально этот ген был обнаружен у культурного картофеля (клон SW93-1015), в который он предположительно был интрогрессирован из *S. demissum* [41], ареал произрастания которого лежит в Северной и Центральной Америке. При сравнении последовательности *R2-like* (GenBank: FJ536323.1) с гомологами гена в полногеномной нуклеотидной последовательности референсного генома картофеля (NW\_006239540.1) [42] были обнаружены существенные различия в нуклеотидных последовательностях. В частности, в области отжига праймеров маркера *R2* агеа 1/2 находились несколько SNP (от трех до восьми в разных гомологах). В любом случае корреляции между наличием этого маркера и устойчивостью не обнаружено ни в одной из изученных групп.

Оба маркера другого эффективного гена устойчивости к фитофторозу *RB/blb1* (*Rpi-sto1* и

Rpi-blb1) найдены только у одного устойчивого генотипа *S. bulbocastanum* и у двух восприимчивых *S. stenotomum* subsp. *stenotomum*, не выявлены ни у одного из исследованных образцов южноамериканских диких видов. В то же время фрагмент гена *RB/blb1* (маркер Rpi-sto1) встречался часто у примитивных культурных видов. Ранее при исследовании семейства NBS-LRR, к которым относится большинство известных генов устойчивости к разным заболеваниям растений, включая фитофтороз, в референсном геноме картофеля (*S. phureja* DM1-3 516 R44) был обнаружен целый ряд последовательностей схожих по отдельным участкам с *RB/blb1* [13]. Как и для гена *R2-like*, последовательности гена *RB/blb1* и его гомологов в референсном геноме удвоенного моноплоида DM1-3 516 R44 имеют ряд существенных отличий. Предсказуемо самые значительные отличия были найдены в области отжига праймеров маркера Rpi-blb1 — до 15 нуклеотидных замен. С другой стороны, наличие обоих маркеров гена *RB/blb1* у некоторых образцов *S. bulbocastanum* и *S. stenotomum* subsp. *stenotomum* свидетельствует о сходстве областей праймирования у этих образцов.

Маркерный фрагмент другого гена, изначально обнаруженного у *S. bulbocastanum* — *Rpi-blb2*, не найден в образцах диких североамериканских видов и обнаружен лишь у единичных примитивных культурных видов картофеля, что также можно объяснить нуклеотидным полиморфизмом между последовательностью гена *S. bulbocastanum* (GenBank: DQ122125.1) и его гомологами у примитивных видов, особенно в областях отжига праймеров. Степень сходства *Rpi-blb2* и сходных последовательностей у DM1-3 516 R44 не превышает 90%.

Результаты исследований по поиску гомологов генов *RB/blb1* и *Rpi-blb2* у диких видов картофеля согласуются с опубликованными данными: гомологи гена *Rpi-blb2* обнаружены у южноамериканских видов *S. alandiae* и *S. okadae* [2] и отсутствуют у североамериканских видов *S. cardiophyllum*, *S. jamesii*, *S. lesteri*, *S. pinnatisectum*, *S. polyadenium*, *S. polytrichon*, *S. stoloniferum*, *S. trifidum* и *S. verrucosum* [43]. Для дальнейшего изучения гомологов гена *RB/blb1* у представителей клубнеобразующих видов рода *Solanum* следует использовать расширенную выборку образцов южноамериканских диких видов. В настоящем исследовании маркеры Rpi-sto1 и Rpi-blb1 не обнаружены у *S. alandiae*, что согласуется с данными Муратовой и соавт. [2], а также не найдены у образцов *S. doddsii*, *S. kurtzianum*, *S. leptophyes*, *S. neocardenasii*, *S. sparsipilum*, *S. spagazzinii* и *S. yungasense*. В то же время маркер RGA1F/R, амплифицируемый с другой парой праймеров, найден у южноамериканских видов *S. chacoense* и *S. huancabambense*, а также у североамериканских *S. cardiophyllum*, *S. jamesii*, *S. lesteri*,

*S. pinnatisectum*, *S. polyadenium*, *S. polytrichon*, *S. stoloniferum*, *S. trifidum* и *S. verrucosum* [43].

С помощью праймеров, разработанных для маркирования эффективного гена устойчивости *Rpi-vnt1*, впервые обнаруженного у дикорастущего вида *S. venturii*, и его гомолога — гена *Rpi-phi1* [16], почти у всех исследуемых образцов примитивных видов картофеля были получены маркерные фрагменты. Однако корреляции между наличием маркера и устойчивостью не наблюдалось. Авторы, ранее изучавшие гены устойчивости к фитофторозу у *S. venturii*, выявили целую серию близких по последовательностям генов, расположенных в едином кластере на хромосоме 9 [17]. Близко к этому кластеру также расположен известный ген устойчивости томата *Tm-2<sup>2</sup>* к вирусу мозаики, а также ген устойчивости к фитофторозу у *S. phureja* — *Rpi-phi1*. Высокая степень сходства *Rpi-vnt1.1*, *Rpi-vnt1.3* и относительная их схожесть с *Tm-2<sup>2</sup>* позволила предполагать их общее происхождение. В настоящем исследовании мы проанализировали N-концевые последовательности coiled-coil (CC) домена у примитивных культурных видов картофеля и выявили несколько вариаций. Один из вариантов является псевдогеном, так как несет делецию в 5 нуклеотидов, что ведет к значительным изменениям в структуре белка. У устойчивых образцов *S. ajanhuiri*, *S. phureja* и *S. stenotomum* subsp. *stenotomum* найдены другие варианты последовательностей, не имеющие стоп-кодона в данном участке. Предполагаемые аминокислотные последовательности этих фрагментов имеют характерную для CC-домена структуру и, возможно, являются частью функциональных генов. Одновременное присутствие нескольких вариантов сходных последовательностей в одном генотипе вполне объяснимо сложным строением локусов генов устойчивости типа CC-NBS-LRR с тандемно расположенными сходными последовательностями. На основе выявленных SNP у найденных вариантов в перспективе может быть разработан ПЦР-маркер для скрининга расширенной выборки примитивных видов картофеля из коллекции ВИР и оценки корреляции вариантов последовательностей подобных *Rpi-vnt1* с устойчивостью к фитофторозу.

Устойчивость к фитофторозу примитивных культурных видов *S. ajanhuiri*, *S. stenotomum*, *S. phureja* и диких видов картофеля, по-видимому, обусловлена разной генетической детерминацией. В настоящей работе для большинства устойчивых и среднеустойчивых образцов примитивных культурных видов обнаружена связь устойчивости к патогену с наличием одной из аллельных вариаций *Rpi-vnt1*. Биоинформационный поиск гомологов других известных генов устойчивости *RB/blb1*, *Rpi-blb2*, *R2-like*, изучение их полиморфизма и возможных связей с признаком у прими-

тивных культурных видов картофеля является перспективным. Наиболее интересны для дальнейшего изучения образцы *S. stenotomum* subsp. *stenotomum*, устойчивые к фитофторозу, но не обладающие ни одним из исследованных SCAR-маркеров *Rpi*-генов. Они могут послужить источниками новых, ранее неизвестных генов устойчивости.

Результаты секвенирования фрагментов *Rpi*-генов получены с использованием оборудования ЦКП “Геномные технологии, протеомика и клеточная биология” ФГБНУ ВНИИСХМ.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № 22-26-00111 “Гены устойчивости картофеля к фитофторозу в контексте эволюции культурных и диких клубненоносных видов *Solanum L.*”.

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. *Ristaino J.B.* Tracking historic migrations of the Irish potato famine pathogen, *Phytophthora infestans* // *Microbes Infect.* 2002. V. 4. № 13. P. 1369–1377. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(02\)00010-2](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(02)00010-2)
2. *Муратова (Фадина) О.А., Бекетова М.П., Кузнецова М.А. и др.* Южноамериканские виды *Solanum alandiae* Card. и *S. okadae* Hawkes et Hjerting как потенциальные источники генов устойчивости к фитофторозу картофеля // *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции.* 2020. Т. 181. № 1. С. 7–83. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2020-1-73-83>
3. *Kim H.J., Lee H.R., Jo K.R. et al.* Broad spectrum late blight resistance in potato differential set plants MaR8 and MaR9 is conferred by multiple stacked R genes // *Theor. Appl. Genet.* 2012. V. 124. P. 923–935. <https://doi.org/10.1007/s00122-011-1757-7>
4. *Samen F.M., Secor G.A., Gudmestad N.C.* Variability in virulence among asexual progenies of *Phytophthora infestans* // *Phytopathology.* 2003. V. 93. № 3. P. 293–304. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.3.293>
5. *Bradeen J.M., Haynes K.G., Kole C.* Introduction to potato // *Genetics, Genomics and Breeding of Potatoes.* Enfield, NH: Sci. Publ., 2011. P. 1–19.
6. *Haas B., Kamoun S., Zody M. et al.* Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* // *Nature.* 2009. V. 461. P. 393–398. <https://doi.org/10.1038/nature08358>
7. *Lee Y., Cho K.S., Seo J.H. et al.* Improved genome sequence and gene annotation resource for the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2020. V. 33. № 8. P. 1025–1028. <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-20-0023-A>
8. *Khavkin E.E.* Plant–pathogen molecular dialogue: evolution, mechanisms and agricultural implementation // *Rus. J. Plant. Physiol.* 2021. V. 68. P. 197–211. <https://doi.org/10.1134/S1021443721020072>
9. *Martin M.D., Vieira F.G., Ho S.Y.W. et al.* Genomic characterization of a South American *Phytophthora* hybrid mandates reassessment of the geographic origins of *Phytophthora infestans* // *Mol. Biol. Evol.* 2016. V. 33. P. 478–491. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv241>
10. *Spooner D.M., Ghislain M., Simon R. et al.* Systematics, diversity, genetics, and evolution of wild and cultivated potatoes // *Bot. Rev.* 2014. V. 80. P. 283–383. <https://doi.org/10.1007/s12229-014-9146-y>
11. *Budin K.Z.* Genetic foci of *Solanum* species, Petota Dumort, resistant to *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary // *Gen. Resurces and Crop Evolution.* 2002. V. 49. P. 229–235. <https://doi.org/10.1023/A:1015549214779>
12. Potato Genome Sequencing Consortium. Genome sequence and analysis of the tuber crop potato // *Nature.* 2011. V. 475. P. 189–195. <https://doi.org/10.1038/nature10158>
13. *Lozano R., Ponce O., Ramirez M. et al.* Genome-wide identification and mapping of *nbs*-encoding resistance genes in *Solanum tuberosum* group *phureja* // *PLoS One.* 2012, V. 7. № 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034775>
14. *Sliwka J., Jakuczun H., Lebecka R. et al.* The novel, major locus *Rpi-phu1* for late blight resistance maps to potato chromosome IX and is not correlated with long vegetation period // *Theor. Appl. Genet.*, 2006. V. 113. № 4. P. 685–695. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0336-9>
15. *Śliwka J., Jakuczun H., Kamiński P. et al.* Marker-assisted selection of diploid and tetraploid potatoes carrying *Rpi-phu1*, a major gene for resistance to *Phytophthora infestans* // *J. Appl. Genet.* 2010. V. 51. P. 133–140. <https://doi.org/10.1007/BF03195721>
16. *Foster S., Park T.H., Pel M. et al.* *Rpi-vnt1.1*, a *Tm-22* homolog from *Solanum venturii*, confers resistance to potato late blight // *MPMI.* 2009. V. 22. P. 589–600. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-5-0589>
17. *Pel M.A., Foster S.J., Park T.H. et al.* Mapping and cloning of late blight resistance genes from *Solanum venturii* using an interspecific candidate gene approach // *MPMI.* 2009. V. 22. P. 601–615. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-5-0601>
18. *Song J., Bradeen J.M., Naess S.K. et al.* Gene *RB* cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. № 16. P. 9128–9133. <https://doi.org/10.1073/pnas.1533501100>
19. *van der Vossen E.A., Gros J., Sikkema A. et al.* The *Rpi-blb2* gene from *Solanum bulbocastanum* is an *Mi-1* gene homolog conferring broad-spectrum late blight resistance in potato // *The Plant J.* 2005. V. 44. P. 208–222. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02527.x>
20. *Orbegozo J., Roman M.L., Rivera C. et al.* *Rpi-blb2* gene from *Solanum bulbocastanum* confers extreme resistance to late blight disease in potato // *Plant Cell Tiss.*

- Organ. Cult. 2016. V. 125. P. 269–281.  
<https://doi.org/10.1007/s11240-016-0947-z>
21. Zhu S., Li Y., Vossen J.H. et al. Functional stacking of three resistance genes against *Phytophthora infestans* in potato // Transgenic Res. 2012. V. 21. № 1. P. 89–99.  
<https://doi.org/10.1007/s11248-011-9510-1>
  22. Aguilera-Galvez C., Champouret N., Rietman H. et al. Two different R gene loci co-evolved with Avr2 of *Phytophthora infestans* and confer distinct resistance specificities in potato // Stud. Mycol. 2018. V. 89. P. 105–115.  
<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.01.002>
  23. Рогозина Е.В., Гурина А.А. Состав коллекции примитивных культурных видов секции *Petota Dumort.* рода *Solanum* L. и актуальные направления их исследования // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2020. Т. 181. № 3. С. 190–202.  
<https://doi.org/10.30901/2227-8834-2020-3-190-202>
  24. Gabriel J., Plata G., Cadima X., Franco J. *Solanum phureja* Juz et Buk.: Valuable source of genetic resistance to potato late blight [*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary] // Revista Latinoamericana de la Papa. 2013. V. 17. P. 131–142.
  25. Blouise J., Uptmoor R., Thieme R. et al. Insights into the genetic basis of the pre-breeding potato clones developed at the Julius Kühn Institute for high and durable late blight resistance // Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization. 2021. V. 1. № 4.  
<https://doi.org/10.1017/S1479262121000447>
  26. Jupe F., Pritchard L., Etherington G.J. et al. Identification and localisation of the NB-LRR gene family within the potato genome // BMC Genomics. 2012. V. 13. № 75.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-75>
  27. Hawkes J.G. The Potato: Evolution, Biodiversity and Genetic Resources. London: Belhaven Press, 1990. 259 p.
  28. Мироненко Н.В., Рогозина Е.В., Гурина А.А. и др. Дикие родичи и межвидовые гибриды картофеля — исходный материал для селекции на устойчивость к золотистой нематоды // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2020. Т. 181. № 4. С. 173–184.  
<https://doi.org/10.30901/2227-8834-2020-4-173-184>
  29. Brylińska M., Śliwka J. Laboratory assessment of potato resistance to *Phytophthora infestans* // Plant Breed. Seed Sci. 2017. V. 76. P. 17–23.  
<https://doi.org/10.1515/plas-2017-00016>
  30. Хотти А.В., Рыбаков Д.А., Гавриленко Т.А., Афанасенко О.С. Устойчивость к возбудителям фитофтороза и глободероза современного сортимента семенного картофеля и его фитосанитарное состояние в различных агроклиматических зонах европейской части России // Вавил. журн. генетики и селекции. 2020. Т. 24. № 4. С. 363–375.  
<https://doi.org/10.18699/VJ20.629>
  31. Vleeshouwers V.G., Van Dooijeweert W., Keizer L.C. et al. A laboratory assay for *Phytophthora infestans* resistance in various *Solanum* species reflects the field situation // Eur. J. Plant Pathol. 1999. V. 105. P. 241–250.  
<https://doi.org/10.1023/A:1008710700363>
  32. Gavrilenko T., Antonova O., Shuvalova A. et al. Genetic diversity and origin of cultivated potatoes based on plastid microsatellite polymorphism // Genet. Resour. Crop Evol. 2013. V. 60. № 7. P. 1997–2015.  
<https://doi.org/10.1007/s10722013-9968-1>
  33. Haesaert G., Vossen J.H., Custers R. et al. Transformation of the potato variety Desiree with single or multiple resistance genes increases resistance to late blight under field conditions // CROP PROTECTION. 2015. V. 77. P. 163–175.  
<https://doi.org/10.1016/J.CROPRO.2015.07.018>
  34. Wang M., Allefs S., van den Berg R.G. et al. Allele mining in *Solanum*: Conserved homologues of Rpi-blb1 are identified in *Solanum stoloniferum* // Theor. Appl. Genet. 2008. V. 116. № 7. P. 933–943.  
<https://doi.org/10.1007/s00122-008-0725-3>
  35. Lenman M., Ali A., Mühlenbock P. et al. Effector-driven marker development and cloning of resistance genes against *Phytophthora infestans* in potato breeding clone SW93-1015 // Theor. Appl. Genet. 2016. V. 129. № 1. P. 105–115.  
<https://doi.org/10.1007/s00122-015-2613-y>
  36. Алпатьева Н.В., Антонова О.Ю., Радченко Е.Е. и др. ПЦР-диагностика вредных организмов гуара: (методические указания). Санкт-Петербург: ВИР, 2019. 36 с.  
<https://doi.org/10.30901/978-5-907145-44-3>
  37. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11 // Mol. Biol. Evol. 2021. V. 38. № 7. P. 3022–3027.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
  38. Huaman Z., Ross R. Updated listing of potato species names, abbreviations and taxonomic status // Am. Potato J. 1985. V. 62. № 11. P. 629–641.  
<https://doi.org/10.1007/BF02854438>
  39. Pel M.A., Jacobsen E., Van der Vossen E.A.G et al. Chapter 4: The potato late blight resistance alleles Rpi-vnt1.1, Rpi-vnt1.2 and Rpi-vnt1.3 from *S. venturii* are not widely spread across *Solanum* section *Petota* and have evolved most probably by illegitimate recombination // Mapping, Isolation and Characterization of Genes Responsible for Late Blight Resistance in Potato: PhD Thesis. The Netherlands: Wageningen Univ., 2010.
  40. Mason J.M., Arndt K.M. Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications // ChemBioChem. 2004. V. 5. P. 170–176.  
<https://doi.org/10.1002/cbic.200300781>
  41. Plich J., Tatarowska B., Lebecka R. et al. R2-like gene contributes to resistance to *Phytophthora infestans* in Polish potato cultivar Bzura // Am. J. Potato Res. 2015. V. 92. P. 350–358.  
<https://doi.org/10.1007/s12230-015-9437-9>
  42. Veilleux R.E. Genetic stocks used for potato genome sequencing // The Potato Genome Compendium of Plant Genomes. Springer, 2017.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-66135-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-66135-3_4)
  43. Tiwari J.K., Devi S., Sharma S. et al. Allele mining in *Solanum* germplasm: Cloning and characterization of RB-homologous gene fragments from late blight resistant wild potato species // Plant Mol. Biol. Reporter. 2015. V. 33. № 5. P. 1584–1598.  
<https://doi.org/10.1007/s11105-015-0859-9>

## Homologues of *R* Genes for Late Blight Resistance among Tuberbearing Species of *Solanum* L. Genus

A. A. Gurina<sup>a,\*</sup>, N. V. Alpatieva<sup>a</sup>, N. A. Chalaya<sup>a</sup>, N. V. Mironenko<sup>b</sup>, A. V. Khiutti<sup>b</sup>, and E. V. Rogozina<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, 190000 Russia

<sup>b</sup>All-Russian Research Institute of Plant Protection, Pushkin, St. Petersburg, 196608 Russia

\*e-mail: a.gurina@vir.nw.ru

Late blight pathogen, oomycete *Phytophthora infestans* Mont de Bary is high variable. As a result, pathogen's new races could overcome resistance of long-term cultivated potatoes variety. Primitive cultivated potato species belongs to primary gene pool and could easily crossed with *Solanum tuberosum* L. So their using in breeding is highly promising. In this research primitive cultivated and some wild species of potato were tested on late blight resistance and presence of late blight resistance genes (*RB/blb1*, *Rpi-blb2*, *R2-like*, *Rpi-vnt1.3*) SCAR-markers. High frequency (up to 0.71) one (*Rpi-sto1*) of two marker fragments of *RB/blb1* gene found in primitive cultivated species. This gene was originally described in wild North American species *S. bulbocastanum* Dunal, which belongs to tertiary gene pool. Three variants of nucleotide sequences homologous to a *Rpi-vnt1.3* resistance gene were found in samples of primitive potato cultivars. We made an assumption about significance discovered allelic variances of *Rpi-vnt1.3* in ensuring the resistance of primitive cultivated potato species to late blight.

**Keywords:** *Rpi*-genes, SCAR-markers, *Phytophthora infestans*, primitive potato cultivars.

**STR-ТИПИРОВАНИЕ ЕВРОПЕЙСКОГО ЛОСЯ И ЕВРОПЕЙСКОЙ КОСУЛИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НОВЫХ КРИМИНАЛИСТИЧЕСКИХ НАБОРОВ ВЫЯВИЛО РАЗЛИЧНЫЕ ПАТТЕРНЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ДВУХ ВИДОВ ОЛЕНЕВЫХ В БЕЛАРУСИ<sup>1</sup>**

© 2022 г. К. Рембала<sup>1</sup>, Д. Э. Недзвецкая<sup>2</sup>, \*, С. А. Котова<sup>2</sup>, Т. В. Забавская<sup>2</sup>,  
В. И. Рыбакова<sup>2</sup>, М. В. Холодова<sup>3</sup>, И. С. Цыбовский<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Кафедра судебной медицины Гданьского медицинского университета, Гданьск, 80-210 Польша

<sup>2</sup>Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз, Минск, 220073 Беларусь

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

<sup>4</sup>Республиканское унитарное предприятие “БелЮрОбеспечение”, Минск, 220069 Беларусь

\*e-mail: Nedzvedskayadiana@gmail.com

Поступила в редакцию 01.02.2022 г.

После доработки 22.03.2022 г.

Принята к публикации 23.03.2022 г.

Для судебно-экспертной идентификации биологических образцов лосей (*Alces alces*) и косуль (*Capreolus capreolus*) разработаны тест-системы для генотипирования, включающие 16 и 12 микросателлитов (STR-локусов) соответственно. Информативность тест-систем проверена генотипированием биологических образцов 386 лосей и 360 косуль из всех шести административных регионов Беларуси. Анализ молекулярной дисперсии выявил генетическую однородность популяции лосей практически по всей территории страны и значительную региональную генетическую дифференциацию популяции косуль. Причиной наблюдаемой популяционно-генетической структуры лосей в Беларуси является “бутылочное горлышко” – задокументированное массовое сокращение популяции в 1920-х гг. с последующим быстрым расширением популяции на основе однородного генетического субстрата, унаследованного от небольшой предковой популяции. Наблюдаемая географическая подразделенность европейской косули, вероятно, является результатом многочисленных генетических дрейфов и/или локального межвидового потока генов между двумя видами косули, обусловленного искусственным расселением сибирской косули (*C. pygargus*) в Восточной Европе в XX в. Вероятность различения генотипов двух неродственных особей с использованием общепольской базы генотипов лосей составляет выше 0.9999999999. В случае использования региональных баз данных генотипов косуль вероятность различения генотипов двух неродственных особей превышает 0.999999999. Это первое исследование, в котором представлены тест-системы для генетической ДНК-идентификации биологических образцов лосей и косуль, статистические параметры которых охарактеризованы исследованием генетической структуры популяций в масштабе всей страны, и с панелью STR-маркеров, достаточной для достижения доказательств уровня чрезвычайно убедительных в судебной экспертизе объектов дикой природы. Судебно-экспертные методики ДНК-идентификации биологических образцов животных вида лось (*A. alces*) и косуля (*C. capreolus*) имплементированы в национальную правовую систему Республики Беларусь.

**Ключевые слова:** микросателлиты (STR-локусы), оленевые, лось, косуля, ДНК-идентификация.

**DOI:** 10.31857/S0016675822120104

Филогенетические исследования делят оленевых (Cervidae) на два подсемейства: Cervinae (олени Старого Света или плезиометакарпальные олени) и Capreolinae (олени Нового Света или телеметакарпальные олени) [1]. В лесах Беларуси (39% площади страны, более 9.4 млн га) обитают

три распространенных вида оленевых: благородный олень (*Cervus elaphus*), лось (*A. alces*) и косуля (*C. capreolus*). Все три вида являются популярными охотничьими млекопитающими во многих странах, на них охотятся как легально, так и нелегально. В 2013 г. в лесах Беларуси обитало около 74000 косуль, 28000 лосей и 12000 благородных оленей [2]. Четвертый вид оленевых – лань (*Dama dama*) можно встретить в дикой природе, однако в

<sup>1</sup> Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0016675822120104 для авторизованных пользователей.

основном разводится как вольерное животное и промыслового значения не имеет.

Ежегодно в Беларуси проводится более тысячи расследований, связанных с правонарушениями в отношении диких животных, и примерно половина из них касается копытных. Всего в 2019 г. Научно-практическим центром Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь проведено 221 судебно-экспертное ДНК-типирование биологических образцов диких животных, причем в большинстве дел (81%) фигурировали три вида оленевых – лось, косуля и олень благородный. Судебные разбирательства по делам о незаконной охоте для предоставления неопровержимых доказательств преступления требуют видовой идентификации биологических образцов и их индивидуализации до уровня особи.

Видовая идентификация обычно основана на секвенировании митохондриальных генов цитохрома *b* (*cytb*) и цитохромоксидазы I (*COI*) [3]. Индивидуальная идентификация образцов заключается в генотипировании высокополиморфных ДНК-маркеров, оценке вероятности существования идентичных генетических профилей ДНК в популяции и демонстрации их уникальности в пределах тестируемых образцов. Мультиаллельные микросателлиты (короткие tandemные повторы, STR-локусы) являются маркерами, обычно используемыми в судебно-экспертных лабораториях для генетической идентификации лиц (особей), и их применение в криминалистике требует разработки методов генотипирования, основанных на мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) и капиллярном электрофорезе [4].

Для расследования случаев незаконной коммерциализации и браконьерства в отношении ряда видов диких животных разработаны криминалистические тесты STR-типирования, созданы базы данных частот STR-аллелей для изучаемых локальных популяций [5]. Ранее нами описан метод криминалистической ДНК-идентификации образцов свиней и проведен обширный анализ полиморфизма микросателлитов у диких кабанов, обитающих в Беларуси, и у домашних свиней [6]. Однако для судебно-экспертного генотипирования оленевых известно только несколько таких тестов. Несмотря на то что олени являются очень популярными охотничьими млекопитающими в Европе [7, 8], большинство судебных STR-тестов и соответствующие базы данных частот аллелей были разработаны для видов оленевых, обитающих в Северной Америке [9–12]. В Европе внимание судебных генетиков приковано к благородному оленю (*C. elaphus*), считающемуся самым ценным охотничьим трофеем в этой части света [13]. Проведено генотипирование микросателлитов и созданы популяционные базы

данных оленей (*C. elaphus*) в графстве Камбрия в Великобритании [14] и в Венгрии [13].

Цель настоящего исследования – разработка метода идентификации биологических образцов двух наиболее многочисленных оленевых Беларуси – лосей (*A. alces*) и косуль (*C. capreolus*), основанного на генотипировании STR-локусов методами мультиплексной ПЦР и капиллярного электрофореза, и создание общеполорусской базы данных частот аллелей для статистической оценки доказательств в криминалистической ДНК-экспертизе диких животных в Беларуси. Для генотипирования лосей разработана панель из 17 ДНК-маркеров, включающая 16 микросателлитов и локус амелогенин для установления пола. Соответственно для косуль предложена панель из 13 ДНК-маркеров, в том числе 12 микросателлитов и локус амелогенин.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Коллекции ДНК представлены 386 образцами лосей и 360 образцами косуль, законно добытых во всех административных областях Беларуси: Брестской области (27 лосей, 73 косули), Витебской (213 лосей, 78 косуль), Гомельской (30 лосей, 37 косуль), Гродненской (48 лосей, 94 косули), Минской (40 лосей, 47 косуль) и Могилевской (25 лосей, 29 косуль). 3 образца лося и 2 образца косули были получены в ходе судебной экспертизы, и их региональное происхождение в пределах Беларуси осталось неизвестным. В качестве контрольной популяции, не подвергшейся массовой убыли, в исследование были включены 11 образцов лосей из Сибири, происходящих из трех административных регионов Российской Федерации: Томской области ( $n = 5$ ), Республики Саха (Якутия,  $n = 4$ ) и Эвенкийского района Красноярского края ( $n = 2$ ).

Для отбора STR-маркеров, проявляющих полиморфизм у лосей и косуль, у других оленевых (*Rangifer tarandus*, *C. elaphus*, *C. canadensis*), а также полорогих (*Bos taurus*, *Ovis aries*, *Capra hircus*), был проведен анализ научной литературы [15–26]. Эффективность отобранных микросателлитов на матрицах ДНК лося/косули была проверена в монолокусной и мультилокусной ПЦР, что позволило разработать два мультиплексных ПЦР-анализа, включающих в общей сложности 17 ДНК-маркеров (16 STR-локусов и локус амелогенин в качестве гендерного маркера) для генотипирования лосей и двух мультиплексных ПЦР, включающих в общей сложности 13 ДНК-маркеров (12 STR-локусов и амелогенин) для генотипирования косуль (табл. 1). Семь микросателлитов (*BL4*, *BM203*, *BM848*, *BM1818*, *BM6438*, *T26*, *T172*) использовали в мультиплексных ПЦР для обоих видов оленевых. Для всех мультиплексных систем амплификацию проводили в термоциклере

C1000 (Bio-Rad) в конечном объеме 10 мкл, содержащем 10 мМ Трис-НСl, рН 8.8, 50 мМ КСl, 0.08% октилфеноксиполиэтоксиганол (Nonidet P-40), 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.2 мМ dNTP, 0.04–0.2 мкМ праймеров, 2 нг ДНК и 0.75 ед. Taq-полимеразы. Программа ПЦР включала начальную денатурацию (3 мин при 95°C), 10 циклов амплификации с отжигом при 60°C (45 с при 94°C, 1 мин при 60°C, 1 мин при 68°C), 21 цикл амплификации с отжигом при 59°C (45 с при 93.5°C, 1 мин при 59°C, 1 мин при 68°C) и терминальную элонгацию (30 мин при 72°C). Продукты ПЦР разделяли электрофоретически на генетическом анализаторе 3500 (Thermo Fisher Scientific). Аллели тестируемых локусов идентифицировали по размеру в парах нуклеотидов (пн) с использованием программного обеспечения GeneMapper ID-X v1.4 (Thermo Fisher Scientific) путем сравнения с внутренним стандартом размера GeneScan 600 LIZ v2.0 (Thermo Fisher Scientific).

Частоты аллелей, значения наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности, а также *P*-значения тестирований на соответствие равновесию Харди–Вайнберга (*HWE*) были получены с использованием программного обеспечения Arlequin 3.1 [27]. Это же программное обеспечение использовали для проверки неравновесия по сцеплению (*LD*) между маркерами с помощью теста отношения правдоподобия. Для проверки различий ожидаемой гетерозиготности между популяциями лосей из Беларуси и Сибири рассчитывали непараметрический критерий знаковых рангов Уилкоксона с использованием программного обеспечения STATISTICA 12 (StatSoft). Вероятность случайного совпадения (*MP*), определяемая как вероятность того, что два генотипа, выбранных случайным образом из популяции, будут идентичными, и сила дискриминации (*PD*), определяемая как вероятность того, что два генотипа, выбранных случайным образом из популяции, будут разными, рассчитывали с помощью PowerStats 1.2 [28]. Генетическую дифференциацию популяций по исследованным микросателлитам оценивали методом молекулярной дисперсии (AMOVA) с использованием программы Arlequin 3.1. Многомерное шкалирование (MDS), основанное на линейаризованных попарных значениях  $F_{ST}$ , выполнено в программе STATISTICA 12.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Распределение частот аллелей исследованных STR-локусов, выявленное в локальных (региональных) популяциях лосей и косуль из Беларуси и в контрольной выборке лосей из Сибири, представлено в табл. S1. Маркер *T172*, описанный как полиморфный у оленей *C. canadensis*, *C. elaphus* [11, 13] и включенный в наши STR-тесты для генотипирования как *A. alces*, так и *C. capreolus*, по-

казал полиморфизм только у косуль. У всех лосей локус *T172* амплифицируется в виде одного неизменного фрагмента с молекулярным размером 144 пн (табл. 1).

Анализ ассоциаций аллелей выявил неравновесное сцепление *LD* ( $P < 0.05$ ) между 13 и 5 парами тестируемых STR-локусов у лосей и косуль соответственно. Однако после коррекции Бонферони *LD* оставалось статистически значимым ( $P < 0.00001$ ; табл. S2) только для одной пары маркеров (*T268* и *T530* у лосей). Детальное изучение этих двух маркеров выявило очень похожее распределение частот аллелей в изученных популяциях лосей, при этом подавляющее большинство, но не все, аллели локусов *T268* и *T530* различаются по размеру на 26 пн. Сравнением последовательностей *T268* и *T530* *C. canadensis*, депонированных в GenBank (инвентарные номера: AF192399.1 и AF442817.1 соответственно), установлено, что две последовательности практически идентичны, а различающиеся два нуклеотида расположены за пределами тандемного участка. Таким образом, праймеры локусов *T268* и *T530* амплифицируют один и тот же STR-локус, а наблюдаемые небольшие различия между двумя маркерами являются результатом вариации фланкирующих областей. Для дальнейшего анализа был выбран локус *T530*, поскольку он показал несколько более высокую силу исключения у белорусских лосей, чем локус *T268* (0.881 против 0.880 соответственно). В конечном итоге, после исключения локусов *T172* (мономорфного у лосей) и *T268* (идентичного с *T530*), в исследовании популяций лосей и косуль были использованы суммарно 14 и 12 микросателлитов соответственно.

Оценка молекулярной дисперсии (AMOVA) выявила генетическую дифференциацию между региональными белорусскими популяциями лосей и косуль (табл. 2). Попарные сравнения *locus by locus* (AMOVA) показали, что наблюдаемая географическая дифференциация является результатом статистически значимых различий в частотах аллелей ( $P < 0.05$ ) двух STR-локусов (*BL4*, *T193*) у лосей и восьми STR-локусов (*BM848*, *BM6438*, *ILST058*, *MaF70*, *NVHRT16*, *NVHRT21*, *T26*, *T172*) у косуль. Единая для всей территории база данных частот аллелей обеспечила бы возможность статистической оценки доказательств, полученных ДНК-типированием, независимо от географического происхождения образцов. Устранение локусов, ответственных за обнаруженную генетическую дифференциацию (согласно AMOVA), привело к географической однородности популяций лосей и косуль по всей изученной части ареала. Суммарная вероятность различия генотипов двух неродственных особей на основе полученных общеприменимых баз данных (12 микросателлитов у лосей и 4 микросателлита у косуль) составила 0.999999999997 и 0.9993 соответственно (табл. 2).

Таблица 1. Характеристика ДНК-маркеров, использованных в данном исследовании

Локус	Тип повтора	Вид-источник	Последовательность праймеров	Тест-система* (флуоресцентная метка)	A. alces (в данном исследовании)		C. sarracinius (в данном исследовании)		Источники литературы
					число аллелей	диапазон аллелей, пн	число аллелей	диапазон аллелей, пн	
<i>BL4</i>	2	<i>B. taurus</i>	F: AAATTTTTCATCCTTCTTCTGAC R: TCACCCCTGACTGTGAATGC	A1 (ROX), C2 (R6G)	13	149–173	15	131–171	[14, 15]
<i>BM203</i>	2	<i>B. taurus</i>	F: GGGTGTGACATTTTGTCC R: CTGCTCGCCACTAGTCCCTC	A2 (ROX), C1 (ROX)	12	219–255	2	213–215	[14, 16]
<i>BM757</i>	2	<i>B. taurus</i>	F: TGGAAACAATGTAACCTGGG R: TTGAGCCACCAAGGAACC	A2 (TMR)	12	180–204	–	–	[16]
<i>BM848</i>	2	<i>B. taurus</i>	F: TGGTTGGAAGGAAAACCTGG R: CCTCTGCTCCTCAAGACAC	A2 (FAM), C2 (FAM)	11	331–361	9	349–371	[16, 17]
<i>BM888</i>	2	<i>B. taurus</i>	F: AGGCCATATAGGAGCAAGCTT R: CTCGGTGAGCTCAAAACGAG	A1 (R6G)	7	175–195	–	–	[16]
<i>BM1258</i>	2	<i>B. taurus</i>	F: GTAATGTAATTTTCCACCCCTGC R: GAGTCAGACATGACTGAGCCTG	A2 (R6G)	8	89–113	–	–	[16]
<i>BM1818</i>	2	<i>B. taurus</i>	F: AGCTGGGAATATAACCAAAGG R: AGTGCTTTCAAGGTCCATGC	A1 (R6G), C2 (R6G)	8	246–264	14	235–269	[16, 18]
<i>BM6438</i>	2	<i>B. taurus</i>	F: TTGAGCACAGACACAGACTGG R: ACTGAATGCCCTCCTTTGTGC	A1 (TMR), C2 (TMR)	9	263–279	10	246–294	[16, 19]
<i>BMС1009</i>	2	<i>B. taurus</i>	F: GCACCAGCAGAGGACATTT R: ACCGGCTAATGTCCATCTTG	C1 (TMR)	–	–	6	279–289	[14]
<i>ILST058</i>	2	<i>B. taurus</i>	F: GCCTTACTACCATTTCCAGC R: CATCCTGACTTTGGCTGTGG	C1 (FAM)	–	–	15	149–179	[20]
<i>MaF46</i>	2	<i>O. aries</i>	F: AAATACCCTATAAGGCACAGTACCAC R: CACCATGGCCACCCTGGAAATCAGG	A1 (FAM)	12	87–113	–	–	[21]

Таблица 1. Окончание

Локус	Тип повтора	Вид-источник	Последовательность праймеров	Тест-система* (флуоресцентная метка)	<i>A. alces</i> (в данном исследовании)		<i>S. capreolus</i> (в данном исследовании)		Источник литературы
					число аллелей	диапазон аллелей, пн	число аллелей	диапазон аллелей, пн	
<i>MaF70</i>	2	<i>O. aries</i>	F: CACGGAGTCAAAAAGAGTCAAGACC R: GCAGGACTCTACGGGGCCCTTTGC	C1 (R6G)	—	14	113–153	[18]	
<i>NVHRT16</i>	2	<i>R. tarandus</i>	F: ATTCTAAGCCCAATAATCTT R: TCTAAGGGGTCTGTGTCTT	C1 (TMR)	—	9	158–178	[22]	
<i>NVHRT21</i>	2	<i>R. tarandus</i>	F: GCAGCGGAGAGGAACAAAAG R: GGGGAGGAGCAGGGAATC	C2 (ROX)	—	14	152–188	[22]	
<i>RBP3</i>	2	<i>B. taurus</i>	F: TGTATGATCACCTTCTATGCTTC R: GCCTTTAGTAAATCATCAGATAGC	A1 (R6G)	8	—	—	[19]	
<i>RT30</i>	2	<i>R. tarandus</i>	F: CACTTGGCTTTTGGACTTA R: CTGGTGTATGTATGCACACT	A2 (R6G)	14	—	—	[23]	
<i>T26</i>	4	<i>C. canadensis</i>	F: GTTCCAAATAGACACGCTCAT R: TGCCATAGTTTTTCCSTACCTT	A2 (R6G), C2 (R6G)	11	26	328–362	[9]	
<i>T172</i>	4	<i>C. canadensis</i>	F: AGCATCTCCCCTTTCAACA R: CTTCCCAACCCCAAGTATCG	A2 (FAM), C2 (FAM)	1	10	152–196	[9]	
<i>T193</i>	4	<i>C. canadensis</i>	F: AGTCCAAAGCCTGCTAAATAA R: CTGCTGTTGTCAATACCC	A1 (TMR)	10	—	—	[24]	
<i>T268</i>	4	<i>C. canadensis</i>	F: ATTCCCTTCTCCAGTGTATG R: GATGATAACAGCTCAACAGATC	A2 (FAM)	7	—	—	[24]	
<i>T530</i>	4	<i>C. canadensis</i>	F: GTCCTCACAGCAGCTCTATG R: GCATCTTTAGAACTCCAACTG	A1 (FAM)	7	—	—	[9]	
<i>Amelogenin</i>	—	<i>B. taurus</i>	F: AGTTCCTGGCCAAACAATC R: GCTGGCCAAAGCTTCCAGA	A1 (ROX), C1 (ROX)	2	2	234–278	[25]	

\* Тест-система для генотипирования *A. alces* (A1, A2) или *S. capreolus* (C1, C2).

**Таблица 2.** Результаты AMOVA, значения вероятностей случайного совпадения генотипов (*MP*), значения вероятностей различения генотипов двух неродственных индивидов (*PD*) у лосей и косуль из шести административных регионов для панелей маркеров из 14 и 12 STR-локусов соответственно и данные, в которых гомогенность была достигнута за счет исключения маркеров, демонстрирующих региональную гетерогенность или генетически различающиеся популяции

Набор данных	AMOVA, $F_{ST}$ -индекс	AMOVA, $P$ -значение	<i>MP</i>	<i>PD</i>
<i>A. alces</i> , 14 STR в шести регионах*	0.00254	0.00822	—	—
<i>A. alces</i> , 12 STR, демонстрирующих однородность в шести регионах	0.00092	0.21762	$1 \times 3.7 \times 10^{-11}$	0.999999999997
<i>A. alces</i> , 14 STR, демонстрирующих однородность в пяти регионах	0.00109	0.16653	$1 \times 6.0 \times 10^{-13}$	0.9999999999998
<i>C. capreolus</i> , 12 STR в шести регионах*	0.00891	0.00000	—	—
<i>C. capreolus</i> , 4 STR, демонстрирующих однородность в шести регионах	0.00300	0.06941	$1 \times 1.4 \times 10^{-3}$	0.9993
<i>C. capreolus</i> , 12 STR, регион Витебска	—	—	$1 \times 1.3 \times 10^{-10}$	0.99999999992
<i>C. capreolus</i> , 12 STR, регион Минска	—	—	$1 \times 5.0 \times 10^{-10}$	0.99999999998
<i>C. capreolus</i> , 11 STR**, регион Гомель + Могилев	0.00140	0.31838	$1 \times 6.0 \times 10^{-9}$	0.9999999998
<i>C. capreolus</i> , 11 STR**, регион Бреста	—	—	$1 \times 5.9 \times 10^{-9}$	0.9999999998
<i>C. capreolus</i> , 11 STR**, регион Гродно	—	—	$1 \times 2.6 \times 10^{-9}$	0.9999999996

\* *MP* и *PD* не рассчитывались из-за генетической неоднородности (AMOVA:  $P < 0.05$ ).

\*\* После исключения *T26*, показавшего отклонение от равновесия Харди–Вайнберга.

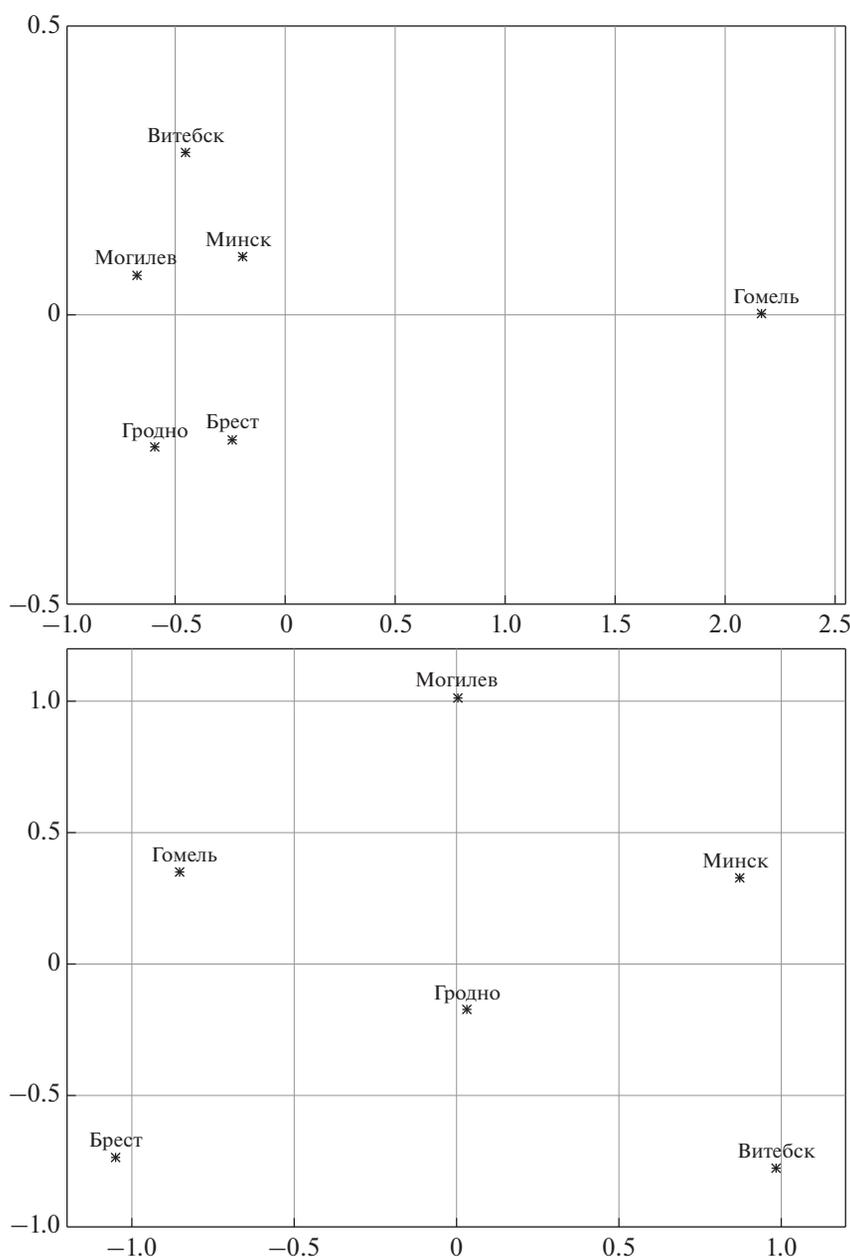
Сила дискриминации общеприменимой базы данных для косуль не соответствует уровню доказательства, потенциально интерпретируемого как чрезвычайно убедительное (т.е. с отношением правдоподобия не менее  $10^6$ ) [29].

Отклонения от равновесия Харди–Вайнберга *HWE* ( $P < 0.05$ ) в популяциях лосей и косуль в Беларуси выявлены всего в двух и трех локусах соответственно. После применения поправки Бонферрони статистически значимым оставалось только одно отклонение от *HWE*, которое касалось маркера *T26* у белорусских косуль ( $P < 0.00001$ ). Неравновесие Харди–Вайнберга в локусе *T26* у косуль оставалось статистически значимым после поправки Бонферрони также в трех региональных популяциях из Беларуси: гомельской, брестской и гродненской (табл. S3). После исключения локуса *T26* из-за несоответствия равновесию Харди–Вайнберга совокупная сила дискриминации в региональных популяциях косуль превышала 0.999999999 (табл. 2).

Генетические дистанции между региональными популяциями лосей и косуль из Беларуси, визуализированные с помощью MDS, показаны на рис. 1. Для полной панели из 12 микросателлитов, протестированных у косуль, все попарные сравнения между региональными популяциями, кроме двух, были статистически значимыми ( $P < 0.05$ ; табл. S4). Последовательное исключение наиболее дивергентных региональных популяций не

позволило сформировать общую базу данных в формате 12 STR-локусов даже для трех наиболее генетически близких популяций косуль – гомельской, Mogilevской и гродненской ( $F_{ST} = 0.00444$ ;  $P = 0.01584$ ). В то же время для полной панели из 14 STR-локусов, протестированных у лосей, статистически значимые попарные значения  $F_{ST}$  для региональных популяций наблюдались только для гомельской популяции, которая оказалась генетически однородной только с лосями из Брестской области. После исключения гомельской выборки из AMOVA остальные региональные популяции показали отсутствие генетической субструктуры в популяции лосей в Беларуси (табл. 2).

Лоси из Сибири генетически отличались от популяций лосей из Беларуси ( $P < 0.00001$  для всех попарных сравнений) со значениями  $F_{ST}$  в среднем в 5 раз выше, чем значения  $F_{ST}$  для внутрибелорусских попарных сравнений. В отношении шести региональных популяций лосей из Беларуси сибирские лоси показали самый низкий индекс  $F_{ST}$  при сравнении с географически ближайшей популяцией из Могилевской области (табл. S4). Хотя в настоящее исследование было включено всего 11 лосей из Сибири по сравнению с 386 белорусскими особями, у сибирских лосей мы выявили суммарно 22 аллеля, которые не наблюдались у лосей из Беларуси (табл. S1). Крите-



**Рис. 1.** График MDS генетических расстояний  $F_{ST}$  между популяциями лосей (верхний график) и косуль (нижний график) из шести административных регионов Беларуси.

рий знаковых рангов Уилкоксона показал, что ожидаемая гетерозиготность исследуемых STR-маркеров у белорусских лосей статистически значимо ниже, чем у лосей из Сибири (среднее: 0.689 против 0.743; медиана: 0.733 против 0.848;  $P = 0.02$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация биологических образцов в судебно-экспертном исследовании ДНК по фактам правонарушений в отношении диких животных

может осуществляться путем генотипирования микросателлитов (STR-локусы) или однонуклеотидных полиморфизмов (SNP). Однако применение SNP-маркеров часто ограничивается тем, что эти маркеры нередко проявляют географическую и/или популяционную специфичность [30].

В разработанной нами панели для криминалистической идентификации образцов оленевых используются STR-маркеры, которые имеют высокую частоту мутаций и с большой вероятностью останутся полиморфными в большинстве популяций [31], что обеспечивает универсальность разра-

ботанного метода ДНК-идентификации образцов лосей и косуль, обитающих в Беларуси, а также его применимость для генотипирования оленевых в других странах Европы.

Микросателлитный анализ, разработанный для судебно-экспертной идентификации лосей, впервые был использован для отнесения особей *A. alces* к их исходным популяциям из провинций Новая Шотландия и Нью-Брансуик в Канаде [32], но информативность анализа для проверки генетической идентичности образцов европейских лосей не оценивалась. Совсем недавно была опубликована новая криминалистическая тест-система для STR-типирования *A. alces*, апробированная на популяциях лосей из провинции Альберта и территории Юкон в Канаде, однако данное исследование не предоставляет базу данных частот аллелей для криминалистических и популяционно-генетических исследований [33]. Другой тест для типирования микросателлитов лося компании “Гордиз” (Россия) недавно стал коммерчески доступным в виде набора COrDIS Alces, но его полезность в судебно-экспертной практике не подтверждена какими-либо оценками параметров полиморфизма или популяционными исследованиями. Аналогично, хотя косули являются наиболее многочисленным видом оленевых [7] и самым добываемым видом оленевых в Европе [34], до недавнего времени было доступно только одно исследование, в котором использовано судебно-экспертное STR-типирование для идентификации и разработки базы данных частот аллелей *C. capreolus*, населяющей регион Передней Померании на северо-востоке Германии [35]. К тому же данный тест включал только шесть STR-локусов и имел ограниченную способность различения неродственных особей в судебно-экспертной практике, достигающей только 0.995, в связи с чем не мог обеспечить получение доказательств, интерпретируемых как чрезвычайно убедительные (с отношением правдоподобия не менее  $10^6$ ) [29]. Новый криминалистический STR-тест для косули, опубликованный в 2021 г., имеет высокую эффективность идентификации, но протестирован только на одной популяции косуль из Швейцарии [36].

Лось – самый крупный из ныне живущих видов оленевых и одно из крупнейших наземных млекопитающих в Европе. По сравнению с более мелкими млекопитающими крупные млекопитающие всегда непропорционально сильно страдали от чрезмерного промысла человеком [37] по причине более долгого жизненного цикла и потребности в более крупных участках обитания, в связи с чем их популяции, вероятно, подвергались событиям генетического дрейфа [38]. Наши результаты выявили противоположные закономерности генетической структуры двух исследованных видов оленевых в Беларуси. Удивительно,

но статистически значимая генетическая дифференциация ( $F_{ST} = 0.00891$ ;  $P < 0.00001$ ) была обнаружена между региональными популяциями гораздо меньших по размеру косуль, возможно, в результате локальных генетических дрейфов, тогда как популяция лосей, имеющих гораздо большие размеры, показала однородность практически на всей территории Беларуси. Данный феномен можно было бы объяснить значительно большими популяционными изъятиями косули, вызванными охотой, браконьерством, гибелью на дорогах, хищниками и болезнями. Однако в официальной статистике показатели ежегодного изъятия особей охотниками в Беларуси сопоставимы для обоих видов и составляют в среднем 6% для лосей и 7% для косуль. Кроме того, предполагаемая ежегодная общая убыль популяции с учетом теоретического коэффициента воспроизводства у косуль лишь немного выше, чем у лосей (23% против 19%) [2]. Таким образом, наблюдаемые различия в генетической структуре обоих видов нельзя объяснить меньшей эксплуатацией и меньшими общими потерями популяции лосей. На наш взгляд, обнаруженная гомогенность региональных популяций лосей из Беларуси может быть связана с прохождением генетического “бутылочного горлышка”, в результате которого вид восстанавливался из небольшой предковой популяции с однородным генетическим субстратом. В 1920-х гг. лось в Беларуси стал чрезвычайно редким видом, находящимся на грани исчезновения. В 1927 г. было зарегистрировано всего около 150 особей лосей [39], а менее чем за столетие популяция лося в Беларуси выросла примерно в 200 раз. Нашими исследованиями зафиксировано также снижение генетического полиморфизма STR-локусов у белорусских лосей по сравнению с сибирскими лосями, что, по-видимому, является еще одним последствием прохождения популяцией довольно жесткого “бутылочного горлышка”. Следы недавнего генетического узкого места были обнаружены также в популяциях лосей, населяющих соседнюю Польшу, с аналогичной демографической историей [40]. Следует также учитывать, что исследованная выборка сибирских лосей насчитывает всего 11 особей, населяющих обширную территорию Сибири, и представляет другой подвид, к тому же с разнообразным генетическим составом [41, 42]. Наблюдаемая географическая подразделенность европейской косули в Беларуси предположительно может быть также результатом локальной гибридизации с сибирской косулей (*C. pygargus*), возникшей естественным или искусственным образом в результате крупномасштабного выпуска особей обоих видов косули в Восточной Европе в XX в. [43, 44]. Таким образом, наиболее вероятной причиной наблюдаемых противоположных паттернов генетической структуры двух исследованных видов

оленевых в Беларуси являются экспансия не-большой предковой популяции лосей после прохождения “бутылочного горлышка” и многочисленные генетические дрейфы и/или межвидовой поток генов в локальных популяциях косуль.

В случаях, если популяционные исследования выявляют генетическую дифференциацию региональных популяций, с целью оценки вероятности встречаемости генетического профиля при статистической интерпретации результатов судебно-экспертных исследований для генетически разнообразных популяций рекомендуется использовать отдельные базы данных частот аллелей [45]. Наши результаты AMOVA показывают, что для лосей в судебной криминалистике в Беларуси следует использовать две базы данных генотипов: одну для всей территории (за исключением Гомельской области) и отдельную базу для локальной юго-восточной популяции, населяющей леса Гомельской области Беларуси. В случае косуль мы рекомендуем проводить оценку вероятностей встречаемости генетических профилей на основе региональных баз данных частот аллелей STR-локусов. Наши результаты также показывают, что для части региональных популяций косуль из Беларуси не следует использовать для статистической оценки достоверности доказательств экспертных исследований локус *T26*. Установлено, что частоты генотипов в этом локусе отклоняются от *HWE* в гомельской, брестской и гродненской популяциях косуль, в то время как оценка вероятности наблюдения идентичного ДНК-профиля в судебной практике может быть непосредственно рассчитана по частотам аллелей только в том случае, если распределение аллелей согласуется с законом Харди–Вайнберга [46].

Таким образом это первое исследование, в котором представлены тест-системы для ДНК-идентификации биологических образцов лосей (*A. alces*) и косуль (*C. capreolus*) с использованием панели STR-маркеров, обладающей статистическими параметрами, достаточными для получения экспертных доказательств уровня чрезвычайной убедительности в расследовании правонарушений в отношении объектов дикой природы. Судебно-экспертные методики ДНК-идентификации биологических образцов животных видов лось (*A. alces*) и косуля (*C. capreolus*) включены в Реестр судебно-экспертных методик и иных методических материалов Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь, что соответствует имплементации разработки в национальную правовую систему Беларуси.

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. Gilbert C., Ropiquet A., Hassanin A. Mitochondrial and nuclear phylogenies of Cervidae (Mammalia, Ruminantia): systematics, morphology, and biogeography // Mol. Phylogenet. Evol. 2006. V. 40. № 1. P. 101–117. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.02.017>
2. Козорез А.И. Ресурсы Оленьих Беларуси: ученые – практика // Лесное и охотничье хоз-во. 2014. Т. 136. № 11. С. 42–47.
3. Tobe S.S., Kitchener A.C., Linacre A.M.T. Reconstructing mammalian phylogenies: A detailed comparison of the cytochrome b and cytochrome oxidase subunit I mitochondrial genes // PLoS One. 2010. V. 5. № 11. e14156. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014156>
4. Butler J.M. Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology. Waltham: Elsevier, 2012. 708 p.
5. Linacre A., Gusmão L., Hecht W. et al. ISFG: recommendations regarding the use of non-human (animal) DNA in forensic genetic investigations // Forensic Sci. Int. Genet. 2011. V. 5. № 5. P. 501–505. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.10.017>
6. Rebała K., Rabtsava A.A., Kotova S.A. et al. STR profiling for discrimination between wild and domestic swine specimens and between main breeds of domestic pigs reared in Belarus // PLoS One. 2016. V. 11. № 11. P. 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166563>
7. Burbaitė L., Csányi S. Roe deer population and harvest changes in Europe // Estonian J. Ecol. 2009. V. 58. № 3. P. 169–180. <https://doi.org/10.3176/eco.2009.3.02>
8. Burbaitė L., Csányi S. Red deer population and harvest changes in Europe // Acta Zool. Litu. 2010. V. 20. № 4. P. 179–188. <https://doi.org/10.2478/v10043-010-0038-z>
9. Jones K.C., Levine K.F., Banks J.D. DNA-based genetic markers in black-tailed and mule deer for forensic applications // Calif. Fish Game. 2000. V. 86. № 2. P. 115–126.
10. Jones K.C., Levine K.F., Banks J.D. Characterization of 11 polymorphic tetranucleotide microsatellites for forensic applications in California elk (*Cervus elaphus canadensis*) // Mol. Ecol. Notes. 2002. V. 2. № 4. P. 425–427. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00264.x>
11. Meredith E.P., Rodzen J.A., Levine K.F., Banks J.D. Characterization of an additional 14 microsatellite loci in California elk (*Cervus elaphus*) for use in forensic and population applications // Conserv. Genet. 2005. V. 6. № 1. P. 151–153. <https://doi.org/10.1007/s10592-004-7735-8>
12. Smith P.F., DenDanto D., Smith K.T. et al. Allele frequencies for three STR loci *RT24*, *RT09*, and *BM1225* in northern New England white-tailed deer // J. Forensic Sci. 2002. V. 47. № 3. P. 673–675. <https://doi.org/10.1520/JFS15312J>
13. Szabolcsi Z., Egyed B., Zenke P. et al. Constructing STR multiplexes for individual identification of Hungarian red deer // J. Forensic Sci. 2014. V. 59. № 4. P. 1090–1099. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12403>

14. *Socratous E., Graham E.A.M., Rutty G.N.* Forensic DNA profiling of *Cervus elaphus* species in the United Kingdom // *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 2009. V. 2. № 1. P. 281–282.  
<https://doi.org/10.1016/j.fsigs.2009.08.127>
15. *Vial L., Maudet C., Luikart G.* Thirty-four polymorphic microsatellites for European roe deer // *Mol. Ecol. Notes.* 2003. V. 3. № 4. P. 523–527.  
<https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00499.x>
16. *Schmidt J.I., Hundertmark K.J., Bowyer R.T., McCracken K.G.* Population structure and genetic diversity of moose in Alaska // *J. Hered.* 2009. V. 100. № 2. P. 170–180.  
<https://doi.org/10.1093/jhered/esn076>
17. *Bishop M.D., Kappes S.M., Keele J.W. et al.* A genetic linkage map for cattle // *Genetics.* 1994. V. 136. № 2. P. 619–639.  
<https://doi.org/10.1093/genetics/136.2.619>
18. *Bonnot N., Gaillard J.M., Coulon A. et al.* No difference between the sexes in fine-scale spatial genetic structure of roe deer // *PLoS One.* 2010. V. 5. № 12. P. 1–5.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014436>
19. *Kuehn R., Hindenlang K.E., Holzgang O. et al.* Genetic effect of transportation infrastructure on roe deer populations (*Capreolus capreolus*) // *J. Hered.* 2007. V. 98. № 1. P. 13–22.  
<https://doi.org/10.1093/jhered/esl056>
20. *Cronin M.A., Patton J.C., Balmysheva N., MacNeil M.D.* Genetic variation in caribou and reindeer (*Rangifer tarandus*) // *Anim. Genet.* 2003. V. 34. № 1. P. 33–41.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2052.2003.00927.x>
21. *Kemp S.J., Hishida O., Wambugu J. et al.* A panel of polymorphic bovine, ovine and caprine microsatellite markers // *Anim. Genet.* 1995. V. 26. № 5. P. 299–306.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1995.tb02663.x>
22. *Swarbrick P.A., Dietz A.B., Womack J.E., Crawford A.M.* Ovine and bovine dinucleotide repeat polymorphism at the *MAF46* locus // *Anim. Genet.* 1992. V. 23. № 2. P. 182.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1992.tb00040.x>
23. *Røed K.H., Midtthjell L.* Microsatellites in reindeer, *Rangifer tarandus*, and their use in other cervids // *Mol. Ecol.* 1998. V. 7. № 12. P. 1773–1776.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00514.x>
24. *Wilson G.A., Strobeck C., Wu L., Coffin J.W.* Characterization of microsatellite loci in caribou *Rangifer tarandus*, and their use in other artiodactyls // *Mol. Ecol.* 1997. V. 6. № 7. P. 697–699.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1997.00237.x>
25. *Meredith E.P., Rodzen J.A., Banks J.D. et al.* Microsatellite analysis of three subspecies of elk (*Cervus elaphus*) in California // *J. Mammal.* 2007. V. 88. № 3. P. 801–808.  
<https://doi.org/10.1644/06-MAMM-A-014R.1>
26. *Gurgul A., Radko A., Słota E.* Characteristics of X- and Y-chromosome specific regions of the amelogenin gene and a PCR-based method for sex identification in roe deer (*Cervus elaphus*) // *Mol. Biol. Rep.* 2010. V. 37. № 6. P. 2915–2918.  
<https://doi.org/10.1007/s11033-009-9852-4>
27. *Excoffier L., Laval G., Schneider S.* Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis // *Evol. Bioinform. Online.* 2005. V. 1. P. 47–50.
28. *Tereba A.* Tools for analysis of population statistics // *Profiles DNA.* 1999. V. 2. № 3. P. 14–16.
29. *Buckleton J.* A framework for interpreting evidence // *Forensic DNA Evidence Interpretation.* Boca Raton: CRC Press, 2005. P. 27–63.
30. *Ferguson B., Street S.L., Wright H. et al.* Single nucleotide polymorphisms (SNPs) distinguish Indian-origin and Chinese-origin rhesus macaques (*Macaca mulatta*) // *BMC Genomics.* 2007. V. 8. № 43.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-43>
31. *Fan H., Chu J.Y.* A brief review of short tandem repeat mutation // *Genom. Proteom. Bioinform.* 2007. V. 5. № 1. P. 7–14.  
[https://doi.org/10.1016/S1672-0229\(07\)60009-6](https://doi.org/10.1016/S1672-0229(07)60009-6)
32. *Ball M.C., Finnegan L.A., Nette T. et al.* Wildlife forensics: “supervised” assignment testing can complicate the association of suspect cases to source populations // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2011. V. 5. № 1. P. 50–56.  
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.02.002>
33. *Sim Z., Monderman L., Hildebrand D. et al.* Development and implementation of a STR based forensic typing system for moose (*Alces alces*) // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2021. V. 53. P. 1–10.  
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102536>
34. *Reimoser F., Reimoser S.* Long-term trends of hunting bags and wildlife populations in Central Europe // *Beitr. Jagd. Wildforsch.* 2016. V. 41. P. 29–43.
35. *Poetsch M., Seefeldt S., Maschke M., Lignitz E.* Analysis of microsatellite polymorphism in red deer, roe deer, and fallow deer – possible employment in forensic applications // *Forensic Sci. Int.* 2001. V. 116. № 1. P. 1–8.  
[https://doi.org/10.1016/s0379-0738\(00\)00337-6](https://doi.org/10.1016/s0379-0738(00)00337-6)
36. *Morf N.V., Koppas A.M., Nater A. et al.* STRoe deer: A validated forensic STR profiling system for the European roe deer (*Capreolus capreolus*) // *Forensic Sci. Int. Anim. Environ.* 2021. V. 1.  
<https://doi.org/10.1016/j.fsiae.2021.100023>
37. *Bowyer R.T., Boyce M.S., Goheen J.R., Rachlow J.L.* Conservation of the world’s mammals: status, protected areas, community efforts, and hunting // *J. Mammal.* 2019. V. 100. № 3. P. 923–941.  
<https://doi.org/10.1093/jmammal/gyy180>
38. *Harris R.B., Wall W.A., Allendorf F.W.* Genetic consequences of hunting: what do we know and what should we do? // *Wildl. Soc. Bull.* 2002. V. 30. № 2. P. 634–643.
39. *Сержанин И.Н.* Млекопитающие Беларуси. 2-е изд. Минск: Изд-во Акад. наук Белорусской ССР, 1961. 330 с.
40. *Świśtocka M., Czajkowska M., Duda N., Ratkiewicz M.* Admixture promotes genetic variation in bottlenecked moose populations in eastern Poland // *Mamm. Res.* 2015. V. 60. № 2. P. 169–179.  
<https://doi.org/10.1007/s13364-015-0221-5>
41. *Hundertmark K.J., Bowyer R.T.* Genetics, evolution, and phylogeography of moose // *Alces.* 2004. V. 40. P. 103–122.

42. Рожков Ю.И., Проняев А.В., Давыдов А.В. и др. Лось: популяционная биология и эволюция. М.: Scientific Press. Ltd., 2009. 520 с.
43. Плахина Д.А., Звычайная Е.Ю., Холодова М.В., Данилкин А.А. Выявление гибридов европейской (*Capreolus capreolus* L.) и сибирской (*C. pygargus* Pall.) косуль на основе микросателлитного анализа // Генетика. 2014. Т. 50. № 7. С. 862–867. <https://doi.org/10.7868/S0016675814070157>
44. Кашина Н.В., Данилкин А.А., Звычайная Е.Ю. и др. О генофонде косуль (*Capreolus*) Восточной Европы: Анализ варибельности нуклеотидных последовательностей гена *cytb* // Генетика. 2018. Т. 54. № 7. С. 817–824. <https://doi.org/10.1134/S0016675818070044>
45. Zhitovskiy L.A., Malyarchuk B.A., Derenko M.V. et al. Developing STR databases on structured populations: the native south Siberian population versus the Russian population // Forensic Sci. Int. Genet. 2009. V. 3. № 4. P. e111–e116. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2008.08.001>
46. Buckleton J. Population genetic models // Forensic DNA Evidence Interpretation. Boca Raton: CRC Press, 2005. P. 65–122.

## STR Typing of European Elk (Moose) and European Roe Deer with Novel Forensic Assays Reveals Contrasting Patterns of Genetic Structure of the Two Cervids in Belarus

K. Rębała<sup>a</sup>, D. E. Nedzvetskaya<sup>b</sup> \*, S. A. Kotova<sup>b</sup>, T. V. Zabavskaya<sup>b</sup>,  
V. I. Rybakova<sup>b</sup>, M. V. Kholodova<sup>c</sup>, and I. S. Tsybovsky<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Department of Forensic Medicine, Medical University of Gdansk, Gdansk, 80-210 Poland

<sup>b</sup>Scientific and Practical Centre of the State Committee of Forensic Expertises, Minsk, 220073 Belarus

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

<sup>d</sup>State Enterprise “BelYurObespechenie”, Minsk, 220069 Belarus

\*e-mail: Nedzvedskayadiana@gmail.com

For forensic identification of biological specimens, a test system for DNA typing of European elk (moose, *Alces alces*) and European roe deer (*Capreolus capreolus*), including 16 and 12 microsatellites (STR loci), respectively, was developed. The reliability of the test systems was verified by genotyping biological samples of 386 elk and 360 roe deer from all administrative regions of Belarus. Analysis of molecular dispersion revealed the genetic homogeneity of the elk almost throughout the country and significant regional genetic differentiation of the roe deer. The reason for the observed genetic structure of the elk in Belarus is the “bottleneck” — a documented massive population decline in the 1920s, followed by a rapid population expansion based on a homogeneous genetic substrate inherited from a small ancestral population. The observed geographic stratification of the European roe deer is likely the result of multiple genetic drifts and/or local interspecific gene flow between two roe deer species driven by the release of the Siberian roe deer (*C. pygargus*) in Eastern Europe in the 20th century. The power of exclusion of unrelated individuals using the Belarusian database of elk genotypes is above 0.9999999999. In the case of using regional databases of roe deer genotypes, the exclusion power exceeds 0.9999999999. This is the first study to present test systems for the genetic identification of elk and roe deer specimens, whose statistical parameters are characterized by a study of the genetic structure of populations on a national scale, and with a panel of STR markers sufficient to achieve evidence levels of extremely convincing in the forensic examination of wildlife. Forensic methods of DNA identification of biological samples of animals of the elk (*A. alces*) and roe deer (*C. capreolus*) species have been implemented in the national legal system of the Republic of Belarus.

**Keywords:** microsatellites (STR loci), cervids, elk, roe deer, DNA identification.

## ГЕНЫ *TMEM136* И *PPP1R12C*, ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕСЯ В ПЛАЦЕНТЕ, АССОЦИИРОВАНЫ С РИСКОМ РАЗВИТИЯ ПРЕЭКЛАМПСИИ

© 2022 г. Е. А. Решетников<sup>1</sup> \*, В. А. Степанов<sup>2</sup>, В. Н. Сереброва<sup>2</sup>, А. В. Бочарова<sup>2</sup>, Е. А. Трифонова<sup>2</sup>, И. В. Пономаренко<sup>1</sup>, Ю. Н. Решетникова<sup>1</sup>, О. А. Ефремова<sup>1</sup>, В. С. Орлова<sup>1</sup>, И. В. Батлуцкая<sup>1</sup>, И. Н. Сорокина<sup>1</sup>, М. И. Чурносов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, 308015 Россия

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, Томск, 634009 Россия

\*e-mail: reshetnikov@bsu.edu.ru

Поступила в редакцию 14.11.2021 г.

После доработки 06.05.2022 г.

Принята к публикации 31.05.2022 г.

Изучены ассоциации генов, дифференциально экспрессирующихся в плаценте, с риском развития преэклампсии (ПЭ) у женщин Центральной России. Исследование проведено на выборке из 366 беременных с преэклампсией и 631 женщин контрольной группы. Всем беременным проводилось типирование специально отобранных девяти SNP генов, дифференциально экспрессирующихся в плаценте. Ассоциации SNP генов-кандидатов с преэклампсией оценивали при помощи логистической регрессии. Для полиморфных вариантов, показавших ассоциации с ПЭ, оценивали *in silico* их функциональные эффекты. Установлено, что аллель *G* rs36011588 *TMEM136* оказывает протективный эффект (ОШ = 0.65), а гаплотип *CA* гаплоглоба rs2532058–rs66707428 *PPP1R12C* является фактором риска (ОШ = 1.21) развития преэклампсии. Ассоциации данных SNP с формированием преэклампсии могут быть обусловлены их важным эпигенетическим значением: расположены в сайтах для модифицированных гистонов в областях промоторов и энхансеров, в ДНК-аза-гиперчувствительных сайтах, сайтах связывания с регуляторными белками, в доменах связывания с факторами транскрипции. Также данные локусы связаны с уровнем транскрипции и альтернативного сплайсинга в тканях, патогенетически значимых для развития преэклампсии.

**Ключевые слова:** преэклампсия, беременность, однонуклеотидный полиморфизм (SNP), ассоциации, гены плаценты.

**DOI:** 10.31857/S0016675822120116

Возникновение различных нарушений гестации негативно сказывается на состоянии развивающегося организма (эмбриона, плода), обуславливая высокие показатели перинатальной заболеваемости и смертности новорожденных и приводя к неблагоприятным последствиям в дальнейшей их жизни (высокая заболеваемость в период детства и во взрослом возрасте и др.) [1–4].

Преэклампсия (ПЭ) – мультисистемное патологическое состояние, возникающее во второй половине беременности (после 20-й недели), характеризующееся артериальной гипертензией в сочетании с протеинурией ( $\geq 0.3$  г/л в суточной моче), нередко, отеками и проявлениями полиорганной/полисистемной дисфункции/недостаточности [5–8]. Как свидетельствуют литературные данные, частота встречаемости преэклампсии во всем мире составляет 2–8% [2, 9]. ПЭ является од-

ной из основных причин материнской смертности и перинатальных смертей [2]. При развитии тяжелой преэклампсии и эклампсии существенно повышается риск развития различных осложнений (отслойка плаценты, массивные акушерские кровотечения, ДВС-синдром, HELLP-синдром, острая почечная и печеночная недостаточность и др.) [10]. В последующей жизни у этих женщин значительно чаще регистрируются артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца, инсульт [11]. Дети, родившиеся в результате беременностей, осложненных ПЭ, имеют низкий вес и высокий риск развития ряда неинфекционных хронических заболеваний [11].

Работы по изучению молекулярно-генетических основ ПЭ проводятся на уровне полногеномных исследований (GWAS) [12, 13]. Также проводятся исследования по поиску ассоциаций

ПЭ с однонуклеотидными полиморфными вариантами (*SNP*) различных групп генов-кандидатов: эндотелиальной дисфункции [14–17], сосудистого тонуса [18–20], иммунных и воспалительных реакций [21, 22], окислительного стресса [23, 24], обмена липидов [25, 26], ренин-ангиотензин-альдостероновой системы [27–30], системы гемостаза [31, 32], обмена фолиевой кислоты [33–35] и др. группы генов-кандидатов [36–38].

Одной из групп генов-кандидатов, которые потенциально с высокой вероятностью могут быть вовлечены в развитие преэклампсии, являются гены, дифференциально экспрессирующиеся в плаценте [39–47]. Однако несмотря на “кажущуюся очевидность” весьма значимой роли данной группы генов-кандидатов в развитии ПЭ, полученные к настоящему времени результаты в этой области неоднозначны и в том числе противоречивы [23, 25, 41, 48–50], что диктует необходимость продолжения исследования в этой области.

Цель настоящей работы – изучение ассоциаций генов, дифференциально экспрессирующихся в плаценте, с риском развития преэклампсии у женщин Центральной России.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Протокол исследования был одобрен этическим комитетом медицинского института Белгородского государственного национального исследовательского университета. Перед включением в исследование все участники подписали информированное согласие.

Выборка для исследования была сформирована в период с 2008 по 2016 гг. на базе профильных отделений стационара перинатального центра Белгородской областной клинической больницы. В выборку для исследования вошли женщины с преэклампсией и женщины контрольной группы (с физиологическим течением беременности), соответствующие ряду критериев: русский этнос, место рождения и проживания – регион Центрального Черноземья России. Основаниями для исключения женщин из исследовательской выборки были отказ от участия в данной работе, наличие родства между ними различной степени, выявление тяжелых хронических заболеваний, проводящих к декомпенсации, нерусский этнос и иные (нежели Центральное Черноземье России) места рождения и/или проживания [51].

Клиническое, клинико-лабораторное, клинико-инструментальное обследование беременных и новорожденных детей, верификация диагноза преэклампсия (или ее отсутствие), проводилось сертифицированными врачами профильных отделений перинатального центра. Преэклампсия определялась как наличие артериальной гипертензии, сопровождающейся протеинурией и оте-

ками. В выборку для данного исследования вошли 997 женщин: 366 беременных с ПЭ и 631 женщин группы контроля.

Выделение геномной ДНК из периферической крови проведено стандартным методом фенол-хлороформной экстракции из замороженной венозной крови [52]. Отбор *SNP* для исследования проведен на основе критериев, описанных в работе [53]. Также при отборе полиморфных локусов учитывалась их связь с экспрессией и альтернативным сплайсингом генов (*eSNP* and *sSNP*) [54, 55]. Регуляторный потенциал и вовлеченность в пути регуляции транскрипции генов *SNP* (*regSNP*, *eSNP*, *sSNP*) оценивались с использованием онлайн портала *HaploReg* (v. 4.1) [56]. С учетом данных критериев для исследования были отобраны девять *SNPs* генов, дифференциально экспрессирующихся в плаценте: rs36011588 *TMEM136*, rs56051972 *KRT19*, rs12691 *CEBPA*, rs10423795 *LHB*, rs12609771 *SIGLEC6*, rs1671215 и rs1654439 *RDH13*, rs2532058 и rs66707428 *PPP1R12C*.

Генотипирование образцов ДНК было выполнено с использованием метода MALDI и масс-спектрометра *MassARRAY Analyzer 4* (“Sequenom”, USA) (Центр коллективного пользования “Медицинская геномика” Томского национального исследовательского медицинского центра РАН). Протокол генотипирования образцов ДНК подробно описан в работе [53].

В изучаемых выборках беременных для девяти *SNP* генов, дифференциально экспрессирующихся в плаценте, вычислены параметры наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготностей ( $H_o$  и  $H_e$  соответственно), определены частоты минорных аллельных вариантов, получены данные о наблюдаемом и ожидаемом распределении генотипов (используя закономерность Харди–Вайнберга) [57, 58]. Расчет показателей проводился при помощи программного комплекса *gPLINK v2.050* [59]. Отбор *SNP* для последующего анализа проводился в соответствии со следующими критериями:  $MAF > 5\%$ , а также соответствие закономерности Харди–Вайнберга (HWE).

Анализ гаплоглобальной структуры осуществлялся с помощью алгоритма “Confidence intervals” (при  $D' > 0.8$ ), имплементированного в программу *gPLINK v2.050*. Ассоциации *SNP* и частот гаплоглобальных генов-кандидатов с формированием преэклампсии оценивали при помощи логистической регрессии с включением в расчеты трех моделей – аддитивной (модель 1), рецессивной (модель 2) и доминантной (модель 3), и поправкой на ковариаты (выявленные средовые факторы риска) и множественные сравнения (использовались адаптивные пермутационные процедуры с расчетом показателя  $p_{perm}$ ). Для оценки направленности ассоциации использовался показатель отноше-

ния шансов (ОШ) и его 95%-ный доверительный интервал (95%CI).

На заключительном этапе настоящего исследования мы изучили связь SNP, показавших значимые ассоциации с ПЭ, с несинонимическими заменами (база данных SIFT PolyPhen-2), эпигенетическими эффектами (базы данных HaploReg (v4.1), rSNP MAPPER, RegulomeDB (v1.1), экспрессией и альтернативным сплайсингом генов (базы данных Blood eQTL browser, GTEx portal) [56, 60–65]. При этом нами оценивались функциональные эффекты не только SNP, показавших значимые ассоциации, но и сильно сцепленных с ними SNP. SNP, находящиеся в неравновесии по сцеплению (при заданном уровне  $r^2 \geq 0.8$ ) с “ассоциированными” SNP, устанавливались с использованием онлайн-портала HaploReg (версия 4.1) [56].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выявлены “рисковые” значения для формирования ПЭ: индекса массы тела (ОШ = 1.12), количества мертворождений (ОШ = 4.74), спонтанных (ОШ = 1.59) и медицинских (ОШ = 1.31) аборт, наличие артериальной гипертензии до беременности (ОШ = 5.43) и преэклампсии в анамнезе (ОШ = 9.19), а также “протективная” роль возраста менархе (ОШ = 0.42) и курения (ОШ = 0.51). Данные факторы риска (протективные факторы) ПЭ на следующем этапе исследования при изучении ассоциаций SNP с формированием ПЭ, использовались в качестве ковариат.

Данные по распределению частот генотипов и аллелей девяти SNP генов, дифференциально экспрессирующихся в плаценте, у изучаемых групп беременных представлены в табл. 1. Для всех локусов наблюдаемое распределение генотипов соответствовало ожидаемому при равновесии Харди–Вайнберга.

Установлены ассоциации с развитием преэклампсии полиморфного локуса rs36011588 *TMEM136*: аллель *G* связан с данным осложнением беременности в рамках рецессивной модели (ОШ = 0.65, 95%CI 0.44–0.97,  $p_{\text{perm}} = 0.036$ ) (табл. 2).

Анализ гаплоглобальной структуры выявил два гаплоглоба среди изучаемых SNP (табл. 3). Установлена связь гаплотипа *CA* гаплоглоба rs2532058–rs66707428 *PPP1R12C* с риском развития преэклампсии (ОШ = 1.21,  $p = 0.047$ ,  $p_{\text{perm}} = 0.050$ ).

На следующем этапе работы с использованием онлайн-ресурсов HaploReg (v4.1), Blood eQTL Browser и GTEx Portal были оценены регуляторные эффекты и влияние на экспрессию и альтернативный сплайсинг генов, локусов, связанных с риском формирования преэклампсии. Следует отметить, что полиморфный локус rs36011588 *TMEM136*, являющийся протективным фактором при формировании ПЭ (ОШ = 0.65), расположен

в сайте для модифицированных гистонов в области промоторов в 24 тканях, в ДНКза-гиперчувствительном сайте в 45 тканях, сайте связывания с регуляторными белками POL2, E2F6, GATA3, а также в TF-связывающем домене для трех TF: KAP1, LRH1, ZNF263. Различия между LOD scores аллелей *G* и *C* составляют –1.3 для KAP1, –11.8 для LRH1 и 1.4 для ZNF263. Таким образом, аллель *G* обуславливает понижение аффинности к KAP1 и LRH1, а аллель *C* – повышение аффинности к ZNF263. Помимо этого, с rs36011588 *TMEM136* сильно сцеплены ( $r^2 \geq 0.8$ ) более десяти полиморфных локусов, которые находятся в сайтах для модифицированных гистонов в промоторных областях (1–24 тканей) и областях энхансеров (13–23 тканей), ДНКза-гиперчувствительных сайтах (2–47 тканей), сайтах связывания с регуляторными белками (2–4 белка) и областях регуляторных последовательностей (1–9 областей).

С помощью онлайн-ресурса GTEx Portal установлено, что аллель *G* rs36011588 *TMEM136* связан с более высокой транскрипцией гена *TMEM136* в подкожной и висцеральной жировой ткани ( $\beta = 0.21$ ,  $p = 3.7 \times 10^{-8}$ ,  $p_{\text{FDR}} \leq 0.05$ ), в молочных железах ( $\beta = 0.23$ ,  $p = 2.9 \times 10^{-7}$ ,  $p_{\text{FDR}} \leq 0.05$ ). С данным полиморфным локусом находятся в сильном сцеплении ( $r^2 \geq 0.8$ ) 39 SNPs, также связанных с уровнем экспрессии мРНК гена *TMEM136* в подкожной и висцеральной жировой ткани, в молочных железах.

Выявлено, что аллель *G* rs36011588 *TMEM136* ассоциирован с пониженным уровнем альтернативного сплайсинга транскрипта гена *TMEM136* в висцеральной жировой ткани (интрон ID: 120325368:120329977:clu\_9525,  $\beta = -0.32$ ,  $p = 2.9 \times 10^{-9}$ ,  $p_{\text{FDR}} \leq 0.05$ ), молочных железах (интрон ID: 120325368:120329977:clu\_9749,  $\beta = -0.39$ ,  $p = 4.8 \times 10^{-11}$ ,  $p_{\text{FDR}} \leq 0.05$ ) и яичниках (интрон ID: 120325368:120329977:clu\_7827,  $\beta = -0.45$ ,  $p = 3.4 \times 10^{-8}$ ,  $p_{\text{FDR}} \leq 0.05$ ). Так же, с rs36011588 *TMEM136* находятся в сильном сцеплении ( $r^2 \geq 0.8$ ) 39 SNP, которые ассоциированы с уровнем альтернативного сплайсинга транскрипта гена *TMEM136* в висцеральной жировой ткани, молочных железах и яичниках.

Нами впервые выявлена вовлеченность полиморфного локуса rs36011588 *TMEM136* в формирование преэклампсии. Ген *TMEM136* кодирует трансмембранный белок 136 (TLC-содержащий домен белок 5 (TLCD5)), функция которого изучена недостаточно (<https://www.genecards.org/>). Результаты исследования по анализу транскриптома (изучались образцы плаценты у 21 женщины русского этноса) показали пониженную экспрессию мРНК и белка *TMEM136* у беременных с ПЭ по сравнению с контрольной группой [24]. В исследовании, проведенном в японской популя-

**Таблица 1.** Распределение частот генотипов девяти SNP генов, дифференциально экспрессирующихся в плаценте, в исследуемых выборках беременных

Локус (полиморфизм)	Хр	Генотипы, минорный аллель	Контроль ( $n = 631$ ) % ( $n$ )		Беременные с преэклампсией ( $n = 366$ ) % ( $n$ )	
			распределение генотипов, аллелей	$p_{HWE}$	распределение генотипов, аллелей	$p_{HWE}$
rs36011588	11	<i>GG</i>	16.32 (103)	0.7	10.93 (40)	0.11
		<i>GC</i>	47.70 (301)		50.00 (183)	
		<i>CC</i>	35.98 (227)		39.07 (143)	
		<i>G</i>	0.40		0.36	
rs56051972	17	<i>GG</i>	13.99 (88)	0.14	13.12 (48)	0.65
		<i>GC</i>	43.08 (271)		48.09 (176)	
		<i>CC</i>	42.93 (270)		38.80 (142)	
		<i>G</i>	0.36		0.37	
rs12691	19	<i>TT</i>	1.74 (11)	0.33	2.46 (9)	0.06
		<i>TC</i>	19.56 (123)		16.12 (59)	
		<i>CC</i>	78.70 (495)		81.42 (298)	
		<i>T</i>	0.12		0.11	
rs10423795	19	<i>CC</i>	14.42 (91)	0.26	11.20 (41)	1.00
		<i>CT</i>	44.22 (279)		44.26 (162)	
		<i>TT</i>	41.36 (261)		44.54 (163)	
		<i>C</i>	0.37		0.33	
rs12609771	19	<i>CC</i>	0.95 (6)	0.20	1.64 (6)	0.60
		<i>CA</i>	39.89 (146)		19.73 (72)	
		<i>AA</i>	75.91 (479)		78.63 (287)	
		<i>C</i>	0.13		0.12	
rs1671215	19	<i>CC</i>	8.41 (53)	0.43	6.28 (23)	0.89
		<i>CA</i>	39.05 (246)		38.80 (142)	
		<i>AA</i>	52.54 (331)		54.92 (201)	
		<i>C</i>	0.28		0.26	
rs1654439	19	<i>TT</i>	2.23 (14)	0.22	1.10 (4)	1.00
		<i>TG</i>	21.46 (135)		18.63 (68)	
		<i>GG</i>	76.31 (480)		80.27 (293)	
		<i>T</i>	0.13		0.10	
rs2532058	19	<i>AA</i>	13.35 (84)	0.35	12.02 (44)	0.82
		<i>AC</i>	48.81 (307)		44.26 (162)	
		<i>CC</i>	37.84 (238)		43.72 (160)	
		<i>A</i>	0.38		0.34	
rs66707428	19	<i>GG</i>	1.74 (11)	0.59	1.37 (5)	0.59
		<i>GA</i>	21.40 (135)		18.90 (69)	
		<i>AA</i>	76.86 (485)		79.73 (291)	
		<i>G</i>	0.12		0.11	

Примечание. Хр – хромосома,  $p_{HWE}$  – уровень значимости при равновесии Харди–Вайнберга.

**Таблица 2.** Ассоциации девяти SNP генов, дифференциально экспрессирующихся в плаценте, с формированием преэклампсии

Минорный аллель (полиморфизм)	Хр	Аддитивная модель				Доминантная модель				Рецессивная модель			
		ОШ	95%CI		<i>p</i>	ОШ	95%CI		<i>p</i>	ОШ	95%CI		<i>p</i>
			L95	U95			L95	U95			L95	U95	
<i>G</i> (rs36011588)	11	0.83	0.68	1.01	0.06	0.85	0.65	1.12	0.24	<b>0.65</b>	<b>0.44</b>	<b>0.97</b>	<b>0.036</b>
<i>G</i> (rs56051972)	17	1.07	0.88	1.30	0.51	1.16	0.89	1.53	0.27	0.95	0.64	1.41	0.81
<i>T</i> (rs12691)	19	0.96	0.72	1.29	0.80	0.90	0.65	1.27	0.56	1.47	0.59	3.66	0.41
<i>C</i> (rs10423795)	19	0.92	0.75	1.12	0.39	0.91	0.70	1.20	0.51	0.85	0.565	1.2	0.42
<i>C</i> (rs12609771)	19	0.97	0.72	1.30	0.85	0.93	0.68	1.28	0.67	1.67	0.51	5.45	0.40
<i>C</i> (rs1671215)	19	0.88	0.71	1.092	0.25	0.90	0.69	1.17	0.42	0.72	0.42	1.22	0.22
<i>T</i> (rs1654439)	19	0.79	0.58	1.06	0.11	0.79	0.57	1.67	0.17	0.49	0.15	1.56	0.23
<i>A</i> (rs2532058)	19	0.86	0.71	1.05	0.15	0.81	0.61	1.07	0.12	0.88	0.59	1.31	0.52
<i>G</i> (rs66707428)	19	0.88	0.666	1.18	0.39	0.88	0.64	1.22	0.45	0.68	0.22	2.06	0.49

Примечание. ОШ – отношение шансов, 95%CI – доверительный интервал отношения шансов, L95 – нижняя граница доверительного интервала, U95 – верхняя граница доверительного интервала, *p* – уровень значимости, полужирным шрифтом выделены статистически значимые результаты с учетом адаптивного пермутационного теста (выполнено 1000 пермутаций).

**Таблица 3.** Частоты гаплогенов, дифференциально экспрессирующихся в плаценте, среди женщин с преэклампсией и в группе контроля

Гапоблоки (гены) и полиморфные локусы, входящие в их состав	Гаплоген	Встречаемость гаплогенов		ОШ	<i>p</i>
		контроль ( <i>n</i> = 631)	беременные с преэклампсией ( <i>n</i> = 366)		
H1 ( <i>RDH13</i> ) rs1671215–rs1654439	<i>CT</i>	0.130	0.104	0.79	0.114
	<i>CG</i>	0.150	0.151	0.99	0.939
	<i>AG</i>	0.720	0.745	1.14	0.217
H2 ( <i>PPP1R12C</i> ) rs2532058–rs66707428	<i>CG</i>	0.123	0.106	0.87	0.343
	<i>AA</i>	0.376	0.341	0.86	0.142
	<i>CA</i>	<b>0.501</b>	<b>0.553</b>	<b>1.21</b>	<b>0.047</b>

Примечание. ОШ – отношение шансов, *p* – уровень значимости, полужирным шрифтом выделены статистически значимые результаты с учетом адаптивного пермутационного теста (выполнено 1000 пермутаций).

ции, по анализу дифференциально экспрессируемых генов плаценты при тяжелой преэклампсии и нормотензивной беременности также был выявлен более низкий уровень транскрипции гена *TMEM136* у женщин с ПЭ [66]. Напротив, в работе V.D. Winn [67] не было выявлено связей между экспрессией гена *TMEM136* и формированием ПЭ. Ассоциации rs36011588 *TMEM136* с риском развития преэклампсии были исследованы только В.Н. Серебровой с соавт. [40]. В данной работе, проведенной на трех этнических группах (русские, якуты и буряты), анализировались ассоциации 29 SNP в 17 генах, дифференциально экспрессирующихся в плаценте, с предрасположенностью к ПЭ. По результатам исследования не

было обнаружено связей rs36011588 *TMEM136* с данным осложнением беременности.

Полиморфные локусы rs2532058 и rs66707428 *PPP1R12C*, ассоциированные с повышенным риском развития ПЭ в составе гаплогена, имеют важное регуляторное значение: локализованы в сайтах для модифицированных гистонов в промоторных областях (24 ткани для rs66707428) и областях энхансеров (четыре ткани для rs2532058), ДНКза-гиперчувствительных сайтах (1–12 тканей для rs2532058 и rs66707428), сайтах связывания с регуляторными белками (три белка для rs66707428) и областях регуляторных мотивов (1–5 мотивов для rs2532058 и rs66707428).

Анализ данных онлайн-ресурса GTE Portal показал, что аллель *C* rs2532058 *PPP1R12C* связан

со снижением уровня альтернативного сплайсинга транскрипта гена *PPP1R12C* в висцеральной жировой ткани (интрон ID: 55093233:55094355:clu\_27045,  $\beta = -0.41$ ,  $p = 4.8 \times 10^{-12}$ ,  $p_{FDR} \leq 0.05$ ) и крови (интрон ID: 55096178:55098784:clu\_21866,  $\beta = -0.18$ ,  $p = 4.3 \times 10^{-7}$ ,  $p_{FDR} \leq 0.05$ ). Помимо этого, с rs2532058 *PPP1R12C* находится в сильном сцеплении rs62126308 ( $r^2 \geq 0.8$ ), также ассоциированный с пониженным уровнем альтернативного сплайсинга транскрипта гена *PPP1R12C* в висцеральной жировой ткани (интрон ID: 55093233:55094355:clu\_27045,  $\beta = -0.40$ ,  $p = 3.6 \times 10^{-11}$ ,  $p_{FDR} \leq 0.05$ ).

Ген *PPP1R12C* кодирует регуляторную субъединицу 12С миозинфосфатазы 1, влияющую на каталитическую активность данного фермента, и таким образом связанную со сборкой актинового цитоскелета в клетках организма (<https://www.genecards.org/>). Результаты проведенных работ указывают на повышенный уровень экспрессии мРНК и протеина *PPP1R12C* у женщин с ПЭ русской [39] и северо-американской популяциях [68]. Анализ ассоциативных исследований, посвященных изучению роли rs2532058 и rs66707428 *PPP1R12C* в формировании преэклампсии, показал, что такие работы были проведены в популяциях русских, якутов, бурятов сибирского региона РФ [40]. В результате данного исследования выявлено, что аллель *A* и генотип *AA* rs66707428 *PPP1R12C* статистически чаще встречаются у женщин бурятской популяции с ПЭ, что в целом согласуется с результатами нашего исследования, в котором выявлено рискованное значение аллеля *A* rs66707428 *PPP1R12C* в составе гаплотипа при развитии ПЭ.

Таким образом, установлено, что аллель *G* rs36011588 *TMEM136* является протективным фактором (ОШ = 0.65), а гаплотип *CA* гапблока rs2532058–rs66707428 *PPP1R12C* фактором риска (ОШ = 1.21) при развитии преэклампсии у беременных Центральной России. Ассоциации данных SNP с формированием преэклампсии могут быть обусловлены их важным эпигенетическим значением: расположены в сайтах для модифицированных гистонов в области промоторов и энхансеров, в ДНК-гиперчувствительных сайтах, сайтах связывания с регуляторными белками, в доменах связывания с факторами транскрипции. Также данные локусы связаны с уровнем транскрипции и альтернативного сплайсинга в тканях, патогенетически значимых для развития преэклампсии.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ “Изучение генетических факторов репродуктивного здоровья женщин” (МД-3284.2022.1.4).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национально-

го комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Reshetnikov E., Zarudskaya O., Polonikov A. et al. Genetic markers for inherited thrombophilia are associated with fetal growth retardation in the population of Central Russia // *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2017. V. 43(7). P. 1139–1144. <https://doi.org/10.1111/jog.13329>
2. Poon L.C., Shennan A., Hyett J.A. et al. The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) initiative on pre-eclampsia: A pragmatic guide for first-trimester screening and prevention // *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 2019. V. 145(S1). P. 1–33. <https://doi.org/10.1002/ijgo.12802>
3. Golovchenko O., Abramova M., Ponomarenko I. et al. Functionally significant polymorphisms of ESR1 and PGR and risk of intrauterine growth restriction in population of Central Russia // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2020. V. 253. P. 52–57. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2020.07.045>
4. Ahmed A.A.M., Azova M.M. Association of VEGFA, factor V and prothrombin gene polymorphisms with early pregnancy loss // *Res. Results in Biomedicine.* 2021. V. 7(2). P. 111–116. <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2021-7-2-0-1>
5. ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. № 33, January 2002. American College of Obstetricians and Gynecologists // *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 2002. V. 77(1). P. 67–75.
6. Rana S., Lemoine E., Granger J.P., Karumanchi S.A. Preeclampsia: Pathophysiology, challenges, and perspectives // *Circ. Res.* 2019. V. 124(7). P. 1094–1112. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313276>
7. Ramos J.G.L., Sass N., Costa S.H.M. Preeclampsia // *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 2017. V. 39(9). P. 496–512. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1604471>
8. Awamleh Z., Gloor G.B., Han V.K.M. Placental microRNAs in pregnancies with early onset intrauterine growth restriction and preeclampsia: Potential impact on gene expression and pathophysiology // *BMC Med. Genomics.* 2019. V. 12(1). P. 91. <https://doi.org/10.1186/s12920-019-0548-x>
9. Apicella C., Ruano C.S.M., Méhats C. et al. The role of epigenetics in placental development and the etiology of preeclampsia // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20(11). P. 2837. <https://doi.org/10.3390/ijms20112837>
10. Phipps E.A., Thadhani R., Benzing T., Karumanchi S.A. Pre-eclampsia: Pathogenesis, novel diagnostics and therapies // *Nat. Rev. Nephrol.* 2019. V. 15(5). P. 275–289. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0119-6>

11. *Caillon H., Tardif C., Dumontet E. et al.* Evaluation of sFlt-1/PlGF ratio for predicting and improving clinical management of pre-eclampsia: Experience in a specialized perinatal care center // *Ann. Lab. Med.* 2018. V. 38. P. 95–101.  
<https://doi.org/10.3343/alm.2018.38.2.95>
12. *Johnson M.P., Brennecke S.P., East C.E. et al.* Genome-wide association scan identifies a risk locus for pre-eclampsia on 2q14, near the inhibin, beta B gene // *PLoS One.* 2012. V. 7(3). P. e33666.  
<https://doi.org/10.3343/alm.2018.38.2.95>
13. *Zhao L., Bracken M.B., DeWan A.T.* Genome-wide association study of pre-eclampsia detects novel maternal single nucleotide polymorphisms and copy-number variants in subsets of the Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) study cohort // *Ann. Hum. Genet.* 2013. V. 77(4). P. 277–287.  
<https://doi.org/10.1111/ahg.12021>
14. *Reshetnikov E., Ponomarenko I., Golovchenko O. et al.* The VNTR polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene and blood pressure in women at the end of pregnancy // *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.* 2019. V. 58(3). P. 390–395.  
<https://doi.org/10.1016/j.tjog.2018.11.035>
15. *Hamid H.M., Abdalla S.E., Sidig M. et al.* Association of VEGFA and IL1 $\beta$  gene polymorphisms with pre-eclampsia in Sudanese women // *Mol. Genet. Genomic. Med.* 2020. V. 8(3). P. e1119.  
<https://doi.org/10.1002/mgg3.1119>
16. *Shaheen G., Jahan S., Bibi N. et al.* Association of endothelial nitric oxide synthase gene variants with pre-eclampsia // *Reprod. Health.* 2021. V. 18(1). P. 163.  
<https://doi.org/10.1186/s12978-021-01213-9>
17. *Abbasi H., Dastgheib S.A., Hadadan A. et al.* Association of endothelial nitric oxide synthase 894G > T polymorphism with pre-eclampsia risk: A systematic review and meta-analysis based on 35 studies // *Fetal Pediatr. Pathol.* 2021. V. 40(5). P. 455–470.  
<https://doi.org/10.1080/15513815.2019.1710880>
18. *Azimi-Nezhad M., Teymoori A., Ebrahimzadeh-Vesal R.* Association of *CYP11B2* gene polymorphism with pre-eclampsia in north east of Iran (Khorasan province) // *Gene.* 2020. V. 733. P. 144358.  
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144358>
19. *Bogacz A., Bartkowiak-Wieczorek J., Procyk D et al.* Analysis of the gene polymorphism of aldosterone synthase (*CYP11B2*) and atrial natriuretic peptide (*ANP*) in women with preeclampsia // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2016. V. 197. P. 11–15.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2015.11.012>
20. *Aung M., Konoshita T., Moodley J., Gathiram P.* Association of gene polymorphisms of aldosterone synthase and angiotensin converting enzyme in pre-eclamptic South African Black women // *Pregnancy Hypertens.* 2018. V. 11. P. 38–43.  
<https://doi.org/10.1016/j.preghy.2017.12.004>
21. *Zheng Y., Ma C., Liu X. et al.* Association between HLA-A gene polymorphism and early-onset pre-eclampsia in Chinese pregnant women early-onset // *BMC Pregnancy Childbirth.* 2020. V. 20(1). P. 656.  
<https://doi.org/10.1186/s12884-020-03340-w>
22. *Wu W., Yang H., Feng Y. et al.* Polymorphisms in inflammatory mediator genes and risk of preeclampsia in Taiyuan, China // *Reprod. Sci.* 2017. V. 24(4). P. 539–547.  
<https://doi.org/10.1177/1933719116660844>
23. *Yi K., Xu J., Peng B.* The association between GSTP1 polymorphism and pre-eclampsia risk: A system review and meta-analysis // *Arch. Gynecol. Obstet.* 2020. V. 301(1). P. 11–18.  
<https://doi.org/10.1007/s00404-019-05411-6>
24. *Zhao G., Liu J., Meng T.* Oxidative stress-related genes (EPHX1 and MnSOD) polymorphism and risk of pre-eclampsia: A meta-analysis // *J. Matern. Fetal Neonatal. Med.* 2021. V. 15. P. 1–13.  
<https://doi.org/10.1080/14767058.2021.1887123>
25. *Abyadeh M., Heydarinejad F., Khakpash M. et al.* Association of apolipoprotein E gene polymorphism with preeclampsia: A meta-analysis // *Hypertens. Pregnancy.* 2020. V. 39(2). P. 196–202.  
<https://doi.org/10.1080/10641955.2020.1753068>
26. *Thakoordeen-Reddy S., Winkler C., Moodley J. et al.* Maternal variants within the apolipoprotein L1 gene are associated with preeclampsia in a South African cohort of African ancestry // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2020. V. 246. P. 129–133.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2020.01.034>
27. *Abedin D.A., Esmailzadeh E., Amin-Beidokhti M. et al.* ACE gene rs4343 polymorphism elevates the risk of pre-eclampsia in pregnant women // *J. Hum. Hypertens.* 2018. V. 32(12). P. 825–830.  
<https://doi.org/10.1038/s41371-018-0096-4>
28. *Procopciuc L.M., Nemeti G., Buzdugan E. et al.* Renin-angiotensin system gene variants and risk of early- and late-onset preeclampsia: A single center case-control study // *Pregnancy Hypertens.* 2019. V. 18. P. 1–8.  
<https://doi.org/10.1016/j.preghy.2019.08.006>
29. *Huang T., Yan Y., Li J. et al.* An insertion-deletion polymorphism in angiotensin-converting enzyme is associated with a reduced risk of preeclampsia: an evidence-based meta-analysis from 44 studies // *Hypertens. Pregnancy.* 2020. V. 39(3). P. 336–347.  
<https://doi.org/10.1080/10641955.2020.1769644>
30. *Jansaka N., Pornwattanakrirlert W., Tongsong T. et al.* A study of the association between angiotensinogen (AGT) gene polymorphism (M235T) and preeclampsia in Thai pregnant women // *J. Obstet. Gynaecol.* 2021. V. 16. P. 1–5.  
<https://doi.org/10.1080/01443615.2020.1837757>
31. *Ababio G.K., Adu-Bonsaffoh K., Abindau E. et al.* Effects of factor V Leiden polymorphism on the pathogenesis and outcomes of preeclampsia // *BMC Med. Genet.* 2019. V. 20(1). P. 189.  
<https://doi.org/10.1186/s12881-019-0924-6>
32. *Ahmed N.A., Adam I., Elzaki S.E.G. et al.* Factor-V Leiden G1691A and prothrombin G20210A polymorphisms in Sudanese women with preeclampsia, a case-control study // *BMC Med. Genet.* 2019. V. 20(1). P. 2.  
<https://doi.org/10.1186/s12881-018-0737-z>
33. *Mohammadpour-Gharehbagh A., Teimoori B., Narooei-Nejad M. et al.* The association of the placental MTHFR 3'-UTR polymorphisms, promoter methylation, and MTHFR expression with preeclampsia // *J. Cell Biochem.* 2018. V. 119(2). P. 1346–1354.  
<https://doi.org/10.1002/jcb.26290>

34. Mishra J., Talwar S., Kaur L. et al. Differential global and MTHFR gene specific methylation patterns in pre-eclampsia and recurrent miscarriages: A case-control study from North India // *Gene*. 2019. V. 704. P. 68–73.  
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.04.036>
35. Ahmed S.F., Ali M.M., Kheiri S. et al. Association of methylenetetrahydrofolatereductase C677T and reduced-f carrier-1 *G80A* gene polymorphism with pre-eclampsia in Sudanese women // *Hypertens. Pregnancы*. 2020. V. 39(2). P. 77–81.  
<https://doi.org/10.1080/10641955.2020.1725037>
36. Сереброва В.Н., Трифонова Е.А., Степанов В.А. Эволюционно-генетический анализ роли регуляторных участков гена *CORO2A* в формировании наследственной предрасположенности к преэклампсии у русских и якутов // *Науч. рез. биомед. исследований*. 2018. Т. 4. № 3. С. 38–48.  
<https://doi.org/10.18413/2313-8955-2018-4-3-0-4>
37. Wang T., Lian Y. The relationship between Fas and Fas ligand gene polymorphism and preeclampsia risk // *Biosci. Rep.* 2019. V. 39(2). P. BSR20181901.  
<https://doi.org/10.1042/BSR20181901>
38. Pinarbasi E., Cekin N., Bildirici A.E. et al. *STOX1* gene Y153H polymorphism is associated with early-onset preeclampsia in Turkish population // *Gene*. 2020. V. 754. P. 144894.  
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144894>
39. Трифонова Е.А., Габидулина Т.В., Ершов Н.И. и др. Характеристика транскриптома плацентарной ткани у женщин с физиологической беременностью и преэклампсией // *Acta Naturae* (русскоязычная версия). 2014. Т. 6. № 2(21). С. 77–90.
40. Сереброва В.Н., Трифонова Е.А., Габидулина Т.В. и др. Выявление новых маркеров предрасположенности к преэклампсии путем анализа регуляторных участков генов, дифференциально экспрессирующихся в плацентарной ткани // *Мол. биология*. 2016. Т. 50. № 5. С. 870–879.
41. Kleinrouweler C.E., van Uiter M., Moerland P.D. et al. Differentially expressed genes in the pre-eclamptic placenta: A systematic review and meta-analysis // *PLoS One*. 2013. V. 8(7). P. e68991.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068991>
42. Christians J.K., Leavey K., Cox B.J. Associations between imprinted gene expression in the placenta, human fetal growth and preeclampsia // *Biol. Lett.* 2017. V. 13(11). P. 20170643.  
<https://doi.org/10.1098/rsbl.2017.0643>
43. Luo S., Pei J., Li X., Gu W. Decreased expression of *JHDMID* in placenta is associated with preeclampsia through HLA-G // *J. Hum. Hypertens.* 2018. V. 32(6). P. 448–454.  
<https://doi.org/10.1038/s41371-018-0062-1>
44. Liu S., Jiang S., Huang L., Yu Y. Expression of *SASH1* in preeclampsia and its effects on human trophoblast // *Biomed. Res. Int.* 2020. V. 2020. P. 5058260.  
<https://doi.org/10.1155/2020/5058260>
45. Deysenroth M.A., Li Q., Escudero C. et al. Differences in placental imprinted gene expression across pre-eclamptic and non-preeclamptic pregnancies // *Genes (Basel)*. 2020. V. 11(10). P. 1146.  
<https://doi.org/10.3390/genes11101146>
46. Zheng Z., Chen H., Zhu S., Hu Y. *CXCR4/CXCR7* protein expression levels in placentas of patients with pre-eclampsia // *Med. Sci. Monit.* 2021. V. 27. P. e931192.  
<https://doi.org/10.12659/MSM.931192>
47. Yong H.E., Melton P.E., Johnson M.P. et al. Genome-wide transcriptome directed pathway analysis of maternal pre-eclampsia susceptibility genes // *PLoS One*. 2015. V. 10(5). P. e0128230.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128230>
48. Brew O., Sullivan M.H., Woodman A. Comparison of normal and pre-eclamptic placental gene expression: A systematic review with meta-analysis // *PLoS One*. 2016. V. 11(8). P. e0161504.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161504>
49. Huang X., Anderle P., Hostettler L. et al. Identification of placental nutrient transporters associated with intra-uterine growth restriction and pre-eclampsia // *BMC Genomics*. 2018. V. 19(1). P. 173.  
<https://doi.org/10.1186/s12864-018-4518-z>
50. Vennou K.E., Kontou P.I., Braliou G.G., Bagos P.G. Meta-analysis of gene expression profiles in preeclampsia // *Pregnancy Hypertens.* 2020. V. 19. P. 52–60.  
<https://doi.org/10.1016/j.preghy.2019.12.007>
51. Starikova D., Ponomarenko I., Reshetnikov E. et al. Novel data about association of the functionally significant polymorphisms of the *MMP9* gene with exfoliation glaucoma in the caucasian population of Central Russia // *Ophthalmic Res.* 2021 V. 64(3). P. 458–464.  
<https://doi.org/10.1159/00051250y>
52. Ponomarenko I., Reshetnikov E., Polonikov A. et al. Candidate genes for age at menarche are associated with endometrial hyperplasia // *Gene*. 2020. V. 757. P. 144933.  
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144933>
53. Stepanov V.A., Trifonova E.A. Multiplex genotyping of single nucleotide polymorphisms by MALDI-TOF mass-spectrometry: Frequencies of 56 SNP in immune response genes in human populations // *Mol. Biol. (Mosk)*. 2013. V. 47(6). P. 976–986.
54. Ponomarenko I., Reshetnikov E., Polonikov A. et al. Candidate genes for age at menarche are associated with endometriosis // *Reprod. Biomed. Online*. 2020. V. 41(5). P. 943–956.  
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.04.016>
55. Moskalenko M., Ponomarenko I., Reshetnikov E. et al. Polymorphisms of the matrix metalloproteinase genes are associated with essential hypertension in a Caucasian population of Central Russia // *Scientific Reports*. 2021 V. 11(1). P. 5224.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-84645-4>
56. Ward L.D., Kellis M. HaploReg v4: Systematic mining of putative causal variants, cell types, regulators and target genes for human complex traits and disease // *Nucl. Ac. Res.* 2016. V. 44(D1). P. D877–D881.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv1340>
57. Zang Y., Yuan Y. A shrinkage method for testing the Hardy–Weinberg equilibrium in case-control studies // *Genet. Epidemiol.* 2013. V. 37(7). P. 743–750.  
<https://doi.org/10.1002/gepi.21753>
58. Tikunova E., Ovtcharova V., Reshetnikov E. et al. Genes of tumor necrosis factors and their receptors and the primary open angle glaucoma in the population of Central Russia // *Int. J. Ophthalmol.* 2017. V. 10. P. 1490–1494.  
<https://doi.org/10.18240/ijjo.2017.10.02>

59. Purcell S., Neale B., Todd-Brown K. et al. PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses // *Am. J. Hum. Genet.* 2007. V. 81. P. 559–575.
60. Xu Z., Taylor J.A. SNPinfo: Integrating GWAS and candidate gene information into functional SNP selection for genetic association studies // *Nucl. Ac. Res.* 2009. V. 37(2). P. W600–W605.
61. Boyle A.P., Hong E.L., Hariharan M. et al. Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB // *Genome Res.* 2012. V. 9. P. 1790–1797.
62. Westra H.J., Peters M.J., Esko T. et al. Systematic identification of transe QTLs as putative drivers of known disease associations // *Nat. Genet.* 2013. V. 45. P. 1238–1243.  
<https://doi.org/10.1038/ng.2756>
63. Guo L., Du Y., Chang S. et al. rSNPBase: A database for curated regulatory SNPs // *Nucl. Ac. Res.* 2014. V. 42. P. D1033–D1039.
64. Moskalenko M.I., Milanova S.N., Ponomarenko I.V. et al. Study of associations of polymorphism of matrix metalloproteinases genes with the development of arterial hypertension in men // *Kardiologiya.* 2019. V. 59(7S). P. 31–39.  
<https://doi.org/10.18087/cardio.2598>
65. Ponomarenko I., Reshetnikov E., Polonikov A. et al. Candidate genes for age at menarche are associated with uterine leiomyoma // *Front. Genet.* 2021. V. 11. P. 512940.  
<https://doi.org/10.3389/fgene.2020.512940>
66. Nishizawa H., Ota S., Suzuki M. et al. Comparative gene expression profiling of placentas from patients with severe pre-eclampsia and unexplained fetal growth restriction // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2011. V. 9. P. 107.  
<https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-107>
67. Winn V.D., Gormley M., Fisher S.J. The impact of pre-eclampsia on gene expression at the maternal-fetal interface // *Pregnancy Hypertens.* 2011. V. 1(1). P. 100–108.  
<https://doi.org/10.1016/j.preghy.2010.12.001>
68. Tsai S., Hardison N.E., James A.H. et al. Transcriptional profiling of human placentas from pregnancies complicated by preeclampsia reveals dysregulation of sialic acid acetyltransferase and immune signalling pathways // *Placenta.* 2011. V. 32(2). P. 175–182.  
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.11.014>

## Genes *TMEM136* and *PPP1R12C* Differentially Expressed in the Placenta Are Associated with Preeclampsia

E. A. Reshetnikov<sup>a, \*</sup>, V. A. Stepanov<sup>b</sup>, V. N. Serebrova<sup>b</sup>, A. V. Bocharova<sup>b</sup>, E. A. Trifonova<sup>b</sup>,  
I. V. Ponomarenko<sup>a</sup>, Yu. N. Reshetnikova<sup>a</sup>, O. A. Efremova<sup>a</sup>, V. S. Orlova<sup>a</sup>,  
I. V. Batlutskaya<sup>a</sup>, I. N. Sorokina<sup>a</sup>, and M. I. Churnosov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Belgorod National State University, Belgorod, 308015 Russia

<sup>b</sup>Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634009 Russia

\*e-mail: reshetnikov@bsu.edu.ru

The associations of genes differentially expressed in the placenta with the risk of preeclampsia in women in Central Russia were studied. The study was conducted on a sample of 366 pregnant women with preeclampsia and 631 women in the control group. All pregnant women underwent typing of specially selected nine SNPs of genes differentially expressed in the placenta. Associations of SNPs of candidate genes with preeclampsia were assessed using logistic regression. For polymorphisms that showed associations with PE, their functional effects were assessed *in silico*. It was established that the G allele rs36011588 *TMEM136* is a protective factor (OR = 0.65), and the CA haplotype of the rs2532058–rs66707428 *PPP1R12C* is a risk factor (OR = 1.21) for the development of preeclampsia. The associations of these SNPs with the formation of preeclampsia may be due to their important epigenetic significance: they are located at the sites of modified histones in the regions of promoters and enhancers, in DNase-hypersensitive sites, binding sites for regulatory proteins, and in the binding domains for transcription factors. Also, these loci are associated with the level of transcription and alternative splicing in tissues pathogenetically significant for the development of preeclampsia.

**Keywords:** preeclampsia, single nucleotide polymorphism (SNP), associations, genes of the placenta.

УДК 618.3:616.8-009.24-02-036.3

**ПОЛИМОРФНЫЙ ЛОКУС rs167479 ГЕНА RGL3 АССОЦИИРОВАН С РИСКОМ РАЗВИТИЯ ПРЕЭКЛАМПСИИ ТЯЖЕЛОГО ТЕЧЕНИЯ**© 2022 г. М. Ю. Абрамова<sup>1</sup>, \*, И. В. Пономаренко<sup>1</sup>, М. И. Чурносов<sup>1</sup><sup>1</sup>Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, 308015 Россия

\*e-mail: abramova\_myu@bsu.edu.ru

Поступила в редакцию 27.01.2022 г.

После доработки 04.04.2022 г.

Принята к публикации 04.05.2022 г.

В настоящей работе были изучены ассоциации полиморфизма генов-кандидатов артериальной гипертензии с развитием преэклампсии (ПЭ) тяжелого течения у населения Центрального Черноземья России. Проведено генотипирование пяти полиморфных вариантов (rs1799945 гена *HFE*, rs8068318 гена *TBX2*, rs1173771 гена *AC025459.1*, rs932764 гена *PLCE1*, rs167479 гена *RGL3*) у 217 женщин с ПЭ тяжелого течения и 235 беременных с ПЭ умеренного течения. Выявлено, что аллель *G* и генотип *GG* полиморфного локуса rs167479 гена *RGL3* ассоциирован с риском развития ПЭ тяжелого течения согласно аллельной ( $OR = 1.35$ ,  $p_{perm} = 0.02$ ), аддитивной ( $OR = 1.36$ ,  $p_{perm} = 0.02$ ) и рецессивной ( $OR = 1.61$ ,  $p_{perm} = 0.04$ ) генетическим моделям. Установлено, что данный полиморфный локус локализуется в функционально активном регионе генома, выполняющем функции энхансеров и промоторов в различных органах и тканях, является областью гиперчувствительности к ДНКазе-1, местом связывания с девятью факторами-регуляторами транскрипции и ассоциирован с уровнем экспрессии гена *CTC-510F12.3* в гипофизе. Кроме того, rs167479 определяет миссенс-мутацию, приводящую к замене Pro162His в белке RalGDS-like3 и имеющую предикторный потенциал “PROBABLY DAMAGING”.

**Ключевые слова:** преэклампсия, полиморфный локус, *RGL3*, GWAS.

**DOI:** 10.31857/S0016675822120025

Преэклампсия (ПЭ) является одним из самых тяжелых осложнений беременности, классическими проявлениями которого является повышение артериального давления (ДАД более 90 и/или САД более 140 мм рт. ст.), протеинурия ( $\geq 0.3$  г/сут), развитие явных или скрытых отеков и сопровождается дисфункцией различных органов и систем [1]. Согласно мировой статистике, ПЭ осложняет течение беременности в 2–8% всех случаев и является одной из основных причин материнской заболеваемости и смертности [2, 3]. Женщины с отягощенным по ПЭ анамнезом относятся к когорте людей с более высоким риском по развитию тромбозов и инсультов, сахарного диабета II типа, артериальной гипертензии (АГ), почечной недостаточности, кардиомиопатий и др. в ближайшие 15 лет после родов [4, 5]. Существенный вклад ПЭ вносит и в структуру перинатальной заболеваемости и смертности. Установлено, что ПЭ у матери значительно увеличивает риск ранней неонатальной смерти, рождения детей с низкой массой тела, развития респираторного дистресс-синдрома и пери- и интравентрикулярных кровоизлияний у новорожденных [6, 7], а также ПЭ является независимым фактором риска развития

сердечно-сосудистых и нервно-психических заболеваний в будущем у детей, рожденных в данную беременность [8, 9].

ПЭ относится к мультифакторным заболеваниям, как и большинство патологий человека [10–14]. Генетические детерминанты в формировании данного осложнения беременности составляют не менее 50% [15]. В последнее время особое внимание уделяется изучению роли полиморфизма различных групп генов-кандидатов, биологические продукты которых вовлечены в патогенез ПЭ, также активно изучаются и гены-кандидаты АГ, как одного из основополагающего симптома данного осложнения беременности [16–18]. Следует отметить, что несмотря на большое количество генетических исследований ПЭ материалы, полученные в ходе данных работ, зачастую неоднозначны, а результаты варьируются в зависимости от этно-территориальных характеристик изучаемых групп, в том числе и в России, что определяет актуальность продолжения изучения молекулярно-генетических основ ПЭ.

Цель исследования — оценить ассоциации полиморфизма генов-кандидатов АГ с развитием ПЭ тяжелого течения.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данное исследование вошло 452 женщины с осложненной ПЭ беременностью (средний возраст пациенток составил  $27.39 \pm 4.05$  лет), которые находились под наблюдением врачей акушеров-гинекологов Перинатального центра ОГБУЗ “Белгородская клиническая больница Святителя Иоасафа” и дали добровольное согласие на участие в этом исследовании. В группу женщин с умеренным течением ПЭ вошло 235 беременных, а группу женщин с ПЭ тяжелого течения – 217. В выборки включались женщины русского этноса, которые родились и проживали в Центральном Черноземье России и не имели родственных связей между собой. Верификация диагноза ПЭ осуществлялась на основании наличия артериальной гипертензии и протеинурии. Диагноз ПЭ тяжелого течения устанавливался при наличии тяжелой АГ (ДАД более 110 мм рт. ст. и/или САД более 160 мм рт. ст.) и суточной протеинурии более 5 г/л в сочетании с одним или более критериев тяжелой ПЭ, указанных в клинических рекомендациях “Гипертензивные расстройства во время беременности, в родах и послеродовом периоде. Преэклампсия. Эклампсия” (2016). При исключении признаков тяжелой ПЭ и наличии АГ (САД = 140–159 и/или ДАД = 90–109 мм рт. ст.) и протеинурии  $\geq 0.3$  г/л устанавливался диагноз ПЭ умеренного течения [19]. Клиническое, клиничко-анамнестическое и клиничко-лабораторное обследование беременных было проведено на сроке родоразрешения, под контролем этического комитета медицинского института НИУ БелГУ.

Всем женщинам с ПЭ было проведено молекулярно-генетическое исследование пяти полиморфных локусов генов-кандидатов, показавших значимые ассоциации с развитием артериальной гипертензии по данным каталога полногеномных исследований (GWAS): rs1799945 *HFE*, rs8068318 *TBX2*, rs1173771 *AC025459.1*, rs932764 *PLCE1*, rs167479 *RGL3* [20–45]. Выделение ДНК и последующее генотипирование полиморфных локусов осуществлялось по методике, представленной ранее [46]. Полиморфные маркеры включались в настоящую работу по следующим критериям [47, 48]: ассоциированы с развитием АГ по двум и более полногеномным исследованиям и имеют значимый регуляторный потенциал согласно данным онлайн-ресурса *HaploReg* (v.4.1) (<http://compbio.mit.edu/HaploReg>) [49]. Для изучаемых выборок были получены данные об эмпирическом распределении генотипов и его соответствии теоретически ожидаемому согласно закономерности Харди–Вайнберга (отклонения принимались за статистически значимые при  $p_{\text{bonf}} \leq 0.01$ ). Изучение ассоциации исследуемых полиморфных локусов с развитием ПЭ тяжелого и средне-тяжелого течения проводили с использованием логистического ре-

грессионного анализа (рассматривалось четыре генетические модели: аллельная, аддитивная, рецессивная и доминантная) с поправками на ковариаты (возраст, наследственная отягощенность по ПЭ, индекс массы тела до беременности). При проведении генетического анализа выполнялась коррекция на множественные сравнения с использованием адаптивного пермутационного теста ( $p_{\text{perm}}$ ). За статистически значимый принимался уровень  $p_{\text{perm}} < 0.05$  [50]. Для оценки ассоциативных связей полиморфных вариантов с ПЭ были определены показатели OR (отношение шансов) и 95%CI (95%-ный доверительный интервал для OR). Все вычисления проводились в программе PLINK v. 2.050 (<http://zzz.bwh.harvard.edu/plink>) [51].

Для полиморфных вариантов, показавших значимые ассоциации с развитием ПЭ тяжелого течения, была изучена их связь с уровнем транскрипционной активности (eQTL) и альтернативного сплайсинга генов (sQTL) с применением онлайн-программы GTExportal (<http://www.gtexportal.org/>) [52], а эпигенетические эффекты рассмотрены с помощью онлайн ресурса *HaploReg* (v4.1), <http://archive.broadinstitute.org/mamals/haploreg/haploreg.php> [53], оценка предиктивного значения несинонимических замен осуществлялась с применением базы данных *PolyPhen-2* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) [54].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенный популяционно-генетический анализ наблюдаемого распределения генотипов по изучаемым полиморфным вариантам генов-кандидатов АГ (rs1799945 *HFE*, rs8068318 *TBX2*, rs1173771 *AC025459.1*, rs932764 *PLCE1*, rs167479 *RGL3*) показал его соответствие ожидаемому распределению согласно закономерности Харди–Вайнберга (вводилась поправка Бонферрони на количество анализируемых локусов  $p_{\text{bonf}} \leq 0.01$  (0.05/5)).

Выявлена ассоциативная связь полиморфного локуса rs167479 гена *RGL3* с развитием тяжелого течения ПЭ. По полученным в настоящей работе данным минорный аллель *G* и генотип *GG* rs167479 гена *RGL3* достоверно связаны с увеличением риска развития ПЭ тяжелого течения согласно аллельной (OR = 1.35, 95%CI 1.03–1.76,  $p = 0.02$ ,  $p_{\text{perm}} = 0.02$ ), аддитивной (OR = 1.37, 95%CI 1.04–1.79,  $p = 0.02$ ,  $p_{\text{perm}} = 0.02$ ) и рецессивной (OR = 1.61, 95%CI 1.02–2.51,  $p = 0.04$ ,  $p_{\text{perm}} = 0.04$ ) генетическим моделям (табл. 1).

По данным GWAS-каталога полиморфный локус rs167479 гена *RGL3* показал значимые ассоциации ( $p \leq 5 \times 10^{-8}$ ) с параметрами артериального давления (АД) и АГ по результатам восьми полногеномных исследований. Выявлено, что аллель *G* исследуемого полиморфного варианта ассоции-

**Таблица 1.** Ассоциации GWAS-значимых полиморфных локусов генов-кандидатов артериальной гипертензии с развитием ПЭ тяжелого течения

Локус (ген)	Аллели, генотипы	ПЭ тяжелого течения ( $n = 217$ ), % ( $n$ )	ПЭ умеренного течения ( $n = 235$ ), % ( $n$ )	OR (95%CI)	$p$
rs1799945 ( <i>HFE</i> )	<i>G</i>	18.31 (78)	22.01 (103)	0.79 (0.56–1.11)	0.19
	<i>C</i>	81.69 (348)	77.99 (365)	1.26 (0.89–1.77)	
	<i>GG</i>	5.63 (12)	4.70 (11)	1.21 (0.48–3.01)	0.81
	<i>GC</i>	25.35 (54)	34.62 (81)	0.64 (0.41–0.98)	0.09
	<i>CC</i>	69.07 (147)	60.68 (142)	1.44 (0.95–2.17)	0.08
	$H_O/H_E$ ( $P_{HWE}$ )	0.253/0.299 (0.036)	0.346/0.343 (1.000)		
	Минорный аллель <i>G</i> (аллельная модель)			0.79 (0.57–1.10)	0.17
	<i>G/G</i> vs. <i>G/C</i> vs. <i>C/C</i> (аддитивная модель)			0.81 (0.48–1.11)	0.18
	<i>G/G</i> vs. <i>G/C</i> + <i>C/C</i> (доминантная модель)			0.69 (0.47–1.03)	0.07
	<i>G/G</i> + <i>G/C</i> vs. <i>C/C</i> (рецессивная модель)			1.21 (0.52–2.80)	0.65
rs8068318 ( <i>TBX2</i> )	<i>C</i>	28.47 (119)	28.38 (130)	1.01 (0.74–1.36)	1.00
	<i>T</i>	71.53 (299)	71.62 (328)	1.00 (0.73–1.35)	
	<i>CC</i>	9.09 (19)	9.61 (22)	0.94 (0.47–1.88)	0.98
	<i>CT</i>	38.76 (81)	37.55 (86)	1.05 (0.70–1.58)	0.87
	<i>TT</i>	47.85 (109)	52.84 (121)	0.97 (0.66–1.44)	0.96
	$H_O/H_E$ ( $P_{HWE}$ )	0.387/0.407 (0.498)	0.375/0.406 (0.256)		
	Минорный аллель <i>C</i> (аллельная модель)			1.00 (0.75–1.35)	0.98
	<i>C/C</i> vs. <i>C/T</i> vs. <i>T/T</i> (аддитивная модель)			1.00 (0.75–1.34)	0.98
	<i>C/C</i> vs. <i>T/T</i> + <i>T/T</i> (доминантная модель)			1.03 (0.70–1.49)	0.89
	<i>C/C</i> + <i>C/T</i> vs. <i>T/T</i> (рецессивная модель)			0.94 (0.49–1.79)	0.85
rs1173771 ( <i>AC025459.1</i> )	<i>A</i>	43.66 (186)	40.79 (186)	1.13 (0.85–1.48)	0.42
	<i>G</i>	56.34 (240)	59.21 (270)	0.89 (0.67–1.17)	
	<i>AA</i>	19.25 (41)	14.91 (34)	1.36 (0.80–2.31)	0.28
	<i>AG</i>	48.83 (104)	51.75 (118)	0.89 (0.60–1.32)	0.60
	<i>GG</i>	31.92 (68)	33.46 (76)	0.94 (0.62–1.43)	0.83
	$H_O/H_E$ ( $P_{HWE}$ )	0.488/0.492 (0.890)	0.503/0.487 (0.558)		
	Минорный аллель <i>A</i> (аллельная модель)			1.12 (0.86–1.47)	0.39
	<i>A/A</i> vs. <i>A/G</i> vs. <i>G/G</i> (аддитивная модель)			1.13 (0.86–1.48)	0.38
	<i>A/A</i> vs. <i>A/G</i> + <i>G/G</i> (доминантная модель)			1.07 (0.71–1.59)	0.75
	<i>A/A</i> + <i>A/G</i> vs. <i>A/G</i> (рецессивная модель)			1.36 (0.83–3.24)	0.23

Таблица 1. Продолжение

Локус (ген)	Аллели, генотипы	ПЭ тяжелого течения ( $n = 217$ ), % ( $n$ )	ПЭ умеренного течения ( $n = 235$ ), % ( $n$ )	OR (95%CI)	$p$
rs932764 ( <i>PLCE1</i> )	<i>A</i>	46.98 (202)	47.22 (221)	1.10 (0.83–1.44)	0.52
	<i>G</i>	53.02 (228)	52.78 (247)	0.91 (0.69–1.19)	
	<i>AA</i>	20.93 (45)	22.22 (52)	0.93 (0.58–1.49)	0.83
	<i>AG</i>	52.09 (112)	50.00 (117)	1.09 (0.74–1.60)	0.73
	<i>GG</i>	26.98 (58)	27.78 (65)	0.96 (0.62–1.49)	0.93
	$H_O/H_E$ ( $P_{HWE}$ )	0.520/0.498 (0.584)	0.510/0.498 (0.637)		
	Минорный аллель <i>A</i> (аллельная модель)			0.99 (0.76–1.28)	0.94
	<i>A/A</i> vs. <i>A/G</i> vs. <i>G/G</i> (аддитивная модель)			0.99 (0.75–1.29)	0.94
	<i>A/A</i> vs. <i>A/G</i> + <i>G/G</i> (доминантная модель)			1.04 (0.68–1.57)	0.84
	<i>A/A</i> + <i>A/G</i> vs. <i>A/G</i> (рецессивная модель)			0.92 (0.59–1.45)	0.73
rs167479 ( <i>RGL3</i> )	<i>G</i>	52.11 (222)	44.61 (207)	1.35 (1.03–1.78)	0.03
	<i>C</i>	47.89 (204)	55.39 (257)	0.74 (0.56–0.97)	
	<i>GG</i>	26.76 (57)	18.53 (43)	1.61 (1.00–2.58)	0.05
	<i>GC</i>	50.70 (108)	52.16 (121)	0.94 (0.64–1.39)	0.83
	<i>CC</i>	22.54 (48)	29.31 (68)	0.70 (0.45–1.10)	0.13
	$H_O/H_E$ ( $P_{HWE}$ )	0.507/0.499 (0.891)	0.521/0.494 (0.428)		
	Минорный аллель <i>G</i> (аллельная модель)			1.35 (1.03–1.76)	0.02
	<i>G/G</i> vs. <i>G/T</i> vs. <i>T/T</i> (аддитивная модель)			1.37 (1.04–1.79)	0.02
	<i>G/G</i> vs. <i>G/T</i> + <i>T/T</i> (доминантная модель)			1.42 (0.93–2.19)	0.10
	<i>G/G</i> + <i>G/T</i> vs. <i>T/T</i> (рецессивная модель)			1.61 (1.02–2.51)	0.04

Примечание. OR – показатель отношения шансов, 95%CI – 95%-ный доверительный интервал для отношения шансов;  $p$  – уровень значимости;  $H_O$  – гетерозиготность наблюдаемая;  $H_E$  – гетерозиготность ожидаемая,  $P_{HWE}$  – уровень значимости отклонения от закономерности Харди–Вайнберга.

рован с повышением показателей САД, ДАД, ПД, в то время как аллель *T* выполняет “протективную” роль в отношении развития АГ и связан с более низким уровнем АД (САД, ДАД, ПД, СрАД) [38–45]; это полностью согласуется с полученными нами данными о “рисковой” роли аллеля *G* для развития ПЭ. Следует отметить, что лишь один из пяти изученных GWAS-значимых для АГ полиморфных локусов продемонстрировал ассоциативную связь с развитием ПЭ у населения Центрального Черноземья России, тогда как четыре полиморфизма не были связаны с риском развития ПЭ, несмотря на их значимую роль в развитии АГ по данным ранее проведенных GWAS-исследований. Особенности генетической детерминации АГ у жителей Центрального

Черноземья России показаны и в других исследованиях [55–57]. Таким образом, результаты нашей работы еще раз подтверждают необходимость проведения репликативных исследований GWAS-значимых полиморфных локусов в отдельных популяциях (в том числе и в Центрально-Черноземном регионе).

Оценка функциональных эффектов показала, что исследуемый полиморфный маркер rs167479 гена *RGL3* локализован в функционально активном регионе генома, который проявляет различные ткане/органоспецифичные регуляторные эффекты. Так, в амнионе, плаценте, культурах мезенхимальных и стволовых клеток участков ДНК, в котором расположен rs167479, выполняет функции как энхансера, так и промотора. В тро-

фобласте, первичных клетках периферической крови регион генома, в котором находится rs167479, является энхансером. Вместе с тем, этот же регион ДНК (место локализации rs167479) считается эволюционно-консервативным участком и является областью повышенной чувствительности (гиперчувствительности) к действию фермента ДНКазы-1 и местом связывания с девятью факторами транскрипции: AP-1, CNT2, Rd 21, SETDB1, SP1, R4, WT 1, ZNF219, Zinc. Следует отметить, что аллель *G*, ассоциированный, согласно нашим данным, с развитием ПЭ тяжелого течения, значительно увеличивает “чувствительность” к факторам транскрипции CCNT2 ( $\Delta$ LOD scores аллелей *G* (ref) и *T* (alt) равно 11.9), Rad21 ( $\Delta$ LOD scores аллелей *G* (ref) и *T* (alt) равно 11.3) и ZNF219 ( $\Delta$ LOD scores аллелей *G* (ref) и *T* (alt) равно 12.0). Согласно данным онлайн-ресурса GTExportal, рассматриваемый полиморфный маркер ассоциирован с уровнем экспрессии гена *CTC-510F12.3* в гипофизе ( $p = 0.0000017$ ). С помощью базы данных PolyPhen-2 получено, что полиморфизм rs167479 определяет несинонимичную замену аминокислоты пролин на аминокислоту гистидин в положении 162 (Pro162His) полипептида RalGDS-like3 (Ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 3). Предикторный потенциал данной миссенс-мутации соответствует классу “PROBABLY DAMAGING” (чувствительность = 0.70; специфичность = 0.97, score = 0.992).

Согласно материалам из генетической базы данных GeneCards [58], ген *RGL3* кодирует белок, относящийся к факторам обмена гуаниловых нуклеотидов (Guanine nucleotide Exchange Factors (GEFs)), и активирует работу малых гуанозинтрифосфатгидролаз (ГТФазы, малые G-белки) посредством облегчения их диссоциации с GDP [59, 60]. Сигнальные пути GEFs, относящиеся преимущественно к семейству Rho, являющиеся общим компонентом патогенеза сахарного диабета и сердечно-сосудистых заболеваний, включая АГ, коронарную и церебро-вазкулярную патологию [61]. Установлено, что GEFs экспрессируются в эндотелиальных и гладкомышечных клетках артерий и участвуют в регуляции работы данных структур, что обуславливает потенциальную роль GEFs в развитии гипертензивных расстройств, включая ПЭ [62]. Малые ГТФазы имеют широкий спектр эффекторов, тем самым принимают участие в регуляции множества биологических процессов (регуляция трансмембранного транспорта, реорганизация цитоскелета, активация транскрипции, регуляция экспрессии генов и др.) [63]. Сигнальные пути с участием малых G-белков модулируют активность различных мембранных ионных каналов (эпителиального натриевого канала (ENaC),  $K^+$ - и  $Ca^{2+}$ -канала). Одним из ключевых факторов регуляции объема циркулирующей в организме жидкости, а следовательно и АД, является реаб-

сорбция ионов натрия в дистальных отделах нефронов через ENaC [64]. Также экспрессия RPM/RGL3 ингибирует индукцию фактора транскрипции Elk-1, участвующего в процессах роста, дифференцировки и миграции клеток [65, 66].

В настоящей работе показана ассоциация GWAS-значимого для АГ полиморфного локуса rs167479 гена *RGL3* с развитием преэклампсии тяжелого течения у населения Центрального Черноземья России (минорный аллель *G* и генотип *GG* повышают риск развития ПЭ тяжелого течения). Полиморфный вариант rs167479 гена *RGL3* оказывает значимые эпигенетические эффекты (локализуется в функционально активном регионе генома, выполняющем функции энхансеров и промоторов в различных органах и тканях, также являющимся областью гиперчувствительности к ДНКазе-1, местом связывания с девятью факторами-регуляторами транскрипции) и ассоциирован с уровнем экспрессии гена *CTC-510F12.3* в гипофизе. Кроме того, rs167479 определяет миссенс-мутацию, приводящую к замене Pro162His в белке RalGDS-like3 и имеющую предикторный потенциал “PROBABLY DAMAGING”.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ “Изучение генетических факторов репродуктивного здоровья женщин” (МД-3284.2022.1.4).

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

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Michalczyk M., Celewicz A., Celewicz M. et al. The role of inflammation in the pathogenesis of preeclampsia // *Mediators Inflamm.* 2020. V. 2020. P. 3864941. <https://doi.org/10.1155/2020/3864941>
2. Gestational hypertension and preeclampsia: ACOG practice bulletin summary, number 222 // *Obstet. Gynecol.* 2020. V. 135. № 6. P. 1492–1495. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000003892>
3. Сереброва В.Н., Трифонова Е.А., Степанов В.А. Беременность как фактор адаптивной эволюции человека. Роль естественного отбора в возникновении преэклампсии // *Генетика.* 2021. Т. 57. № 1. С. 29–43.
4. Turbeville H.R., Sasser J.M. Preeclampsia beyond pregnancy: long-term consequences for mother and child // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2020. V. 318. № 6.

- P. F1315–F1326.  
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00071.2020>
5. *Chourdakis E., Oikonomou N., Fouzas S. et al.* Preeclampsia emerging as a risk factor of cardiovascular disease in women // *High Blood Press Cardiovasc. Prev.* 2021. V. 28. № 2. P. 103–114.  
<https://doi.org/10.1007/s40292-020-00425-7>
  6. *Mendola P., Mumford S.L., Männistö T.I. et al.* Controlled direct effects of preeclampsia on neonatal health after accounting for mediation by preterm birth // *Epidemiology.* 2015. V. 26. № 1. P. 17–26.  
<https://doi.org/10.1097/EDE.0000000000000213>
  7. *Khader Y.S., Batieha A., Al-Njadat R.A., Hijazi S.S.* Preeclampsia in Jordan: incidence, risk factors, and its associated maternal and neonatal outcomes // *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 2018. V. 31. № 6. P. 770–776.  
<https://doi.org/10.1080/14767058.2017.1297411>
  8. *Nahum Sacks K., Friger M., Shoham-Vardi I. et al.* Prenatal exposure to preeclampsia as an independent risk factor for long-term cardiovascular morbidity of the offspring // *Pregnancy Hypertens.* 2018. V. 13. P. 181–186.  
<https://doi.org/10.1016/j.preghy.2018.06.013>
  9. *Nahum Sacks K., Friger M., Shoham-Vardi I. et al.* Long-term neuropsychiatric morbidity in children exposed prenatally to preeclampsia // *Early Hum. Dev.* 2019. V. 130. P. 96–100.  
<https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2019.01.016>
  10. *Reshetnikov E.A., Akulova L.Y., Dobrodomova I.S. et al.* The insertion-deletion polymorphism of the ACE gene is associated with increased blood pressure in women at the end of pregnancy // *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2015. V. 16. № 3. P. 623–632.  
<https://doi.org/10.1177/1470320313501217>
  11. *Severinova O.V., Lokteva T.I., Gureev V.V. et al.* The effect of arginase ii selective inhibitors on the functional parameters of experimental animals in adma-like preeclampsia // *J. Intern. Pharmaceutical Res.* 2019. V. 46. № 4. P. 272–275.
  12. *Vennou K.E., Kontou P.I., Braliou G.G., Bagos P.G.* Meta-analysis of gene expression profiles in preeclampsia // *Pregnancy Hypertens.* 2020. V. 19. P. 52–60.  
<https://doi.org/10.1016/j.preghy.2019.12.007>
  13. *Решетников Е.А.* Полиморфизм rs34845949 гена *SASH1* ассоциирован с риском развития преэклампсии // *Науч. результаты биомед. исследований.* 2021. Т. 7. № 1. С. 44–55.  
<https://doi.org/10.18413/2658-6533-2020-7-1-0-4>
  14. *Golovchenko O., Abramova M., Ponomarenko I. et al.* Functionally significant polymorphisms of ESR1 and PGR and risk of intrauterine growth restriction in population of Central Russia // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2020. V. 253. P. 52–57.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2020.07.045>
  15. *Galaviz-Hernandez C., Sosa-Macias M., Teran E. et al.* Paternal determinants in preeclampsia // *Front. Physiol.* 2019. V. 9. P. 1870.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01870>
  16. *Сереброва В.Н., Трифонова Е.А., Степанов В.А.* Эволюционно-генетический анализ роли регуляторных участков гена *CORO2A* в формировании наследственной предрасположенности к преэклампсии у русских и якутов // *Науч. результаты биомед. исследований.* 2018. Т. 4. № 3. С. 38–48.  
<https://doi.org/10.18413/2313-8955-2018-4-3-0-4>
  17. *Reshetnikov E., Ponomarenko I., Golovchenko O. et al.* The VNTR polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene and blood pressure in women at the end of pregnancy // *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.* 2019. V. 58. № 3. P. 390–395.  
<https://doi.org/10.1016/j.tjog.2018.11.035>
  18. *Chen G., Li L., Wu J. et al.* Correlations of P-selectin and E-selectin gene polymorphisms with preeclampsia // *Panminerva Med.* 2021. V. 63. № 1. P. 93–94.  
<https://doi.org/10.23736/S0031-0808.19.03672-3>
  19. Гипертензивные расстройства во время беременности, в родах и послеродовом периоде. Преэклампсия. Эклампсия. Клинические Рекомендации (протокол лечения). М., 2016. С. 4–6.
  20. *Ehret G.B., Munroe P.B., Rice K.M. et al.* Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk // *Nature.* 2011. V. 478. № 7367. P. 103–109.  
<https://doi.org/10.1038/nature10405>
  21. *Pichler I., Minelli C., Sanna S. et al.* Identification of a common variant in the TFR2 gene implicated in the physiological regulation of serum iron levels // *Hum. Mol. Genet.* 2011. V. 20. № 6. P. 1232–1240.  
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddq552>
  22. *Astle W.J., Elding H., Jiang T. et al.* The allelic landscape of human blood cell trait variation and links to common complex disease // *Cell.* 2016. V. 167. № 5. P. 1415–1429. e19.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.042>
  23. *Chambers J.C., Zhang W., Lord G.M. et al.* Genetic loci influencing kidney function and chronic kidney disease // *Nat. Genet.* 2010. V. 42. № 5. P. 373–375.  
<https://doi.org/10.1038/ng.566>
  24. *Wain L.V., Verwoert G.C., O'Reilly P.F. et al.* Genome-wide association study identifies six new loci influencing pulse pressure and mean arterial pressure // *Nat. Genet.* 2011. V. 43. № 10. P. 1005–1011.  
<https://doi.org/10.1038/ng.922>
  25. *Ehret G.B., Ferreira T., Chasman D.I. et al.* The genetics of blood pressure regulation and its target organs from association studies in 342,415 individuals // *Nat. Genet.* 2016. V. 48. № 10. P. 1171–1184.  
<https://doi.org/10.1038/ng.3667>
  26. *Pilling L.C., Atkins J.L., Duff M.O. et al.* Red blood cell distribution width: Genetic evidence for aging pathways in 116,666 volunteers // *PLoS. One.* 2017. V. 12. № 9. P. e0185083.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185083>
  27. *Raffield L.M., Louie T., Sofer T. et al.* Genome-wide association study of iron traits and relation to diabetes in the Hispanic Community Health Study/Study of Latinos (HCHS/SOL): Potential genomic intersection of iron and glucose regulation? // *Hum. Mol. Genet.* 2017. V. 26. № 10. P. 1966–1978.  
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddx082>
  28. *Kanai M., Akiyama M., Takahashi A. et al.* Genetic analysis of quantitative traits in the Japanese population links cell types to complex human diseases // *Nat. Gen-*

- et. 2018. V. 50. № 3. P. 390–400.  
<https://doi.org/10.1038/s41588-018-0047-6>
29. *Sung Y.J., Winkler T.W., de Las Fuentes L. et al.* A large-scale multi-ancestry genome-wide study accounting for smoking behavior identifies multiple significant loci for blood pressure // *Am. J. Hum. Genet.* 2018. V. 102. № 3. P. 375–400.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.01.015>
30. *Oskarsson G.R., Oddsson A., Magnusson M.K. et al.* Predicted loss and gain of function mutations in *ACO1* are associated with erythropoiesis // *Commun. Biol.* 2020. V. 3. № 1. P. 189.  
<https://doi.org/10.1038/s42003-020-0921-5>
31. *Vuckovic D., Bao E.L., Akbari P. et al.* The polygenic and monogenic basis of blood traits and diseases // *Cell.* 2020. V. 182. № 5. P. 1214–1231. e11.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.008>
32. *Chen J., Spracklen C.N., Marenne G. et al.* The trans-ancestral genomic architecture of glycemic traits // *Nat. Genet.* 2021. V. 53. № 6. P. 840–860.  
<https://doi.org/10.1038/s41588-021-00852-9>
33. *Wain L.V., Vaez A., Jansen R. et al.* Novel blood pressure locus and gene discovery using genome-wide association study and expression data sets from blood and the kidney // *Hypertension.* 2017.  
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09438>
34. *Kato N., Loh M., Takeuchi F. et al.* Trans-ancestry genome-wide association study identifies 12 genetic loci influencing blood pressure and implicates a role for DNA methylation // *Nat. Genet.* 2015. V. 47. № 11. P. 1282–1293.  
<https://doi.org/10.1038/ng.3405>
35. *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>
36. *Takeuchi F., Akiyama M., Matoba N. et al.* Interethnic analyses of blood pressure loci in populations of East Asian and European descent // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 5052.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-07345-0>
37. *Tachmazidou I., Süveges D., Min J.L. et al.* Whole-genome sequencing coupled to imputation discovers genetic signals for anthropometric traits // *Am. J. Hum. Genet.* 2017. V. 100. № 6. P. 865–884.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.04.014>
38. *Liu C., Kraja A.T., Smith J.A. et al.* Meta-analysis identifies common and rare variants influencing blood pressure and overlapping with metabolic trait loci // *Nat. Genet.* 2016. V. 48. № 10. P. 1162–1170.  
<https://doi.org/10.1038/ng.3660>
39. *Surendran P., Drenos F., Young R. et al.* Trans-ancestry meta-analyses identify rare and common variants associated with blood pressure and hypertension // *Nat. Genet.* 2016. V. 48. № 10. P. 1151–1161.  
<https://doi.org/10.1038/ng.3654>
40. *Hoffmann T.J., Ehret G.B., Nandakumar P. et al.* Genome-wide association analyses using electronic health records identify new loci influencing blood pressure variation // *Nat. Genet.* 2017. V. 49. № 1. P. 54–64.  
<https://doi.org/10.1038/ng.3715>
41. *Giri A., Hellwege J.N., Keaton J.M. et al.* Trans-ethnic association study of blood pressure determinants in over 750,000 individuals // *Nat. Genet.* 2019. V. 51. № 1. P. 51–62.  
<https://doi.org/10.1038/s41588-018-0303-9>
42. *German C.A., Sinsheimer J.S., Klimentidis Y.C. et al.* Ordered multinomial regression for genetic association analysis of ordinal phenotypes at Biobank scale // *Genet. Epidemiol.* 2020. V. 44. № 3. P. 248–260.  
<https://doi.org/10.1002/gepi.22276>
43. *Wu Y., Byrne E.M., Zheng Z. et al.* Genome-wide association study of medication-use and associated disease in the UK Biobank // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 1891.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-09572-5>
44. *Sakaue S., Kanai M., Tanigawa Y. et al.* A cross-population atlas of genetic associations for 220 human phenotypes // *Nat. Genet.* 2021. V. 53. № 10. P. 1415–1424.  
<https://doi.org/10.1038/s41588-021-00931-x>
45. *Jeong H., Jin H.S., Kim S.S., Shin D.* Identifying Interactions between Dietary Sodium, Potassium, Sodium-Potassium Ratios, and FGF5 rs16998073 variants and their associated risk for hypertension in Korean Adults // *Nutrients.* 2020. V. 12. № 7. P. 2121.  
<https://doi.org/10.3390/nu12072121>
46. *Tikunova E., Ovtcharova V., Reshetnikov E. et al.* Genes of tumor necrosis factors and their receptors and the primary open angle glaucoma in the population of Central Russia // *Int. J. Ophthalmol.* 2017. V. 10. P. 1490–1494.  
<https://doi.org/10.18240/ijo.2017.10.02>
47. *Reshetnikov E., Zarudskaya O., Polonikov A. et al.* Genetic markers for inherited thrombophilia are associated with fetal growth retardation in the population of Central Russia // *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2017. V. 43. № 7. P. 1139–1144.  
<https://doi.org/10.1111/jog.13329>
48. *Starikova D., Ponomarenko I., Reshetnikov E. et al.* Novel data about association of the functionally significant polymorphisms of the MMP-9 gene with exfoliation glaucoma in the Caucasian population of Central Russia // *Ophthalmic. Res.* 2021. V. 64. № 3. P. 458–464.  
<https://doi.org/10.1159/000512507>
49. *Ward L.D., Kellis M.* HaploReg v4: Systematic mining of putative causal variants, cell types, regulators and target genes for human complex traits and disease // *Nucl. Acids Res.* 2016. V. 44. № D1. P. D877–D881.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv1340>
50. *Che R., Jack J.R., Motsinger-Reif A.A., Brown C.C.* An adaptive permutation approach for genome-wide association study: Evaluation and recommendations for use // *BioData Min.* 2014. V. 7. № 1. P. 9.  
<https://doi.org/10.1186/1756-0381-7-9>
51. *Purcell S., Neale B., Todd-Brown K. et al.* PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses // *Am. J. Hum. Genet.* 2007. V. 81. № 3. P. 559–575.  
<https://doi.org/10.1086/519795>
52. *GTE Consortium.* The GTE Consortium atlas of genetic regulatory effects across human tissues // *Science.* 2020. V. 369. № 6509. P. 1318–1330.  
<https://doi.org/10.1126/science.aaz1776>
53. *Minyaylo O., Ponomarenko I., Reshetnikov E. et al.* Functionally significant polymorphisms of the MMP-9

- gene are associated with peptic ulcer disease in the Caucasian population of Central Russia // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. № 1. P. 13515.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-92527-y>
54. Adzhubei I., Jordan D.M., Sunyaev S.R. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2 // *Curr. Protoc. Hum. Genet.* 2013.  
<https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0720s76>
55. Moskalenko M.I., Milanova S.N., Ponomarenko I.V. et al. Study of associations of polymorphism of matrix metalloproteinases genes with the development of arterial hypertension in men // *Kardiologiya.* 2019. V. 59. № 7S. P. 31–39.  
<https://doi.org/10.18087/cardio.2598>
56. Polonikov A., Rymarova L., Klyosova E. et al. Matrix metalloproteinases as target genes for gene regulatory networks driving molecular and cellular pathways related to a multistep pathogenesis of cerebrovascular disease // *J. Cell. Biochemistry.* 2019. V. 120. № 10. P. 16467–16482.  
<https://doi.org/10.1002/jcb.28815>
57. Moskalenko M., Ponomarenko I., Reshetnikov E. et al. Polymorphisms of the matrix metalloproteinase genes are associated with essential hypertension in a Caucasian population of Central Russia // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. № 1. P. 5224.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-84645-4>
58. Stelzer G., Rosen N., Plaschkes I. et al. The GeneCards suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses // *Curr. Protoc. Bioinformatics.* 2016. V. 54. P. 1.30.1–1.30.33.  
<https://doi.org/10.1002/cpbi.5>
59. McNiven M.A., Razidlo G.L. Regulation of cell migration // *Encyclopedia Cell Biology.* 2016. V. 3. P. 208–215.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394447-4.30030-X>
60. Budko A.A., Khesina P.A., Diakov L.M., Lazarevich N.L. Small GTPase Rab3B: Biological properties and possible role in carcinogenesis // *Advances Mol. Oncology.* 2018. V. 5. № 4. P. 78–85.  
<https://doi.org/10.17650/2313-805X-2018-5-4-78-85>
61. Loirand G., Scalbert E., Bril A., Pacaud P. Rho exchange factors in the cardiovascular system // *Curr. Opin. Pharmacol.* 2008. V. 8. № 2. P. 174–180.  
<https://doi.org/10.1016/j.coph.2007.12.006>
62. Li M., Jiao Q., Xin W. et al. The emerging role of Rho guanine nucleotide exchange factors in cardiovascular disorders: Insights into atherosclerosis: A mini review // *Front. Cardiovasc. Med.* 2022. V. 8. P. 782098.  
<https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.782098>
63. Hurd C.A., Brear P., Revell J. et al. Affinity maturation of the RLIP76 Ral binding domain to inform the design of stapled peptides targeting the Ral GTPases // *J. Biol. Chem.* 2021. V. 296. P. 100101.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.015735>
64. Карпушев А.В., Михайлова В.Б., Абрамочкин Д.В. Роль малых G-белков в регуляции ионных каналов // *Успехи физиол. наук.* 2020. Т. 51. № 1. С. 3–17.  
<https://doi.org/10.31857/S0301179820010063>
65. Ehrhardt G., Korherr C., Wieler J. et al. A novel potential effector of M-Ras and p21 Ras negatively regulates p21 Ras-mediated gene induction and cell growth // *Oncogene.* 2001. V. 20. № 2. P. 188–197.  
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204053>
66. Kasza A. Signal-dependent Elk-1 target genes involved in transcript processing and cell migration // *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. V. 1829. № 10. P. 1026–1033.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.05.004>

## The Polymorphic Locus rs167479 of the *RGL3* Gene Is Associated with the Risk of Severe Preeclampsia

M. Yu. Abramova<sup>a,\*</sup>, I. V. Ponomarenko<sup>a</sup>, and M. I. Churnosov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Belgorod State National Research University, Belgorod, 308015 Russia

\*e-mail: [abramova\\_myu@bsu.edu.ru](mailto:abramova_myu@bsu.edu.ru)

In this work, the associations of polymorphism of candidate genes of arterial hypertension with the development of severe preeclampsia (PE) in the population of the Central Chernozem region of Russia studied. Genotyping of five polymorphic variants (rs1799945 of the *HFE* gene, rs8068318 of the *TBX2* gene, rs1173771 of the *AC025459.1* gene, rs932764 of the *PLCE1* gene, rs167479 of the *RGL3* gene) performed in 217 women with severe PE and 235 pregnant women with moderate PE. It was revealed that the *G* allele and the *GG* genotype of the rs167479 polymorphic locus of the *RGL3* gene are associated with the risk of severe PE according to allelic (OR = 1.35,  $p_{perm} = 0.02$ ), additive (OR = 1.36,  $p_{perm} = 0.02$ ) and recessive (OR = 1.61,  $p_{perm} = 0.04$ ) genetic models. It has been established that this polymorphic locus is localized in a functionally active region of the genome that performs the functions of enhancers and promoters in various organs and tissues, is an area of hypersensitivity to DNase-1, a binding site with nine transcription regulatory factors and is associated with the expression level of the *CTC-510F12.3* gene in the pituitary gland. In addition, rs167479 identifies a missense mutation that leads to the replacement of the amino acid Pro162His in the RalGDS-like3 protein and has a predictor potential of “PROBABLY DAMAGING”.

**Keywords:** preeclampsia, polymorphic locus, *RGL3*, GWAS.

УДК 575.22:636.2

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ KASP ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ АССОЦИАЦИЙ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ВАРИАНТОВ В ГЕНАХ *GPAD4*, *CCL3*, *DGKG*, *PPARGC1A*, *STAT1*, *TLR4* С МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТЬЮ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

© 2022 г. М. В. Модоров<sup>1, 2, \*</sup>, А. А. Клещева<sup>1</sup>, К. Р. Осинцева<sup>1</sup>,  
И. В. Ткаченко<sup>1</sup>, М. Ю. Севостьянов<sup>1</sup>, Н. Н. Зезин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр  
Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, 620142 Россия

<sup>2</sup>Институт экологии растений и животных Уральского отделения  
Российской академии наук, Екатеринбург, 620144 Россия

\*e-mail: mmodorov@gmail.com

Поступила в редакцию 04.02.2022 г.

После доработки 07.04.2022 г.

Принята к публикации 12.04.2022 г.

С использованием метода KASP-генотипирования определены частоты аллелей шести однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в выборке племенного голштинизированного черно-пестрого скота Свердловской области. SNP8: g.107062990G>A гена *TLR4* (rs8193048) не проявил изменчивости в анализируемой выборке крупного рогатого скота, остальные SNP были изменчивы. Проведен ассоциативный тест между генотипами коров и удоем за 305 дней первой лактации, процентным содержанием и количеством жира и белка молока. Для SNP *CCL3* rs109686238, *DGKG* rs41608610, *PPARGC1A* rs133669403 и *STAT1* rs43705173 – ассоциации не выявлены. При проведении маркер-ориентированной селекции, направленной на увеличение молочной продуктивности голштинизированного черно-пестрого скота Свердловской обл., использовать эти локусы не рекомендуется. Для SNP27: g.36531442T>C гена *GPAD4* (rs109913786) показана ассоциация с процентным содержанием жира в молоке. Дана рекомендация по использованию этого SNP в программах маркер-ориентированной селекции уральской популяции голштинизированного черно-пестрого скота.

**Ключевые слова:** ПЦР, генотипирование, SNP, голштинская порода, молочная продуктивность.

**DOI:** 10.31857/S0016675822120086

Дикий бык (*Bos taurus* L. 1758) является одним из наиболее важных объектов животноводства, генетическим исследованиям которого уделяется много внимания. К настоящему времени расшифрован геном и получены тысячи прочтений полного генома представителей многих пород [1, 2]. Разработаны и активно используются SNP-чипы, включающие от нескольких десятков до сотен тысяч маркеров [3–5]. Для тысяч геновариантов показаны ассоциации с хозяйственно ценными признаками крупного рогатого скота [6–8].

Основной массив данных, способствующих современному прогрессу генетических исследований крупного рогатого скота, получен с использованием SNP-чипов и прочтений полного генома. В то же время существует ряд научных и прикладных задач, которые могут быть эффективно (дешевле и быстрее) решены с использованием более простых методов генетических исследований. К таким задачам можно отнести:

1. Подтверждение достоверности происхождения породы крупного рогатого скота с использованием STR-маркеров [9, 10].

2. Определение геновариантов менделирующих признаков (фенов, проявление которых определяется одним геном). В качестве примера можно привести наследственные заболевания крупного рогатого скота [11–13], одну из мутаций гена *CSN3* (однонуклеотидный полиморфизм SNP – 6: g.85656736T>C, rs43703015), ассоциированную с сыродельческими качествами молока, а также одну из мутаций в гене *CSN2* (SNP 6: g.85451132C>G, rs43703013), определяющую так называемое А2-молоко [14].

3. Поиск казуальной мутации для какого-либо признака [15, 16]. Довольно часто скрининг выборки, проведенный с использованием SNP-чипов и полногеномного секвенирования, указывает на наличие нескольких кандидатных геновариантов, ассоциированных с исследуемым признаком

[15, 17–23]. Для выбора казуальной мутации необходимо оценить распространение кандидатных генотипов в популяции и их связь с фенотипом.

4. Различного рода научные проекты, в задачи которых входит генотипирование образцов по небольшому числу маркеров [24, 25]. В эту же группу можно включить задачи, связанные с проведением маркер-ориентированной селекции по локусам, вносящим существенный вклад в проявление количественных хозяйственно ценных признаков животных.

Если есть необходимость определить генотипы небольшой по размеру выборки животных, процедура постановки и оптимизации ПЦР может являться наиболее долгим, трудоемким и непредсказуемым этапом работы. В связи с этим интерес представляют методы ПЦР, не требующие значительных ресурсозатрат на этапе постановки реакции и определения генотипов животных. В качестве подобного метода в данной работе мы рассмотрим **KASP** (competitive allele specific PCR, конкурентная аллель-специфическая ПЦР).

KASP позволяет проводить генотипирование образцов по принципу “один локус в одной лунке” (uniplex) с использованием реагентов LGC Genomics (<http://www.lgcgenomics.com>, <https://www.biotech.com/>). Состав реагентов реакции, как и последовательность уникальных праймеров для исследования целевого полиморфизма, является коммерческой тайной производителя, детекция продукта проводится по конечной точке. В качестве локусов могут быть выбраны биаллельные SNP, инсерции и делеции [26, 27]. Удобство использования KASP определяется простотой постановки реакции (необходимо смешать универсальный мастер-микс, праймеры и ДНК). Кроме этого, метод подразумевает использование единой для всех маркеров последовательности температур и времени термоциклирования. В данной работе с использованием метода KASP-генотипирования будет проанализирована связь шести SNP с молочной продуктивностью голштинизированного черно-пестрого скота Свердловской обл.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования был племенной голштинизированный черно-пестрый скот 2016–2018 гг. рождения, содержащийся в сельскохозяйственной организации, расположенной на территории Свердловской обл. Данные о продуктивности животных (удой за 305 дней первой лактации, процентном содержании и массе белка и жира в молоке) брали из ИАС “Селэкс – Молочный скот”. Размеры проанализированных выборок коров для разных маркеров составили от 91 до 182 голов.

ДНК выделяли из крови, законсервированной в ЭДТА, с использованием набора “ДНК-Экстракт-1” (“Синтол”, Россия). Концентрацию ДНК измеряли с использованием Nabi Spectrophotometer (MicroDigital, Республика Корея). В качестве генетических маркеров были выбраны шесть SNP, для которых ранее в работе E. Viale с соавт. [3] была показана ассоциация с молочной продуктивностью, либо количеством жира в молоке голштинской породы крупного рогатого скота, разводимой на территории Италии. При заполнении формы заказа реагентов использовали UCSC Genome Browser (<https://genome-euro.ucsc.edu/>), из которого брали последовательность нуклеотидов в районе расположения мутации. Названия SNP и последовательности ДНК с их локализацией приведены в табл. 1. Реагенты были изготовлены LGC Genomics (США), заказ осуществляли через официального дистрибьютора LGC Genomics в России ООО “Максим Медикал”. KASP-генотипирование проводили с использованием Applied Biosystems Real-Time PCR System 7500 согласно протоколу производителя реагентов. Для амплификации использовали 96-луночные прозрачные планшеты Kirgen (KG2561) и пленку для планшетов (KG2571). Расшифровку генотипов проводили после 42 циклов ПЦР.

Статистическую обработку данных проводили в R-project [28]. Выполняли ассоциативный тест между генотипом коров и их молочной продуктивностью, а именно: удоем за 305 дней первой лактации, процентном содержанием и массой белка и жира в молоке. При проведении ассоциативного теста использовали дисперсионный анализ (ANOVA), множественные сравнения групповых средних выполняли с использованием критерия Тьюки. При проверке статистических гипотез использовали уровень статистической значимости  $p < 0.05$ . Вводили поправку Бонферрони на множественное сравнение  $p < 0.05/6 = 0.0083$  (шесть генетических маркеров).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Частоты аллелей и генотипов шести исследуемых SNP представлены в табл. 2. SNP8: g.107062990G>A гена *TLR4* не проявил изменчивости, все проанализированные особи имели гомозиготные генотипы *GG*. Остальные пять локусов были изменчивы. Для трех SNP частоты минорных аллелей не более чем на 3% отличались от частот, отмеченных для популяции голштинской породы скота, разводимой на территории Италии [3], они составили 22% для *DGKG* rs41608610, 20% для *PPARGC1A* rs133669403 и 16% для *CCL3* rs109686238. Частота минорного аллеля *STAT1* rs43705173 в выборке уральского скота составляет 38%, что на восемь процентов больше, чем в популяции Италии. Для *GPAD4* rs109913786 обнаруженная нами

**Таблица 1.** Локализация исследуемых SNP в геноме *Bos taurus* с указанием последовательностей, используемых при заказе реагентов для KASP-генотипирования

SNP (ген)	Положение SNP*	Последовательность	Присутствие локуса на SNP-чипах**
rs109913786 ( <i>AGPAT6</i> , <i>syn. GPAD4</i> )	chr27: 36220692 36531442	AGCGGGAGCAGTAAGGCCCTGGACAACAC TCCCGAGTTTGAGCTCTCGGA[T/C]ATTTTCT ATTTCTGCCGAAAKGAATGGAGACCATCA TGGACGATGAGGT	Illumina BovineHDBead Chip
rs109686238 ( <i>CCL3</i> )	chr19: 14673538 14359777	CACACGAATAGGGCAGGCGCGATGTTGCC GGGACRGTGGCCCAAGCCTC[T/C]TTTGGAT GGAAGGAAGTGAATTAAGGAATCCCCGCA GAGGACCAGGAAG	Illumina BovineSNP50 BeadChip
rs41608610 ( <i>DGKG</i> )	chr1: 81589478 80999135	AGTATACAATAGCCACATGTGGCTAATGGC TAAGTCACTTTGGCAACTTA[C/T]GGAGATA AAAAACAGAAAGGAGACAGTAAGACAGA TTATTTGGTATTTG	Illumina BovineHDBead Chip, Illumina BovineSNP50 BeadChip
rs133669403 ( <i>PPARGCIA</i> )	chr6: 44875315 43401661	ATTACCTGGGCCCGCCGGCTATGGGGCGATC TTGAACGTGACGCRCACAGG[A/G]GCGAATT TCGGTGTGTGCGGTGTCTGCAGTGGCCTGA CTCATAGTAGTAG	
rs43705173 ( <i>STAT1</i> )	chr2: 79888611 79518124	GCTTTATGATGCTGGCTAATATCAATAGAA GGAAGTAACTTTACAAATT[C/T]ATGAGTA GTATCTTCCATTTCCAGCTTTAATACCAAAGT TGAATATATTCTG	
rs8193048 ( <i>TLR4</i> )	chr8: 108834063 107062990	CGATCATCAGTGTGTGCGGTGGTCACTGTGC TCCTGGTGTCTGTGGTAGGR[G/A]TCCTAGT CTACAAGTTCTATTTCCACCTGATGCTTCTT GCTGGCTGCAA	

Примечание. \* – сверху позиция в сборке генома *Bos taurus*\_UMD\_3.1.1/bosTau8 (<https://genome-euro.ucsc.edu/>), внизу – позиция в сборке генома ARS-UCD1.2 (106 annotation release, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), \*\* – данные взяты с сайта <https://www.ensembl.org/>.

частота минорного аллеля составляет 36%, что на 17% больше, чем в выборке итальянских голштинов. Во всех случаях наблюдаемые частоты генотипов статистически значимо не отличались от частот, соответствующих равновесию Харди–Вайнберга ( $p < 0.05$ ).

Ассоциативный тест выявил связь генотипов SNP27: g.36531442T>C гена *GPAD4* с процентным содержанием жира в молоке коров за первую лактацию ( $p < 0.00029$ ). Особи с генотипом *CC* статистически значимо превосходили особей с генотипом *TC* ( $p = 0.0018$ ) и особей с генотипом *TT* ( $p = 0.0031$ ), рис. 1. Особи с генотипом *CC* имели средний процент жира в молоке – 3.87%, особи с генотипом *TC* – 3.73%, с генотипом *TT* – 3.69%. Ассоциаций других генотипов с молочной продуктивностью коров выявлено не было.

Минимальное достаточное количество ДНК для корректного определения генотипа составило не менее 50 нг/реакцию.

## ОБСУЖДЕНИЕ

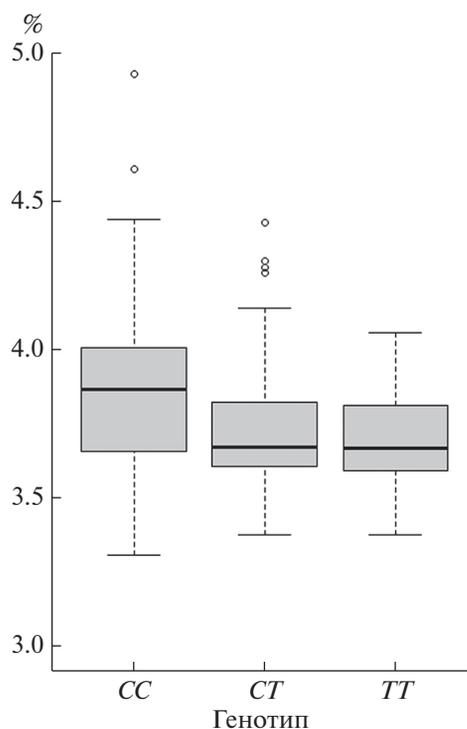
Во многих исследованиях полногеномного поиска ассоциаций (GWAS) было показано, что в районе локализации гена *GPAD4* находится локус количественного признака (QTL), связанного с процентным содержанием жира молока. Связь различных геновариантов *GPAD4* с процентным содержанием жира в молоке была показана для нескольких пород крупного рогатого скота [2, 3, 29–31].

Исследуемый нами SNP27: g.36531442T>C гена *GPAD4* (rs109913786) локализован в третьем из 12 экзонов, мутация является синонимичной. Ранее ассоциативный тест для данного локуса был проведен только в двух работах. Для швейцарской породы коров ассоциация геновариантов rs109913786 с молочной продуктивностью обнаружена не была [32], тогда как для скота голштинской породы, разводимой на территории Италии, локус был ассоциирован как с процентным содержанием, так и с количеством жира в молоке [3]. Согласно результатам

**Таблица 2.** Частота встречаемости аллелей и генотипов в выборке голштинизированного черно-пестрого скота Свердловской обл.

SNP (ген)	<i>N</i>	Генотип	Частота генотипа, %	Частота аллеля, %	
rs109913786 ( <i>AGPAT6</i> , <i>syn.</i> <i>GPAD4</i> )	180	<i>TT</i>	15.0	<i>T</i>	36.1
		<i>TC</i>	42.2	<i>C</i>	63.9
		<i>CC</i>	42.8		
rs109686238 ( <i>CCL3</i> )	182	<i>AA</i>	72.8	<i>A</i>	84.3
		<i>AG</i>	23.9	<i>G</i>	15.7
		<i>GG</i>	3.3		
rs41608610 ( <i>DGKG</i> )	171	<i>AA</i>	61.4	<i>A</i>	77.8
		<i>AG</i>	32.8	<i>G</i>	22.2
		<i>GG</i>	5.8		
rs133669403 ( <i>PPARGCIA</i> )	89	<i>GG</i>	64	<i>G</i>	80.3
		<i>GA</i>	32.6	<i>A</i>	19.7
		<i>AA</i>	3.4		
rs43705173 ( <i>STAT1</i> )	92	<i>GG</i>	35.9	<i>G</i>	62.5
		<i>GA</i>	53.2	<i>A</i>	37.5
		<i>AA</i>	10.9		
rs8193048 ( <i>TLR4</i> )	91	<i>GG</i>	100	<i>G</i>	100
		<i>GA</i>	0	<i>A</i>	0
		<i>AA</i>	0		

Примечание. *N* – число проанализированных особей.



**Рис. 1.** Жирность молока у коров с разными генотипами по замене 27: g.36531442T>C (rs109913786) в гене *GPAD4*.

нашего исследования, геновариант CCSNP27: g.36531442T>C гена *GPAD4* ассоциирован с высоким процентным содержанием жира в молоке голштинизированного черно-пестрого скота Свердловской обл.

Таким образом, метод KASP-генотипирования показал свою эффективность при проведении популяционно-генетических исследований крупного рогатого скота. Метод позволил расшифровать генотипы животных для всех SNP, попавших в сферу наших интересов, при этом затраты времени на дизайн реагентов и отработку протоколов амплификации были минимальными. SNP *GPAD4* rs109913786 можно рекомендовать для использования в программах маркер-ориентированной селекции уральской популяции голштинизированного черно-пестрого скота. Для пяти SNP, а именно: *DGKG* rs41608610, *PPARGCIA* rs133669403, *CCL3* rs109686238, *STAT1* rs43705173, *TLR4* rs8193048, ассоциации с удоем, процентным содержанием жира и белка в молоке в выборке голштинизированного черно-пестрого скота обнаружены не были. При проведении маркер-ориентированной селекции, направленной на увеличение молочной продуктивности голштинизированного черно-пестрого скота Свердловской обл., использовать эти локусы не рекомендуется.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-016-00239.

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. *Elsik C.G., Tellam R.L., Worley K.C.* The genome sequence of taurine cattle: A window to ruminant biology and evolution // *Science*. 2009. V. 324. № 5926. P. 522–528. <https://doi.org/10.1126/science.1169588>
2. *Hayes B.J., Daetwyler H.D.* 1000 bull genomes project to map simple and complex genetic traits in cattle: Applications and outcomes // *Ann. Rev. Animal Biosciences*. 2019. V. 7. P. 89–102. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-020518-115024>
3. *Viale E., Tiezzi F., Maretto F. et al.* Association of candidate gene polymorphisms with milk technological traits, yield, composition, and somatic cell score in Italian Holstein-Friesian sires // *J. Dairy Sci.* 2017. V. 100. № 9. P. 7271–7281. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12666>
4. *Neumann G.B., Korcuć P., Arends D. et al.* Design and performance of a bovine 200k SNP chip developed for endangered German Black Pied cattle (DSN) // *BMC Genomics*. 2021. V. 22. Article number 905. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-08237-2>
5. *Zaalberg R.M., Poulsen N.A., Bovenhuis H. et al.* Genetic analysis on infrared-predicted milk minerals for Danish dairy cattle // *J. Dairy Sci.* 2021. V. 104. № 8. P. 8947–8958. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19638>
6. *Jiang J., Ma L., Prakapenka D. et al.* A large-scale genome-wide association study in US Holstein cattle // *Frontiers in Genet.* 2019. V. 10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00412>
7. *Liu L., Zhou J., Chen C.J. et al.* GWAS – based identification of new loci for milk yield, fat, and protein in Holstein cattle // *Animals*. 2020. V. 10. № 11. <https://doi.org/10.3390/ani10112048>
8. *Hoze C., Escoufflaire C., Fritz S., Capitan A.* A splice site mutation in *CENPU* is associated with recessive embryonic lethality in Holstein cattle // *J. of Dairy Sci.* 2020. V. 103. № 1. P. 607–612. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17056>
9. *Модоров М.В., Ткаченко И.В., Грин А.А. и др.* Генетическая структура популяции голштинизированного черно-пестрого скота на территории Урала // *Генетика*. 2021. Т. 57. № 4. С. 437–444. <https://doi.org/10.31857/S001667582104010X>
10. *Модоров М.В., Ткаченко И.В., Грин А.А.* Индивидуальная идентификация особей и контроль родословной в популяции голштинизированного черно-пестрого скота Урала // *Вопр. нормативно-правового регулирования в ветеринарии*. 2019. № 4. С. 119–121. <https://doi.org/10.17238/issn2072-6023.2019.4.119>
11. *Khan M.Y.A., Omar A.I., He Y. et al.* Prevalence of nine genetic defects in Chinese Holstein cattle // *Veter. Med. and Sci.* 2021. V. 7. № 5. P. 1728–1735. <https://doi.org/10.1002/vms3.525>
12. *Zhang Y., Liang D., Huang H. et al.* Development and application of KASP assays for rapid screening of 8 genetic defects in Holstein cattle // *J. Dairy Sci.* 2020. V. 103. № 1. P. 619–624. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16345>
13. *Модоров М.В., Мартынов Н.А., Шкуратова И.А. и др.* Распространение рецессивных генетических нарушений в уральской популяции крупного рогатого скота // *Генетика*. 2022. Т. 58. № 4. С. 429–437. <https://doi.org/10.31857/S0016675822040105>
14. *Caroli A.M., Chessa S., Erhardt G.J.* Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition // *J. Dairy Sci.* 2009. V. 92. № 11. P. 5335–5352. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2461>
15. *Lehner S., Zerbin I., Doll K. et al.* A genome-wide association study for left-sided displacement of the abomasum using a high-density single nucleotide polymorphism array // *J. Dairy Sci.* 2018. V. 101. № 2. P. 1258–1266. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13216>
16. *Sieck R.L., Fuller A.M., Bedwell P.S. et al.* Mandibulofacial dysostosis attributed to a recessive mutation of *CYP26C1* in Hereford cattle // *Genes*. 2020. V. 11. № 11. <https://doi.org/10.3390/genes11111246>
17. *Adams H.A., Sonstegard T.S., VanRaden P.M. et al.* Identification of a nonsense mutation in *APAF1* that is likely causal for a decrease in reproductive efficiency in Holstein dairy cattle // *J. Dairy Sci.* 2016. V. 99. № 8. P. 6693–6701. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10517>
18. *Kunz E., Rothammer S., Pausch H. et al.* Confirmation of a non-synonymous SNP in *PNPLA8* as a candidate causal mutation for Weaver syndrome in Brown Swiss cattle // *Genet. Select. Evol.* 2016. V. 48. Article number 21. <https://doi.org/10.1186/s12711-016-0201-5>
19. *Pausch H., Schwarzenbacher H., Burgstaller J. et al.* Homozygous haplotype deficiency reveals deleterious mutations compromising reproductive and rearing success in cattle // *BMC Genomics*. 2015. V. 16. Article number 312. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1483-7>
20. *Rothammer S., Kunz E., Seichter D. et al.* Detection of two non-synonymous SNPs in *SLC45A2* on BTA20 as candidate causal mutations for oculocutaneous albinism in Braunvieh cattle // *Genet. Select. Evol.* 2017. V. 49. Article number 73. <https://doi.org/10.1186/s12711-017-0349-7>
21. *Schwarzenbacher H., Burgstaller J., Seefried F.R. et al.* A missense mutation in *TUBD1* is associated with high juvenile mortality in Braunvieh and Fleckvieh cattle // *BMC Genomics*. 2016. V. 17. Article number 400. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2742-y>
22. *Schwarzenbacher H., Wurmser C., Flisikowski K. et al.* A frameshift mutation in *GON4L* is associated with proportionate dwarfism in Fleckvieh cattle // *Genet. Se-*

- lect. *Evol.* 2016. V. 48. Article number 25. <https://doi.org/10.1186/s12711-016-0207-z>
23. Venhoranta H., Pausch H., Flisikowski K. et al. In frame exon skipping in *UBE3B* is associated with developmental disorders and increased mortality in cattle // *BMC Genomics*. 2014. V. 15. 890. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-890>
  24. Neary M.T., Breckenridge R.A., Neary J.M. et al. A comparison of DNA collection methods in cattle and yaks // *J. Anim. Sci.* 2014. V. 92. № 9. P. 3811–3815. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-7445>
  25. Pareek C.S., Błaszczuk P., Dziuba P. et al. Single nucleotide polymorphism discovery in bovine liver using RNA-seq technology // *PLoS One*. 2017. V. 12. № 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172687>
  26. Semagn K., Babu R., Hearne S., Olsen M. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): Overview of the technology and its application in crop improvement // *Mol. Breeding*. 2014. V. 33. № 1. P. 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11032-013-9917-x>
  27. Rasheed A., Wen W., Gao F. et al. Development and validation of KASP assays for genes underpinning key economic traits in bread wheat // *Theor. Appl. Genet.* 2016. V. 129. № 10. P. 1843–1860. <https://doi.org/10.1007/s00122-016-2743-x>
  28. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2020. <https://www.R-project.org>
  29. Littlejohn M.D., Tiplady K., Lopdell T. et al. Expression variants of the lipogenic *AGPAT6* gene affect diverse milk composition phenotypes in *Bos taurus* // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 1. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085757>
  30. Bouwman A.C., Bovenhuis H., Visser M.H.P.W., van Arendonk J.A.M. Genome-wide association of milk fatty acids in Dutch dairy cattle // *BMC Genetics*. 2011. V. 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-12-43>
  31. Wang X., Wurmser C., Pausch H. et al. Identification and dissection of four major QTL affecting milk fat content in the German Holstein-Friesian population // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040711>
  32. Cecchinato A., Ribeca C., Chessa S. et al. Candidate gene association analysis for milk yield, composition, urea nitrogen and somatic cell scores in Brown Swiss cows // *Animal*. 2014. V. 8. № 7. P. 1062–1070. <https://doi.org/10.1017/S1751731114001098>

## KASP Technology Use to Study Associations of Single Nucleotide Polymorphism in *GPAD4*, *CCL3*, *DGKG*, *PPARGC1A*, *STAT1*, *TLR4* Genes with Cattle Milk Production

M. V. Modorov<sup>a, b, \*</sup>, A. A. Kleshcheva<sup>a</sup>, K. R. Osintseva<sup>a</sup>,  
I. V. Tkachenko<sup>a</sup>, M. Yu. Sevost'yanov<sup>a</sup>, and N. N. Zezin<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ural Federal Agrarian Scientific Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, 620142 Russia

<sup>b</sup>Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, 620144 Russia

\*e-mail: mmodorov@gmail.com

The allele frequencies of six single-nucleotide polymorphisms in a sample of Holstein Black Pied cattle of the Sverdlovsk oblast were determined using the KASP-genotyping method. The minimum sufficient amount of DNA for a correct genotype determination is at least 50 ng per reaction when DNA was isolated from the blood of animals. Locus 8: g.107062990G>A of the *TLR4* gene (rs8193048) showed no variability, other loci were variable. An association test was performed between cow genotypes, as well as milk yield in 305 days of the first lactation, percentage and amount of milk fat and protein. The associations doesn't found for rs109686238, rs41608610, rs133669403, rs43705173, rs8193048 loci. Significant SNP trait associations were observed for polymorphisms located in *AGPAT6* genes (locus 27: g.36531442T>C, rs109913786) for fat yield.

**Keywords:** PCR, genotyping, SNP, Holstein, milk yield, milk composition.