

СОДЕРЖАНИЕ

Том 58, номер 1, 2022

Обзорные и теоретические статьи

Эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов у бактерий рода *Bacillus*

Н. Г. Васильченко, Е. В. Празднова, Е. И. Левитин

5

Перспектива внедрения аллеля *Ppd-D1a* в сорта яровой мягкой пшеницы в России

С. Б. Лепехов

27

Генетика растений

Генетическое разнообразие четырех видов рода *Astragalus* L. секции *Cenantrum* Bunge (Fabaceae) в азиатской части России по данным изменчивости *trnL-trnF* хлоропластной ДНК и изоферментных маркеров

О. С. Корчагина, Д. А. Кривенко, А. Ю. Беляев

35

Генетика животных

Динамика генетической структуры популяций медоносной пчелы *Apis mellifera* на Южном Урале

М. Д. Каскинова, Л. Р. Гайфуллина, Е. С. Салтыкова, А. В. Поскряков, А. Г. Николенко

45

Генетика человека

Полиморфизм митохондриальной ДНК и шести генов ядерного генома в популяции амурских эвенков

М. А. Губина, В. Н. Бабенко, В. А. Бацевич, Н. А. Лейбова, А. П. Забияко

52

Распространенность полиморфных вариантов гена *ABCB1* среди коренных популяций Сибири

*Т. А. Баирова, Н. В. Немчинова, Е. В. Беляева,
А. Ю. Самбялова, О. А. Ершова, Л. В. Рычкова*

68

Общие и специфические генетические факторы риска развития трех расстройств с депрессивной симптоматикой

*Е. И. Рафикова, Д. В. Шибалёв, М. И. Шадрина, П. А. Сломинский,
А. Б. Гехт, А. П. Рысков, В. А. Васильев*

76

Длина теломер и базовый уровень цитогенетических повреждений в лейкоцитах больных раком легкого

*В. Г. Дружинин, Е. Д. Баранова, В. П. Волобаев, В. И. Иванов,
А. В. Ларионов, В. И. Минина, Ф. Смагулова,
Л. Легофф, В. А. Титов, А. Фучич*

86

Математические модели и методы

Эволюция хищника в модели взаимодействующих видов:
к вопросу о существовании полиморфизма по размеру
помета в естественных популяциях песцов

О. Л. Жданова, Г. П. Неверова, Е. Я. Фрисман

99

Краткие сообщения

Маркеры хлоропластной ДНК для идентификации близкородственных
редких видов рододендронов Восточной Азии

М. А. Полежаева, Д. Р. Юнусова, Н. А. Тихонова, А. Н. Полежаев, М. Н. Колдаева

116

Contents

Vol. 58, No. 1, 2022

Reviews and Theoretical Articles

- Epigenetic Mechanisms of Gene Expression Regulation in Bacteria of the Genus *Bacillus*
N. G. Vasilchenko, E. V. Prazdnova, and E. Lewitin 5
- Prospect for Incorporation of *Ppd-D1a* Allele in Russian Spring Bread Wheat Cultivars
S. B. Lepekhov 27
-

Plant Genetics

- Genetic Diversity of Four Species of the Genus *Astragalus* L. Section *Cenantrum* Bunge (Fabaceae) in the Asian Part of Russia according to the Data of *trnL-trnF* Chloroplast DNA Variability and Isoenzyme Markers
O. S. Korchagina, D. A. Krivenko, and A. Yu. Belyaev 35
-

Animal Genetics

- Dynamics of the Genetic Structure of *Apis mellifera* Populations in the Southern Urals
M. D. Kaskinova, L. R. Gaifullina, E. S. Saltykova, A. V. Poskryakov, and A. G. Nikolenko 45
-

Human Genetics

- Polymorphism of Mitochondrial DNA and Six Nuclear Genes in the Amur Evenk Population
M. A. Gubina, V. N. Babenko, V. A. Batsevich, N. A. Leibova, and A. P. Zabiako 52
- The Prevalence of Polymorphic Variants of *ABCB1* Gene among Indigenous Populations of Siberia
T. A. Bairova, N. V. Nemchinova, E. V. Belyaeva, A. Yu. Sambyalova, O. A. Ershova, and L. V. Rychkova 68
- Common and Specific Genetic Risk Factors for Three Disorders with Depressive Symptoms
E. I. Rafikova, D. V. Shibalev, M. I. Shadrina, P. A. Slominsky, A. B. Guekht, A. P. Ryskov, and V. A. Vasilyev 76
- Telomere Length and Baseline Length and Baseline Cytogenetic Damage in Lung Cancer Patients
V. G. Druzhinin, E. D. Baranova, V. P. Volobaev, V. I. Ivanov, A. V. Larionov, V. I. Minina, F. Smagulova, L. Legoff, V. A. Titov, and A. Fucic 86
-

Mathematical Models and Methods

- Predator Evolution in a Model of Interacting Species: To the Question about Maintaining Polymorphism by Litter Size in Natural Populations of Arctic Fox
O. L. Zhdanova, G. P. Neverova, and E. Ya. Frisman 99
-

Short Communications

Genetic Identification of Closely Related Endangered *Rhododendron* Species from East Asia

M. A. Polezhaeva, D. R. Iunusova, N. A. Tikhonova, A. N. Polezhaev, and M. N. Koldaeva

116

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ У БАКТЕРИЙ РОДА *Bacillus*

© 2022 г. Н. Г. Васильченко¹, *, Е. В. Празднова¹, Е. И. Левитин²

¹Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии
им. Д.И. Иванковского, Ростов-на-Дону, 344058 Россия

²Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов
Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”, Москва, 117545 Россия

*e-mail: nvasilchenko@sfedu.ru

Поступила в редакцию 28.08.2020 г.

После доработки 28.06.2021 г.

Принята к публикации 08.07.2021 г.

Бурное развитие молекулярно-генетических технологий позволило детально проанализировать явления, которые можно отнести к эпигенетическим – фенотипические переключения в культурах бактериальных клеток. Изменения фенотипа на фоне неизменного генома могут быть временной реакцией на внешние факторы и исчезать со сменой условий или могут быть обусловлены клеточной дифференциацией, поддерживаются независимо от внешних факторов. В литературе используется чрезвычайно неоднородная терминология с синонимичными терминами для таких явлений в зависимости от их особенностей (бистабильность, специализация, гистерезис, фазовая вариация, диссоциация). Одной из целей данного обзора является систематизация применяемой терминологии. В качестве объекта анализа выбраны представители рода *Bacillus*, поскольку у них выявлено значительное число эпигенетических феноменов. Кроме того, бистабильность является важным фактором, влияющим на эффективность использования бактерий рода *Bacillus* в биотехнологических процессах. Настоящая работа дает краткий обзор эпигенетических переключений в роде *Bacillus*, их механизмов, способов обнаружения и исследования, их возможную эволюционную и экологическую роль, а также практическое применение.

Ключевые слова: *Bacillus*, механизмы эпигенетической наследственности, клеточная дифференцировка, кооперативное поведение бактерий, чувство кворума, сигнальная сеть, бистабильность.

DOI: 10.31857/S001667582201012X

Для подавляющего большинства бактерий характерен феномен “бистабильности”, т.е. существования параллельных морфологически и физиологически различных линий клеток в культуре, полученной из одного клона. Например, типичным случаем бистабильности является параллельное существование в клональной популяции линий неподвижных клеток, формирующих биопленку, и свободноплавающих клеток бактерий [1]. Разнообразие внутри клональных клеточных линий может как определяться генетическими изменениями, так и проявляться без изменений геномных последовательностей. Эти проявления иногда достаточно сложно различить. Как правило, генетически обусловленные изменения практически необратимы и стабильно наследуются, в то время как признаки, не связанные с изменениями последовательности ДНК, легко переключаются. Тем не менее существуют геномные изменения, предопределяющие обратимые и квазиобратимые переключения фенотипа с высокой частотой 10^{-5} – 10^{-2} на

поколение – рекомбинация транспозонов, изменение копийности плазмид и основной хромосомы [2], появление реверсивных и супрессорных мутаций [3]. Проявления фенотипической изменчивости могут быть как кратковременными, так и могут наследоваться с частотой переключений менее 10^{-6} на поколение. Переключения эпигенетических состояний могут быть стохастическими и независимыми для каждой отдельной клетки или кооперативными, запускающими единый для всех клеток популяции сценарий, имитируя поведение тканей многоклеточного организма [4]. До 2000 г. комплексное изучение переключаемых состояний бактериальной клетки представляло собой почти неразрешимую проблему. Но за последние десять лет произошел качественный рывок, связанный с накоплением данных и появлением новых методов исследований. Это делает вполне доступным анализ механизма и проявлений почти любого случая фенотипической бистабильности. Обзор механизмов, феноменологии и роли эпиге-

нетического переключения бистабильных состояний в роде *Bacillus* интересен как с точки зрения значения этой группы в природе и биотехнологии, так и потому, что бациллы оказались одним из самых важных модельных объектов изучения регуляции этих процессов.

ИСТОРИЯ ИЗУЧЕНИЯ

Понятие эпигенетического или фенотипического наследования получает смысл с того момента, как Нагели сформулировал в 1860 г. идею о разделении материала живого организма на “сому” (тело организма) и “идиоплазму” (генетический материал), а Шванн в 1865 г. сформулировал представление о линиях клеток с наследуемым дифференцированным состоянием [5], хотя сам термин “эпигенетика” был введен взамен размытого понятия “эпигенез” лишь в 1944 г. [6]. Дифференцированные клетки бактерий были описаны еще до того, как исследуемые организмы были охарактеризованы как бактерии. Так, Кютцинг в 1843 г. описал гетероцисты цианобактерий (“водорослей”) [7], а Беркли в 1874 г. дал описание дифференциации спор и вегетативных клеток миксобактерии *Chondromyces crocatus*, которую он ошибочно считал миксомицетом [8]. Первым сообщением о наблюдаемом процессе дифференциации клетки бацилл стали статьи Коха и Кона о формировании эндоспор бациллами в 1874 г. [9]. Хотя с момента получения бактериальных чистых культур Пастером и Кохом была очевидна их морфологическая и физиологическая гетерогенность, воспроизводящаяся в течение нескольких поколений, никаких средств анализа для понимания механизмов переключения и наследования таких структур не было.

С момента появления генетики как науки и построения генетических карт стало возможным разделение признаков, наследуемых через генетический аппарат и помимо него [10]. К началу 80-х гг. для линий клеток животных, растений, а также для модельных эукариотических микроорганизмов помимо наблюдения многочисленных случаев фенотипического наследования были описаны конкретные механизмы: метилирование ДНК, сайленсинг, реструктуризация хроматина и посттрансляционная модификация гистонов [10]. Особые эпигенетические механизмы, впоследствии идентифицированные как “прионы”, наследуемые белковые конформации, были обнаружены у аскомицетов: *HetS* у *Podospora anserina* в 1952 г. [11] и *Psi+* у *S. cerevisiae* в 1965 г. [12].

В то же время эпигенетические механизмы бактерий практически не изучались. Тем не менее некоторые ярко выраженные эпигенетические явления у прокариот открыты достаточно давно: в 1935 г. были исследованы L-формы бактерий [13], в 1940-х гг. — открыты клетки-перси-

стеры (persister cells) [14], наблюдаемые у многих бактерий (в том числе бацилл).

Бактерии долгое время рассматривались как организмы, существующие в клональных популяциях генетически идентичных клеток, с фенотипами, отражающими их генетическое строение. При этом считалось, что эпигенетические механизмы у бактерий либо представлены очень слабо, либо отсутствуют вовсе. О данной точке зрения может косвенно свидетельствовать число публикаций в PubMed [15], относящихся к изучению эпигенетических механизмов у эукариот и у бактерий. За период с 1958 г. по 2021 г. статей, в которых были изучены и описаны эпигенетические механизмы у эукариот, было опубликовано в 55 раз больше в сравнении с аналогичной тематикой в отношении бактерий (из 1589 статей по эпигенетике бактерий лишь 107 относятся к изучению данного вопроса у бактерий рода *Bacillus* [15]). Стоит также отметить тот факт, что большая часть статей, касающихся изучения эпигенетических механизмов у бактерий, была опубликована в течение двух последних десятилетий, что свидетельствует о росте интереса в мировой науке к исследованиям в данной области.

Многие состояния клетки, известные длительное время, такие как компетентность *B. subtilis*, обнаруженная в 1961 г. [16], а также коллективные переключения поведения с образованием структур разнообразного строения, не рассматривались как эпигенетически запрограммированные. Поэтому, несмотря на широкое наблюдение эпигенетического разнообразия среди бактерий рода *Bacillus*, играющих важную роль в природе и технологиях, а также используемых как модельный объект во многих исследованиях, почти все работы, касающиеся эпигенетической бистабильности бацилл, сделаны лишь после 2000 г.

ИСПОЛЬЗУЕМАЯ ТЕРМИНОЛОГИЯ

Смысл термина “эпигенетика” с момента его введения в 1942 г. сильно изменился и трактуется разными исследователями очень по-разному [17]. Наиболее общее определение можно сформулировать так: “самоподдерживающееся состояние клетки, не преддетерминированное генетически”. То есть существует возможность альтернативных состояний и их переключения.

В целом понятие “эпигенетическая регуляция” можно определить как надгенетические изменения в паттернах экспрессии генов, которые сохраняются в поколениях. Эпигенетические механизмы эукариот включают такие процессы как метилирование ДНК, модификации гистонов, сайленсинг, связанный с РНК (РНК-интерференция). Эти и другие механизмы контролируют и изменяют паттерн экспрессии генов. Показана

роль эпигенетических механизмов в эмбриогенезе эукариот, клеточной дифференцировке, геномном импринтинге и влияние на онкологические заболевания, которые возникают из-за неправильной экспрессии или “молчания” различных генов [18, 19].

Существует широкое разнообразие терминов, характеризующих эпигенетические явления. Здесь приведены основные варианты терминологии, применяемые в отношении бактерий.

1. “*Эпигенетика*” в наиболее широком смысле – любые изменения клеточной морфологии или физиологии, непосредственно не связанные с геномом. Особенно широко термин “эпигенетика” в этом значении используется для обозначения ковалентных модификаций ДНК, воспроизводящихся в пострепликационном цикле. У эубактерий из ковалентных модификаций ДНК встречается лишь метилирование. Поэтому термин “эпигеном” в настоящее время используется как синоним термина “метилом”, т.е. паттерн распределения метилированных нуклеотидов по всей клеточной ДНК. Следует специально отметить, что такое использование термина “эпигенетика” и “эпигеном” может не подразумевать наличия переключаемых состояний. В отношении единообразно воспроизводимой надгенетической структуры уместно употребить термин “конститутивная эпигенетика”.

2. “*Состояние гомеостаза*”, “*гистерезис*”, “*бистабильность*”. Клетка представляется как сложная динамическая система с множеством различных состояний. Некоторые из них являются более вероятными или метастабильными и имеют тенденцию поддерживаться в течение нескольких генераций клеток.

3. *Сегрегация, диссоциация, расщепление культуры*. Феноменологическое описание клональной культуры, в которой возникают клетки с измененной морфологией или культуральными свойствами, которые более-менее устойчиво наследуют эти свойства.

4. *Специализация, дифференциация, дифференцировка*. Развитие клетки по пути, отличному от программы материнских клеток. Такие клетки могут продолжить деление в измененном состоянии (эпигенетическое наследование); это состояние может быть терминальным – тогда клетка теряет способность к дальнейшему делению и гибнет (как, к примеру, гетероцисты цианобактерий или материнская клетка при споруляции бацилл); либо при дальнейшем делении происходит дедифференцировка клетки (например, состояние компетентной клетки или споры не передается потомкам).

5. *Фазовые состояния, фазовые варианты, фазе-варианты*. Возникновение в клональной культуре множественных линий с отличающимся паттерном экспрессии генов. Как правило, наследование неустойчиво и продолжается лишь в ограниченном

числе делений. При пересеве, споруляции, шоковых воздействиях на культуру происходит переадресация эпигенетического статуса.

Перечисленные термины в исследованиях, связанных с эпигенетикой, используются часто как синонимы, а также существует значительное количество терминов, изобретенных *ad hoc*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Традиционные методы исследования

В традиционной микробиологической практике клоны с возникшим *de novo* эпигенетическим состоянием часто выявлялись по измененной морфологии колоний (расплывающаяся–нерасплывающаяся, сухая–слизистая, окрашенная–неокрашенная, расползающаяся, формирующая пленку и т.п.), появившихся при расसेве культуры. Часто клоны с измененной морфологией и измененными биохимическими и физиологическими свойствами обнаруживались при стрессовых воздействиях или отбирались в селективных условиях. При обнаружении клонов с измененными культуральными свойствами их подвергали неоднократным пассажам и рассевам, в некотором диапазоне условий, с целью определить стабильность наследуемости измененного приобретенного признака. Клоны, устойчиво сохранявшие приобретенный признак, рассматривались как несущие мутацию, а показывавшие некоторый уровень возврата к исходным свойствам представляли собой кандидатов для выявления фенотипического наследования. Клоны с высокой частотой реверсий, вызванной геномными событиями (перестройками, появлением супрессорных мутаций), можно было выявить при помощи генетического анализа (рекомбинации с клонами дикого типа, секвенированием подозрительных участков, слиянием протопластов). Невозможность выявить геномный характер наследственных изменений была косвенным указанием на эпигенетическую природу явления [20]. Поэтому до полного изучения деталей механики поддержания эпигенетического состояния само его существование оставалось гипотетическим. Наиболее надежным показателем наличия эпигенетического механизма, связанного с конкретной структурой, считается эксперимент, в котором какой-либо маркер-репортер оказывается под контролем данного механизма при его искусственном соединении с данной структурой (например, ген-репортер, поставленный под контроль промотора, подверженного эпигенетической регуляции, проявляет паттерн экспрессии, сопутствующий соответствующему эпигенетическому переключению). Тем не менее такой подход совершенно неприменим к переключениям, зависящим от коллективного поведения бактерий и поддержания структуры пространственной организации популяции. Большая

часть исследований, касающаяся группового, кратковременного, многофакторного, малозаметного фенотипически эпигенетического наследования, требует иного подхода.

Новые методы

За последние двадцать лет появилось множество технических и аналитических подходов, применяемых для эффективного анализа эпигенетики бактерий, здесь перечислены наиболее часто используемые.

1. Секвенирование полного генома клона, несущего измененные, предположительно наследуемые характеристики, что позволяет отсеять или подтвердить предположение о возможной мутации [21].

2. Бисульфитное, нанопоровое, SMRT и другое секвенирование, а также родственные методы дают возможность создать полную карту метилома (к настоящему моменту имеется более 2000 полных метиломов) и сопоставить соответствие различий метилированных и деметилированных участков измененным физиологическим характеристикам клона [22].

3. Проточная цитометрия позволяет точно посчитать в культуре количество клеток с измененными физиологическими характеристиками, благодаря чему становится возможным анализ неустойчивых состояний, при которых переключение происходит с высокой частотой — один раз в несколько поколений [23, 24].

4. Микрофлюидный анализ линии потомков индивидуальных клеток позволяет проследить кратковременные эпизоды неустойчивого наследования фенотипов и количественную характеристику частот переключений [25].

5. К настоящему моменту имеются базы данных протеомов, транскриптомов, метиломов и интерактомов многих видов, поэтому обнаружение в клетке изучаемого организма элементов, аналогичных найденным в близких таксонах и связанных с эпигенетическим наследованием, также предполагает наличие эпигенетического переключения [26].

6. Многие эпигенетические состояния наблюдаются в клетках, составляющих часть пространственной структуры бактериального сообщества, биопленки, агрегата или цепочки клеток. В настоящее время существует возможность непосредственного анализа состояния клетки и автоматизированного отслеживания ее судьбы в составе такой структуры при помощи новых микроскопических систем визуализации [27].

Большинство исследований бистабильности были выполнены на стандартном лабораторном штамме *B. subtilis* 168. Тем не менее, как оказалось, он может служить лишь ориентировочной моделью, поскольку, как было показано во мно-

гих работах, он в результате мутагенеза при доместикации утратил многие гены, участвующие в формировании пространственных многоклеточных структур, организации коллективного поведения и регуляторов цикла развития. Среди утраченных компонентов несколько генов системы межклеточной сигнализации Rap (например, *rapP*), сигма-субъединицы (например, σ^N), регуляторные элементы, обеспечивавшие тонкую регуляцию уровня фосфорилирования одного из центральных клеточных регуляторов — транскрипционного фактора DegU [28–30]. В настоящее время исследования ведутся также с другими штаммами *B. subtilis*, близкими к природным изолятам, и другими видами данного рода [30].

ИЗУЧЕННЫЕ И ГИПОТЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ СПЕЦИАЛИЗАЦИИ

Бистабильность в теории динамических систем, частным случаем которой являются модели живых организмов, рассматривается как два типа переключателей: переключатели типа кнопки (push-button) и переключатели типа реле (switch, trigger). Переключатели типа кнопки действуют лишь пока фактор, вызвавший переключение “индуктор”, продолжает присутствовать в системе, а с его уходом система возвращается в исходное состояние. Переключатели второго типа — “реле”, будучи переключенные индуктором остаются в новом состоянии независимо от наличия индуктора. В клетке и сообществе клеток есть множество переключателей как первого, так и второго вида. Переключение физиологического состояния может быть мгновенным, а может быть растянутым на протяжении нескольких поколений. Нет четкой границы между видами переключений. Кроме того, один и тот же механизм может работать как переключатель первого, так и второго рода. Так, например, классическая модель регуляции, *lac*-промотор *E. coli*, в основном работает как переключатель типа “кнопка” [31]. Большинство механизмов поддержания альтернативных состояний клетки более сложны и включают себя несколько переключателей, как типа кнопки, так и типа реле. Это может приводить к инерционности переключений и существованию множества разнообразных форм, а иногда и континуума состояний [32].

С точки зрения продолжительности состояния относительно клеточного цикла следует выделить состояния, не препятствующие делению и продолжающиеся в течение нескольких поколений, и состояния терминальной специализации, для которых переход к делению возможен лишь после выхода из данного состояния или невозможен вообще, как в случае программируемой клеточной смерти.

С точки зрения поведения популяции формы бистабильности можно также разделить на две категории: первая, когда переключение происходит стохастически, независимо для каждой клетки, и вторая – кооперативная, когда клетки ведут себя подобно тканям многоклеточного организма, осуществляя синхронные переключения состояния по всей популяции, будучи связанными системой внеклеточной химической сигнализации.

Дадим краткую характеристику основных известных молекулярных механизмов эпигенетического переключения состояний клеток.

Метилирование

Метилирование геномных участков – широко распространенный среди бактерий механизм модификации характера экспрессии генов. В течение длительного времени он считался единственным видом ковалентных модификаций оснований ДНК, хотя в последнее время появились сведения о других модификациях [33]. Во многих работах между понятием “метилирование ДНК” и понятием “эпигенетика” ставится знак равенства [4], хотя между метилированием и изменением фенотипа нет прямой взаимосвязи, и только для единичных случаев в роде *Bacillus* показано появление бистабильности, связанной с эпигенетическим наследованием паттернов метилирования на фоне идентичного генотипа. В клетках бактерий обнаружено три основных типа метилирования: с образованием N⁶-метиладенина, N⁴-метилцитозина и 5-метилцитозина [34].

К моменту описания нескольких систем метилирования у бацилл [35] было понятно, что бактериальные ДНК-метилазы (метилтрансферазы) преимущественно работают в паре с рестриктазами, являясь системой метилирования–рестрикции, работающей в качестве иммунной защиты от чужеродной ДНК. Обнаружены и так называемые “орфанные метилтрансферазы”, не имеющие рестриктового партнера. В клетках бацилл найдено около 60 таких систем различной специфичности из трех различных семейств. Каждый штамм обладает “уникальным” набором систем метилирования. При этом родственные и неродственные метилтрансферазы широко распространены по разным бациллярным пангеномам благодаря межвидовому горизонтальному переносу [36]. Группы бацилл с высокой частотой горизонтального переноса, такие как *B. cereus sensu lato*, *B. pumilus sensu lato*, *B. subtilis sensu lato*, обладают в значительной степени перекрывающимся набором метилаз, неравномерно распределенным по штаммам. Часть метилома неизменна в пределах конкретного штамма, поскольку большинство

метилаз экспрессируются с конститутивных промоторов, находящихся под контролем преимущественно вегетативно-специфичных сигма-субъединиц (σ A). При межштабном обмене ДНК происходит не только обмен генами, но и перегрузка метилома. Такая схема не приводит к появлению культуральной бистабильности внутри штамма, а является примером “конститутивной” эпигенетики. В отличие от эукариот в клетках бактерий наиболее важную роль играет метилирование аденина. До недавнего времени в бациллах были изучены лишь адениновые ДНК-метилазы, хотя недавно в одном из штаммов *B. pumilus* была обнаружена цитозин-специфическая система метилирования (N⁴-метилцитозин), экспериментальное отключение которой дает множественные изменения в экспрессионной активности по всему геному [37]. Еще одним отличием от эукариот является то, что в клетках бактерий отсутствуют деметилазы. Поэтому “перегрузка” метилома при смене паттерна метилаз происходит за счет “разбавления” метилированных молекул ДНК в процессе деления клетки. Экспрессия гетерологичной метилазы Dam из *E. coli* в клетках *B. subtilis* приводила к активации систем репарации и вырезанию N⁶-метиладенина, но такой механизм регуляции паттерна метилирования неизвестен для природных штаммов [38].

Метилирование ДНК может быть фенотипически нейтральным, а может оказывать существенное воздействие на транскрипцию, репликацию и пространственную структуру ДНК, если оказывается в зоне узнавания соответствующего механизма [4, 39]. Иногда метилирование проявляется в виде фенотипических бистабильных состояний при наличии обратной связи между метилированием участка ДНК и эффективностью метилирования. Сейчас известно несколько механизмов такой зависимости.

Первый механизм, описанный у бацилл только в одной работе, но уже неоднократно упоминаемый у других бактерий, состоит в следующем: между высокоафинным белком, связывающимся со специфическим участком ДНК и экранирующим его, и метилированием участка идет конкуренция. Так, при исследовании штаммов *B. subtilis*, несущих метилтрансферазу DnmA, оказалось, что многие сайты, соответствующие консенсусу узнавания (GACGmAG), не были метилированы. Как оказалось, точки отсутствия метилирования соответствовали участкам связывания высокоафинных белков, в частности маркировали места связывания репрессоров в промоторах. При суперэкспрессии метилазы многие участки связывания репрессоров все же метилировались и метилирование данного участка воспроизводилось

беспрепятственно во многих поколениях клеток благодаря тому, что метильные группы связывания репрессором оказывались лишены афинности к соответствующему репрессору [40]. Механизм бистабильности экспрессии гена за счет экранирования сайта метилирования был изучен на многих видах и сейчас существуют искусственные гетерологичные экспрессионные кассеты с наследственно переключаемым по этому механизму уровнем экспрессии [41].

Второй механизм возможной бистабильности связан с воспроизведением метилированной ДНК по механизмам, подобным эукариотическим. Наличие метильной группы в одной цепи ДНК в данной точке повышает эффективность ее метилирования по другой цепи по сравнению с метилированием *de novo* немодифицированной ДНК. В таком случае при устойчивой экспрессии метилазы устойчиво воспроизводится существующий паттерн метилирования в любом из альтернативных вариантов. В случае экспрессионного шума или при экспрессии метилазы лишь в определенные моменты роста культуры возникает разнообразие субклонов, отличающихся наследуемым паттерном метилирования. Такие временно формируемые эпигенетические состояния часто называют *фазовыми вариантами*. Такой механизм представляется крайне вероятным для определенных видов популяционного разнообразия бацилл. В то же время пока он обнаружен лишь среди грамотрицательных бактерий, таких как *E. coli* [42].

Петля самоактивации гена или группы генов

Классическая схема самоактивации подразумевает прямую или косвенную зависимость эффективной транскрипции промотора, которая в свою очередь зависит от продукта экспрессии гена, находящегося под контролем этого промотора. Продукт оперона может одновременно быть и транскрипционным фактором, участвующим в инициации транскрипции, и запускать другие гены, усиливающие экспрессию с этого промотора. Особенность эубактерий в том, что последовательности всех промоторов в геноме расклассифицированы по нескольким большим группам, каждая из которых экспрессируется с участием специальной сигма-субъединицы РНК-полимеразы или сигма-фактора. В клетке *B. subtilis* имеются 17 видов сигма-факторов. Каждое состояние клетки соответствует своему паттерну экспрессирующихся сигма-факторов. Базовую информацию по сигма-факторам можно найти в классическом обзоре [43]. Основной фактор σ_A работает почти во всех клетках. Фактор σ_B контролирует экспрессию генов в условиях стресса, σ_D — генов

подвижности и хемотаксиса, $\sigma_E, \sigma_F, \sigma_K, \sigma_G$ ответственны за экспрессию генов при споруляции. Остальные сигма-факторы в основном обеспечивают работу оперонов, участвующих во взаимодействии с химически активными агентами вне клетки. Большинство промоторов сигма-факторов являются самоактивирующимися, т.е. транскрипция с них может происходить с участием соответствующего сигма-фактора и/или с участием этого сигма-фактора происходит непосредственное или косвенное усиление экспрессии белков; так, промотор *sigB* может экспрессироваться с участием σ_B , *sigF* — с участием σ_F , *sigD* — с участием σ_D . Кроме того, экспрессия оперонов, зависящих от каждого из сигма-факторов, приводит к экспрессии генов, вызывающих положительную петлю активации промотора соответствующего *sig*-гена. Полный компендиум механизмов активации каждого из генов и взаимодействий соответствующих белков можно найти на сайте [44]. Таким образом, состояние, связанное с экспрессией определенного сигма-фактора, в принципе может поддерживаться самопроизвольно. Следует отметить, что хотя построена достаточно полная качественная карта взаимодействий для *B. subtilis*, наличие множества факторов, положительно и отрицательно влияющих на экспрессию каждого из ключевых генов, предсказание поведения системы требуют применения сложных математических моделей, учитывающих многие дополнительные количественные и динамические параметры. Такие модели существуют лишь для ограниченного количества случаев. В частности, определенные модели предполагают дополнительную стабилизацию альтернативных состояний за счет конкуренции сигма-факторов [45]. Определенную роль в такой конкуренции могут сыграть некодирующие 6S РНК [46] и анти-сигма-факторы [45], подавляющие транскрипцию, контролируемую сигма-субъединицами, присутствующими в недостаточном количестве. Особую роль в клетке играет σ_H , фактор переходного состояния. С участием σ_H происходит транскрипция многих генов, ответственных за дестабилизацию выбранного гистерезисного состояния и переключения в новое метастабильное состояние. Так, с участием σ_H в переходном состоянии происходит транскрипция *sigA*, оперонов чувства кворума, генов, ответственных за реструктуризацию цитоскелета [44].

Ферментативная самоактивация

В клетке бацилл возможно поддержание альтернативных состояний за счет создания петли обратной связи, формируемой взаимной активацией ферментов. Такие петли действительно из-

вестны; так, например, в пуле киназ *B. subtilis* при инициации процесса споруляции происходит взаимное и автофосфорилирование киназ KinA, B, C, D и активируемых ими факторов споруляции. Видимо, подобный механизм не работает сам по себе как устойчивое самоподдерживающееся состояние в ряду поколений, но он используется как составная часть процессов дифференциации, например при фосфорилировании Spo0A при споруляции или DegU при запуске образования матрикса биопленки. Запуск происходит при активации киназы за счет изменения сенсорного домена в ответ на внешний сигнал, а далее амплифицируется за счет авто или взаимного фосфорилирования нескольких киназ. В клетке бацилл существует более 50 таких так называемых “двухкомпонентных сенсорных систем” и запуск дифференцированной экспрессии почти каждого из сигма-факторов сопровождается активацией соответствующего пула киназ. Общий обзор двухкомпонентных сенсорных систем можно найти на сайте SubtiWiki [47]. Более полную компиляцию см. в работе [44]. Как было сказано, что хотя автокаталитическая активация имеет самоподдерживающийся характер, степень устойчивости динамической системы, возможно, недостаточна для поддержания выраженной фенотипической бистабильности. Поэтому кооперативные состояния, существующие длительное время, такие как биопленка, имеют дополнительные механизмы стабилизации [48].

Прионы

Воспроизводящиеся конформационные состояния белка (прионы) в настоящее время довольно хорошо изучены на примере инфекционных конформаций белков млекопитающих и эпигенетически наследуемых состояний дрожжей. Прионы представляют собой особые конформации третичной структуры белка, обычно в виде амилоидных агрегатов. Белок “нормальной конформации” при контакте с белком-прионом также уходит в агрегированное состояние, приобретая конформацию приона. Прионовые агрегаты могут быть фрагментированы за счет протеолитической активности, при помощи шаперонов или другими воздействиями, формируя “прионовые заправки “prion seeds”, служащие источником дальнейшего распространения прионовой инфекции. Первичные последовательности белков, формирующих прионы, имеют характерные последовательности: богатые глутамином или аспарагином аминокислотные повторы, что дает возможность с высокой достоверностью предсказать возможность формирования амилоидов. Пред-

сказание дало высокую долю амилоидных белков в бактериальных протеомах [49]. Среди около 100 предсказанных амилоидных белков *B. subtilis* значительное количество регуляторов транскрипции, трансляции, а также секретрируемых белков, в том числе растворимых сигнальных пептидов и токсинов, компонентов клеточной стенки и всех основных белков, формирующих матрикс биопленки. Однако до настоящего времени прионная регуляция у бацилл не обнаружена. Тем не менее возможность поддержания альтернативных состояний была показана для двух бактериальных белков: секретрируемого токсина *Klebsiella pneumoniae* микроцина [50] и фактора терминации транскрипции Rho в клетках *Clostridium botulinum* [51]. Микроцин – секретрируемый токсин, образующий трансмембранные поры в клетках бактерий. При начале роста культуры *K. pneumoniae* секретрируемый микроцин представляет собой растворимый активный белок. При старении культуры в ней иногда происходит спонтанное зарождение микроцина-приона, агрегирующего растворимый токсин в амилоидные филаменты. Перенесение культуральной жидкости, содержащей прионовые филаменты, в молодую культуру приводит к ее кооперативной прионизации [50]. Как оказалось, схема прионизации легко воспроизводится в гетерологической системе экспрессии *E. coli* с рекомбинантными модификациями белка [52]. Для терминатора транскрипции *C. botulinum* Rho было показано, что он содержит потенциально амилоидный участок и, будучи экспрессирован в гетерологических системах (*S. cerevisiae* и *E. coli*), ведет себя как прион, т.е. формирует эпигенетически наследуемые состояния [51]. Поскольку клетки бацилл синтезируют множество прионоподобных белков, в частности ортолог Rho (крайне близкий по свойствам белку из *Clostridium*), а также бацитрацин и другие токсины, аналоги микроцина, формирование альтернативных прионных структур крайне вероятно у бацилл. Формирование переключаемых амилоидоподобных состояний обсуждалось как один из вероятных механизмов формирования биопленки и структуры колонии [53].

Наследование внеклеточного матрикса и структуры пространственной организации популяции

Бактериальная популяция может быть организована как жидкая культура индивидуально плавающих клеток, а может быть весьма упорядочена в трехмерную структуру, где положение клеток влияет на их поведение и судьбу. Взаимодействия непосредственно через контакт клеток или через

полисахариды матрикса запускают сигналы внутриклеточной регуляции. Внутри пространственно организованной популяции бактерий, как правило, обнаруживаются градиенты концентрации биологически активных веществ, что влияет на способы дифференцировки в течение поколений. Передача сигналов о пространственной организации и внешних контактах клетки может происходить через систему хемотаксиса или через трансмембранные белки, взаимодействующие с цитоскелетом [54].

Чувство кворума (Quorum sensing, QS)

Бациллы, как и другие бактерии выделяют в среду аутоиндукторы (АИ), сигнальные молекулы, влияющие на физиологическое поведение клеток бактерий того же вида или других видов. Эти вещества представляют собой низкомолекулярные пептиды, циклопептиды, липопептиды и их производные. АИ имеют поверхностные или внутриклеточные рецепторы в клетках бактерий и действуют по механизму положительной обратной связи: связывание АИ с рецептором бактерии вызывает включение механизма синтеза или секреции клеткой этого же вещества. Таким образом при достижении порогового уровня готовности популяции сигнал, первоначально стохастически запущенный одной клеткой, амплифицируется всеми клетками культуры, благодаря чему достигается кооперативность и синхронность изменения статуса популяции которая ведет себя подобно тканям многоклеточного организма [55]. Положительная петля регуляции может служить как средством поддержания “коллективного эпигенетического состояния”, так и вторичным сигналом для запуска клеточной дифференциации. Существуют также QS-системы с отрицательной обратной связью, позволяющие ограничивать распространение сигналов типа “чувства кворума” или локально воздействовать на соседние клетки. В клетках *B. subtilis* 168 существуют две основные системы чувства кворума: 1) группа секреторируемых пентапептидов PhrA-PhrH, подавляющих Rap-белки (ингибиторы трансляции); 2) геранил-олигопептид ComX запускающий фосфорилирование фактора транскрипции ComA через мембранный рецептор ComP и каскад процессов формирования поздней специализации клеток. Клетки других штаммов бацилл имеют широкое разнообразие систем коммуникации, в той или иной степени напоминающих две вышеперечисленные [56].

Экспрессионный шум

Гетерогенность экспрессии генов в клетке на уровне транскрипции в популяции – закономерное следствие малого размера клеток. При небольшом количестве факторов, регулирующих транскрипцию, сильные стохастические вариации количества продукта экспрессии между клетками и во временной развертке – “экспрессионный шум” (noisy expression) оказываются почти неизбежными. В случае, когда для функционирования клетки важно тонко регулируемое количество нужного фактора (белка, РНК, метаболита), как правило, имеются специальные механизмы для регуляции его доступности. В то же время экспрессионный шум сам по себе может играть существенную роль в физиологии и гомеостазе культуры бацилл. Так, гетерогенность экспрессии может использоваться для запуска стохастического перехода индивидуальной клетки в иное физиологическое состояние, если уровень продукта экспрессии достигает порогового значения, при котором запускается механизм перехода. Для культур большинства видов бацилл запуск перехода к споруляции является стохастическим и несколько растянутым по времени, хотя и является реакцией на одни и те же изменения среды. С другой стороны, экспрессионный шум может использоваться для обеспечения кооперативного перехода с использованием механизмов чувства кворума. Клетка, достигшая порогового уровня накопленного продукта, выделяет в среду сигнальный пептид, тот связывается сенсорной системой других клеток и запускает коллективный выброс сигнала из клеток с подпороговым уровнем накопленного продукта [57, 58]. Возможны и другие стратегии использования экспрессионного шума. Так, в нескольких работах была показана роль некодирующих 6S РНК и Rap-белков, осуществляющих подавление экспрессии на посттранскрипционном этапе на фоне гетерогенности экспрессии [59, 60]. Согласно математическим моделям, такого рода регуляция может приводить к стабилизации синтеза белковых продуктов, экспрессирующихся генов на двух уровнях – высоком и низком. Пока неясно, насколько такие эффекты проявляются в виде морфологически выраженных альтернативных фенотипов или участвуют в поддержании бистабильности иного рода.

Материнский эффект

Данный эффект наблюдается как инерционность признака в ряду поколений за счет передачи материала материнского организма дочернему в виде запаса метаболитов. Классическим приме-

ром материнского эффекта являются эксперименты, при которых дрозофилы, прошедшие цикл развития на богатой среде, откладывали яйца с большим количеством желтка, чем прошедшие цикл на бедной среде, что приводило к появлению более крупных личинок, из которых получались мухи, откладывавшие более крупные яйца. Инерционное наследование присуще и клеткам бацилл, наследующим от родительской клетки часть паттерна метилирования, пул ферментов и метаболиты, разбавляемые в последующих делениях. Такого рода наследование может оказаться критичным для выживания, если происходит через терминально специализированное состояние клетки. Так, соотношение выгод от ранней и поздней споруляции и эффективности прорастания спор зависит от накопленных в споре метаболитов [61], от которых зависит эффективность прорастания спор.

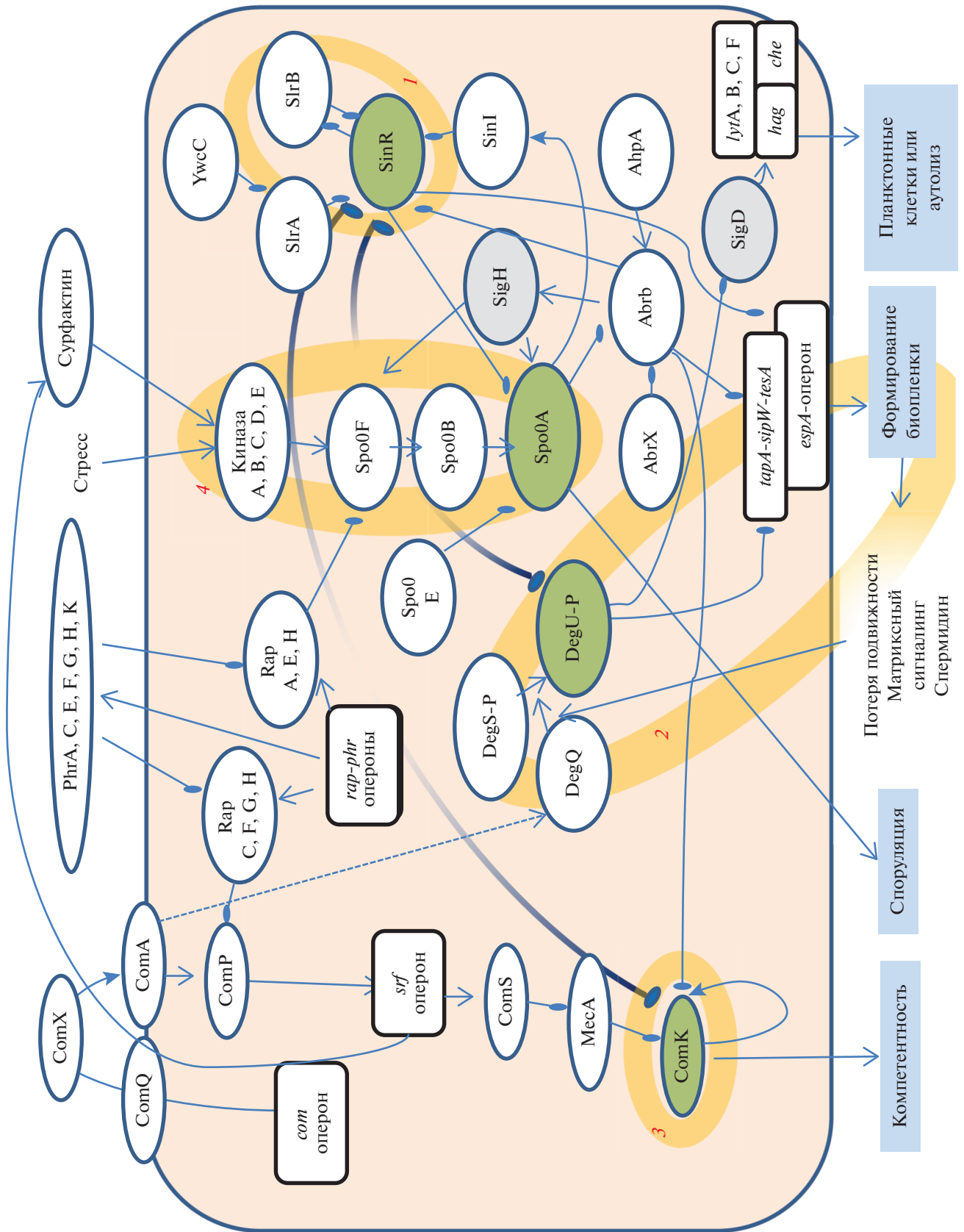
ФЕНОМЕНОЛОГИЯ

Жизненный цикл бацилл с некоторой долей условности можно разделить на пять основных видов специализации: 1) рост в виде вегетативных планктонных клеток, преобладающих в логарифмической культуре; 2) формирование поздних агрегирующих вегетативных состояний, таких как биопленка, при переходе в стационарную фазу; 3) образование компетентных клеток; 4) споруляция; 5) программируемая клеточная смерть – лизис. За исключением вегетативных клеток (1 и 2) все перечисленные виды специализации являются терминальными, т.е. состояние клетки не передается по наследству. Каждому из состояний соответствует характерный паттерн экспрессии транскрипционных факторов и определенный уровень их фосфорилирования. Выбор одной из пяти программ определяется, с одной стороны, набором факторов среды, с другой, может зависеть от взаимодействия клеток. Так, богатая питательная среда и кислородные условия способствуют росту в вегетативной форме, аноксигенные вызывают лизис, достижение определенной плотности клеток в культуре приводит к появлению компетентных клеток, истощение среды запускает споруляцию, старение культуры запускает формирование биопленки. Выбор стратегии осуществляется при помощи внутриклеточных сигналов, включающих каскады реакций фосфорилирования, протеолитического расщепления, выключения/включения групп промоторов. Одновременно в выборе пути участвуют секреторные пептиды, играющие роль феромонов, которые по механизму “чувства кворума” запус-

кают переход в специализированное состояние значительной части культуры. Карта основных элементов сигнальной сети, осуществляющей выбор стратегии специализации клеток, приведена в ряде обзоров, например [62], и рассмотрена как математическая модель динамической системы [63, 64]. Основные элементы сети “принятия решений” хорошо охарактеризованы [63], как и механизмы поддержания функционирования планктонных клеток, запуска споруляции, компетентности, лизиса, в то время как в механизмах формирования агрегированных структур остается много неясного. Здесь мы не будем касаться деталей механизма каждого из процессов, а дадим лишь краткую характеристику, приведя ссылки на соответствующие обзоры.

На рис. 1 приведена упрощенная схема взаимодействий клеточных и внеклеточных механизмов, отвечающая за решение о переходе клетки на тот или иной путь специализации. Эта схема – компиляция на основании многочисленных исследований, сделанных на типовом штамме *B. subtilis* 168. Фрагменты рассмотрены в многочисленных обзорах и при обсуждении данных моделирования и экспериментальных работ [1, 63, 65]. В основной схеме сети сигнальных взаимодействий можно выделить четыре основных блока переключаемых состояний: 1) состояние планктонных подвижных клеток, для которого характерен активный транскрипционный репрессор SinR; 2) состояние биопленки, характеризующееся умеренным уровнем экспрессии и фосфорилирования Spo0A и активированным транскрипционным регулятором DegU; 3) компетентное состояние – высокий уровень транскрипционного активатора ComK; 4) состояние перехода к споруляции, которому соответствует максимальный уровень активности Spo0A. Эти четыре включенных состояния были подробно описаны на типовом штамме *B. subtilis* 168, они связаны между собой антагонистической регуляцией на уровне транскрипции, посттранскрипционных процессах и межклеточной сигнализации. Далее будут представлены все выявленные механизмы, отвечающие за бистабильность в культуре бактериальных клеток, а также дана обобщающая схема.

Планктонное состояние: быстро делящиеся подвижные клетки, характеризуются высокой активностью SinR – транскрипционного репрессора с широким кругом плеiotропных межбелковых взаимодействий, осуществляющего в вегетативных клетках репрессию генов многих регуляторных белков, в том числе нескольких σ -субъединиц и других факторов транскрипции, участвующих в переходе клеток в специализированные состоя-



ния или опосредованную их инактивацию. В планктонных клетках за счет эффективной транскрипции, осуществляемой σ^D , происходит экспрессия генов автолиза, участвующих в разделении цепочек клеток, оперонов, ответственных за формирование жгутиков и хемотаксис. Репрессия конкурирующих генов, в том числе *sigH*, и цепочка белковых взаимодействий, препятствующих фосфорилированию факторов транскрипции DegU, Spo0A, ComK, способствуют сохранению планктонного состояния в ряду поколений. При повышении плотности культуры и истощении среды появляется тенденция к подавлению активности репрессора SinR за счет экспрессии конкурирующих генов. Обычно непосредственным фактором, выключающим активность SinR, является активация гена *sinI*, продукт которого образует неактивный комплекс с SinR, снимая репрессию с его антагонистов, в том числе *abrB*, экспрессия которых в дальнейшем препятствует его синтезу. Так как *sinI* экспрессируется очень неоднородно, переход в новое состояние оказывается стохастическим.

Биопленка. При переходе в стационарную стадию в жидкой среде и при росте на поверхности субстрата происходит изменение морфологии клеток бактерий и запускается процесс формирования биопленки. Клетки слипаются, теряют жгутики, формируется межклеточный матрикс — гель, каркас которого состоит преимущественно из волокон экзополисахаридов и связующего амфилоидного белка TasA, заякоренного на поверхности клеточных стенок при помощи белка TapA. Внешние факторы, запускающие формирование биопленки, — частичное истощение среды, контакт клеток, торможение жгутиков, накопление катаболитов в среде. В отличие от споруляции, компетентности и лизиса вегетативные клетки биопленки не являются терминальным состоянием, а воспроизводятся в ряду поколений, а также могут переходить в состояние компетентности или спорулировать. Запуск состояния биопленки связан с активацией DegU. Формирование биопленки

происходит на фоне определенного уровня активности Spo0A, также участвующего в споруляции. Биопленка не является равномерной, и существует несколько категорий растущих и покоящихся клеток биопленки с различной специализацией [1, 66]. DegU — транскрипционный фактор, является элементом двухкомпонентной системы фосфорилирования киназ DegU—DegS, которая активируется за счет сигнала подавленного функционирования жгутиков, через белок DegQ. Само состояние биопленки, видимо, поддерживается не только петлей автокаталитического фосфорилирования. Это можно предположить, исходя из того, что трудно представить механизм передачи строго определенного уровня сигнала в ряду поколений воспроизводящихся в биопленке клеток, поскольку уровень транскрипции и трансляции подвержен колебаниям, в то время как стабильность наследуемого состояния самоактивации фермента зависит от тонкого баланса синтеза и деградации. Уровень транскрипции и трансляции подвержен колебаниям и трудно предположить полную стабильность наследуемого состояния самоактивации фермента, которое зависит от тонкого баланса синтеза и деградации. Можно предположить, что стабилизация дифференцированного состояния клеток биопленки является многофакторной. Клетки биопленки подвергаются отбору за счет “каннибалистического поведения” большинства дифференцированных клеток, т.е. недифференцированные клетки подвергаются воздействию токсинов, выделяемых клетками в дифференцированном состоянии [1]. Имобилизованная клетка при дедифференцировке получает сигнал о нарушении функции жгутиков через Swg белки, препятствующий дефосфорилированию DegU. Постепенно накапливаются сведения, что сам контакт с другими клетками и матриксом является сенсорным сигналом, стабилизирующим дифференцированное состояние [67]. В последнее время появились некоторые предположи-

Рис. 1. Взаимодействия сигнальной системы клеток бактерий, ответственной за основные типы включаемой дифференциации. Овалы обозначают белковые элементы, прямоугольники — экспрессируемые опероны. Стрелки обозначают непосредственное и опосредованное воздействие активности одного белкового элемента на активность других структур без различия транскрипционных и посттранскрипционных эффектов, т.е. включают активацию транскрипции, стабилизацию мРНК, предохранение от протеолиза, активационное фосфорилирование и др. Линия с перемычкой обозначает ингибирование или инактивацию элемента сигнальной сети. Оранжевым овалом с соответствующим номером выделены особенно важные элементы сигнальной сети, способные автономно поддерживать альтернативные состояния бистабильности. Обозначены четыре центра бистабильности: 1 — транскрипционный репрессор SinR, ответственный за удержание состояния планктонных клеток; 2 — транскрипционный активатор DegU, в активном фосфорилированном состоянии поддерживающий формирование биопленки и роение; 3 — транскрипционный активатор ComK, поддерживающий формирование компетентного состояния; 4 — транскрипционный активатор Spo0A, ответственный за споруляцию и участвующий в поддержании биопленки. Розовый фон — клетка; элементы в нем — взаимодействия внутри клетки. Элементы вне розового фона обозначают факторы внеклеточной сигнализации, ответственные за коллективное поведение.

тельные данные о возможной роли метилирования в поддержании стабильности биопленки [68].

Компетентное состояние характеризуется остановкой деления и формированием специальных механизмов захвата ДНК из среды. После некоторого времени состояние компетентности заканчивается с восстановлением статуса вегетативной клетки и последующим делением. Механизм формирования состояния естественной компетентности достаточно консервативен для грамположительных бактерий и, видимо, свойствен всем видам бацилл [69], тем не менее в отличие от лабораторного штамма *B. subtilis* 168 природные изоляты редко проявляют компетентное состояние, вероятно вследствие того, что гены, ответственные за его запуск и формирование, выключены через сайленсинг за счет мелких некодирующих РНК и метилирования. В некоторых случаях запуск компетентного состояния может быть осуществлен за счет суперэкспрессии регуляторных белков, таких как ComK [70]. В штамме *B. subtilis* 168 запуск состояния компетентности происходит при достижении клетками растущей культуры определенной плотности. Запуск идет через внешний сигнал – секретлируемый пептид ComX, который, связываясь с мембранным рецептором ComA, запускает каскад реакций, приводящий к активации гена фактора транскрипции ComK, который является собственным активатором, и тем самым обеспечивается поддержание состояния. Клетки перестают двигаться и в мембране из продуктов генов, экспрессируемых под контролем ComK, формируется система захвата ДНК из среды. Мембранный экспорт “феромона” ComX в среду также активируется тем же каскадом. Это обеспечивает координированный переход в компетентное состояние значительной части популяции бацилл.

Споруляция, необратимая специализация, представляет собой неравное деление, при котором меньшая часть делящейся клетки, погружаясь внутрь, превращается в покоящуюся эндоспору, а материнская часть клетки, поспособствовав формированию споры, отмирает. Споруляция – самый известный и подробно изученный случай дифференциации клетки. Процесс споруляции включает в себя дифференциальную систему экспрессии приблизительно 500 генов и сложную сеть сигналов, работающих дифференциально в материнской клетке и протопоре. Споруляция запускается максимально высоким уровнем фосфорилирования фактора транскрипции Spo0A, достигаемого за счет нескольких взаимно фосфорилирующих киназ. В ходе споруляции на ранней стадии отключаются все остальные системы дифференци-

ции и запускаются споруляционные сигма-факторы в соответствующих компартментах спорулирующей клетки. Подробно механизм споруляции бацилл рассмотрен в многочисленных обзорах [71, 72].

Автолиз. В условиях резкого голодания или плохой аэрации среды у большинства бацилл запускается механизм массового самоубийства, в виде продукции автолизина гидролизующего пептидогликан клеточной стенки. Запуск самопроизвольного лизиса связан с понижением уровня АТФ в клетке и деполяризацией цитоплазматической мембраны. Автолиз идет при активной экспрессии *skf*- и *sdp*-оперонов на фоне повышения активности SinR. В литературе автолиз бацилл рассматривается как вариант альтруистического поведения, способствующего выживанию некоторых клеток в условиях истощенной среды [73].

Существование аналогичной схемы дифференциации предполагается для большинства видов рода *Bacillus*. Тем не менее полного исследования системы взаимодействий, аналогичной построенной для *B. subtilis* 168, нет ни для одного другого штамма. В то же время работы по транскриптомике и протеомике других видов показывают, что паттерн экспрессии ортологов и паралогов ключевых генов, ответственных за регуляцию основных форм жизненного цикла, в принципе соответствует таковому, который характерен для *B. subtilis* [74]. Для группы *B. cereus* есть характеристики отдельных фрагментов цепочек взаимодействий, а для других групп бацилл существуют только феноменологические описания процесса формирования биопленки [74, 75].

Роение (swarming) представляет собой согласованное передвижение клеток бактерий, соединенных между собой специальными пиллями. Роение свойственно почти всем штаммам рода *Bacillus*, но не наблюдается на стандартном лабораторном штамме *B. subtilis* 168. Анализ других штаммов показывает промежуточный уровень фосфорилирования DegU на фоне эффективной экспрессии генов жгутиков и хемотаксиса под контролем σD .

Для бацилл также характерно синхронное выделение некоторых ферментов, пигментов и других вторичных метаболитов. В случае появления такого рода бистабильности было показано, что состояния бистабильности экспрессии по крайней мере частично контролируются уровнем ортологов SinR, например [76]. Интересно, что экспрессия белков внутриклеточных включений, таких как кристаллические белки *B. thuringiensis*, может быть контролируема SinR и Spo0A состояниями или независима от жизненных стадий [77, 78].

Фазовые вариации. При росте в экспоненциальной культуре, начиная с поздней лаг-фазы, у многих бактерий с высокой частотой наблюдается переход части клеток между двумя или более фенотипическими состояниями с частичной или полной инактивацией многих локусов. Для бацилл пока нет ясности с механизмами формирования фазовых вариантов. Тем не менее в экспериментах по поточной цитометрии было показано, что линии фазовых вариантов действительно существуют и представляют собой наследуемые фенотипические состояния [24]. Следует отметить, что в некоторых работах “фазовыми вариациями” называются любые эпигенетические переключения.

Клетки-персистеры. Клетки-персистеры представляют собой формы с крайне медленным ростом, у которых заторможено развитие почти всех клеточных функций, обладающих устойчивостью ко многим стрессовым факторам, температуре, антибиотикам, повышенным концентрациям детергентов и др. При снятии стресса выжившие клетки-персистеры прорастают в обычные колонии вегетативных клеток, генетически идентичных исходному штамму. Они были обнаружены уже 80 лет назад у широкого круга бактерий. До недавнего времени было невозможно ни изучить механизм их формирования, ни выяснить, представляют ли они наследуемое эпигенетическое состояние или терминальный вариант специализации клетки [79]. В культурах бацилл клетки-персистеры образуются с низкой частотой (порядка 10^{-6}) [80, 81]. Поскольку клеток-персистеров крайне мало, а их рост сопровождается быстрым переключением в программу обычной вегетативной клетки, их трудно выделить в достаточном количестве для цитологического и молекулярно-биологического исследования. Относительно недавно за счет микрофлюидного анализа индивидуальных клеток-персистеров нескольких видов бактерий, в том числе и *B. subtilis*, удалось показать передачу данного фенотипа в нескольких поколениях [82]. Механизм образования и поддержания фенотипа персистеров неясен, хотя косвенные данные по персистерам *E. coli* и *Salmonella enterica* дают возможность предположить стохастическое метилирование многих геномных локусов при формировании клетки-персистера, поскольку нокаут некоторых генов метилаз приводил к прекращению появления персистеров в культуре [68]. Исследование библиотек мутантов *E. coli* с целью выявить штаммы с высокой частотой образования персистеров обнаруживает клоны, в которых инактивированы очень различные гены с плейотропными проявлениями, в некоторых случаях нежизнеспособные без компенсаторных мутаций [83].

L-формы. Представляют собой штаммы бактерий, лишенные нормальной клеточной стенки, формы и регулярной организации элементов цитоскелета, растущие за счет спонтанного отпочковывания нерегулярных выпячиваний. L-формы *B. subtilis* воспроизводятся как устойчивое эпигенетическое состояние благодаря тому, что для формирования нормальной палочкообразной клетки с нормальной клеточной стенкой необходима иммобилизация протопласта внутри растущей клеточной стенки, хотя сама по себе пептидогликановая оболочка может быть сформирована без затравки для роста в виде матрицы пептидогликана [84, 85].

Старение клеток бацилл. Как уже было сказано, вегетативная бациллярная клетка делится симметрично перетяжкой посередине с участием Z-кольца, образуя морфологически идентичные дочерние клетки. Тем не менее в образующихся клетках можно выделить различающиеся полюса, соответствующие перетяжке более старого и более нового деления. При каждом новом делении один конец бактериальной палочковидной клетки оказывается продуктом последнего деления, а другой соответствует структуре, получившейся в результате деления несколько поколений назад. Соответственно каждой клетке можно приписать рейтинг возраста. Отслеживание судьбы потомков старых клеток *B. subtilis* показывает, что они образуют субпопуляцию с заметно сниженной скоростью роста [86, 87]. Возможно, в некоторых условиях эффективность споруляции коррелирует с возрастом клетки [87]. Работы, сделанные на *E. coli*, показали, что стареющий конец клетки активно накапливает агрегаты неправильно свернутых и частично деградировавших белков [88, 89]. Можно предположить, что некоторые адаптивные механизмы, такие как образование миниклеток *E. coli* и споруляция бацилл, позволяют избавиться от такого рода структурной наследственности [90]. Аналогичные примеры накопления балластного материала в старых структурах сомы для мицелиальных грибов и дрожжей имеют длительную историю изучения [91, 92].

Общее количество проявлений бистабильности в культуре клеток бацилл огромно и варьирует от штамма, условий и характеристик культуры. Мы предлагаем лишь краткую схему, частично компилирующую изложенные выше представления о бистабильности бацилл. Схема представлена на рис. 2.

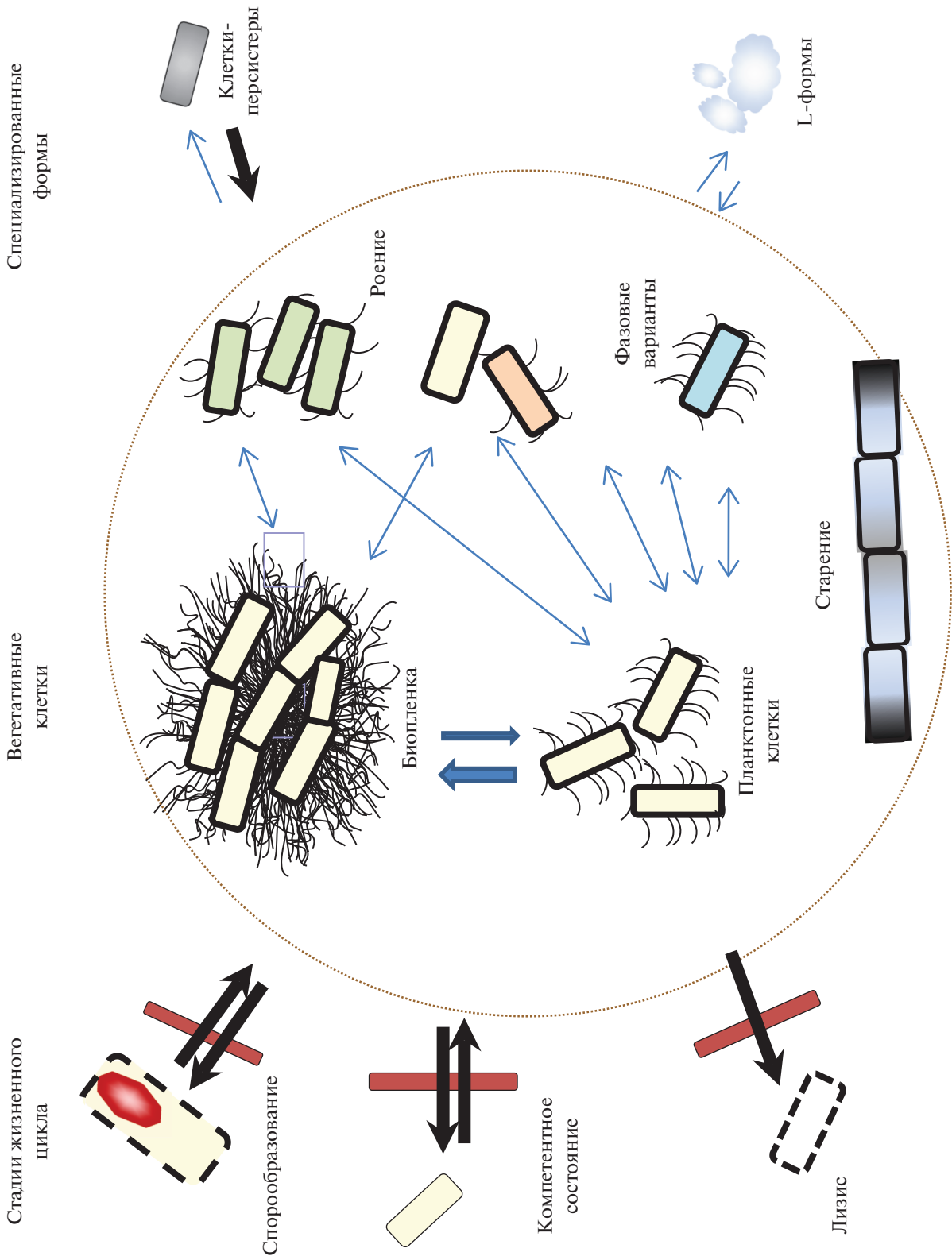


Рис. 2. Компляция наиболее изученных бистабильных состояний клеток бацилл, как коллективных, так и стохастических.

РОЛЬ БИСТАБИЛЬНОСТИ ДЛЯ ВЫЖИВАНИЯ В ПРИРОДЕ

Бистабильность играет очень большую роль в выживании бактерий. Это подтверждается тем, что механизмы поддержания бистабильности могут быть достаточно консервативны. Однако прямое исследование значения бистабильности встречается со значительными трудностями. Большинство эволюционно консервативных механизмов поддержания и переключения бистабильности ассоциированы со сложными сигнальными сетями, участвующими в других процессах внутриклеточной регуляции. Нокаут или мутагенез генов, ассоциированных с бистабильностью, приводит к очень многообразным изменениям фенотипа. К тому же не всегда понятно, насколько бистабильность лабораторных штаммов соответствует природным. Так, штамм *B. subtilis* 168, на котором проведено большинство исследований сигнальных путей бацилл, как указано во многих работах, в процессе доместикации, видимо, утратил многие регуляторные переключатели, а некоторые формы специализированного поведения, такие как роение, свойственные почти всем штаммам рода *Bacillus*, у него вообще отсутствуют. Кроме того, ситуацию природного биотопа, меняющуюся непрерывно в течение длительного времени, трудно имитировать в лабораторных условиях. Поэтому роль бистабильности в экологии и эволюции изучается на основе косвенных моделей. Гипотезы об ее адаптивной роли следуют традиционным концепциям теории эволюции и эволюционной экологии.

Основные формы специализации клеток бацилл – вегетативные клетки, споруляцию, состояние компетентности, лизис – с точки зрения экологии и эволюционной приспособленности стоит рассматривать скорее как этапы жизненного цикла, чем как параллельно существующие альтернативные состояния. Каждому из них можно приписать четко определенную функцию: споруляция – образование спор длительного хранения, компетентность – обмен генетическим материалом, автолизис – обеспечение выживания части клеток в резко изменившихся условиях и рассеивание генетического материала в виде ДНК из лизировавшихся клеток. В данном случае популяция может рассматриваться как составной единый организм, а способность к воспроизведению и выживанию в эволюционном процессе проходит проверку на метапопуляционном уровне.

Итак, первая, вполне очевидная гипотеза предполагает, что существование дифференцированных физиологических форм в культуре позволит более эффективно использовать среду. Так,

бистабильность с наличием свободноплавающих клеток и клеток в составе биопленки позволяет одновременно осуществить две стратегии в пределах одного первоначального клона. Биопленка способствует удержанию и эффективному использованию секретлируемых ферментов, закреплению клеток на субстрате, эффективной борьбе с конкурентами за счет накопления токсинов или формированию устойчивых связей с симбиотическими микроорганизмами, экранированию от вредных внешних воздействий. Пленка также полезна с точки зрения приложения кооперативных воздействий на внешние объекты. Так, например, пленка *B. thuringiensis* служит местом накопления экзо- и эндотоксинов, выделяемых при споруляции, в составе биопленки, в количестве, достаточном для отравления макроскопических беспозвоночных, используемых в дальнейшем как источник метаболитов. Планктонные клетки служат расселительной стадией, которые могут эффективно скрещиваться. Кооперированное расплывание клеток в виде роения служит средством заселения новой среды в условиях конкуренции. Переключение экспрессии генов метаболических путей может быть использовано для дифференциальной стратегии использования химических веществ.

Аналогичным образом, наличие различных фазевариантов в растущей культуре, вероятно, позволяет отобрать формы, наиболее эффективно растущие в среде, а возможно способствует уменьшению конкуренции растущих клонов за счет специализации потребления метаболитов, имеющихся в среде. Поскольку синтез белковых компонентов определенных метаболических путей является очень ресурсоемким процессом, метаболическая специализация, т.е. выключение промоторов отдельных оперонов или целых групп промоторов экономит ресурсы, при этом обеспечивая достаточно полное использование разнообразия метаболитов среды за счет разнообразия клонов.

Коллективные состояния бактерий подразумевают альтруистическое поведение, выражающееся в том, что клетка тратит ресурсы или снижает собственные шансы на размножение за счет вклада в пользу всей популяции. В связи с этим появляется вероятность отклонений за счет спонтанных мутаций в сторону эгоистического поведения – отказа от энергоемкого синтеза метаболитов, торможения деления или программируемой смерти. Действительно клетки-мутанты, названные читерами, способные обходить механизмы, регулирующие коллективное поведение, были найдены. Одновременно с этим были обнаружены и эволюционные механизмы, позволяющие сообществу

бактерий подавлять такого рода эффекты, аналогично многоклеточному организму [93, 94].

Вторая гипотеза, которую следует иметь в виду, что бистабильность в каждом конкретном случае вообще может не являться адаптивным признаком. Возможно, что наблюдаемая в лабораторных условиях бистабильность не является релевантной для природных штаммов в реальной среде обитания. Так, например, адаптивная роль эпигенетического переключателя Psi^+ в дрожжах *S. cerevisiae* [95] оказалась заметной лишь в лабораторных штаммах на фоне мутантных аллелей, не отмеченных в природных штаммах, а само эпигенетическое переключение в природе не наблюдается [96]. При этом хотя сама по себе бистабильность не является адаптивным фактором, но может быть вторичным проявлением важного функционирующего механизма. Так, петля положительной обратной связи необязательно должна проявляться в форме бистабильных состояний, а может быть лишь способом усиления сигнала. Таким образом, бистабильность в виде измененного эпигенетического состояния может оказаться всего лишь проявлением амплифицированного сигнала внутри пошедшего в разнос регуляторного механизма. Интересно, что если механизм играет важную роль, то гены, участвующие в формировании такой бистабильности, будут достаточно консервативными, как и само явление.

Третья гипотеза предполагает, что существование промежуточного состояния при переключении невыгодно с энергетической точки зрения. Так, экспрессия генов по принципу “все или ничего” при экспрессии с регуляторных случаев предпочтительна с точки зрения экономии ресурсов при промежуточной концентрации индукторов. Например, это характерно для регуляции оперонов при помощи репрессоров LacI-GalR группы, таких как *CsrA* в *B. subtilis* и его ортологов. Видимо, гетерогенность уровня экспрессии генов (expression noise) является важным фактором функционирования клетки. В некоторых случаях он может быть полезен для создания гетерогенности физиологических состояний в популяции и извлечения из этого кооперативной выгоды, в некоторых подвергаться жесткому ограничению при помощи специальных механизмов. Побочным эффектом такой регуляции может быть появление стабильно воспроизводимых альтернативных состояний.

Четвертая гипотеза “хеджирование рисков” (bet-hedging) – наличие долгосрочной стратегии выживания в череде поколений в меняющихся условиях. Она предполагает распределение рисков неопределенности среди нескольких по-разному

дифференцированных растущих клонов. При этом пониженная адаптивность каждого из клонов в каждом из состояний среды компенсируется их наследственным фенотипическим разнообразием, адаптивные ресурсы которого перекрывают в какой-то степени возможную вариативность среды. Таким образом, можно ожидать расширенное воспроизведение хотя бы некоторых из клонов культуры в изменившихся условиях среды. Можно предположить, что все эпигенетически наследуемые состояния клетки и культуры подвержены контролю балансирующего отбора (balancing selection) и/или являются его результатом. Эта гипотеза является одним из важнейших элементов общей теории эволюции, поэтому изучение и моделирование этого феномена вызвало большой интерес. Поскольку для микроорганизмов пока изучение сложных популяционно-генетических явлений на уровне отдельных клеток в природе пока невозможно, изучение касалось построения математических моделей и моделирования эволюционного процесса в бактериальной культуре. Так, в одной работе проводился отбор в популяции *Pseudomonas fluorescens* в ряду поколений с периодической сменой направления отбора на противоположный [97]. В течение нескольких циклов отбора альтернативные фенотипы получались за счет геномных мутаций. Примерно через 10 циклов мутагенеза среди получаемых клонов с измененным фенотипом отобраны также “эпигенетические мутаторы”, т.е. генотипы, позволяющие поддерживать соответствующие эпигенетически наследуемые фенотипы и переключать их с некоторой частотой. Штаммы рода *Bacillus* изучались в экспериментах по искусственной эволюции в лаборатории и очевидно, что эволюция затрагивала гены, связанные с бистабильностью, однако прямых результатов формирования эпигенетических механизмов у бацилл в ходе лабораторных исследований пока не опубликовано [98].

Подобные наблюдения позволяют предполагать, что важнейшие регуляторы в основных системах жизнеобеспечения клетки должны содержать в себе возможность поддержания эпигенетического переключения и наследования приобретенных состояний, поскольку линии клеток микроорганизмов подвергаются постоянному воздействию балансирующего отбора. Эта концепция находит подтверждение в том, что среди белков, основных регуляторов клеточных процессов, вероятно имеется значительная доля имеющих консенсусы для формирования альтернативных состояний [49]. Такого типа механизм позволяет за счет спорадических переключений формировать приспособленность в изменившихся условиях, без из-

менения последовательности ДНК, что может сопровождаться необратимой потерей функциональности гена [97]. В то же время математический анализ показывает, что слишком высокая эпигенетическая лабильность большого количества механизмов является эволюционно тупиковой стратегией [99].

ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ ПРИРОДНОЙ СРЕДЫ И ЧЕЛОВЕКА

Наличие специализированных состояний клеток бацилл по основной схеме жизненного цикла (вегетативные клетки (1), споруляция (2), компетентность (3) и лизис (4)) является основой для планирования генетических и физиологических манипуляций в лаборатории, планирования и моделирования поведения клеток бацилл в природе. В ходе лабораторных процедур основные состояния специализации клеток бацилл используются с целью получения биомассы (1, 2) и ДНК-трансформации (1, 3), экспрессии соответствующего рекомбинантного гена (1, 2), долговременного хранения культуры (1, 2) [20].

С точки зрения биотехнологии существование бистабильности бацилл критично, поскольку это один из главных механизмов, позволяющий бактериям избегать контроля лимитирующих факторов среды. Гетерогенность бактериальной культуры снижает универсальность и воспроизводимость биотехнологических процессов. При использовании бацилл в сельскохозяйственном и пищевом производстве это может способствовать появлению форм с непредсказуемыми характеристиками. Повышенная устойчивость бацилл в биопленке к ряду неблагоприятных воздействий, в том числе к антибактериальным агентам, и долговременное выживание бактериальных спор в матриксе биопленки породили целую науку о методах, позволяющих преодолеть эту устойчивость [100]. Биопленки, неравномерная споруляция, частичный лизис культуры создают трудности для эффективного отделения продуктов секреции бацилл, накопленных в жидкой культуральной среде, от клеток. В то же время многие процессы с участием бациллярных клеток в природе и технологических процессах целиком зависят от динамики воспроизведения планктонных и иммобилизованных форм, например процессы биологической деградации силикатных пород *B. mucilaginosus*, *B. edaphicus* и др. [101].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В клетках развивающейся популяции бацилл постоянно происходит смена программ поведения, зависящая от окружения или предопределенная предыдущим развитием. Значительная доля таких переключений достаточно долговременна и может самоподдерживаться. Эпигенетическое переключение может быть кооперативным или стохастическим. Представление о клетке бацилл как о структуре, не обладающей морфологической сложностью достаточной для воспроизведения многих альтернативных состояний, ушло в прошлое. Методы нового поколения (геномного секвенирования, компьютерного моделирования на основе обширных баз данных, массового трекинга состояний отдельной клетки бацилл) позволяют более аккуратно выявить механизмы поддержания бистабильных состояний. Роль бистабильности, как в природных используемых штаммах бацилл очень велика. Она в значительной степени определяет экологический и биотехнологический потенциал штаммов рода *Bacillus*. Тем не менее изучение бистабильности бацилл сильно отстает от исследования других модельных организмов *E. coli*, *P. fluorescens*, *S. cerevisiae*. Остается неясной значимость широкого разнообразия метилтрансфераз бацилл с точки зрения бистабильности. Гипотетически остаются механизмы формирования фазовых вариаций растущей культуры. Непонятно, какую роль играют клеточные контакты в биопленке и других коллективных взаимодействиях, и в отличие от *Pseudomonas* sp. неясно даже, как устроены сенсорные механизмы такого взаимодействия. Неясны механизмы, контролирующие роение. Нет данных о весьма вероятной кооперативной агрегации многочисленных амилоидных белков. Частично меньшая изученность связана с широким разнообразием проявлений бистабильности, с менее удобными репортерными системами. Кроме того, практически вся схема внутриклеточных и межклеточных взаимодействий была построена на изучении единственного лабораторного штамма *B. subtilis* 168, который представляет лишь одну группу внутри рода *Bacillus* и к тому же утратил многие элементы сигнальных сетей вследствие отбора при доместикации.

Можно предположить, что наибольший прогресс в изучении бистабильности бацилл следует ожидать за счет вовлечения в исследования широкого разнообразия природных штаммов, вовлечения новых математических моделей; необходимо сделать упор на недостаточно до сих пор изучавшиеся и гипотетические механизмы, такие как конформационные переходы белков (прионы), структурное наследование и роль нетранслируемых РНК.

Это позволит расширить представление об имеющихся механизмах формирования бистабильного состояния у бактерий рода *Bacillus*.

Работа поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации в рамках госзадания (Южный федеральный университет, проект № 0852-2020-0029).

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. Шарупова М.Р., Марданова А.М., Рудакова Н.Л. и др. Бистабильность и формирование матрикса биопленки как механизмы адаптации *Bacillus subtilis* в стационарной фазе // Микробиология. 2021. Т. 90. № 1.
2. Hartwell L. Genetics: From Genes to Genomes. Boston: McGraw-Hill Higher Education, 2008. 827 p.
3. Gunka K., Tholen S., Gerwig J. et al. A high-frequency mutation in *Bacillus subtilis*: Requirements for the de-cryptification of the gudB glutamate dehydrogenase gene // J. Bacteriol. 2012. V. 194. № 5. P. 1036–1044. <https://doi.org/10.1128/JB.06470-11>
4. Casadesús J., Low D. Epigenetic gene regulation in the bacterial world // Microbiol. Mol. Biol. Rev. Am. Soc. Microbiol. 2006. V. 70. № 3. P. 830–856.
5. Coleman W. Cell, nucleus, and inheritance: An historical study // Proc. Am. Philos. Soc. 1965. V. 109. № 3. P. 124–158.
6. Deichmann U. Epigenetics: The origins and evolution of a fashionable topic // Dev. Biol. 2016. V. 416. № 1. P. 249–254. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.06.005>
7. Kützing F.T. Phycologia Generalis: oder Anatomie, Physiologie und Systemkunde der Tange. Leipzig, 1843. 458 p.
8. Berkeley M.J. Notices of North American fungi // Grevillea. 1874. V. 3. № 25. P. 1–17.
9. Strick J.E., Gradmann E. Laboratory disease: Robert Koch's medical bacteriology // Br. J. Hist. Sci. 2011. V. 44. № 1. P. 140.
10. Felsenfeld G. A brief history of epigenetics // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2014. V. 6. № 1. P. a018200. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018200>
11. Rízet G. Les phenomenes de barrage chez *Podospora anserina*: Analyse genetique des barrages entre les souches s et S // Rev. Cytol. Biol. Veg. 1952. V. 13. P. 51–92.
12. Cox B.S. Ψ, A cytoplasmic suppressor of super-suppressor in yeast: 4 // Heredity. 1965. V. 20. № 4. P. 505–521.
13. Klieneberger E. The natural occurrence of pleuropneumonia-like organisms in apparent symbiosis with *Streptobacillus moniliformis* and other bacteria // J. Pathol. Bacteriol. 1935. V. 40. P. 93–105.
14. Bigger J.W. Treatment of Staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation // Lancet. 1944. P. 497–500.
15. PubMed [Electronic resource] // PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed: 17.12.2020).
16. Anagnostopoulos C., Spizizen J. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis* // J. Bacteriol. 1961. V. 81. № 5. P. 741–746. <https://doi.org/10.1128/jb.81.5.741-746.1961>
17. Deans C., Maggert K.A. What Do You Mean, “Epigenetic”? // Genetics. 2015. V. 199. № 4. P. 887–896. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.173492>
18. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy | Nature [Electronic resource]. URL: <https://www.nature.com/articles/nature02625?free=2> (accessed: 15.12.2020).
19. Portela A., Esteller M. Epigenetic modifications and human disease: 10 // Nat. Biotechnol. 2010. V. 28. № 10. P. 1057–1068.
20. Harwood C.R., Cutting S.M. Molecular Biological Methods for Bacillus. Wiley, 1990. 581 p.
21. Goodwin S., McPherson J.D., McCombie W.R. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies: 6 // Nat. Rev. Genet. 2016. V. 17. № 6. P. 333–351. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>
22. Beaulaurier J., Schadt E.E., Fang G. Deciphering bacterial epigenomes using modern sequencing technologies: 3 // Nat. Rev. Genet. 2019. V. 20. № 3. P. 157–172. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0081-3>
23. Smits W.K., Veening J.-W., Kuipers O.P. Phenotypic variation and bistable switching in bacteria // Bacterial Physiology: A Molecular Approach / Ed. El-Sharoud W. Berlin; Heidelberg: Springer, 2008. P. 339–365. https://doi.org/10.1007/978-3-540-74921-9_12
24. Ambriz-Aviña V., Contreras-Garduño J.A., Pedraza-Reyes M. Applications of flow cytometry to characterize bacterial physiological responses // BioMed Res. Int. Hindawi. 2014. V. 2014. P. e461941. <https://doi.org/10.1155/2014/461941>
25. Tewari Kumar P., Decrop D., Safdar S. et al. Digital microfluidics for single bacteria capture and selective retrieval using optical tweezers: 3 // Micromachines. Multidisciplinary Digital Publ. Institute. 2020. V. 11. № 3. P. 308. <https://doi.org/10.3390/mi11030308>
26. Reel P.S., Reel S., Pearson E. et al. Using machine learning approaches for multi-omics data analysis: A

- review // *Biotechnol. Adv.* 2021. V. 49. P. 107739.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107739>
27. Zhang M., Zhang J., Wang Y. et al. Non-invasive single-cell morphometry in living bacterial biofilms: 1 // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 6151.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-19866-8>
28. Murray E.J., Kiley T.B., Stanley-Wall N.R. Y. A pivotal role for the response regulator DegU in controlling multicellular behaviour // *Microbiology.* 2009. V. 155. № 1. P. 1–8.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.023903-0>
29. Barreto H.C., Cordeiro T.N., Henriques A.O. et al. Rampant loss of social traits during domestication of a *Bacillus subtilis* natural isolate: 1 // *Sci. Rep. Nature Publ. Group.* 2020. V. 10. № 1. P. 18886.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-76017-1>
30. Omer Bendori S., Pollak S., Hizi D. et al. The RapP-PhrP quorum-sensing system of *Bacillus subtilis* strain NCIB3610 affects biofilm formation through multiple targets, due to an atypical signal-insensitive allele of RapP // *J. Bacteriol.* 2015. V. 197. № 3. P. 592–602.
<https://doi.org/10.1128/JB.02382-14>
31. Robert L., Paul G., Chen Y. et al. Pre-dispositions and epigenetic inheritance in the *Escherichia coli* lactose operon bistable switch // *Mol. Syst. Biol.* 2010. V. 6. № 1. P. 357.
<https://doi.org/10.1038/msb.2010.12>
32. Díaz-Hernández O., Santillán M. Bistable behavior of the lac operon in *E. coli* when induced with a mixture of lactose and TMG // *Front. Physiol.* 2010. V. 1. P. 158.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2010.00022>
33. Wang X., Jiang S., Deng Z. et al. Genetic variants of the oppA gene are involved in metabolic regulation of surfactin in *Bacillus subtilis* // *Microb. Cell Factories.* 2019. V. 18. № 1. P. 1–12.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuy036>
34. Sánchez-Romero M.A., Cota I., Casadesús J. DNA methylation in bacteria: from the methyl group to the methylome // *Curr. Opin. Microbiol.* 2015. V. 25. P. 9–16.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.03.004>
35. Trautner T.A., Pawlek B., Bron S. et al. Restriction and modification in *B. subtilis* // *Mol. Gen. Genet. MGG.* 1974. V. 131. № 3. P. 181–191.
<https://doi.org/10.1007/BF00267958>
36. Sitaraman R. The role of DNA restriction-modification systems in the biology of *Bacillus anthracis* // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. P. 11.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00011>
37. Liu G., Jiang Y.M., Liu Y.C. et al. A novel DNA methylation motif identified in *Bacillus pumilus* BA06 and possible roles in the regulation of gene expression // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2020. V. 104. № 8. P. 3445–3457.
<https://doi.org/10.1007/s00253-020-10475-5>
38. Guha S., Guschibauer W. Expression of *Escherichia coli* dam gene in *Bacillus subtilis* provokes DNA damage response: N6–methyladenine is removed by two repair pathways // *Nucl. Acids Res.* 1992. V. 20. № 14. P. 3607–3615.
<https://doi.org/10.1093/nar/20.14.3607>
39. Low D.A., Casadesús J. Clocks and switches: Bacterial gene regulation by DNA adenine methylation // *Curr. Opin. Microbiol.* 2008. V. 11. № 2. P. 106–112.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.02.012>
40. Nye T.M., van Gijtenbeek L.A., Stevens A.G. et al. Methyltransferase DnmA is responsible for genome-wide N6-methyladenosine modifications at non-palindromic recognition sites in *Bacillus subtilis* // *Nucl. Acids Res.* 2020. V. 48. № 10. P. 5332–5348.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa266>
41. Olivenza D.R., Nicoloff H., Sánchez-Romero M.A. et al. A portable epigenetic switch for bistable gene expression in bacteria: 1 // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 11261.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-47650-2>
42. Taghbalout A., Landoulsi A., Kern R. et al. Competition between the replication initiator DnaA and the sequestration factor SeqA for binding to the hemimethylated chromosomal origin of *E. coli in vitro* // *Genes Cells.* 2000. V. 5. № 11. P. 873–884.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2000.00380.x>
43. Haldenwang W.G. The sigma factors of *Bacillus subtilis* // *Microbiol Rev.* 1995. V. 59. № 1. P. 1–30.
<https://doi.org/10.1128/mr.59.1.1-30.1995>
44. Zhu B., Stülke J. SubtiWiki in 2018: from genes and proteins to functional network annotation of the model organism *Bacillus subtilis* // *Nucl. Acids Res.* 2018. V. 46. № D1. P. D743–D748.
45. Mauri M., Klumpp S. A model for sigma factor competition in bacterial cells // *PLoS Comput. Biol.* 2014. V. 10. № 10. P. e1003845.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003845>
46. Steuten B., Hoch P.G., Damm K. et al. Regulation of transcription by 6S RNAs // *RNA Biol.* 2014. V. 11. № 5. P. 508–521.
<https://doi.org/10.4161/rna.28827>
47. Fabret C., Feher V.A., Hoch J.A. Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: how one organism sees its world // *J. Bacteriol.* 1999. V. 181. № 7. P. 1975–1983.
<https://doi.org/10.1128/JB.181.7.1975-1983.1999>
48. O'Toole G.A., Wong G.C. Sensational biofilms: surface sensing in bacteria // *Curr. Opin. Microbiol.* 2016. V. 30. P. 139–146.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.02.004>
49. Iglesias V., de Groot N.S., Ventura S. Computational analysis of candidate prion-like proteins in bacteria and their role // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. P. 1123.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01123>
50. Bieler S., Estrada L., Lagos R. et al. Amyloid formation modulates the biological activity of a bacterial protein //

- J. Biol. Chem. 2005. V. 280. № 29. P. 26880–26885. Epub 2005 May 25. PMID: 15917245. <https://doi.org/10.1074/jbc.M50203120015917245>
51. Yuan A.H., Hochschild A. A bacterial global regulator forms a prion // *Science*. 2017. V. 355. № 6321. P. 198–201. <https://doi.org/10.1126/science.aai7776>
 52. Shahnawaz M., Park K.W., Mukherjee A. et al. Prion-like characteristics of the bacterial protein Microcin E492: 1 // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 45720. <https://doi.org/10.1038/srep45720>
 53. Otzen D., Riek R. Functional Amyloids // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2019. V. 11. № 12. P. a033860. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033860>
 54. Kassinger S.J., van Hoek M.L. Biofilm architecture: An emerging synthetic biology target // *Synth. Syst. Biotechnol.* 2020. V. 5. № 1. P. 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2020.01.001>
 55. Kalamara M., Spacapan M., Mandic-Mulec I. et al. Social behaviours by *Bacillus subtilis*: quorum sensing, kin discrimination and beyond // *Mol. Microbiol.* 2018. V. 110. № 6. P. 863–878. <https://doi.org/10.1111/mmi.14127>
 56. Gastérum G., de la Torre M., Rocha J. Rap protein paralogs of *Bacillus thuringiensis*: A multifunctional and redundant regulatory repertoire for the control of collective functions // *J. Bacteriol.* 2020. V. 202. № 6. P. e00747-19. <https://doi.org/10.1128/JB.00747-19>
 57. Bailly-Bechet M., Benecke A., Hardt W.D. et al. An externally modulated, noise-driven switch for the regulation of SPI1 in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* // *J. Math. Biol.* 2011. V. 63. № 4. P. 637–662.
 58. Silva-Rocha R., de Lorenzo V. Noise and robustness in prokaryotic regulatory networks // *Annu. Rev. Microbiol.* 2010. V. 64. № 1. P. 257–275.
 59. Wassarman K.M. 6S RNA, a global regulator of transcription // *Regulating with RNA in Bacteria and Archaea*. John Wiley & Sons, Ltd., 2018. P. 355–367. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.RWR-0019-2018>
 60. Burenina O.Y., Hoch P.G., Damm K. et al. Mechanistic comparison of *Bacillus subtilis* 6S-1 and 6S-2 RNAs—commonalities and differences // *RNA*. 2014. V. 20. № 3. P. 348–359. <https://doi.org/10.1261/rna.042077.113>
 61. Mutlu A., Trauth S., Ziesack M. et al. Phenotypic memory in *Bacillus subtilis* links dormancy entry and exit by a spore quantity-quality tradeoff: 1 // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 69. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02477-1>
 62. Freyre-González J.A., Manjarrez-Casas A.M., Merino E. et al. Lessons from the modular organization of the transcriptional regulatory network of *Bacillus subtilis* // *BMC Syst. Biol.* 2013. V. 7. № 1. P. 127. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-7-127>
 63. Schultz D., Wolynes P.G., Ben Jacob E. et al. Deciding fate in adverse times: Sporulation and competence in *Bacillus subtilis* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. № 50. P. 21027–21034. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912185106>
 64. Faria J.P., Overbeek R., Taylor R.C. et al. Reconstruction of the regulatory network for *Bacillus subtilis* and reconciliation with gene expression data // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. P. 275. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00275>
 65. Vlamakis H., Chai Y., Beaugregard P. et al. Sticking together: Building a biofilm the *Bacillus subtilis* way: 3 // *Nat. Rev. Microbiol.* 2013. V. 11. № 3. P. 157–168. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2960>
 66. Cairns L.S., Hobley L., Stanley-Wall N.R. Biofilm formation by *Bacillus subtilis*: New insights into regulatory strategies and assembly mechanisms // *Mol. Microbiol.* 2014. V. 93. № 4. P. 587–598. <https://doi.org/10.1111/mmi.12697>
 67. Steinberg N., Kolodkin-Gal I. The matrix reloaded: Probing the extracellular matrix synchronizes bacterial communities // *J. Bacteriol.* 2015. V. 197. № 13. P. 2092–2103. <https://doi.org/10.1128/JB.02516-14>
 68. Xu Y.Y., Liu S., Zhang Y. et al. Role of DNA methylation in persister formation in uropathogenic *E. coli* // *bioRxiv*. 2020. P. 2020.01.07.897686. <https://doi.org/10.1101/2020.01.07.897686>
 69. Mirończuk A.M., Kovács Á.T., Kuipers O.P. Induction of natural competence in *Bacillus cereus* ATCC14579 // *Microb. Biotechnol.* 2008. V. 1. № 3. P. 226–235. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2008.00023.x>
 70. Attaiech L., Charpentier X. Silently transformable: The many ways bacteria conceal their built-in capacity of genetic exchange // *Curr. Genet.* 2017. V. 63. № 3. P. 451–455. <https://doi.org/10.1007/s00294-016-0663-6>
 71. Tan I.S., Ramamurthi K.S. Spore formation in *Bacillus subtilis* // *Environ. Microbiol. Rep.* 2014. V. 6. № 3. P. 212–225. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12130>
 72. Errington J. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*: 2 // *Nat. Rev. Microbiol.* 2003. V. 1. № 2. P. 117–126. <https://doi.org/10.1038/nrmicro750>
 73. Engelberg-Kulka H., Amitai S., Kolodkin-Gal I. et al. Bacterial programmed cell death and multicellular behavior in bacteria // *PLOS Genet.* 2006. V. 2. № 10. P. e135. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020135>
 74. Caro-Astorga J., Frenzel E., Perkins J.R. et al. Biofilm formation displays intrinsic offensive and defensive features of *Bacillus cereus*: 1 // *Npj Biofilms Microbiomes*. 2020. V. 6. № 1. P. 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41522-019-0112-7>
 75. Majed R., Faille C., Kallassy M. et al. *Bacillus cereus* Biofilms—Same, Only Different // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. P. 1054. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01054>

76. Pflughoeft K.J., Sumbly P., Koehler T.M. *Bacillus anthracis* sin locus and regulation of secreted proteases // J. Bacteriol. Am. Soc. Microbiol. 2011. V. 193. № 3. P. 631–639.
<https://doi.org/10.1128/JB.01083-10>
77. Fagerlund A., Dubois T., Økstad O.A. et al. SinR controls enterotoxin expression in *Bacillus thuringiensis* biofilms // PLoS One. 2014. V. 9. № 1. P. e87532.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087532>
78. Grandvalet C., Gominet M., Lereclus D. Identification of genes involved in the activation of the *Bacillus thuringiensis* inhA metalloprotease gene at the onset of sporulation. The GenBank/EMBL/DDBJ accession number for the sequence reported in this paper is AF287346 // Microbiology. 2001. V. 147. № 7. P. 1805–1813.
<https://doi.org/10.1099/00221287-147-7-1805>
79. Balaban N.Q., Merrin J., Chait R. et al. Bacterial persistence as a phenotypic switch // Science. 2004. V. 305. № 5690. P. 1622–1625.
<https://doi.org/10.1126/science.1099390>
80. Day T. Interpreting phenotypic antibiotic tolerance and persister cells as evolution via epigenetic inheritance // Mol. Ecol. 2016. V. 25. № 8. P. 1869–1882.
<https://doi.org/10.1111/mec.13603>
81. Lewis K. Persister cells // Annu. Rev. Microbiol. 2010. V. 64. № 1. P. 357–372.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134306>
82. Manuse S., Shan Y., Canas-Duarte S.J. et al. Bacterial persisters are a stochastically formed subpopulation of low-energy cells // PLoS Biol. 2021. V. 19. № 4. P. e3001194.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001194>
83. Windels E.M., Michiels J.E., Fauvart M. et al. Bacterial persistence promotes the evolution of antibiotic resistance by increasing survival and mutation rates: 5 // ISME J. 2019. V. 13. № 5. P. 1239–1251.
<https://doi.org/10.1038/s41396-019-0344-9>
84. Mercier R., Kawai Y., Errington J. General principles for the formation and proliferation of a wall-free (L-form) state in bacteria // eLife. 2014. V. 3. P. e04629.
<https://doi.org/10.7554/eLife.04629>
85. Domínguez-Cuevas P., Mercier R., Leaver M. et al. The rod to L-form transition of *Bacillus subtilis* is limited by a requirement for the protoplast to escape from the cell wall sacculus // Mol. Microbiol. 2012. V. 83. № 1. P. 52–66.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07920.x>
86. Veening J.-W., Stewart E.J., Berngruber T.W. et al. Bet-hedging and epigenetic inheritance in bacterial cell development // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. № 11. P. 4393–4398.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0700463105>
87. Dunn G., Mandelstam J. Cell polarity in *Bacillus subtilis*: Effect of growth conditions on spore positions in sister cells // J. Gen. Microbiol. 1977. V. 103. № 1. P. 201–205.
<https://doi.org/10.1099/00221287-103-1-201>
88. Rokney A., Shagan M., Kessel M. et al. *E. coli* transports aggregated proteins to the poles by a specific and energy-dependent process // J. Mol. Biol. 2009. V. 392. № 3. P. 589–601.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.07.009>
89. Winkler J., Seybert A., König L. et al. Quantitative and spatio-temporal features of protein aggregation in *Escherichia coli* and consequences on protein quality control and cellular ageing // EMBO J. 2010. V. 29. № 5. P. 910–923.
<https://doi.org/10.1038/emboj.2009.412>
90. Rang C.U., Proenca A., Buetz C. et al. Minicells as a damage disposal mechanism in *Escherichia coli* // mSphere. 2018. V. 3. № 5. P. e00428-18.
<https://doi.org/10.1128/mSphere.00428-18>
91. He C., Zhou C., Kennedy B.K. The yeast replicative aging model // Biochim. Biophys. Acta BBA – Mol. Basis Dis. 2018. V. 1864. № 9. Part A. P. 2690–2696.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.02.023>
92. Osiewacz H.D. Genes, mitochondria and aging in filamentous fungi // Ageing Res. Rev. 2002. V. 1. № 3. P. 425–442.
[https://doi.org/10.1016/s1568-1637\(02\)00010-7](https://doi.org/10.1016/s1568-1637(02)00010-7)
93. Martin M., Dragos A., Otto S.B. et al. Cheaters shape the evolution of phenotypic heterogeneity in *Bacillus subtilis* biofilms: 9 // ISME J. 2020. V. 14. № 9. P. 2302–2312.
94. Lyons N.A., Kolter R. A single mutation in rapP induces cheating to prevent cheating in *Bacillus subtilis* by minimizing public good production: 1 // Commun. Biol. 2018. V. 1. № 1. P. 1–12.
<https://doi.org/10.1038/s42003-018-0136-1>
95. True H.L., Lindquist S.L. A yeast prion provides a mechanism for genetic variation and phenotypic diversity: 6803 // Nature. 2000. V. 407. № 6803. P. 477–483.
<https://doi.org/10.1038/35035005>
96. Wickner R.B., Edskes H.K., Bateman D. et al. The yeast prions [PSI⁺] and [URE3] are molecular degenerative diseases // Prion. 2011. V. 5. № 4. P. 258–262.
<https://doi.org/10.4161/pri.17748>
97. Beaumont H.J., Gallie J., Kost C. et al. Experimental evolution of bet hedging // Nature. 2009. V. 462. № 7269. P. 90–93.
<https://doi.org/10.1038/nature08504>
98. Kovács Á.T., Dragoš A. Evolved biofilm: Review on the experimental evolution studies of *Bacillus subtilis* pellicles // J. Mol. Biol. 2019. V. 431. № 23. P. 4749–4759.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.02.005>
99. Libby E., Ratcliff W.C. Short-sighted evolution constrains the efficacy of long-term bet hedging // Am. Nat. 2019. V. 193. № 3. P. 409–423.
<https://doi.org/10.1086/701786>
100. Sharma D., Misba L., Khan A.U. Antibiotics versus biofilm: An emerging battleground in microbial communities // Antimicrob. Resist. Infect. Control. 2019. V. 8. № 1. P. 76.
<https://doi.org/10.1186/s13756-019-0533-3>
101. Etesami H., Emami S., Alikhani H.A. Potassium solubilizing bacteria (KSB): Mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects – A review // J. Soil Sci. Plant Nutr. 2017. V. 17. № 4. P. 897–911.
<https://doi.org/10.4067/S0718-95162017000400005>

Epigenetic Mechanisms of Gene Expression Regulation in Bacteria of the Genus *Bacillus*

N. G. Vasilchenko^{a, *}, E. V. Prazdnova^a, and E. Lewitin^b

^a Southern Federal University, Academy of Biology and Biotechnology, Rostov-on-Don, 344058 Russia

^b State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, 117545 Russia

*e-mail: nvasilchenko@sfedu.ru

The explosive development of molecular genetic technologies has made it possible to analyze in detail phenomena that can be classified as epigenetic – phenotypic switches in bacterial cell cultures. Phenotype changes against the background of an unchanged genome may be a temporary reaction to external factors and disappear with changing conditions, or may be due to cellular differentiation, maintained independently of external factors. The literature uses an extremely heterogeneous terminology with synonymous terms for such phenomena depending on their features (bistability, specialization, hysteresis, phase variation, dissociation). One of the goals of this review is the systematization of the used terminology. Representatives of the genus *Bacillus* were chosen as the object of analysis, since a significant number of epigenetic phenomena have been identified in them. In addition, the bistability phenomenon is an important factor influencing the efficiency of the use of bacteria of the genus *Bacillus* in biotechnological processes. This work gives a brief overview of epigenetic switches in the genus *Bacillus*, their mechanisms, methods of detection and investigation, their possible evolutionary and ecological role, as well as practical applications.

Keywords: *Bacillus*, epigenetic heritability mechanisms, cell differentiation, cooperative behavior of bacteria, quorum sensing, signaling network, bistability.

**ОБЗОРНЫЕ
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ**

УДК 633.111.1

**ПЕРСПЕКТИВА ВНЕДРЕНИЯ АЛЛЕЛЯ *Ppd-D1a* В СОРТА ЯРОВОЙ
МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ В РОССИИ**

© 2022 г. С. Б. Лепехов*

Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, Барнаул, 656910 Россия

*e-mail: sergei.lepehov@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.03.2021 г.

После доработки 13.04.2021 г.

Принята к публикации 12.05.2021 г.

Сорта яровой мягкой пшеницы с аллелью *Ppd-D1a* нечувствительны к фотопериоду и широко распространены в мире. В России подавляющее большинство сортов яровой мягкой пшеницы чувствительны к длине светового дня. Внедрение аллеля *Ppd-D1a* в российские сорта яровой мягкой пшеницы позволит ускорить селекционный процесс, используя одну–две дополнительные вегетации в год. Цели работы: 1) рассмотреть закономерности распространения аллеля *Ppd-D1a* среди яровой мягкой пшеницы северного полушария, 2) выявить влияние аллеля *Ppd-D1a* на агрономические признаки яровой мягкой пшеницы, 3) наметить основные пути селекционной работы при создании российских сортов яровой мягкой пшеницы, нечувствительной к фотопериоду. Частота встречаемости аллеля *Ppd-D1a* возрастает от стран верхних широт к странам нижних широт. Влияние аллеля *Ppd-D1a* на агрономические признаки зависит от географической широты проведения эксперимента и сводится к сокращению периода “всходы – колошение”, к снижению высоты растения, количества колосков в колосе и содержания белка в зерне, к повышению продолжительности функционирования листьев после колошения. Аллель *Ppd-D1a* оказывает отрицательное влияние на урожайность пшеницы севернее 50° с.ш. Высокая встречаемость аллеля *Ppd-D1a* в канадских сортах яровой мягкой пшеницы свидетельствует о том, что данный аллель может получить распространение в некоторых регионах России. Отрицательные эффекты, вызванные наличием аллеля *Ppd-D1a*, могут быть компенсированы обоснованным подбором родительских пар для гибридизации.

Ключевые слова: яровая мягкая пшеница, чувствительность к фотопериоду, отрицательный эффект признака, *Ppd-D1a*, ускорение селекции.

DOI: 10.31857/S0016675822010064

На длительность периода “всходы–колошение” у мягкой пшеницы влияют три генетические системы: гены чувствительности к яровизации – *Vrn*, гены чувствительности к фотопериоду – *Ppd* и гены *Eps* (earliness *per se*) [1]. Гены чувствительности к яровизации и фотопериоду ускоряют или замедляют наступление колошения у пшеницы в зависимости от стимулов окружающей среды [2]. Например, в высокоширотных регионах северного полушария гены чувствительности к яровизации задерживают развитие колоса у озимых сортов, для избежания повреждения органов цветка низкими температурами зимой. В регионах, где лето слишком жаркое, гены нечувствительности к фотопериоду ускоряют развитие колоса, чтобы растение успело вступить в репродуктивную фазу до наступления жары [3].

Пшеница относится к растениям длинного светового дня, но нечувствительность к фотопериоду – это важная составляющая ее изменений в ходе Зеленой революции [4]. Реакция различных

генотипов на фотопериод находится под контролем серии генов чувствительности к фотопериоду (*Ppd*) [5]. На сегодняшний день идентифицировано три таких гена, включая *Ppd-A1*, *Ppd-B1* и *Ppd-D1*, локализованных на хромосомах 2A, 2B и 2D соответственно [6, 7]. Аналогично генетической системе *Vrn* (за исключением *Vrn-B1*), доминантные аллели локуса *Ppd* (*Ppd1a*) придают растению нечувствительность к длине светового дня, а рецессивные аллели (*Ppd1b*) детерминируют чувствительность к фотопериоду [8]. Ген *Ppd-D1* обладает самым сильным эффектом. За ним по силе влияния следуют *Ppd-B1* и *Ppd-A1* [9]. Различия между аллелями гена *Ppd-D1* вызваны делецией 2089 пн у аллеля *Ppd-D1a*. Аллель нечувствительности к фотопериоду *Ppd-D1a* гексаплоидной пшеницы на самом деле экспрессируется неправильно, то есть активируется без сигнала окружающей среды или продолжительности дня и изменяет экспрессию ключевого цветочного регулятора FT, вызывая более раннее цветение [4].

Низкая фотопериодическая чувствительность важна для сортов, возделываемых на широте южнее 45° с.ш., где световой день может быть коротким [10]. Пшеница с аллелем *Ppd-D1a* имеет одинаковый период от всходов до колошения как при коротком (<10 ч), так и при длинном световом (>16 ч) дне. Чувствительная к фотопериоду пшеница с аллелем *Ppd-D1b* при коротком дне существенно задерживает колошение. Нечувствительность к фотопериоду позволяет получать несколько урожаев в год [11] или проводить посев в отличное от традиционной для России посевной кампании время года, то есть не поздней весной. Внедрение аллеля *Ppd-D1a* в российские сорта яровой мягкой пшеницы позволит ускорить селекционный процесс, используя одну–две дополнительные вегетации в год. В масштабном сравнении сортов яровой мягкой пшеницы, созданных в Северном Казахстане, Западной Сибири, канадских прериях, севере США, Северо-Восточном Китае и генотипов из СИММИТ, продемонстрирована широкая адаптация для казахстанских и сибирских сортов в северных пунктах испытания, а также их строгая фотопериодическая чувствительность [12].

Цель работы: 1) рассмотреть закономерности распространения аллеля *Ppd-D1a* среди яровой мягкой пшеницы северного полушария, 2) выявить влияние аллеля *Ppd-D1a* на морфобиологические признаки у яровой мягкой пшеницы, высеваемой весной, 3) наметить основные пути селекционной работы при создании российских сортов яровой мягкой пшеницы нечувствительной к фотопериоду.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ АЛЛЕЛЯ *Ppd-D1a* В СЕВЕРНОМ ПОЛУШАРИИ И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА АГРОНОМИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

Во всем мире широко распространены сорта пшеницы, нечувствительные к фотопериоду. Однако таких сортов больше в регионах, где яровая пшеница выращивается в течение зимнего периода, а озимая пшеница, посеянная осенью, должна созреть в следующем году до наступления высоких температур, как в случае Южной Европы [13].

Для яровой пшеницы характерно возрастание доли чувствительных к фотопериоду сортов при продвижении с юга на север (табл. 1). Нечувствительность к фотопериоду была передана европейским сортам мягкой пшеницы итальянским селекционером Н. Стрампелли, который использовал японский сорт Акакотуги для уменьшения длины соломины и сокращения периода “всходы–колошение” [29]. Значительному распространению нечувствительности к фотопериоду у пшениц в Северной Африке, Средиземноморье и Азии способствовало привлечение в скрещивания сортов из СИММИТ и ИКАРДА [30]. В Япо-

нии скороспелые сорта с аллелем *Ppd-D1a* отбирались для избегания предуборочного прорастания и поражения фузариозом [21]. Вероятно, селекционеры закрепили наиболее подходящий вариант гена *Ppd* для местных условий на основе отбора по агрономически важным признакам [24]. Так, у всех сортов, возделываемых в пакистанских провинциях Пенджаб и Синдх до Зеленой революции, обнаружен аллель *Ppd-D1a* [16].

В исследовании Лихенко с соавт. [27] обнаружен только один сибирский сорт с аллелем *Ppd-D1a* – Тулун 15. В исследовании 2014 г. в России обнаружено всего пять сортов яровой мягкой пшеницы, из них четыре гетерогенных сорта с аллелем *Ppd-D1a* [28].

Сорта яровой мягкой пшеницы с аллелем *Ppd-D1a* всегда колосятся раньше, чем сорта с аллелем *Ppd-D1b* [31]. Несоблюдение требований фотопериода у чувствительных сортов (с аллелем *Ppd-D1b*) задерживает колошение, величина которого зависит от географической широты региона произрастания [3]. Мы проанализировали результаты девяти исследований о влиянии аллелей гена *Ppd-D1* на длительность периода “всходы–колошение”. Если в работе данный показатель не приводился для каждой географической точки, то рассчитывалась средняя географическая широта проведения полевого эксперимента (рис. 1).

Установлен средний, но статистически незначимый коэффициент корреляции между географической широтой проведения эксперимента и разностью дат колошения у генотипов с аллелями *Ppd-D1b* и *Ppd-D1a* ($r = -0.59$). Уравнение линейной регрессии позволяет предположить более раннее наступление колошения для сортов с аллелем *Ppd-D1a* на 2.1–0.7 дня на широте 50 – 55 градусов – основной широте сева яровой мягкой пшеницы в России. Таким образом, анализ данных подтвердил часто встречающийся в научной литературе тезис о минимальном влиянии аллеля *Ppd-D1a* на ускорение фазы колошения в северных районах возделывания пшеницы с продолжительным летним днем [9, 37], поскольку естественной длины дня достаточно для удовлетворения требований растений к фотопериоду [38].

Аллели локуса *Ppd-D1* имеют плейотропный эффект, величина которого зависит от географической широты и от генетического фона испытываемых линий [39]. Универсальное влияние аллеля *Ppd-D1a*, обнаруженное во многих исследованиях, сводится к снижению высоты растений [10, 25, 26, 33, 38], уменьшению количества колосков в колосе [10, 40], снижению содержания белка в зерне [25, 38], более продолжительному функционированию флагового листа после колошения [32, 33].

Влияние генов фотопериодической чувствительности на урожайность варьирует в засимости

Таблица 1. Распространение аллеля *Ppd-D1a* среди яровой мягкой пшеницы в северном полушарии (регионы упорядочены по географической широте)

Регион (страна)	Изучено образцов	Выявлено образцов с аллелем <i>Ppd-D1a</i>	%	Литературный источник
Индия	99	90	91	[14]
Пакистан	59	58	98	[15]
	119	107	90	[16]
Марокко	20	3	15	[17]
Южная Корея ¹	15	15	100	[18]
Турция ²	11	10	91	[19]
Южная Европа (Португалия, Испания, Италия, Албания, бывшая Югославия, Греция, Болгария)	55	18	33	[20]
Болгария	2	1	50	[13]
Хоккайдо (Япония)	10	1	10	[21]
Северо-восточная зона яровой пшеницы в Китае	25	9	36	[22]
Украина ³	27	9	33	[23]
Западная и Центральная Европа (Великобритания, Франция, Бельгия, Германия, Чехия, Румыния)	167	2	1	[20]
Беларусь	98	0	0	[24]
Канада	82	26	32	[25]
	70	26	37	[26]
Сибирь (Россия)	48	1	2	[27]
Россия ⁴	143	5	3	[28]
Северная Европа (Швеция, Норвегия, Финляндия)	23	1	4	[20]

Примечание: 1 – яровыми считались сорта гаплотипа *vrn-A1, vrn-B1, Vrn-D1*; 2 – 11 сортов, созданных с 2000 по 2006 гг., хотя бы с одним доминантным геном *Vrn*; 3 – учтены гомо- и гетерогенные сорта с аллелем *Ppd-D1a*; 4 – общее количество включает четыре гетерогенных сорта по аллелю *Ppd-D1a*.

от географической широты и даты посева [41, 42]. Зависимость такова, что сравнение генотипов, различающихся по фотопериодической чувствительности, в нижних широтах Северной Америки (44°–49° с.ш.) выявляет преимущество аллеля *Ppd-D1a* [26, 38, 39], а в верхних широтах Северной Америки (49°–53° с.ш.) – аллеля *Ppd-D1b* [10, 33, 36, 43]. Также имеются данные о нейтральном влиянии гена на урожайность в тех же широтах (46°–53° с.ш.) [25, 32, 34].

СОЗДАНИЕ СОРТОВ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ С АЛЛЕЛЕМ *Ppd-D1a* ДЛЯ РОССИИ

Основное преимущество, которое дает нечувствительность к фотопериоду, заключается в возможности возделывания яровой мягкой пшеницы в межсезонье [44]. Это может быть как челночная селекция, так и выращивание пшеницы в

вегетационных комнатах селекционеров России. Пшеница с аллелем *Ppd-D1a* способна колоситься и формировать зерновки при минимальных затратах на искусственное освещение и даже при естественном освещении при посеве в сентябре. Эта особенность позволит получить одну–две дополнительные вегетации в год, которые могут быть использованы для сокращения времени создания селекционных линий и для выравнивания генетически неоднородного селекционного материала. Другие возможные направления использования сортов с аллелем *Ppd-D1a* – селекция на скороспелость и сокращение длины соломины.

Данные табл. 1 демонстрируют общеизвестную закономерность возрастания доли чувствительных к фотопериоду сортов яровой мягкой пшеницы при продвижении с юга на север. Однако частота аллеля *Ppd-D1a* у сортов Канады не укладывается в общую тенденцию. В Канаде ген

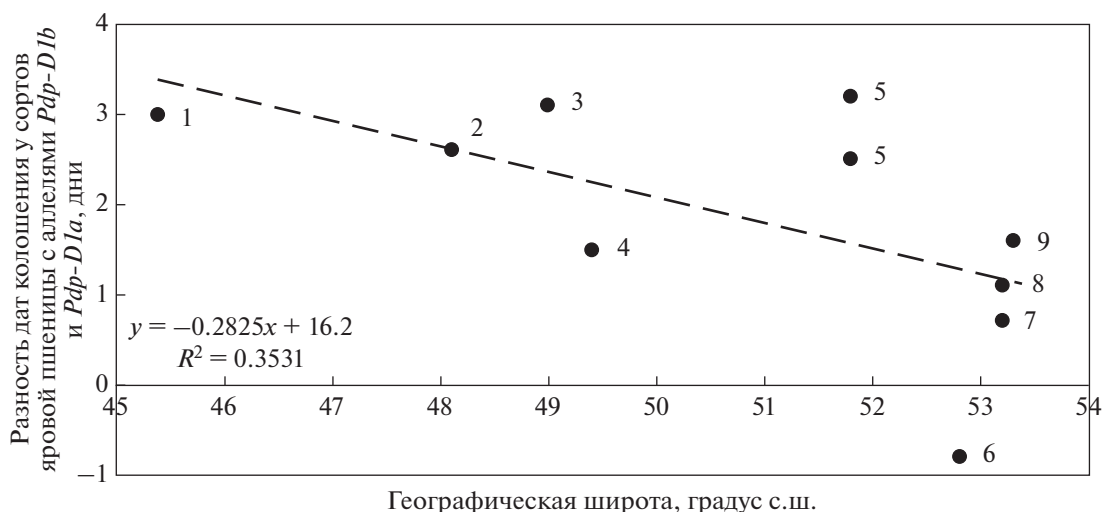


Рис. 1. Влияние географической широты и разности дат колошения у генотипов с аллелями *Ppd-D1b* и *Ppd-D1a*. Номер точки соответствует исследованию: 1 – [32], 2 – [33], 3 – [10], 4, 9 – [34], 5 – [20], 6 – [25], 7 – [35], 8 – [36]. R^2 – коэффициент детерминации.

Ppd-D1a был внедрен в местные сорта в 1986 г., чтобы использовать челночную селекцию для продвижения поколений в межсезонье [25]. Встречаемость аллеля *Ppd-D1a* у канадских сортов яровой мягкой пшеницы аномально высока по сравнению с пшеницей из стран той же географической широты (табл. 1). А. Kamran с соавт. при исследовании канадских сортов и селекционных линий обнаружили аллель *Ppd-D1a* у 72% генотипов [34]. Таким образом, факт уже свершившегося распространения аллеля *Ppd-D1a* у сортов яровой мягкой пшеницы в Канаде позволяет говорить, по крайней мере, об актуальности аналогичных исследований для России.

Очевидно, что использование аллеля *Ppd-D1a* для ускорения селекции возможно, только если нечувствительность к фотопериоду не оказывает негативного влияния на урожайность [33].

Не до конца понятным остается вопрос: связано ли снижение урожайности, при сравнении чувствительных и нечувствительных к фотопериоду изогенных линий в северных широтах, с действием аллеля *Ppd-D1a* или со скороспелостью, к которой ведет наличие этого аллеля? Скороспелость не является оптимальным признаком для регионов с удовлетворительными по влагообеспеченности условиями, а также в природных зонах с достаточно увлажненной второй половиной лета, например в степных районах Сибири. Общеизвестна отрицательная взаимосвязь между длительностью периода “всходы–колошение” и урожайностью [45]. Укороченный вегетационный период, вызванный наличием аллеля *Ppd-D1a*, может быть компенсирован заменой одних аллелей генов *Vrn* другими, а также исключением ге-

нов *Eps*. Это осуществимо, поскольку для генов *Ppd-D1*, *Vrn* и *Eps* описан аддитивный тип взаимодействия [35, 46]. Кроме того, аллелей пяти главных генов развития (*Ppd-B1*, *Ppd-D1*, *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1*) недостаточно для объяснения значительной части изменчивости периода “всходы–колошение” [47], поэтому возможность компенсировать раннее колошение у линий с аллелем *Ppd-D1a* не сводится только к генам яровизации. Например, сочетание гена *Rht12*, замедляющего колошение, и аллеля *Ppd-D1a*, ускоряющего колошение, у озимой пшеницы позволило добиться оптимального времени колошения [48]. Ф. Yang с соавт. приводят пример нечувствительного к фотопериоду китайского сорта Kefeng 4 с аллелем *Ppd-D1a*, который на широте 48° конкурировал с чувствительными к фотопериоду сортами. Авторы предположили наличие у этого сорта каких-то других генов, влияющих на период “всходы–колошение” [22]. Известно, что генетический фон также влияет на величину сокращения периода “всходы–колошение” у изогенных линий с аллелем *Ppd-D1a* [38, 39].

Возможная причина некоторых неудач, при вовлечении в скрещивания иностранных сортов с аллелем *Ppd-D1a* в России, могла заключаться в сцеплении гена *Ppd1* и гена редукции высоты растения *Rht8* [49]. Поскольку *Rht8* и *Ppd-D1a* действуют независимо и аддитивно на высоту растения, комбинирующий эффект двух генов больше, чем эффект каждого гена по отдельности [50]. Снижения длины соломины нельзя допускать по причине взаимосвязи высоты растения и засухоустойчивости [51]. Так как все аллели генов *Vrn* и *Ppd*, ассоциированные с ранним колошением,

снижают высоту растения [25], такие фенотипы, вероятно, браковались селекционерами. Снижение высоты растения, вызванное наличием аллеля *Ppd-D1a*, может быть компенсировано за счет скрещиваний с традиционными высокорослыми сортами яровой мягкой пшеницы России.

Негативное влияние на количество колосков в колосе, связанное с присутствием аллеля *Ppd-D1a*, может быть погашено путем гибридизации с крупноколосыми сортами. Работа по изучению исходного материала для селекции ведется повсеместно, поэтому нахождение источников необходимых признаков не будет затруднено.

Непонятным остается вопрос о положительном влиянии аллеля *Ppd-D1a* на длительность функционирования флагового листа после колошения. Имеет ли влияние на этот признак сам ген *Ppd-D1* или какой-то другой сцепленный с ним ген? Так, обнаружен QTL для сохранности зеленой окраски листа после колошения на хромосоме 2D, который косегрегировал с геном *Ppd-D1* [52]. Меньшее содержание белка в зерне у линий с аллелем *Ppd-D1a* может быть следствием более длительной жизни их листьев после колошения, поскольку выявлена отрицательная корреляция между данными признаками [53].

Украинские исследователи полагают, что чувствительность к фотопериоду не критична для адаптации мягкой пшеницы [23]. В Северной Америке в локусе *Ppd-D1* закрепились как чувствительные, так и нечувствительные к фотопериоду аллели, вероятно в результате отбора в пользу нечувствительного аллеля в жаркие годы и чувствительного – в более прохладные годы [54].

Таким образом, частота встречаемости аллеля *Ppd-D1a* возрастает от стран верхних широт к странам нижних широт. Влияние аллеля *Ppd-D1a* на агрономические признаки зависит от географической широты проведения эксперимента и сводится к сокращению периода “всходы–колошение”, к снижению высоты растения, количества колосков в колосе и содержания белка в зерне, к повышению продолжительности функционирования листьев после колошения. Аллель *Ppd-D1a* оказывает отрицательное влияние на урожайность пшеницы севернее 50° с.ш. Внедрение аллеля *Ppd-D1a*, вызывающего нечувствительность к фотопериоду, в сорта яровой мягкой пшеницы, будет способствовать ускорению селекционного процесса в России. Возможный негативный эффект рассматриваемого аллеля на урожайность будет компенсирован обоснованным подбором пар для скрещиваний, а также за счет меньшего времени, требуемого на создание линий, следовательно, работой с большим количеством вариантов сочетания генов и признаков.

Работа выполнена в рамках государственного задания Федерального Алтайского научного центра агробиотехнологий 0534-2019-0013 “Использование молекулярно-генетических методов исследований в селекции растений”.

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Stelmakh A.F.* Genetic systems regulating flowering response in wheat // *Wheat: Prospects for Global Improvement. Developments in Plant Breeding*. Dordrecht: 1997. V. 6. P. 491–501.
https://doi.org/10.1007/978-94-011-4896-2_64
2. *Law C.N., Worland A.J.* Genetic analysis of some flowering time and adaptive traits in wheat // *New Phytol.* 1997. V. 137. Iss. 1. P. 19–28.
<https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1997.00814.x>
3. *Kamran A., Iqbal M., Spaner D.* Flowering time in wheat (*Triticum aestivum* L.): A key factor for global adaptability // *Euphytica*. 2014. V. 197. P. 1–26.
<https://doi.org/10.1007/s10681-014-1075-7>
4. *Beales J., Turner A., Griffiths S. et al.* A pseudo-response regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive *Ppd-D1a* mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Theor. Appl. Genet.* 2007. V. 115. P. 721–733.
<https://doi.org/10.1007/s00122-007-0603-4>
5. *Worland T., Snape J.W.* Genetic basis of worldwide wheat varietal improvement // *The World Wheat Book: A History of Wheat Breeding*. Paris: Lavoisier Publishing, 2001. P. 59–100.
6. *Law C.N., Sutka J., Worland A.J.* A genetic study of day length response in wheat // *Heredity*. 1978. V. 41. P. 575–585.
<https://doi.org/10.1038/hdy.1978.87>
7. *Scarth R., Law C.N.* The location of the photoperiod gene *Ppd-B1* and an additional genetic factor for ear emergence time on chromosome 2B of wheat // *Heredity*. 1983. V. 51. P. 607–619.
<https://doi.org/10.1038/hdy.1983.73>
8. *Pugsely A.T.* The photoperiodic sensitivity of some spring wheats with special reference to the variety Thatcher // *Aust. J. Agric. Res.* 1966. V. 17. Iss. 5. P. 591–599.
<https://doi.org/10.1071/AR9660591>
9. *Worland A.J.* The influence of the flowering time genes on environmental adaptability in European wheats // *Euphytica*. 1996. V. 89. P. 49–57.
<https://doi.org/10.1007/BF00015718>
10. *Dyck J., Matus-Cadiz M., Hucl P. et al.* Agronomic performance of hard red spring wheat isolines sensitive and insensitive to photoperiod // *Crop Sci.* 2004. V. 44. № 6. P. 1976–1981.
<https://doi.org/10.2135/cropsci2004.1976>

11. Mohler V., Lukman R., Ortiz-Islas S. et al. Genetic and physical mapping of photoperiod insensitive gene *Ppd-B1* in common wheat // *Euphytica*. 2004. V. 138. P. 33–40.
<https://doi.org/10.1023/B:EUPH.0000047056.58938.76>
12. Trethowan R.M., Morgunov A., He Z. et al. The global adaptation of bread wheat at high latitudes // *Euphytica*. 2006. V. 152. P. 303–316.
<https://doi.org/10.1007/s10681-006-9217-1>
13. Kolev S., Ganeva G., Christov N. et al. Allele variation in loci for adaptive response and plant height and its effect on grain yield in wheat // *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2010. V. 24. Iss. 2. P. 1807–1813.
<https://doi.org/10.2478/V10133-010-0042-2>
14. Singh S., Singh A., Jain N. et al. Molecular characterization of vernalization and photoperiod genes in wheat varieties from different agro-climatic zones of India // *Cereal Res. Communications*. 2013. V. 41. Iss. 3. P. 376–387.
<https://doi.org/10.1556/crc.2013.0017>
15. Iqbal M., Shahzad A., Ahmed I. Allelic variation at the *VrnA1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*, *Vrn-B3* and *Ppd-D1a* loci of Pakistani spring wheat cultivars // *Electronic J. Biotechnol.* 2011. V. 14. № 1. P. 1–8.
<https://doi.org/10.2225/vol14-issue1-fulltext-6>
16. Rasheed A., Xia X., Mahmood T. et al. Comparison of economically important loci in landraces and improved wheat cultivars from Pakistan // *Crop Sci.* 2016. V. 56. № 1. P. 1–15.
<https://doi.org/10.2135/cropsci2015.01.0015>
17. Henkrar F., El-Haddoury J., Ouabbou H. et al. Genetic characterization of Moroccan and the exotic bread wheat cultivars using functional and random DNA markers linked to the agronomic traits for genomics-assisted improvement // *3 Biotech.* 2016. V. 6. Iss. 1. P. 97.
<https://doi.org/10.1007/s13205-016-0413-y>
18. Cho E.J., Kang C.-S., Yoon Y.M., Park C.S. The relationship between allelic variations of *Vrn-1* and *Ppd-1* and agronomic traits in Korean wheat cultivars // *Indian J. Genet.* 2015. V. 75. № 3. P. 294–300.
<https://doi.org/10.5958/0975-6906.2015.00046.2>
19. Andeden E.E., Yediy F.E., Baloch F.S. et al. Distribution of vernalization and photoperiod genes (*Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*, *Vrn-B3*, *Ppd-D1*) in Turkish bread wheat cultivars and landraces // *Cereal Res. Communications*. 2011. V. 39. Iss. 3. P. 352–364.
<https://doi.org/10.1556/crc.39.2011.3.5>
20. Shcherban A.B., Borner A., Salina E.A. Effect of *VRN-1* and *PPD-D1* genes on heading time in European bread wheat cultivars // *Plant Breeding*. 2015. V. 134. Iss. 1. P. 49–55.
<https://doi.org/10.1111/pbr.12223>
21. Seki M., Chono M., Matsunaka H., et al. Distribution of photoperiod-insensitive alleles *Ppd-B1a* and *Ppd-D1a* and their effect on heading time in Japanese wheat cultivars // *Breeding Sci.* 2011. V. 61. Iss. 4. P. 405–412.
<https://doi.org/10.1270/jsbbs.61.405>
22. Yang F.P., Zhang X.K., Xia X.C. et al. Distribution of the photoperiod insensitive *Ppd-D1a* allele in Chinese wheat cultivars // *Euphytica*. 2009. V. 165. P. 445–452.
<https://doi.org/10.1007/s10681-008-9745-y>
23. Chebotar G., Bakuma A., Filimonov V., Chebotar S. Haplotypes of *Ppd-D1* gene and alleles of *Ppd-A1* and *Ppd-B1* in Ukrainian bread wheat varieties // *Visnyk of the Lviv University. Series Biology*. 2019. Iss. 80. P. 82–89.
<https://doi.org/10.30970/vlubs.2019.80.10>
24. Фомина Е.А., Дмитриева Т.М., Малышев С.В., Урбанович О.Ю. Молекулярно-генетическая характеристика коллекции сортов пшеницы (*Triticum aestivum* L.) по аллельному составу гена чувствительности к фотопериоду *Ppd-D1* и генов, кодирующих *cbf*-факторы *Fr-B2* локуса // *Мол. и прикладная генетика*. 2018. Т. 25. С. 7–14.
25. Chen H., Moakhar N.P., Iqbal M. et al. Genetic variation for flowering time and height reducing genes and important traits in western Canadian spring wheat // *Euphytica*. 2016. V. 208. P. 377–390.
<https://doi.org/10.1007/s10681-015-1615-9>
26. Perez-Lara E., Semagn K., Chen H. et al. Allelic variation and effects of 16 candidate genes on disease resistance in western Canadian spring wheat cultivars // *Mol. Breeding*. 2017. V. 37. № 3. P. 23.
<https://doi.org/10.1007/s11032-017-0627-7>
27. Лихенко И.Е., Стасюк А.И., Щербань А.Б. и др. Изучение аллельного состава генов *Vrn-1* и *Ppd-1* у раннеспелых и среднеранних сортов яровой мягкой пшеницы Сибири // *Вавилов. журн. генет. и селекции*. 2014. Т. 18. Вып. 4/1. С. 691–703.
28. Лысенко Н.С., Киселева А.А., Митрофанова О.П., Потюкина Е.К. Каталог мировой коллекции ВИР. Выпуск 815. Мягкая пшеница. Молекулярное тестирование аллелей *Vrn-* и *Ppd-*генов у допущенных к использованию в Российской Федерации селекционных сортов. СПб.: ВИР, 2014. 30 с.
29. Strampelli N. Early Ripening Wheats and the Advance of Italian Wheat Production. Rome: 1932. P. 5–7.
30. Ferrara G.O., Mosaad M.G., Mahalakshmi V., Rajaram S. Photoperiod and vernalisation response of Mediterranean wheats, and implications for adaptation // *Wheat: Prospects for Global Improvement. Developments in Plant Breeding*. Dordrecht: Springer, 1997. P. 509–516.
https://doi.org/10.1007/978-94-011-4896-2_66
31. Pérez-Gianmarco T.I., Slafer G.A., González F.G. Wheat pre-anthesis development as affected by photoperiod sensitivity genes (*Ppd-1*) under contrasting photoperiods // *Functional Plant Biol.* 2018. V. 45. Iss. 6. P. 645–657.
<https://doi.org/10.1071/FP17195>
32. Blake N.K., Lanning S.P., Martin J.M. et al. Effect of variation for major growth habit genes on maturity and yield in five spring wheat populations // *Crop Sci.* 2009. V. 49. № 4. P. 1211–1220.
<https://doi.org/10.2135/cropsci2008.08.0505>
33. Lanning S.P., Hucl P., Pumphrey M. et al. Agronomic performance of spring wheat as related to planting date and photoperiod response // *Crop Science*. 2012. V. 52. № 4. P. 1633–1639.
<https://doi.org/10.2135/cropsci2012.01.0052>

34. Kamran A., Randhawa H.S., Pozniak C., Spaner D. Phenotypic effects of the flowering gene complex in Canadian spring wheat germplasm // *Crop Sci.* 2013. V. 53. № 1. P. 84–94.
<https://doi.org/10.2135/cropsci2012.05.0313>
35. Kamran A., Iqbal M., Navabi A. et al. Earliness per se QTLs and their interaction with the photoperiod insensitive allele *Ppd-D1a* in the Cutler × AC Barrie spring wheat population // *Theor. Appl. Genet.* 2013. V. 126. Iss. 8. P. 1965–1976.
<https://doi.org/10.1007/s00122-013-2110-0>
36. Perez-Lara E., Semagn K., Chen H. et al. QTLs associated with agronomic traits in the Cutler × AC Barrie spring wheat mapping population using single nucleotide polymorphic markers // *PLoS One.* 2016. V. 11. Iss. 8. e0160623.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160623>
37. Файт В.И., Балашова И.А., Федорова В.Р., Бальвинская М.С. Идентификация генотипов *Ppd-1* сортов мягкой пшеницы методами генетического и STS-ПЦР анализа // Физиол. растений и генетика. 2014. Т. 46. № 4. С. 325–336.
38. Marshall L., Busch R., Cholick F. et al. Agronomic performance of spring wheat isolines differing for day length response // *Crop Sci.* 1989. V. 29. № 3. P. 752–757.
<https://doi.org/10.2135/cropsci1989.0011183X002900-030043x>
39. Carter A.H., Garland-Campbell K., Kidwell K.K. Genetic mapping of quantitative trait loci associated with important agronomic traits in the spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cross ‘Louise’ × ‘Penawawa’ // *Crop Sci.* 2011. V. 51. № 1. P. 84–95.
<https://doi.org/10.2135/cropsci2010.03.0185>
40. Wall P.C., Cartwright P.M. Effects of photoperiod, temperature and vernalization on the phenology and spikelet numbers of spring wheats // *Ann. Appl. Biol.* 1974. V. 76. Iss. 3. P. 299–309.
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1974.tb01370.x>
41. Busch R.H., Elsayed F.A., Heiner R.E. Effect of daylength insensitivity on agronomic traits and grain protein in hard red spring wheat // *Crop Sci.* 1984. V. 24. № 6. P. 1106–1109.
<https://doi.org/10.2135/cropsci1984.0011183X002400-060023x>
42. Matsuyama H., Fujita M., Seki M. et al. Growth and yield properties of near-isogenic wheat lines carrying different photoperiodic response genes // *Plant Prod. Sci.* 2015. V. 18. Iss. 1. 57–68.
<https://doi.org/10.1626/ppls.18.57>
43. Knott D.R. Effects of genes for photoperiodism, semi-dwarfism, and awns on agronomic characters in a wheat cross // *Crop Sci.* 1986. V. 26. № 6. P. 1158–1162.
<https://doi.org/10.2135/cropsci1986.0011183X002600-060016x>
44. Tanio M., Kato K., Ishikawa N. et al. Effect of shuttle breeding with rapid generation advancement on heading traits of Japanese wheat // *Breeding Sci.* 2006. V. 56. Iss. 3. P. 311–320.
<https://doi.org/10.1270/jsbbs.56.311>
45. Ризин Б.В., Зуев Е.В., Тюнин В.А. и др. Селекционно-генетические аспекты создания продуктивных форм мягкой яровой пшеницы с высокой скоростью развития // Тр. по прикладной бот., генет. и селекции. 2018. Т. 179. Вып. 3. С. 194–202.
<https://doi.org/10.30901/2227-8834-2018-3-194-202>
46. Kumar S., Sharma V., Chaudhary S. et al. Genetics of flowering time in bread wheat *Triticum aestivum*: complementary interaction between vernalization-insensitive and photoperiod-insensitive mutations imparts very early flowering habit to spring wheat // *J. Genetics.* 2012. V. 91. № 1. P. 33–47.
47. Bloomfield M.T., Hunt J.R., Trevaskis B. et al. Ability of alleles of *PPD1* and *VRN1* genes to predict flowering time in diverse Australian wheat (*Triticum aestivum*) cultivars in controlled environments // *Crop Pasture Sci.* 2018. V. 69. Iss. 11. P. 1061–1075.
<https://doi.org/10.1071/CP18102>
48. Chen L., Du Y., Lu Q. et al. The photoperiod-insensitive allele *Ppd-D1a* promotes earlier flowering in *Rht12* dwarf plants of bread wheat // *Front. Plant Sci.* 2018. V. 9. P. 1312.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01312>
49. Worland A.L., Law C.N. Genetic analysis of chromosome 2D of wheat I. The location of genes affecting height, day length insensitivity and yellow rust resistance // *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung.* 1985. B. 96. № 4. S. 331–345.
50. Zhang K., Wang J., Qin H. et al. Assessment of the individual and combined effects of *Rht8* and *Ppd-D1a* on plant height, time to heading and yield traits in common wheat // *The Crop J.* 2019. V. 7. Iss. 6. P. 845–856.
<https://doi.org/10.1016/j.cj.2019.06.008>
51. Потоцкая И.В., Шаманин В.П., Шепелев С.С., Моргунов А.И. Синтетическая гексаплоидная пшеница как исходный материал для селекции на засухоустойчивость в условиях Западной Сибири // Вестник Омского гос. аграр. университета. 2019. № 1(33). С. 38–46.
52. Naruoka Y., Sherman J.D., Lanning S.P. et al. Genetic analysis of green leaf duration in spring wheat // *Crop Sci.* 2012. V. 52. № 1. P. 99–109.
<https://doi.org/10.2135/cropsci2011.05.0269>
53. Cook J.P., Acharya R.K., Martin J.M. et al. Genetic analysis of stay-green, yield, and agronomic traits in spring wheat // *Crop science.* 2021. V. 61. Iss. 1. P. 383–395.
<https://doi.org/10.1002/csc2.20302>
54. Kalous J.R., Martin J.M., Sherman J.D. et al. Phenotypic variation and patterns of linkage disequilibrium associated with introduced genes in spring wheat // *Crop Sci.* 2011. V. 51. № 6. P. 2466–2478.
<https://doi.org/10.2135/cropsci2011.03.0172>

Prospect for Incorporation of *Ppd-D1a* Allele in Russian Spring Bread Wheat Cultivars

S. B. Lepekhov*

Federal Altai Scientific Centre of Agro-BioTechnologies, Barnaul, 656910 Russia

**e-mail: sergei.lepehov@yandex.ru*

Varieties of spring bread wheat with the *Ppd-D1a* allele are insensitive to the photoperiod and are widespread in the world. Overwhelming majority of spring bread wheat cultivars in Russia is sensitive to the day length of the light. Incorporation of *Ppd-D1a* allele in Russian cultivars of spring soft wheat will permit to accelerate breeding, using one-two additional vegetation per year. The aims of this paper are to: (1) consider a trend of distribution of the *Ppd-D1a* allele among spring bread wheat of the northern hemisphere, (2) reveal an influence of the *Ppd-D1a* allele on agronomic traits of spring bread wheat, (3) designate main ways of breeding work for creation of Russian spring bread wheat with insensitive to photoperiod. A frequency of *Ppd-D1a* allele increases from high latitude countries to low latitude countries. The influence of *Ppd-D1a* allele on agronomic traits depends on geographic latitude of experimental place and leads to a reduction of period from seedling to heading, plant height, spikelets per spike and protein content, to an increasing green leaf duration after heading. The *Ppd-D1a* allele has a negative effect on wheat yield north of 50° north latitude. High frequency of *Ppd-D1a* allele in Canadian spring bread wheat varieties indicates that this allele can become widespread in some regions of Russia. The negative effects caused by this allele can be compensated by reasonable selection of parents for hybridization.

Keywords: spring soft wheat, sensitivity to photoperiod, negative effect of a trait, *Ppd-D1a*, acceleration of breeding.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ЧЕТЫРЕХ ВИДОВ РОДА *Astragalus* L.
СЕКЦИИ *Cenantrum* Bunge (Fabaceae) В АЗИАТСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ
ПО ДАННЫМ ИЗМЕНЧИВОСТИ *trnL–trnF* ХЛОРОПЛАСТНОЙ
ДНК И ИЗОФЕРМЕНТНЫХ МАРКЕРОВ

© 2022 г. О. С. Корчагина¹, *, Д. А. Кривенко², **, А. Ю. Беляев³

¹Сахалинский филиал ботанического сада-института Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Южно-Сахалинск, 693023 Россия

²Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения
Российской академии наук, Иркутск, 664033 Россия

³Институт экологии растений и животных Уральского отделения
Российской академии наук, Екатеринбург, 620144 Россия

*e-mail: dymshakova@rambler.ru

**e-mail: krivenko.irk@gmail.com

Поступила в редакцию 24.03.2021 г.

После доработки 14.07.2021 г.

Принята к публикации 09.08.2021 г.

Изучено генетическое разнообразие и филогенетические связи четырех видов рода *Astragalus* секции *Cenantrum*: *A. frigidus*, *A. mongholicus*, *A. penduliflorus* и *A. sericeocanus* в азиатской части России по данным изменчивости *trnL–trnF* хпДНК и изоферментных маркеров. Для каждого вида выявлены специфичные наборы хлоропластных гаплотипов, аллелей и частот изоферментов. По данным хпДНК изученные популяции характеризуются низким гаплотипическим (h изменяется от 0.095 до 0.333) и нуклеотидным (π изменяется от 0.00019 до 0.00378) разнообразием. Большинство популяций (20 из 27) были мономорфными. По данным аллозимного анализа показатели полиморфизма для трех видов (исключение составляет мономорфная популяция *A. penduliflorus*) имеют довольно высокие значения. Для вида в среднем полиморфность (P_{95}) варьирует от 55.5 до 85.5%, число аллелей на локус (A) — от 1.8 до 2.7, наблюдаемая гетерозиготность (H_o) — от 0.134 до 0.215. Географическая приуроченность гаплотипов и полиморфные популяции *A. frigidus* и *A. mongholicus* выявлены на Алтае и в Байкальской Сибири. Эти местонахождения располагаются, вероятно, на месте пересечения миграционных путей или рефугиумов.

Ключевые слова: *Astragalus*, *Cenantrum*, хпДНК, изоферментный анализ, полиморфизм.

DOI: 10.31857/S0016675822010052

Род *Astragalus* L. — крупнейший не только в семействе Fabaceae, но и среди покрытосеменных растений, насчитывает около 2900 видов, из которых в Старом Свете встречаются более 2400 видов, в Новом Свете — около 500 видов [1, 2]. В системе рода выделяют два подрода: *Astragalus* — растения, опушенные простыми волосками, и *Cercidothrix* Bunge — в опушении растений присутствуют как простые, так и двуконечные (мальпигиевые) волоски [3], и примерно 200 секций [1].

Секция *Cenantrum* Bunge относится к типовому подроду *Astragalus*. Она характеризуется примитивностью морфологических признаков: многолетние поликарпические растения с ассимилирующими (листовыми) прилистниками, парноперистыми черешковыми листьями, многоцветковыми кистевидными соцветиями, желтыми цветками и одно-

гнездными бобами, — занимая, таким образом, базальное положение в системе рода [3, 4]. Эта секция объединяет в своем составе около 40 видов, обитающих преимущественно в Азии, с центром биоразнообразия в восточной ее части (Корейский полуостров, Японские острова, восточная часть Китая). На территории России, в том числе ее азиатской части, известно восемь видов секции *Cenantrum* [5, 6].

В настоящее исследование включены четыре вида: *A. frigidus* (L.) A. Gray — европейско-североазиатский вид, *A. mongholicus* Bunge — вид с ареалом на юге Сибири и Дальнего Востока (Россия, Китай, Япония), северной части Центральной Азии (Казахстан, Монголия), *A. penduliflorus* Lam. — северо- и центральноевропейский вид с единственным местонахождением на Среднем Урале и

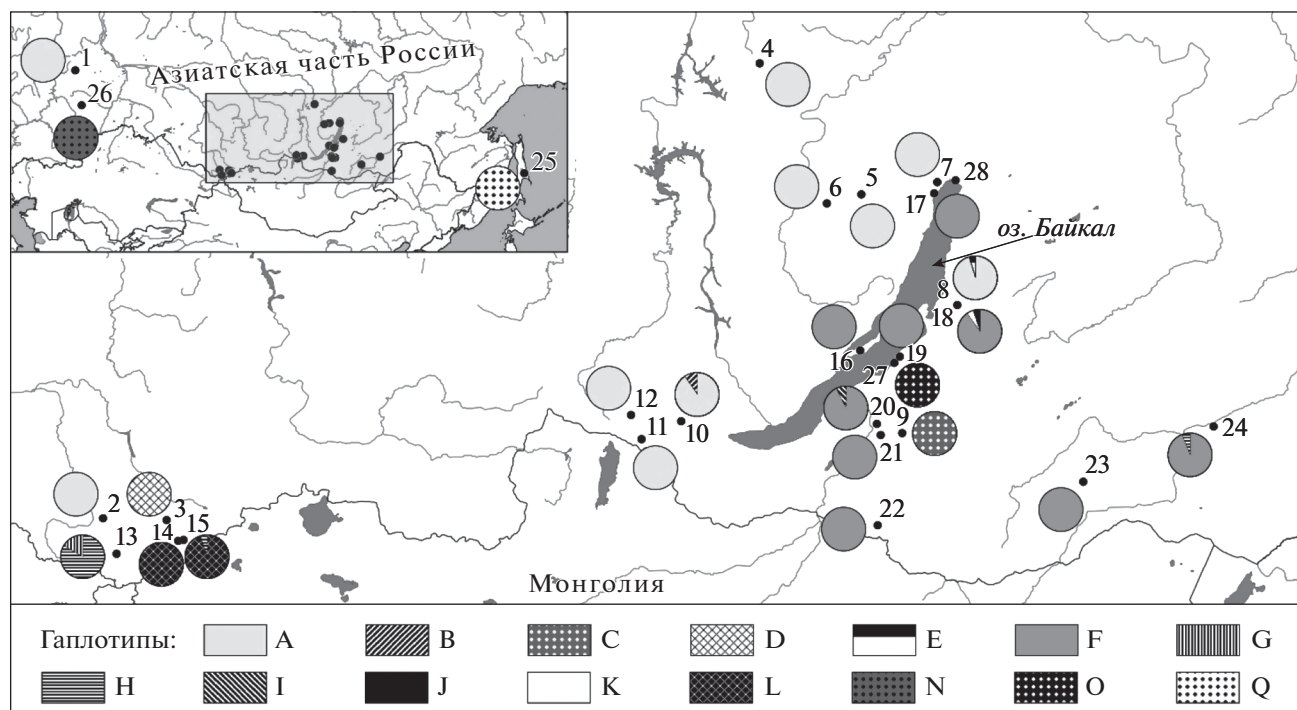


Рис. 1. Географическое распределение выявленных 15 гаплотипов хпДНК для 27 исследованных популяций четырех видов *Astragalus* секции *Cenantrum*.

A. sericeocanus Gontsch. — эндемик побережий оз. Байкал, внесен в Красную книгу Республики Бурятия, с присвоением третьей (NT) категории статуса редкости — редкий вид [7]. Трактовка видов и объем секции *Cenantrum* приняты нами в соответствии с последней монографической обработкой рода *Astragalus* Старого Света [5].

С точки зрения современной систематики, в частности для рода *Astragalus*, необходимо привлекать молекулярно-генетические исследования (полиморфизм изоферментов и хлоропластной ДНК (хпДНК)), также они необходимы для познания эволюционной истории, организации охраны генофонда редких и эндемичных видов, идентификации сырья лекарственных растений [8–11].

Цель настоящего исследования — охарактеризовать генетическое разнообразие, структуру популяций и степень генетического родства четырех видов рода *Astragalus* секции *Cenantrum* (*A. frigidus*, *A. mongholicus*, *A. penduliflorus* и *A. sericeocanus*) азиатской части России по данным анализов изменчивости изоферментов и хпДНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для изучения изменчивости хпДНК были 437 растений, для изоферментного анализа — 291. Географическое положение исследованных популяций видов рода *Astragalus* секции *Cenantrum* представлено на рис. 1 и в табл. 1.

Геномная ДНК экстрагирована СТАВ-методом [12] из проростков или высушенных в силикагеле листьев. Для амплификации и секвенирования фрагмента *trnL–trnF* хпДНК использованы праймеры “с” и “d” [13]. Реакцию ПЦР проводили согласно протоколу, описанному в работе Е.В. Хантемировой с соавт. [14]. Секвенирование ПЦР-продукта проведено в обоих направлениях при условиях, описанных J. Shaw et al. [15], с использованием набора BigDye v 3.1 на генетическом анализаторе 3130 DNA Analyzer (Applied Biosystems, США). Нуклеотидные последовательности отредактировали в программе BioEdit v 7.0.5.3 [16].

Для анализа популяционной изменчивости был проведен рестриктивный анализ с ферментом *TaqI*, согласно протоколу производителя. При наличии делеций разной длины, а также точечных замен, при которых появлялся/исчезал сайт рестрикции, на электрофореграмме присутствовали фрагменты разной длины или отсутствовали совсем. Для визуализации рестриктивных продуктов использовали электрофорез в вертикальной камере S2 (Life Technologies) в 6%-ном денатурирующем полиакриламидном геле и серебряное окрашивание [17]. По совокупности фрагментов разной длины нуклеотидные последовательности относили к тому или иному гаплотипу.

Для выявления генеалогических связей между гаплотипами был использован метод Median-Joining (MJ, программа Network 5.0.1.1 [18]) как

Таблица 1. Генетический полиморфизм у видов *Astragalus* секции *Cenantrum* по данным хлДНК

Популяция	Координаты		№ ваучера	<i>nH</i>	<i>h</i>	π
	с.ш.	в.д.				
<i>A. frigidus</i>						
1. Ивдель	60°46'	60°15'	IRK36800	27 A	—	—
2. Белый Бом	50°18'	86°58'	IRK36495	14 A	—	—
3. Саратам	50°16'	88°41'	IRK45181	7 D	—	—
4. Игирма	57°30'	104°33'	IRK24685	17 A	—	—
5. Харахикта	55°33'	107°16'	IRK55549	26 A	—	—
6. Орлингга	55°25'	106°20'	IRK46601	20 A	—	—
7. Тья	55°45'	109°18'	IRK45554	17 A	—	—
8. Улюн-1	53°50'	109°50'	IRK45537	20 A, 1 E	0.095 (0.084)	0.00034
9. Челутай	51°45'	108°21'	IRK55479	3 C	—	—
10. Охор-Шибирь	51°56'	102°26'	IRK32809	9 A, 1 B	0.200 (0.154)	—
11. Мойготы	51°39'	101°23'	IRK29595	15 A	—	—
12. Китой	52°03'	101°06'	IRK16611	16 A	—	—
Общие показатели для вида				181 A, 1 B, 3 C, 7 D, 1 E	0.120 (0.032)	0.00022
<i>A. mongholicus</i>						
13. Джазатор	49°41'	87°20'	IRK39812	1 G, 5 H	0.333 (0.215)	0.00060
14. Кокоря	49°54'	88°59'	IRK39813	12 L	—	—
15. Чуйская степь	49°55'	89°08'	IRK32832	18 L, 1 H	0.105 (0.092)	0.00019
16. Шара-Нур	53°06'	107°14'	IRK28971	24 F	—	—
17. Северобайкальск	55°34'	109°13'	IRK23043	10 F	—	—
18. Улюн-2	53°50'	109°50'	IRK55583	16 F, 1 J, 1 K	0.216 (0.124)	0.00378
19. Горячинск	53°00'	108°18'	IRK32252	24 F	—	—
20. Улан-Удэ	51°54'	107°41'	IRK41767	25 F, 2 I	0.143 (0.086)	0.00077
21. Николаевский	51°43'	107°47'	IRK32253	16 F	—	—
22. Малая Кудара	50°11'	107°42'	IRK39814	5 F	—	—
23. Ара-Иля	50°55'	113°12'	IRK16604	20 F	—	—
24. Калиновка	51°51'	116°41'	IRK23897	15 F, 1 H	0.125 (0.106)	0.00023
25. Известковый	49°57'	143°22'	VLA197661	6 Q	—	—
Общие показатели для вида				155 F, 1 G, 7 H, 2 I, 1 J, 1 K, 30 L, 6 Q	0.395 (0.040)	0.00102
<i>A. penduliflorus</i>						
26. Голендухино	57°27'	61°25'	IRK32794	20 N	—	—
<i>A. sericeocanus</i>						
27. Турка	52°54'	108°09'	IRK 23490	21 O	—	—

Примечание. *nH* – число гаплотипов в популяции; *h* – гаплотипическое разнообразие, в скобках – стандартное отклонение; π – нуклеотидное разнообразие.

наиболее подходящий для исследований на внутривидовом уровне и в группах близкородственных видов. Каждую делецию, вставку или замену кодировали как единичное мутационное событие, обозначая 1/0 как присутствующие/отсутствующие соответственно.

Популяционно-генетический анализ выполнен в программах Arlequin v 3.5 [19] и DnaSP v 6.12.03 [20]. Были рассчитаны следующие параметры: число гаплотипов (*nH*), гаплотипическое разнообразие (*h*), нуклеотидное разнообразие (π), генный поток (N_m) и дивергенция нуклеотидных по-

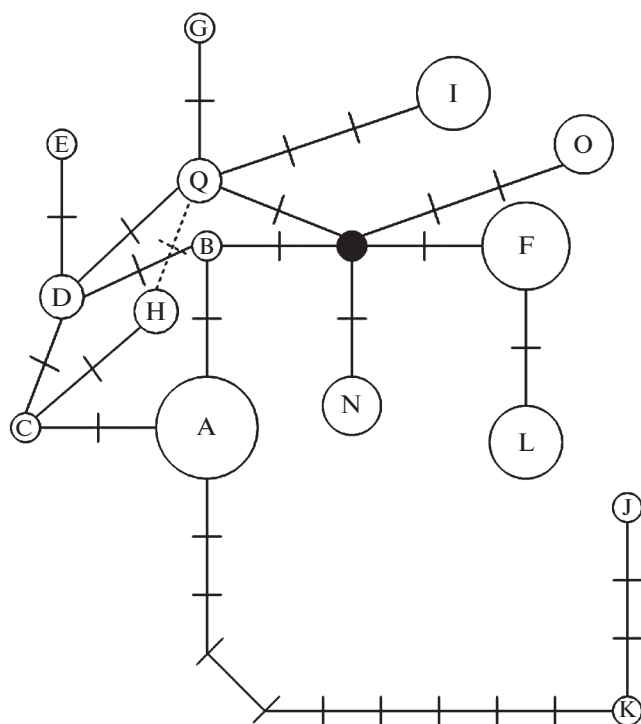


Рис. 2. Филогенетическая сеть гаплотипов хпДНК. Размер кружка соответствует частоте встречаемости гаплотипа, поперечные штрихи на связывающих линиях соответствуют количеству мутационных событий. Черный кружок – предполагаемый промежуточный гаплотип.

следовательностей (D_{xy}). С помощью анализа молекулярной дисперсии (AMOVA, Arlequin v 3.5) оценивали распределение генетической изменчивости между популяциями и между видами.

Для определения филогенетической структуры сравнивали индексы N_{ST} и G_{ST} в программе Permut v 2.0 [21], где показатель G_{ST} отражает только частоту гаплотипов в популяции, тогда как N_{ST} учитывает родство гаплотипов, а филогенетическая структура определяется при N_{ST} значимо ($p < 0.05$) больше, чем G_{ST} [22].

Для реконструкции демографической истории исследуемых популяций использовали показатели отклонения от стандартной нейтральной модели эволюции: тесты F. Tajima (D) [23] и Y.-X. Fu (F_S) [24]. Для выявления популяционно-генетических изменений во времени применяли анализ распределения парных различий (Arlequin v 3.5), связывающий число различий между гаплотипами с их частотой, используя значения суммы квадратов отклонений (SSD) между наблюдаемым и ожидаемым значениями распределения и индекс r как тест на уровень значимости. Доверительный 95%-ный интервал демографических параметров оценивали при 1000 повторях.

Протокол для исследования изменчивости изоферментов представлен в нашей ранней работе [25].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ изменчивости хпДНК

Для 437 образцов четырех видов рода *Astragalus* получены нуклеотидные последовательности части фрагмента некодирующей области *trnL-trnF* (554–563 пн). В сиквенсах этого региона выявлены 24 полиморфных сайта, из них 11 информативны согласно методу максимальной экономии. На основе полученных данных выявлено 15 гаплотипов (A–Q), последовательности которых депонированы в GenBank под номерами доступа MW594292–MW594306.

Для каждого вида характерен специфичный набор гаплотипов (рис. 1, табл. 1), а их генеалогические связи представлены на рис. 2. Наиболее часто встречающийся гаплотип для *A. frigidus* – A (выявлен у 93.8% образцов), гаплотипы C и D обнаружены у 1.6 и 3.6% растений соответственно, гаплотипы B и E – единичные (менее 1%). Часто встречающийся гаплотип для *A. mongholicus* – F (обнаружен у 76.4% образцов), алтайский гаплотип L выявлен у 14.8% растений, гаплотипы H и Q обнаружены у 3.5 и 3.0% образцов соответственно, остальные гаплотипы – менее 1%. Для *A. penduliflorus* и *A. sericeocanus* характерны специфичные гаплотипы N и O соответственно. На популяционном уровне показатели гаплотипического и нуклеотидного разнообразия были низкими, для *A. mongholicus* показатели гаплотипического и нуклеотидного разнообразия выше, чем для *A. frigidus* (табл. 1). Генетические взаимоотношения гаплотипов остались неясными из-за наличия в медианной сети альтернативных связей, свидетельствующих о гомоплазии (рис. 2).

Согласно результатам AMOVA, у *A. frigidus* и *A. mongholicus* основная доля всей генетической изменчивости приходится на межвидовые различия – 84.17% ($p < 0.01$), между популяциями внутри видов и внутри популяций доля генетической изменчивости составляет 9.82 и 6.01% соответственно ($p < 0.01$).

Дивергенция нуклеотидных последовательностей (D_{xy} , среднее число нуклеотидных замен на один сайт) между популяциями *A. frigidus* составила 0.0002 – между “Улюн-1” и остальными популяциями, 0.0018 – между парами, образованными каждой из популяций “Саратам” и “Челутай” с остальными популяциями. Между остальными популяциями *A. frigidus* D_{xy} отсутствует. Между популяциями *A. mongholicus* показатель D_{xy} варьировал от 0.0000 до 0.0024 (между “Улюн-2” и “Улан Удэ”). В табл. 2 приведены значения дивергенции нуклеотидных последовательностей

Таблица 2. Нуклеотидная дивергенция (среднее число нуклеотидных замен на один сайт) между видами *Astragalus* секции *Cenantrum* по данным хпДНК

Вид	<i>A. frigidus</i>	<i>A. mongholicus</i>	<i>A. penduliflorus</i>	<i>A. sericeocanus</i>
<i>A. frigidus</i>	—	0.00359	0.00193	0.00550
<i>A. mongholicus</i>		—	0.00201	0.00555
<i>A. penduliflorus</i>			—	0.00361
<i>A. sericeocanus</i>				—

Таблица 3. Значения тестов на нейтральность и анализов несоответствия распределения в популяциях видов *Astragalus* секции *Cenantrum* по данным хпДНК

Вид, популяции	Тест на нейтральность		Анализ несоответствия распределения				
	<i>D</i>	<i>F_S</i>	τ (CI)	Θ_0 (CI)	Θ_1 (CI)	<i>SSD</i>	<i>r</i>
<i>A. frigidus</i>	-0.960	-3.614*	3.000 (0.445–3.000)	0.000 (0.000–0.000)	0.103 (0.000–∞)	0.006	0.709
8. Улюн-1	-1.727*	0.494	3.000 (0.496–3.000)	0.000 (0.000–0.000)	0.055 (0.000–∞)	0.013*	0.837
10. Охор-Шибирь	-1.112	-0.339	2.930 (0.000–87.930)	0.900 (0.000–8.387)	3.600 (0.136–∞)	0.331	0.400
<i>A. mongholicus</i>	-1.392*	-0.398	3.439 (0.000–5.918)	0.004 (0.000–0.030)	1.607 (0.190–∞)	0.021	0.098
13. Джазатор	-1.132	0.952	2.982 (0.000–87.982)	0.900 (0.00–6.589)	3.600 (0.292–∞)	0.260	0.667
15. Чуйская степь	-1.861*	1.055	3.000 (0.449–3.000)	0.000 (0.000–0.002)	0.061 (0.000–∞)	0.016	0.823
18. Улюн-2	-1.244	3.547	3.000 (0.467–3.000)	0.000 (0.000–0.005)	0.149 (0.000–∞)	0.042*	0.659
20. Улан-Удэ	-1.192	1.842	3.000 (0.463–3.000)	0.000 (0.000–0.000)	0.087 (0.000–∞)	0.030*	0.776
24. Калиновка	-1.696*	0.769	3.000 (0.611–3.000)	0.000 (0.000–0.000)	0.076 (0.000–∞)	0.022*	0.797

Примечание. *D* – тест Tajima, *F_S* – тест Fu, τ – время экспансии популяции, Θ_0 и Θ_1 – начальное и конечное значение размера популяции соответственно, *SSD* – сумма квадратов отклонений между наблюдаемым и ожидаемым значениями распределения, *r* – индекс несоответствия, * *p* < 0.05, CI – 95%-ный интервал значимости.

между исследуемыми видами. Наибольшие значения *D_{xy}* определены между парами, образованными каждым из видов *A. frigidus* и *A. mongholicus* с *A. sericeocanus*, наименьшее – между *A. frigidus* и *A. penduliflorus*.

Показатели генетической дифференциации популяций высоки (*G_{ST}* = 0.942; *N_{ST}* = 0.922), значения *N_{ST}* < *G_{ST}*, что указывает на отсутствие филогенетической структуры [21, 22].

Результаты тестов на нейтральность и анализов несоответствия представлены в табл. 3. Значения теста *D* для всех популяций были отрицательными, для *A. frigidus* “Улюн-1”, *A. mongholicus* “Чуйская степь” и “Калиновка” показатели статистически значимы (*p* < 0.05). Показатели теста *F_S*, кроме *A. frigidus* “Охор-Шибирь”, – положительные (*p* > 0.05). Анализ демографических параметров выявил, что все полиморфные популяции находятся в стабильном состоянии (интервалы Θ_0 и Θ_1 перекрываются).

Анализ изменчивости изоферментных маркеров

Значения основных показателей генетического полиморфизма в исследованных популяциях

приведены в табл. 4. Популяция *A. penduliflorus* “Голендухино” является мономорфной. Среднее число аллелей на locus для полиморфных популяций варьирует от 1.3 до 3.0, эффективное число аллелей – от 1.04 до 1.49. Доля полиморфных locусов (*P₉₅*) изменяется от 22.2 до 88.9%. Средняя наблюдаемая гетерозиготность (*H_o*) находится в диапазоне от 0.107 до 0.261 и почти во всех популяциях ниже, чем значения ожидаемой гетерозиготности (*H_e*), варьирующей от 0.115 до 0.331. Отличие значений *H_o* и *H_e* значимое (*p* < 0.05), за исключением четырех популяций *A. frigidus* (“Игирма”, “Орлинг”, “Тыя”, “Харахикта”) и одной популяции *A. mongholicus* (“Николаевский”).

Анализ генетической структуры, выполненный с помощью индексов фиксации Райта, для трех популяций *A. mongholicus* показал, что каждая особь обнаруживает 25.1%-ный дефицит гетерозигот относительно популяции и 29.0%-ный относительно вида в целом. У *A. mongholicus* на межпопуляционную изменчивость приходится 5.2% от выявленной генетической изменчивости и 94.8% – на внутривидовую. Этот же анализ для семи популяций *A. frigidus* показал, что

Таблица 4. Значения показателей генетического полиморфизма в популяциях видов *Astragalus* секции *Cenantrum* по данным аллозимного анализа

Популяция	N_i	N_j	A	N_e	$P_{95}, \%$	H_o	H_e
<i>A. frigidus</i>							
1. Ивдель	19	19.0 (0.0)	1.3 (0.2)	1.13	22.2	0.111 (0.083)	0.115 (0.080)
2. Игирма	30	30.0 (0.0)	2.2 (0.3)	1.30	77.8	0.200 (0.072)	0.232 (0.071)
5. Харахикта	25	24.0 (1.0)	1.7 (0.3)	1.20	44.4	0.136 (0.065)	0.166 (0.068)
6. Орлинга	16	15.6 (0.3)	1.9 (0.3)	1.21	66.7	0.140 (0.040)	0.175 (0.050)
7. Тья	13	12.4 (0.6)	1.4 (0.2)	1.04	33.3	0.026 (0.018)	0.042 (0.022)
10 Охор-Шибирь	9	8.9 (0.1)	1.9 (0.3)	1.23	55.6	0.123 (0.054)	0.186 (0.069)
11. Мойготы	30	29.3 (0.2)	2.2 (0.2)	1.25	88.9	0.202 (0.072)	0.201 (0.057)
Среднее	20.3	19.9 (0.3)	1.8 (0.3)	1.09	55.5	0.134 (0.058)	0.160 (0.060)
<i>A. mongholicus</i>							
16. Шара-Нур	38	33.2 (0.8)	2.8 (0.4)	1.32	88.9	0.166 (0.043)	0.244 (0.067)
19. Горячинск	20	20.0 (0.0)	3.0 (0.4)	1.49	88.9	0.217 (0.040)	0.331 (0.078)
21. Николаевский	17	16.9 (0.1)	2.3 (0.3)	1.40	77.8	0.261 (0.073)	0.284 (0.077)
Среднее	24.7	23.4 (0.3)	2.7 (0.4)	1.40	85.2	0.215 (0.052)	0.286 (0.074)
<i>A. penduliflorus</i>							
26. Голендухино	18	18.0 (0.0)	1.0 (0.0)	1.00	0.0	0.000 (0.000)	0.000 (0.000)
<i>A. sericeocanus</i>							
27. Турка	37	31.1 (1.2)	2.7 (0.4)	1.38	80.0	0.213 (0.069)	0.274 (0.071)
28. Ярки	26	26.0 (0.0)	2.0 (0.4)	1.20	44.4	0.107 (0.054)	0.169 (0.086)
Среднее	31.5	28.6 (0.6)	2.4 (0.4)	1.29	62.2	0.160 (0.062)	0.222 (0.079)

Примечание. N_i – число исследованных растений, N_j – средний размер выборки на локус, A – среднее число аллелей на локус, N_e – эффективное число аллелей, P_{95} – полиморфизм с учетом 95%-ного критерия, H_o – средняя наблюдаемая гетерозиготность, H_e – средняя ожидаемая гетерозиготность. В скобках даны значения стандартной ошибки среднего.

каждая особь обнаруживает 10.0%-ный дефицит гетерозигот относительно популяции и 37.0%-ный относительно вида в целом. У *A. frigidus* на межпопуляционную изменчивость приходится 30% от выявленной генетической изменчивости и 70% – на внутривидовую.

Выявлена большая генетическая дистанция ($D_N = 1.08$) между *A. frigidus* и остальными изученными видами (рис. 3). Внутри клады *A. frigidus* выявлены две субклады ($D_N = 0.15$): предбайкальская, объединяющая популяции “Игирма” и “Мойготы”, расположенные на значительном удалении от оз. Байкал, и прибайкальская, объединяющая наиболее приближенные к озеру популяции “Орлинга”, “Тья”, “Харахикта” и “Охор-Шибирь”, а также включающая краевую уральскую популяцию “Ивдель” ($D_N = 0.11$). Внутри субклад значения D_N варьируют от 0.01 до 0.03. Внутри клады *A. mongholicus*–*A. penduliflorus*–*A. sericeocanus* также выявлены две субклады ($D_N = 0.42$): первая объединяет популяции *A. mongholicus* и эндемичный вид *A. sericeocanus*, вторая представлена популяцией *A. penduliflorus*. Следует отметить, что *A. sericeocanus* не образует самостоятельной ветви –

$D_N = 0.07$ между популяцией “Ярки” и популяциями *A. mongholicus*, $D_N = 0.12$ между популяцией “Турка” и остальными популяциями субклады.

ОБСУЖДЕНИЕ

Секция *Cenantrum* – монофилетичная группа, для которой, как и для рода *Astragalus* в целом, интрогрессия и межвидовая гибридизация считаются крайне редкими событиями [9]. Однако, несмотря на это, ее представители характеризуются морфологическим полиморфизмом, имеют обширные ареалы и разнообразный спектр экологических условий обитания.

По результатам анализа изменчивости хпДНК для *A. frigidus* выявлена однородность исследуемых популяций, большая часть которых мономорфна. Полиморфные популяции “Улюн-1” и “Охор-Шибирь” обнаружены в области, близкой к центральной части ареала вида – в Прибайкалье. Анализ показателей демографических данных указывает на то, что они находятся в стабильном состоянии, для последней возможен популяционный рост. Показатели теста на нейтральность для по-

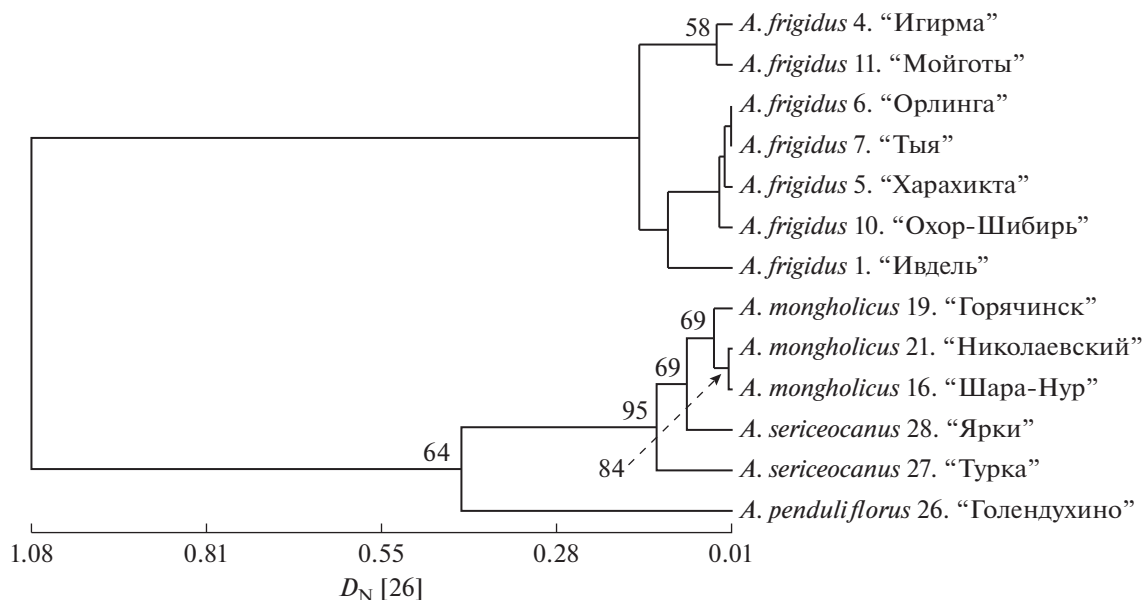


Рис. 3. Дендрограмма сходства популяций видов *Astragalus* секции *Cenanthrum*, построенная на основе генетических дистанций D_N [26]. Цифры в узлах ветвления — значения бутстрепа.

пуляции “Улюн-1” свидетельствуют о наличии распространенных гаплотипов и относительно недавнем прохождении популяции через “бутылочное горлышко”. В пользу последнего свидетельствует ее местонахождение в поврежденном лесу среди валунов на берегу горной реки. Вероятно, она произошла от единичных особей, сохранившихся после природного разрушительного события. Показатели нуклеотидной дивергенции между популяциями *A. frigidus* низкие (до 0.00180), хотя такие же низкие значения (0.00193) выявлены между *A. frigidus* и *A. penduliflorus*. Показатели генного потока $N_m = 0.081, 0.030$ и 0.010 между *A. frigidus* и *A. mongholicus*, *A. penduliflorus* и *A. sericeocanus* соответственно, указывая на отсутствие заметного обмена генами между ними в настоящее время [27].

Анализ изоферментных данных выявил генетическую дистанцию между *A. frigidus* и остальными видами секции — 1.08, которая, согласно шкале генетических дистанций, разработанной для растений, соответствует видам разных подсекций (0.12–1.2) [28].

Разнообразные по морфологическим признакам особи *A. mongholicus* имеются как в генетически мономорфных, так и в полиморфных по хпДНК популяциях. По показателям тестов на нейтральность полиморфные популяции *A. mongholicus* содержат редкие гаплотипы при равновесии “мутация–дрейф”. Показатели $N_m = 0.130$ и 0.040 между *A. mongholicus* и *A. penduliflorus*, *A. sericeocanus* соответственно. Для популяций “Чуйская степь” и “Калиновка” вероятно иххождение через “бутылочное горлышко”. Первая

представляет собой локальную популяцию в небольшом понижении рельефа среди степи, вероятно возникшую здесь от единичных особей. Вторая находится близ населенного пункта на опушке леса у автомобильной дороги и вероятно в прошлом подвергалась чрезмерному антропогенному воздействию [29].

Показатели гаплотипического и нуклеотидного разнообразия для видов *A. frigidus* и *A. mongholicus* ниже, чем, например, для *A. onobrychus* [30], что возможно связано с использованием только одного и относительно короткого фрагмента хпДНК. Напротив, показатели изменчивости аллелизм *A. frigidus* и *A. mongholicus* выше по сравнению с другими видами рода *Astragalus*, как и для травянистых бобовых в целом, что уже отмечалось нами ранее [25]. Вероятно, это объясняется их нахождением вблизи центров ареалов видов и небольшим количеством исследуемых локусов. Наиболее низкие значения показателей генетического полиморфизма по изоферментным маркерам получены для популяции *A. frigidus* “Ивдель”, что обычно характерно для краевых популяций, как правило находящихся под влиянием дрейфа генов и изоляции в течение длительного времени [31].

Эндемик побережий оз. Байкал *A. sericeocanus* резко отличается от *A. mongholicus* и *A. penduliflorus* по морфологическим, экологическим и, как было установлено, генетическим признакам. Растения этого вида имеют характерное серебристо-мохнатое опушение, местообитания приурочены к перевиваемым пескам. Для вида выявлены видоспецифичные признаки: набор изоферментных ал-

лелей и их частот, а также гаплотип О. Значения нуклеотидной дивергенции между *A. sericeocanus* и остальными видами самые высокие: от 0.00361 до 0.00555. Значения изоферментного полиморфизма высокие для популяции “Турка” и значительно меньше для популяции “Ярки”, что ожидаемо для островной популяции. При этом интересно отметить, что величины показателей полиморфизма даже в этой популяции сопоставимы с таковыми для ряда популяций широкоареального *A. frigidus*, а в среднем для вида показатели полиморфизма узколокального эндемика *A. sericeocanus* выше, чем у *A. frigidus* (табл. 4). Полученные на основе изоферментных маркеров значения генетических дистанций между популяциями *A. mongholicus* и *A. sericeocanus* соответствуют значениям для видов одной подсекции (0.032–0.652) [28].

По морфологическим признакам и генетическим показателям *A. penduliflorus* отличается от других исследованных видов. Для него выявлены специфичный гаплотип N и мономорфность по показателям изменчивости изоферментов и хпДНК. По изоферментным маркерам значение генетической дистанции 0.42 является самой большой для видов клады *A. mongholicus*–*A. penduliflorus*–*A. sericeocanus*, но также соответствует величине дистанции между близкородственными видами одной подсекции [28]. Генетические показатели этой популяции характерны для краевых частей ареала вида. В настоящее время ареал вида разорван [6], его основная часть находится в европейских горных системах (Альпы, Карпаты и Пиренеи) и в Центральной Швеции [5]. Можно предположить, что ранее существовала обширная предковая европейская популяция *A. penduliflorus*, а сейчас популяция “Голендухино” представляет собой лишь ее фрагмент и является реликтовой.

Обнаружена корреляция между гаплотипами и их географическим положением. Так, для *A. mongholicus* гаплотип F отмечен только в байкальских популяциях, а гаплотипы G, H и L – в алтайских, гаплотип Q выявлен только на о-ве Сахалин. Для *A. frigidus* гаплотипы B, C и E характерны для байкальских популяций, а D – для алтайских. Подобная корреляция с использованием ITS, ITS2 и *psbA-trnH* была выявлена для *A. mongholicus* в Китае [32]. Вероятно, в прошлом типичные местообитания этих видов неоднократно подвергались изменению, сокращаясь и вновь расширяясь из-за климатических циклов в плейстоцене. Было показано, что такие климатические циклы могли способствовать диверсификации видов растений за счет многократного деления популяций, что привело к аллопатрическому видообразованию [33, 34]. Вероятно, таким же образом в ходе эволюционной дивергенции *A. sericeocanus* обособился в условиях специфической среды песчаных арен Прибайкалья.

Ранее было показано [35], что для большинства видов покрытосеменных растений присутствие нескольких гаплотипов в популяциях указывает на их расположение в зонах контакта разных материнских линий. Это позволяет проследить пути миграции этих видов и число рефугиумов, а иногда и их предполагаемые местонахождения. Анализируя полученные нами данные, можно предположить, что такие зоны путей миграции и контакта находились к востоку и юго-западу от оз. Байкал и на Алтае.

Выражаем благодарность коллегам А.В. Верхожиной, Е.В. Жмудь, М.А. Полежаевой, Д.В. Санданову, Д.Г. Чимитову и Е.Г. Филиппову за помощь в сборе материала для исследований и при анализе полученных данных.

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. Zarre Sh., Azani N. Perspectives in taxonomy and phylogeny of the genus *Astragalus* (Fabaceae): a review // Prog. Biol. Sci. 2013. V. 3. № 1. P. 1–6. <https://doi.org/10.22059/PBS.2013.32086>
2. Frodin D.G. History and concepts of big plant genera // Taxon. 2004. V. 53. № 3. P. 753–776. <https://doi.org/10.2307/4135449>
3. Podlech D. Revision von *Astragalus* L. sect. *Caprini* DC. (Leguminosae) // Mitt. Bot. Staatssamml. München. 1988. V. 25. P. 1–924.
4. Сытин А.К. Астрагалы (*Astragalus* L., Fabaceae) Восточной Европы и Кавказа: систематика, география, эволюция: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. СПб., 2009. 48 с.
5. Podlech D., Zarre Sh. A Taxonomic Revision of the Genus *Astragalus* L. (Leguminosae) in the Old World. Vienna: Naturhistorisches Museum Wien, 2013. V. 1. 822 p.
6. Беляев А.Ю., Дымяшкова О.С., Зимницкая С.А., Князев М.С. Уникальная природная популяция астрагала (*Astragalus penduliflorus* Lam. s.l.) на Среднем Урале // Проблемы популяционной биологии: Матер. XII Всеросс. популяционного семинара памяти Николая Васильевича Глотова (1939–2016). Йошкар-Ола: ООО ИПФ “СТРИНГ”, 2017. С. 41–43.
7. Санданов Д.В., Кривенко Д.А. Астрагал шелковице-седой – *Astragalus sericeocanus* Gontsch. // Красная книга Республики Бурятия: редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды животных, растений и грибов. Улан-Удэ: Изд-во БНЦ СО РАН, 2013. С. 518–519.
8. Karron J.D., Linhart Y.B., Chaulk C.A., Robertson C.A. Genetic structure of populations of geographically restricted and widespread species of *Astragalus* (Fabaceae) //

- Amer. J. Bot. 1988. V. 75. № 8. P. 1114–1119.
<https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1988.tb08823.x>
9. *Kazempour Osaloo S., Maassoumi A.A., Murakami N.* Molecular systematics of the genus *Astragalus* L. (Fabaceae): Phylogenetic analyses of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers and chloroplast gene *ndhF* sequences // *Plant Syst. Evol.* 2003. V. 242. № 1–4. P. 1–32.
<https://doi.org/10.1007/s00606-003-0014-1>
 10. *Riahi M., Zarre Sh., Maassoumi A.A. et al.* Towards a phylogeny for *Astragalus* section *Carpini* (Fabaceae) and its allies based on nuclear and plastid DNA sequences // *Plant Syst. Evol.* 2011. V. 293. № 1–4. P. 119–133.
<https://doi.org/10.1007/s00606-011-0417-3>
 11. *Choi I.-S., Kim S.-Y., Choi B.-H.* Taxonomic position and genetic differentiation of Korean *Astragalus mongholicus* Bunge // *Korean J. Pl. Taxon.* 2013. V. 43. № 1. P. 12–21.
<https://doi.org/10.11110/kjpt.2013.43.1.12>
 12. *Devey M.E., Bell J.C., Smith D.N. et al.* A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD and microsatellite markers // *Theoret. Appl. Genetics.* 1996. V. 92. № 6. P. 673–679.
<https://doi.org/10.1007/BF00226088>
 13. *Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J.* Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA // *Plant Mol. Biol.* 1991. V. 17. № 5. P. 1105–1109.
<https://doi.org/10.1007/BF00037152>
 14. *Хантемирова Е.В., Пименова Е.А., Корчагина О.С.* Полиморфизм хлоропластной ДНК и филогеография ольхи зеленой (*Alnus alnobetula* (Enhr.) K. Koch. s.l.) в Азиатской России // *Генетика.* 2018. Т. 54. № 1. С. 75–86.
<https://doi.org/10.7868/S0016675818010058>
 15. *Shaw J., Lickey E.B., Beck J.T. et al.* The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis // *Am. J. Bot.* 2005. V. 92. № 1. P. 142–166.
<https://doi.org/10.3732/ajb.92.1.142>
 16. *Hall T.A.* BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 1999. V. 41. P. 95–98.
https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-14998u1.29
 17. *Bassam B.J., Caetano-Anollés G., Gresshoff P.M.* Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels // *Anal. Biochem.* 1991. V. 196. № 1. P. 80–83.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(91\)90120-I](https://doi.org/10.1016/0003-2697(91)90120-I)
 18. *Bandelt H.-J., Forster P., Röhl A.* Median-Joining Networks for inferring intraspecific phylogenies // *Mol. Biol. Evol.* 1999. V. 16. № 1. P. 37–48.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
 19. *Excoffier L., Laval G., Schneider S.* Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetic data analysis // *Evol. Bioinform. Online.* 2005. V. 1. P. 47–50.
 20. *Rozas J., Sánchez-DelBarrio J.C., Messeguer X., Rozas R.* DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods // *Bioinform.* 2003. V. 19. № 18. P. 2496–2497.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg359>
 21. *Petit R.J., Duminil J., Fineschi S. et al.* Comparative organization chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations // *Mol. Ecol.* 2005. V. 14. № 3. P. 689–701.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02410.x>
 22. *Pons O., Petit R.J.* Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles // *Genetics.* 1996. V. 144. № 3. P. 1237–1245.
 23. *Tajima F.* The effect of change in population size on DNA polymorphism // *Genetics.* 1989. V. 123. № 3. P. 597–601.
 24. *Fu Y.-X.* Statistical tests of neutrality of mutation against population growth hitchhiking and background selection // *Genetics.* 1997. V. 147. № 2. P. 915–925.
 25. *Дымышакова О.С., Кривенко Д.А., Беляев А.Ю., Верховина А.В.* Генетическая дифференциация трех видов рода *Astragalus* L. секции *Cenantrum* Bunge (Fabaceae) // *Генетика.* 2015. Т. 51. № 8. С. 887–894.
<https://doi.org/10.7868/S0016675815080020>
 26. *Nei M.* Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // *Genetics.* 1978. V. 89. № 3. P. 583–590.
 27. *Wright S.* *Evolution and the Genetics of Populations. Volume 4: Variability within and among Natural Populations.* Chicago: Univ. Chicago Press, 1978. 580 p.
 28. *Шурхал А.В., Подогаз А.В., Животовский Л.А.* Уровни генетической дифференциации жестких сосен род *Pinus*, подрод *Pinus*, по данным аллозимной изменчивости // *Генетика.* 1993. Т. 29. № 1. С. 77–90.
 29. *Forman R.T.T., Alexander L.E.* Roads and their major ecological effect // *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 1998. V. 29. P. 207–231.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.29.1.207>
 30. *Plenk K., Willner W., Deminaet O.N. et al.* Phylogeographic evidence for long-term persistence of the Eurasian steppe plant *Astragalus onobrychis* in the Pannonian region (eastern Central Europe) // *Flora.* 2020. V. 264. P. 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.flora.2020.151555>
 31. *Тимофеев-Ресовский Н.В., Яблоков А.В., Глозов Н.В.* Очерк учения о популяции. М.: Наука, 1973. 277 с.
 32. *Li L., Zheng S., Brinckmann J. et al.* Chemical and genetic diversity of *Astragalus mongholicus* grown in different eco-climatic region // *PLoS One.* 2017. V. 12. № 9. e0184791.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184791>
 33. *Bargheri A., Maassoumi A.A., Rahiminejad M.R. et al.* Molecular phylogeny and divergence time of *Astragalus* section *Hymenostegis*: An analysis of rapidly diversifying species group in Fabaceae // *Scientific Reports.* 2017. V. 7. 14033.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-14614-3>
 34. *Абрамсон Н.И.* Филогеография: итоги, проблемы, перспективы // *Информ. вестник ВОГиС.* 2007. Т. 11. № 2. С. 307–331.
 35. *Soltis D.E., Soltis P.S., Ranker T.A., Ness B.D.* Chloroplast DNA variation in a wild plant, *Tolmiea menziesii* // *Genetics.* 1989. V. 121. № 4. P. 819–826.

Genetic Diversity of Four Species of the Genus *Astragalus* L. Section *Cenantrum* Bunge (Fabaceae) in the Asian Part of Russia according to the Data of *trnL-trnF* Chloroplast DNA Variability and Isoenzyme Markers

O. S. Korchagina^{a, *}, D. A. Krivenko^{b, **}, and A. Yu. Belyaev^c

^a Sakhalin Branch of the Botanical Garden-Institute, Far-Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Yuzhno-Sakhalinsk, 693023 Russia

^b Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia

^c Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch of Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, 620144 Russia

*e-mail: dymshakova@rambler.ru

**e-mail: krivenko.irk@gmail.com

The genetic diversity and phylogenetic relationships of four species of the genus *Astragalus* of the section *Cenantrum*: *A. frigidus*, *A. mongholicus*, *A. penduliflorus*, and *A. sericeocanus* from the Asian part of Russia, were studied according to the variability of *trnL-trnF* cpDNA and isozyme markers. For each species specific sets of chloroplast haplotypes, alleles, and isozyme frequencies were identified. According to cpDNA data, the studied populations are characterized by low haplotype (h varies from 0.095 to 0.333) and nucleotide (π varies from 0.00019 to 0.00378) diversity. Most of the populations (20 out of 27) were monomorphic. According to the data of isozyme analysis, the indicators of polymorphism for three species (the exception is the monomorphic population of *A. penduliflorus*) have rather high values. For a species, on average, polymorphism (P_{95}) varies from 55.5 to 85.5%, the number of alleles per locus (A) is from 1.8 to 2.7, and the observed heterozygosity (H_o) is from 0.134 to 0.215. The geographic confinement of haplotypes and polymorphic populations of *A. frigidus* and *A. mongholicus* were revealed in Altai and Baikal Siberia. These localities are probably located at the intersection of migration routes or refugia.

Keywords: *Astragalus*, *Cenantrum*, cpDNA, isozyme analysis, polymorphism.

ДИНАМИКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИЙ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ *Apis mellifera* НА ЮЖНОМ УРАЛЕ

© 2022 г. М. Д. Каскинова¹ *, Л. Р. Гайфуллина¹, Е. С. Салтыкова¹,
А. В. Поскряков¹, А. Г. Николенко¹

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

*e-mail: kaskinovamilyausha@mail.ru

Поступила в редакцию 29.03.2021 г.

После доработки 12.07.2021 г.

Принята к публикации 10.08.2021 г.

Мы проанализировали выборки пчел из трех районов Республики Башкортостан, в том числе выборки из охраняемых природных территорий, отобранных с 6–8-летним интервалом для оценки изменений их генетической структуры. Проанализирован полиморфизм межгенного участка *COI-COII* митохондриальной ДНК и девять *SSR*-локусов ядерной ДНК. В популяции *Apis mellifera mellifera* из охраняемой природной территории была выявлена интрогрессия генофонда подвидов из эволюционной ветви *C*. Полученные результаты позволяют предложить меры по ограничению ввоза пчелосемей.

Ключевые слова: *Apis mellifera* L., гибридизация, темная лесная пчела, особо охраняемые природные территории.

DOI: 10.31857/S0016675822010040

Медоносная пчела является важным опылителем сельскохозяйственных культур и естественных фитоценозов. В настоящее время наблюдается снижение численности и биоразнообразия опылителей, в том числе медоносной пчелы [1]. Среди причин сокращения численности медоносных пчел выделяют несколько факторов, в том числе гибридизацию подвидов, которая ведет к потере адаптивного потенциала [2, 3]. Происходит как естественная гибридизация в пограничных зонах распространения подвидов, так и антропогенная, вызванная импортом чужеродных подвидов. Темная лесная пчела (*A. m. mellifera*) – аборигенный подвид медоносной пчелы для России, является представителем эволюционной ветви *M* [4–7]. Некогда ареал распространения темной лесной пчелы занимал территорию от Пиренейских до Уральских гор [8], сейчас же этот подвид представлен отдельными локальными популяциями, которые сохранились в некоторых странах Европы и регионах России. Популяции темной лесной пчелы были выявлены на территории Пермского края (вишерская и южно-прикамская популяции), Башкортостана (бурзянская и татышлинская) и Удмуртии (камбарская) [9]. Импорт пакетов пчелиных семей, принадлежащих к эволюционной ветви *C*, куда входят два

наиболее распространенных в коммерческом пчеловодстве подвидов – итальянская медоносная пчела *A. m. ligustica* и краинская *A. m. carnica*, привел к фрагментации ареала *A. m. mellifera*. Проблема сохранения генофонда разных подвидов медоносной пчелы была поднята в связи с тем, что гибридизация приводит к потере генных ассоциаций, характерных для каждого конкретного подвида и экотипа, ответственных за адаптивность и экологическую пластичность.

Морфометрические и генетические исследования пчел из разных районов Республики Башкортостан (**РБ**) показали, что гибридизация популяции темной лесной пчелы в данном регионе достигла уровня, при котором естественное восстановление генофонда *A. m. mellifera* невозможно [10, 11]. В качестве одного из способов его восстановления было предложено создание закрытых локальных популяций, то есть селекционных центров по разведению темной лесной пчелы. В РБ охраной темной лесной пчелы занимается заповедник федерального значения “Шульган-Таш”. С целью охраны бурзянской популяции был также создан заказник регионального значения “Алтын Солок”. Помимо государственных природоохранных организаций, разведением

Таблица 1. Показатели интрогрессии генофонда эволюционной ветви С в исследуемых выборках на уровне митохондриальной ДНК

Выборка	Янаульская		Бурзянская		Иглинская	
	2011 (100)	2019 (93)	2013 (65)	2019 (228)	2012 (95)	2019 (82)
Частота аллельного варианта Q <i>COI-COII</i> мтДНК	0.00	0.00	0.00	0.24	0.03	0.01
Частота аллельного варианта PQQ <i>COI-COII</i> мтДНК	0.91	0.59	1.00	0.76	0.97	0.98
Частота аллельного варианта PQQQ <i>COI-COII</i> мтДНК	0.09	0.41	0.00	0.00	0.00	0.01

темной лесной пчелы занимается племенное хозяйство в Иглинском р-не.

Цель данной работы – оценка изменения в генетической структуре популяций темной лесной пчелы на территории Бурзянского, Янаульского и Иглинского р-нов РБ на основе анализа выборок 2011–2013 гг. и 2019 г. Территория первых двух районов является ареалом обитания сохранившейся на Южном Урале популяции темной лесной пчелы. Территория Иглинского р-на относится к умеренно-гибридной зоне [9]. Тем не менее, этот район интересен тем, что в нем располагается племенное хозяйство, специализирующееся на разведении темной лесной пчелы, в условиях неблагоприятного трутневого фона. С помощью анализа полиморфизма межгенного локуса *COI-COII* мтДНК и девяти SSR-локусов нами была проанализирована генетическая структура данных выборок, отобранных с интервалом в 6–8 лет. Анализ межгенного локуса *COI-COII* мтДНК является одним из простых и надежных методов дифференциации эволюционных ветвей М и С [12]. Аллельные варианты $P(Q)_{1-n}$ являются маркерами происхождения пчел от *A. m. mellifera*, вариант Q – от подвидов из эволюционной ветви С по материнской линии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для анализа стали выборки из Янаульского (девять населенных пунктов, 2011 и 2019 гг.), Бурзянского (три пункта, заповедник “Шульган-Таш” и заказник “Алтын Солок”, 2013 и 2019 гг.) и Иглинского р-нов (одна племенная пасека, 2012 и 2019 гг.) РБ. Расположение районов приведено на рис. 1. В качестве референтных групп эволюционной ветви М были использованы выборки *A. m. mellifera* из Татышлинского р-на РБ (выборка 2003 г., $N = 72$) и Пермского края (выборка 2003 г., $N = 67$). Выборки из Республики

Адыгея (выборка 2003 г., *A. m. carnica*, $N = 15$), Краснодарского края (выборка 2003 г., *A. m. caucasica*, $N = 53$), Закарпатской области Украины (выборка 2003 г., *A. m. carpatica*, $N = 13$) и Узбекистана (выборка 2016 г., *A. m. carnica/A. m. carpatica*, $N = 52$) использовались в качестве референтных выборок, принадлежащих к эволюционной ветви С.

Отобранные из каждой семьи живые рабочие пчелы фиксировались в 96%-ном этаноле и хранились до выделения ДНК при -30°C . ДНК выделяли из мышц торакса с использованием набора ДНК-ЭКСТРАН-2 (ООО “СИНТОЛ”, Москва). Качество и количество тотальной ДНК анализировали на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Thermo, США). Подвидовую принадлежность определяли при помощи ПЦР-анализа мтДНК (межгенный участок *COI-COII*) и SSR-локусов Ap243, 4a110, A24, A8, A43, A113, A88, Ap049, A28 [13]. Для визуализации продуктов амплификации использовали электрофорез в 8% полиакриламидном геле с последующей детекцией в фотосистеме Gel Doc XR+ (Bio-Rad Laboratories).

Вычисления частот аллелей микросателлитных локусов и оценку попарных генетических расстояний F_{st} между выборками выполняли в FSTAT. Кластерный анализ данных был осуществлен в ПО Structure 2.3.4 (с использованием модели Admixture с Burnin Period и MCMC равными 10000 и 100000 соответственно). Число кластеров было задано от 1 до 12. Предполагаемое число кластеров рассчитывали в онлайн-сервисе Structure Harvester [14]. Полученные в Structure результаты обрабатывали в CLUMPP 1.1.2 с помощью алгоритма FullSearch [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В табл. 1 представлены показатели интрогрессии генофонда эволюционной ветви С в исследу-

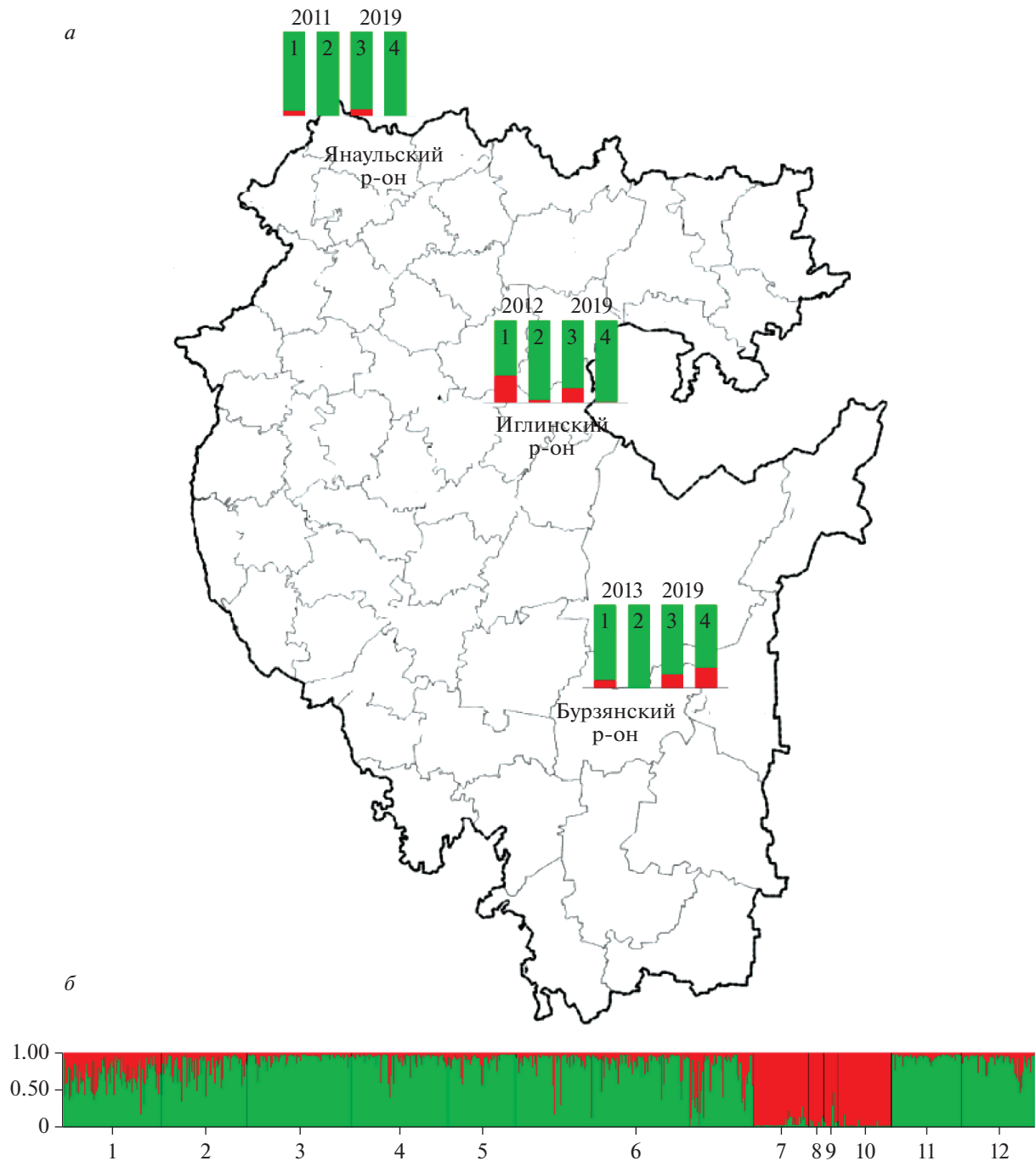


Рис. 1. *a* – географическое расположение выборок и их генетическая структура на основе данных по локусу *COI-COII* мтДНК (2 и 4) и по данным SSR-локусов (1 и 3). *b* – генетическая структура популяции исследуемых выборок при $K = 2$. 1 и 2 – Иглинская 2012 и 2019 гг., 3 и 4 – Янаульская 2011 и 2019 гг., 5 и 6 – Бурзянская 2013 и 2019 гг., 7 – Краснодарский край (*A. m. caucasica*), 8 – Республика Адыгея (*A. m. carnica*), 9 – Украина (*A. m. carpatica*), 10 – Узбекистан (*A. m. carpatica/A. m. carnica*), 11 – Пермский край (*A. m. mellifera*), 12 – РБ, Татышлинский р-н (*A. m. mellifera*). Зеленым цветом обозначена доля эволюционной ветви М, красным – ветви С.

емых выборках на уровне мтДНК. Аллельный вариант Q был выявлен в бурзянской выборке за 2019 г. у 24% семей, в иглинской – у 2%. В янаульской выборке данный аллельный вариант не обнаружен.

Анализ выходных данных Structure в Structure-harvester показал, что общая исследуемая выборка состоит из двух основных кластеров ($K = 2$, $\Delta K = 391.025947$) (рис. 1). Первый кластер представлен темной лесной пчелой, в состав второго

Таблица 2. Показатели интрогрессии генофонда эволюционной ветви С в исследуемых выборках на уровне ядерной ДНК

Выборка	Янаульская		Бурзянская		Иглинская	
	2011 (100)	2019 (93)	2013 (65)	2019 (228)	2012 (95)	2019 (82)
Доля М (ядНК)	0.938	0.919	0.903	0.839	0.677	0.823
Увеличение +/снижение – уровня интрогрессии генофонда ветви С (ядНК), %	+1.9%		+6.4%		–14.6%	

кластера входят оставшиеся подвиды из эволюционной ветви С.

В табл. 2 представлены данные об изменениях уровня интрогрессии генофонда линии С в исследуемой выборке, которые в целом соответствуют данным по локусу *COI-COII*.

Для оценки генетических расстояний между выборками были рассчитаны попарные F_{st} (табл. 3). Наибольший уровень дивергенции наблюдается между янаульской выборкой и референсной выборкой ветви С, представленной подвидами *A. m. carnica*, *A. m. carpatica* и *A. m. caucasica* (см. Материалы и методы). Наименьшая дивергенция с ветвью С наблюдается у иглинской выборки за 2012 г. Тогда как дивергенция между референсными выборками С и М составила 0.4920.

Проблема сохранения популяций *A. m. mellifera* является актуальной не только для России, но и в европейских странах [16–18]. Так, в 1964 г. была создана ассоциация, известная сейчас как BIBBA (Bee Improvers and Bee Breeders Association), целями которой стали сохранение, восстановление и изучение темной лесной пчелы, приспособленной к условиям обитания в Великобритании и Ирландии (<https://bibba.com/>). В Швеции еще в 1990 г. был организован проект по защите местных популяций темной лесной пчелы (<https://www.nordbi.se/>). Для восстановления генофонда темной лесной пчелы необходим поиск и дальнейший мониторинг сохранившихся популяций. Популяционно-генетические исследования на территории России на основе анализа межгенного участка *COI-COII* мтДНК и девяти SSR-локусов яДНК, используемых в данном исследовании, показали, что на Урале и в Поволжье сохранился массив чистопородного генофонда темной лесной пчелы, распределенный в пяти популяциях: бурзянской и татышлинской (РБ), южно-прикамской и вишерской (Пермский край) и камбарской (Республика Удмуртия) [11]. В данном исследовании было установлено, что в янаульской выборке за во-

семь лет произошло увеличение доли аллельного варианта PQQQ. Данный аллельный вариант PQQQ характерен для пчелосемей из Пермского края. В иглинской выборке наблюдается снижение доли интрогрессии ветви С как на уровне митохондриального, так и ядерного генома.

Для оценки динамики генетической структуры популяций темной лесной пчелы нами были оценены выборки из трех районов РБ. Это выборки из янаульской и бурзянской популяции темной лесной пчелы, где пробы были отобраны из разных пасек, и выборка из племенной пасеки Иглинского р-на, специализирующейся на разведении *A. m. mellifera* в отсутствие благоприятной буферной зоны. Кластерный анализ генетической структуры на основе полиморфизма SSR-локусов показал, что за семь лет в иглинской выборке произошло снижение уровня интрогрессии на 14.6%. Тогда как в янаульской и бурзянской произошло увеличение уровня интрогрессии генофонда линии С. Минимальная дивергенция между выборками, отобранными в разные годы, составила 0.0173 в Янаульском р-не. В иглинской и бурзянской выборках дивергенция почти одинакова и составила 0.0488 и 0.0503 соответственно. Следовательно, можно предположить, что за 6–7 лет произошло небольшое изменение генофонда данных выборок. Если в иглинской выборке изменение идет в сторону улучшения, то в бурзянской наблюдается гибридизация с подвидами из эволюционной ветви С. Дивергенция между выборками С и М, используемыми в данном исследовании как референсные, составила 0.4920. Наибольшая дивергенция наблюдается между янаульскими выборками и выборкой С (табл. 2). По данным J. Cridland с соавт., значение попарных F_{st} между выборками пчел из эволюционных ветвей М и С, вычисленное на основе полногеномных данных, составляет 0.268; в своем исследовании авторы изучали подвиды пчел, принадлежащие пяти эволюционным ветвям [6]. Нами были использованы подвиды пчел, принадлежа-

Таблица 3. Попарные F_{st} между выборками четырех подвидов

	С	М	Yn2011	Yn2019	Ig2012	Ig2019	Bz2013	Bz2019
С	0.0000	0.4920	0.5334	0.5119	0.2894	0.3988	0.4987	0.4045
М	*	0.0000	0.0263	0.0128	0.0980	0.0605	0.0828	0.0299
Yn2011	*	*	0.0000	0.0173	0.1249	0.0759	0.0626	0.0278
Yn2019	*	*	*	0.0000	0.1103	0.0589	0.0668	0.0251
Ig2012	*	*	*	*	0.0000	0.0488	0.0895	0.0559
Ig2019	*	*	*	*	*	0.0000	0.0700	0.0134
Bz2013	*	*	*	*	*	*	0.0000	0.0503
Bz2019	*	*	*	*	*	*	*	0.0000

Примечание. С – референсная выборка ветви С, М – референсная выборка ветви М, Yn2011 – Янаульская 2011, Yn2019 – Янаульская 2019, Ig2012 – Иглинская 2012, Ig2019 – Иглинская 2019, Bz2013 – Бурзянская 2013, Bz2019 – Бурзянская 2019, * – $p < 0.05$.

щие только двум эволюционным ветвям – М и С. Эти результаты показывают, что используемый подход анализа генетической структуры популяций сильно зависит от численности выборок и количества анализируемых локусов.

На основе полученных данных мы предположили, что сохранению генофонда *A. m. mellifera* способствуют два основных фактора. Первый фактор – это наличие благоприятной буферной зоны, то есть наличие непрерывного массива семей *A. m. mellifera*. Сохранность янаульской популяции обеспечивается за счет соседства с Пермским краем и Удмуртией, где большинство семей принадлежат к *A. m. mellifera*. Второй фактор – это контроль со стороны пчеловода. Он включает в себя мониторинг подвидовой принадлежности с последующей заменой маток в гибридных семьях и искусственное осеменение спермой трутней, принадлежащих к *A. m. mellifera*, если естественный трутневый фон неблагоприятный. Пример иглинской выборки показывает, что данные мероприятия могут привести к восстановлению генофонда темной лесной пчелы.

Неожиданные результаты были получены для бурзянской популяции. Несмотря на действующий запрет ввоза пчелосемей на охраняемую природную территорию, в исследуемой выборке был выявлен опасный уровень гибридизации. За шесть лет интрогрессия генофонда ветви С увеличилась на 6.4% и составила 16.1% на уровне ядерного генома и 24% на уровне митохондриального. Причиной такой разницы является наличие благоприятного трутневого фона, который компенсирует последствия завоза пчелосемей из ветви С и таким образом сдерживает гибридизацию. Следовательно наличие благоприятного трутневого

фона не является единственным гарантом сохранности генофонда темной лесной пчелы. Без контроля со стороны пчеловодов и отсутствия мониторинга дальнейшая судьба данной популяции находится под угрозой. На сегодняшний день запрещено завозить пчел на территорию заповедника “Шульган-Таш” и заказника “Алтын Сокол”. Общая площадь данных охранных зон небольшая (225 и 899 км² соответственно, т.е. около 25% от территории Бурзянского р-на) и, следовательно, для обеспечения охраны бурзянской популяции этой площади недостаточно. Необходимо ввести запрет на ввоз пчел не только на охраняемые территории, а на всю территорию Бурзянского р-на. Несмотря на то, что местное население старается контролировать завоз пчел, как показывают наши данные, он все же происходит. В Норвегии на территории площадью около 3500 км² разрешается содержать только *A. m. mellifera*, и примерно такие же территории отведены под разведение *A. m. carnica* [19]. Аналогичную тактику пчеловодства можно внедрить и в РБ – выделить территории, где преобладает *A. m. mellifera* или *A. m. carnica*, и разводить их в пределах выделенной зоны.

Чтобы компенсировать потери пчелосемей пчеловоды вынуждены закупать пчелосемьи неизвестного происхождения. Зачастую ими оказываются пакеты с подвидами из эволюционной ветви С, поскольку они более доступны. Решением данной проблемы является создание селекционных центров по разведению темной лесной пчелы. Основная задача таких селекционных центров должна заключаться прежде всего не в создании экономически эффективных линий и

породных типов, а в восстановлении естественного генофонда.

Авторы выражают благодарность В.О. Кугейко, М.Н. Косареву, АНО “Алтын Солок” (Золотая Борть), а также всем пчеловодам за предоставленный материал и сотрудничество.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 19-54-70002 (3-й, 4-й и 5-й авторы) и госзадания АААА-А21-121011990120-7 (1-й и 2-й авторы) с использованием оборудования ЦКП “Агидель” и УНУ “Кодинк” УФИЦ РАН.

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Patel V., Pauli N., Biggs E. et al. Why bees are critical for achieving sustainable development // *Ambio*. 2021. V. 50. P. 49–59. <https://doi.org/10.1007/s13280-020-01333-9>
2. Jensen A.B., Palmer K.A., Boomsma J.J., Pedersen B.V. Varying degrees of *Apis mellifera ligustica* introgression in protected populations of the black honeybee, *Apis mellifera mellifera*, in northwest Europe // *Mol. Ecol.* 2005. V. 14. P. 93–106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02399.x>
3. Espregueira Themudo G., Rey-Iglesia A., Robles Tascon L. et al. Declining genetic diversity of European honeybees along the twentieth century // *Sci. Reports*. 2020. V. 10. 10520. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67370-2>
4. Wallberg A., Han F., Wellhagen G., Dahle B. et al. A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera* // *Nat. Genetics*. 2014. V. 6(10). P. 1081–1088. <https://doi.org/10.1038/ng.3077>
5. Techer M.A., Clemencet J., Simiand C. et al. Large-scale mitochondrial DNA analysis of native honey bee *Apis mellifera* populations reveals a new African subgroup private to the South West Indian Ocean islands // *BMC Genet.* 2017. V. 18(1). P. 53. <https://doi.org/10.1186/s12863-017-0520-8>
6. Cridland J.M., Tsutsui N.D., Ramirez S.R. The complex demographic history and evolutionary origin of the western honey bee, *Apis mellifera* // *Genome Biol. Evol.* 2017. V. 9(2). P. 457–472. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx009>
7. Tihelka E., Cai C., Pisani D., Donoghue P.C.J. Mitochondrial genomes illuminate the evolutionary history of the Western honey bee (*Apis mellifera*) // *Sci. Reports*. 2020. V. 10. 14515. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71393-0>
8. Ruttner F. Biogeography and Taxonomy of Honey Bees. Berlin: Springer, 1998. 284 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-72649-1>
9. Ильясов Р.А., Петухов А.В., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Локальные популяции *Apis mellifera mellifera* L. на Урале // *Генетика*. 2007. Т. 43. № 6. С. 855–858.
10. Кугейко В.О. Морфофункциональные аспекты селекции среднерусских пчел в условиях Республики Башкортостан: Дис. ... канд. биол. наук. Уфа: Башкирский гос. аграр. ун-т, 2002. 151 с.
11. Ильясов Р.А. Генетическая структура популяции и филогенетическое положение темной лесной пчелы *Apis mellifera mellifera* L. Урала и Поволжья: Дис. ... доктора биол. наук. Уфа: Ин-тут биохимии и генетики Уфимского науч. центра РАН, 2016. 326 с.
12. Bertrand B., Alburaki M., Legout H. et al. MtDNA COI-COII marker and drone congregation area: An efficient method to establish and monitor honeybee (*Apis mellifera* L.) conservation centres // *Mol. Ecol. Resour.* 2015. V. 15. P. 673–683. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12339>
13. Meixner M.D., Pinto M.A., Bouga M. et al. Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera* // *J. Apicultural Res.* 2013. V. 52(4). P. 1–28. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.05>
14. Earl D.A., von Holdt B.M. Structure Harvester: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method // *Conservation Genet. Resources*. 2012. V. 4(2). P. 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
15. Jakobsson M., Rosenberg N.A. CLUMPP: A cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure // *Bioinformatics*. 2007. V. 14. P. 1801–1806. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm233>
16. Parejo M., Wragg D., Gauthier L. et al. Using whole-genome sequence information to foster conservation efforts for the European dark honey bee, *Apis mellifera mellifera* // *Front Ecol Evol.* 2016. V. 4. P. 140. <https://doi.org/10.3389/fevo.2016.00140>
17. Hassett J., Browne K.A., McCormack G.P. et al. A significant pure population of the dark European honey bee (*Apis mellifera mellifera*) remains in Ireland // *J. Apicultural Res.* 2018. V. 57(3). P. 337–350. <https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1433949>
18. Pinto M.A., Henriques D., Chavez-Galarza J., et al. Genetic integrity of the Dark European honey bee (*Apis mellifera mellifera*) from protected populations: A genome-wide assessment using SNPs and mtDNA sequence data // *J. Apicultural Res.* 2014. V. 53(2). P. 269–278. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.53.2.08>
19. Bouga M., Alaux C., Bienkowska M. et al. A review of methods for discrimination of honey bee populations as applied to European beekeeping // *J. Apicultural Res.* 2011. V. 50(1). P. 51–84. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.50.1.06>

Dynamics of the Genetic Structure of *Apis mellifera* Populations in the Southern Urals**M. D. Kaskinova^{a, *}, L. R. Gaifullina^a, E. S. Saltykova^a, A. V. Poskryakov^a, and A. G. Nikolenko^a**^a *Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*^{*}*e-mail: kaskinovamilyausha@mail.ru*

We analyzed samples of bees from three districts of the Republic of Bashkortostan, including samples from protected natural areas, selected with a 6–8 year interval to assess changes in their genetic structure. The polymorphism of the intergenic region *COI-COII* of mitochondrial DNA and 9 SSR loci of nuclear DNA was analyzed. In the *Apis mellifera mellifera* population from a protected natural area, the introgression of the gene pool of subspecies from the evolutionary lineage C was revealed. The results allow us to propose measures to limit the import of bee colonies from the evolutionary lineage C.

Keywords: *Apis mellifera* L., hybridization, dark forest bee, specially protected natural areas.

УДК 575.174:599.9

ПОЛИМОРФИЗМ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК И ШЕСТИ ГЕНОВ
ЯДЕРНОГО ГЕНОМА В ПОПУЛЯЦИИ АМУРСКИХ ЭВЕНКОВ© 2022 г. М. А. Губина¹, *, В. Н. Бабенко¹, В. А. Бацевич², Н. А. Лейбова³, А. П. Забияко⁴¹Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт
и Музей антропологии, Москва, 125009 Россия³Институт этнологии и антропологии им. Н.Н. Миклухо-Маклая Российской академии наук, Москва, 119334 Россия⁴Амурский государственный университет, Благовещенск, 675000 Россия

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

Поступила в редакцию 21.01.2021 г.

После доработки 17.06.2021 г.

Принята к публикации 23.06.2021 г.

Проведен анализ по шести генам ядерного генома *ACE* (I/D, rs1799752), *NOS3* (4b/4a, rs61722009), *ADRA2B* (I/D, rs28365031), *MTHFR* (C677T, rs1801133), *TCF7L2* (rs7903146) и *CSK* (rs1378942), а также митохондриальной ДНК в популяции амурских эвенков. Выявлено, что для эвенков наиболее характерны восточно-евразийские гаплогруппы мтДНК с преобладанием двух: С и D (58%), данные гаплогруппы наиболее характерны для популяций Северной Азии и Сибири. Среди западно-евразийских гаплогрупп самая распространенная – H (15%). Наименьшие статистически значимые различия по мтДНК выявлены между эвенками, тюрками и самодийцами и наибольшие с финно-угорскими популяциями. Наблюдаемое распределение частот локусов по четырем генам в исследованной популяции не отличалось от теоретически ожидаемого согласно закону Харди–Вайнберга, исключение составили *TCF7L2* и *CSK*. Обнаружена статистически значимая ассоциация по гамети-ческому неравновесию между четырьмя парами генов (*ACE* и *MTHFR*, *ACE* и *TCF7L2*, *NOS3* и *CSK*, *ADRA2B* и *MTHFR*). Проведена оценка распределения сочетаний аллелей по шести локусам методом максимального правдоподобия. Посчитано число ассоциированных аллелей на каждый псевдо-гаплотип. Обнаружено, что число ассоциированных аллелей пропорционально возрастает с уменьшением частоты встречаемости псевдо-гаплотипов ($R^2 = 0.5$, $R = 0.7$, $d.f. = 16$, $p < 0.001$). Полученные нами данные, возможно, характерны не только для исследованной популяции и вероятно могут отражать такие процессы как гамети-ческое неравновесие (мейотический драйв).

Ключевые слова: митохондриальная ДНК, гены, генотипы, гаплотипы, полиморфизм, полимеразная цепная реакция, рестрикция.

DOI: 10.31857/S0016675822010039

Огромный интерес для исследователей представляют народы Северной, Центральной и Восточной Азии с их этнической историей и широким ареалом расселения. Коренные этносы Сибири всегда были интересным объектом популяционной генетики человека. Эвенки – один из таких этносов, который занимает обширную территорию от левобережья Енисея на западе до Охотского моря на востоке. Южная граница проходит по левобережью Амура и Ангаре. Амурская область располагается на территории, которая с глубокой древности выступала ареалом расселения и перемещения популяций человека. Бассейн среднего течения Амура находится на стыке Северной, Восточной и Северо-Восточной Азии. Амур связывал обитателей Восточной Сибири и Приморья.

Равнины к северу от Амура являлись своеобразным перекрестком переселенческих путей и местом культурных контактов древних обитателей территории современного Китая, Кореи и населения Северо-Восточной Азии [1]. В период палеометалла (2–1 тыс. до н. э.) данный регион населяли племена, которые, вероятно, относились к предкам тунгусо-маньчжурской общности. В эпоху раннего средневековья земли Верхнего и Среднего Амура заселяли племена мохэ, вероятно связанные с тунгусо-маньчжурскими и монголо-язычными племенами [2]. Язык – эвенкийский, принадлежит к тунгусо-маньчжурской группе алтайской языковой семьи. Среди северных народностей эвенки – самая многочисленная языковая группа. Численность эвенков, проживающих на

территории Российской Федерации – 37843 чел. [3]. В Амурской области ныне проживает около 1300 человек, большая их часть живет в пяти поселках – Бомнак (Зейского района), Ивановское (Селемджинского района), Усть-Уркима, Первомайское и Усть-Нюкжа (Тындинского района) [4].

В антропологическом отношении современные эвенки неоднородны. Для эвенков Прибайкалья, Якутии и Охотского побережья характерны черты байкальского антропологического типа. Среди западных эвенков таежной зоны Средней Сибири широко распространен катанский антропологический тип, в южных группах эвенков Забайкалья и бассейна Среднего Амура – центрально-азиатский [5–7]. Таким образом, на протяжении многих тысячелетий на данной территории происходили процессы миграции и метисации, которые оказали влияние на популяцию эвенков.

В последнее время в связи с изменением образа жизни и диеты у коренных народов Сибири и Дальнего Востока все чаще выявляется предрасположенность к сердечно-сосудистым заболеваниям и сахарному диабету. Данные заболевания относятся к мультифакториальным, и их развитие обусловлено как взаимодействием факторов внешней среды, образа жизни, так и наследственной предрасположенностью. В формировании наследственной предрасположенности участвует большое количество генов, которые могут работать как самостоятельно, так и путем взаимодействия друг с другом и с факторами внешней среды [8, 9]. Многочисленные исследования позволили определить круг генов-кандидатов, вовлеченных в патогенез этих заболеваний [10–15]. Также было выявлено, что сочетания “неблагоприятных” аллелей с различной частотой встречаются среди больных не только мужского и женского пола, но и национальной принадлежности [16–18]. Ранее было высказано предположение, что в процессе расо- и этногенеза частоты аллелей и генотипов приобрели свою специфику у разных народов и это, в свою очередь, могло внести определенный вклад в наследственную компоненту в разных популяциях [19].

Таким образом, в рамках реализации поставленных задач в работе приведены данные по полиморфизму генов *ACE* (I/D, rs 1799752), *NOS3* (4b/4a rs 61722009), *ADRA2B* (I/D, rs28365031), *MTHFR* (C677T, rs1801133), *TCF7L2* (rs7903146) и *CSK* (rs1378942), а также митохондриальной ДНК в популяции амурских эвенков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор образцов и выделение ДНК

Материалом для исследования является ДНК представителей амурских эвенков, проживающих в населенных пунктах Усть-Нюкжа Тындинского

района и Ивановское Селемджинского района Амурской области. Выборка составила 230 человек, из них 147 женщин и 83 мужчины. Выборка представлена шестью возрастными группами (1939–1960 гг., 8.2%; 1961–1970, 10%; 1971–1980, 12.6%; 1981–1990, 12.2%; 1991–2000, 11.3%; 2001–2011, 45.7%). ДНК была выделена из буккального эпителия, собранного у добровольцев (взрослых и детей старше восьми лет). Забор материала проводили после подписания информационного согласия участниками исследования или их законными представителями. Материал был собран в ходе экспедиционных работ под руководством профессора А.П. Забияко и к. б. н. доцента В.А. Бацевич. Этническую принадлежность людей выясняли методом анкетирования и дополнительным перекрестным опросом, с выяснением национальности родителей как минимум до третьего поколения.

ДНК из буккального эпителия выделяли с помощью набора реагентов РеалБест экстракция 100 (Вектор Бест, Новосибирск).

Анализ мтДНК

Проведен анализ нуклеотидной последовательности гипервариабельных сегментов I и II (ГВС I и II) у 98 представителей эвенкийской национальности. Фрагменты ГВС I и II мтДНК соответствуют 15898–16402 пн (и гипервариабельный сайт 16519) и 73–400 пн, согласно референсной последовательности [20]. Амплифицировали методом ПЦР с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров, подобранных по референсной последовательности мтДНК [20]. После электрофореза ПЦР-продукты переосаждали с использованием ацетата аммония, проводили прямое секвенирование по методу Сенгера с использованием автоматического секвенатора ABI Prism 3500 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems) и BigDay Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit. Полиморфные позиции выявляли методом сопоставления с Кембриджской последовательностью [20]. Гаплогруппы определяли с помощью анализа характерных “диагностических” сайтов рестрикции (ПДРФ).

Анализ ядерных генов

Полиморфизм генов *ACE* (I/D, rs 1799752), *NOS3* (4b/4a, rs 61722009), *ADRA2B* (I/D, rs28365031), *MTHFR* (C677T, rs1801133), *TCF7L2* (rs7903146) и *CSK* (rs1378942) тестировали с помощью ПЦР и рестрикционного анализа (табл. 1).

Таблица 1. Последовательности праймеров и особенности амплификации полиморфных участков генов

Ген, полиморфизм	Полиморфный сайт	Последовательность праймеров	Темп. отжига	Рестриктаза	Длина
<i>ACE</i> , rs1799752	I/D	5'-GCCCTGCAGTGTCTGCAGCATGT-3', 5'-GGATGGCTCTCCCCGCCTTGTCTC-3' Для инсерции 5'-TGGGACCACAGCGCCCGCCACTAC-3', 5'-TCGCCAGCCCTCCCATGCCATAA-3'	58°C 58°C	—	319 пн – делеция, 355 пн – инсерция
<i>NOS3</i> , rs61722009	4a/4b	5'-AGGCCCTATGGTAGTGCCTTT-3', 5'-TCTCTTAGTGCTGTGCTCAC-3'	65°C	—	4bb – 420 пн, 4aa – 393 пн, гетерозиготы 420/393 пн
<i>ADRA2B</i> , rs28365031	I/D	5'-AGGGTGTTTGTGGGGCATCTCC-3', 5'-CAAGCTGAGGCCGGAGACTG-3'	68°C		103/112 пн
<i>MTHR</i> , rs1801133	C677T	5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3', 5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'	62°C	<i>HinfI</i>	198 пн – продукт при наличии аллеля <i>T</i> : 175 и 23 пн
<i>TCF7L2</i> , rs7903146	C/T	5'-TAGAGCGCTAAGCACTTTTAGGA-3', 5'-TTGCCTTCCCTGTAAGTGTG-3'	58°C	<i>RsaI</i>	96 пн
<i>CSK</i> , rs1378942	C/A	5'-TGAATCTGAGCTCATTATAGGGAGG-5', 5'-CCTGCTGAAGAAATAGTGGGTGAT-3'	60°C	<i>HaeIII</i>	124 пн

Примечание. [Lindpaintner et al., 1995; Fujimura et al., 2000; Wang et al., 1999; Avila-Vanzini et al., 2015; Rolim et al., 2015; Hu et al., 2014].

Статистические методы

Многомерное шкалирование, основанное на частотах гаплотипов мтДНК, было посчитано с помощью программы XLStat (Addinsoft, Inc., 2011).

Генетическое разнообразие h было оценено как:

$$h = [n/(n-1)] \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right),$$

где n – общее число последовательностей, k – число различных гаплотипов, и p_i – частота различных гаплотипов.

Генетическую дифференциацию между различными популяциями и ее статистическую значимость оценивали с помощью статистики F_{ST} (рассчитанной по частотам гаплогрупп и гаплотипов ГВС I мтДНК). Статистическую значимость межпопуляционных различий по частотам гаплогрупп оценивали с помощью точного теста популяционной дифференциации (количество шагов цепей Маркова – 10000, уровень значимости $P = 0.001$). Среднее генетическое разнообразие по локусам считали методом максимального правдоподобия [21]. Расчеты индексов разнооб-

разия для мтДНК, фазирование и подсчет псевдо-гаплотипов по ядерным генам проводились с использованием программы Arlequin 3.01 [22].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Митохондриальный генофонд амурских эвенков

Исследование нуклеотидной последовательности гипервариабельных сегментов I и II (ГВС I и II) у 98 представителей эвенкийской национальности выявило 61 гаплотип, который был классифицирован в 10 гаплогрупп (табл. 2, 3). Генетическое разнообразие в данной популяции составило 0.984.

Большинство гаплогрупп относятся к восточно-евразийским (A, C, D, G, M), их частота составила 70%. Распространенными являются две: C и D (58%). Обе гаплогруппы характерны для популяций Азии и Восточной Сибири [23].

Самая высокая частота (71.8%) гаплогруппы C выявлена в Центральной Сибири у эвенков: у западных она колеблется от 48.4 до 71.9%, у восточных – 62% [24, 25]. Ранее было показано, что данная гаплогруппа выявлена в Северо-Восточной

Таблица 2. Частота встречаемости гаплотипов мтДНК в популяции эвенков

№ п/п	ГВС I (-16000)	ГВС II	Гаплогруппа	%
1	134-223-290-319	73-152	A	1
2	223-290-311-362	73-152-263	A	1
3	223-290-319-362	73-152	A	1
4	179-223-290-311-319-362	73-152	A2a3	4
5	219-223-298-327	73	C	1
6	219-223-298-327	73-96-124-146	C	1
7	223-298-318-519	73-263	C	1
8	223-298-327	73-146	C	2
9	223-298-327	73	C	1
10	223-298-327-519	73-146	C	3
11	223-298-327-519	73	C	2
12	223-298-327-519	73-146-249d	C	2
13	223-298-327-519	73-146-263	C	2
14	129-223-298-327	73-124-249d	C4a1	1
15	129-223-298-327	73-249d-263	C4a1	1
16	129-223-298-327-519	73-249d-263	C4a1	1
17	93-129-223-298-327	73	C4a1	4
18	93-129-223-298-327-519	73	C4a1	1
19	129-150-223-235-298-327-519	73-152	C4a1a4a	1
20	129-150-223-298-327-519	73-195-263	C4a1a4a	1
21	51-171-223-198-327-344-357-519	73	C4a2a1	1
22	171-223-198-327-344-357-519	73-249d-263	C4a2a1	8
23	171-223-241-198-327-344-357	73-249d-263	C4a2a1	1
24	223-298-327-344-357-519	73-146	C4a2a1	1
25	93-223-261-288-298-519	73	C5a	1
26	223-261-288-298-519	73	C5a1	4
27	223-288-298-327-390-519	73-85-152	C5a1	2
28	223-263-288-327-390-519	73	C5d	1
29	223-362		D	2
30	223-362-519	73-263	D	1
31	223-362-368	85-152	D4i	2
32	223-362-368-557-558	125-127	D4i	1
33	145-223-362	152-199	D4I1a	2
34	223-291-362	73	D4j2	1
35	223-263-362	73-150-263	D4j4a	1
36	223-263-362-519	73-149-254-263	D4j4a	2
37	223-263-362-519	73-263	D4j4a	1
38	172-182-183-189-223-362	73-150-263	D5a2a	1
39	223-227-274-278-362	73-152-263	G2a	1
40	223-227-278-362	73-152-263	G2a	2
41	519	73-124	H	1
42	519	73-146	H	1
43	CRS	73	H	2
44	519	73-151-152-201-249-263	H	1
45	362-519	73	H13b	1

Таблица 2. Окончание

№ п/п	ГВС I (–16000)	ГВС II	Гаплогруппа	%
46	362	73-152	H13b	1
47	162-465-519	73-263	H1a3b	4
48	357	73	H1af	1
49	304	73	H5	1
50	288-344-362	73	H8	2
51	129-172-223-311-391-519	73-199	I1a	1
52	126-171	69-73-150	J	1
53	126-241	73-150-195-263	J	1
54	69-126-143-519	73-150-152	J	1
55	140-187-209-223-519	73-146	M7a2a3	2
56	92-172-182-183-189-266-362	73-150-263	N10a	4
57	92-172-182-183-189-362	73-150-198	N10a	1
58	172-182-183-189-296-342-362	73-150-263	N10a	1
59	172-182-183-189-362	73-150-198	N10a	2
60	148-223	73	N	1
61	223-519	73-263	N	2
<i>h</i>				0.984

Азии у юкагиров (67%), на Дальнем Востоке у тубаларов (19.4%), в Западной Сибири у тундровых ненцев (48%), на Алтае у алтайцев (32.2%), в Восточном Саяне у тофаларов (62.1%), в Западном Саяне у хакасов (27.3%), в районе оз. Байкал у бурят (21.2%), в Волго-Уральском регионе у башкир (12.1%) [23, 25–28]. Таким образом, самая высокая частота данной гаплогруппы обнаружена в Центральной Сибири (52.6%), далее идет Восточный Саян (49.9%), Западная Сибирь (25.6%), Северо-Восточная Азия (22.8%), Алтайский регион и Западный Саян (20%), район оз. Байкал (19%), Дальний Восток (12.3%) и Волго-Уральский регион (3.7%) [23]. В Монголии ее частота достигает 15%, а в популяциях Кореи, Китая, Таиланда, Японии и Индии колеблется от 1 до 5% [23, 28–34]. По частоте данной гаплогруппы эвенки наиболее близки к якутам, тоджинцам и тофаларам [23, 35]. Среди гаплотипов гаплогруппы С наиболее распространенным вариантом является 171-223-198-327-344-357-519 (8%). Ранее данный гаплотип был выявлен в популяциях Средней Азии (тувинцы (3.5%), алтайцы (3.2%), хакасы (2.7%) и шорцы (3.6%)), Дальнего Востока (юкагиры (9.1%), эвенки (5.1%), нганасаны (1.8%)), самодийцев (селькупы (4.2%) и ненцы (1.3)) и кетов (4.5%) [23, 36–38]. Гаплогруппа С, как полагают, возникла между Каспийским морем и оз. Байкал приблизительно 60 000 лет назад, и сейчас наиболее распространена в Северо-Восточной Азии (включая Сибирь) [25, 28, 39].

Второй по распространенности в популяции амурских эвенков является гаплогруппа D (13.3%). Гаплогруппа D широко представлена в популяциях Северной Азии и Алтае-Саянского нагорья. Частота гаплогруппы D у западных эвенков варьирует от 21.1 до 30.4%, у восточных – 24.1% [24, 25]. Самая высокая частота зафиксирована в районе оз. Байкал, от 46.7% у сойотов до 29% у калмыков [23]. На Дальнем Востоке частота этой гаплогруппы – 27.5% (от 0 у удэгейцев до 68.8% у ороков) [25, 40], на Алтае – 18.7% (от 8.9% у алтай-кижи до 26.5% у алтайских казахов) [23], в Западной Сибири – 17% (от 2.9% у кетов до 39.5% у долган) [28, 38], в районе Восточного и Западного Саяна обнаружена у тувинцев (15.6%) и отсутствует у тофа-

Таблица 3. Частота встречаемости гаплогрупп мтДНК в популяции амурских эвенков

№ п/п	Гаплогруппа	%
1	A	7.0
2	C	43.9
3	D	13.3
4	G2a	3.1
5	H	15.3
6	I1a	1.0
7	J	3.1
8	M7a2a3	2.0
9	N10a	8.2
10	N	3.1

ларов [23], в Волго-Уральском регионе — 4.8% (от 0.8% у мордвы до 12.7% у удмуртов) [26]. Гаплогруппа D с низкой частотой найдена и в некоторых северо-восточных популяциях Европы, таких как карелы, скандинавы, популяциях балтийского региона [41, 42]. Наиболее представленным в исследованной популяции является гаплотип 16223-16263-16362 (D4) и его производные (4%) (табл. 2). Данный гаплотип был обнаружен на Дальнем Востоке и в Китае. На Дальнем Востоке его частота колеблется от 0.6% у ульчей до 12.6% у эвенков [43]. Ранее проведенные исследования популяции эвенков также показали высокую частоту данного гаплотипа (7.9%) [36]. В Китае его частота составила 0.96% [44].

Среди западно-евразийских гаплогрупп выявлено пять (N, R, H, I, J), их частота составила 30%. Самая высокая частота гаплогруппы H, (около 48%), выявлена во всех европейских популяциях, а также в Волго-Уральском регионе (42%) [26, 45]. Ранее было показано, что данная гаплогруппа была выявлена у амурских эвенков (2.6%) и западных (1.4%) [24, 36].

В табл. 4 представлены статистически значимые межпопуляционные различия (F_{ST}). Наибольшие различия популяции эвенков выявлены с коми, мордвой, финнами, немцами и португальцами (табл. 5), наименьшие различия выявлены у эвенков с шорцами, тувинцами, алтайцами, тофаларами, ненцами и нганасанами. Нами не выявлено никаких статистических различий между алтайцами и шорцами, чувашами и татарами, португальцами и немцами ($F_{ST} = 0$) (табл. 5).

На рис. 1 представлены результаты многомерного шкалирования попарных генетических расстояний гаплотипов мтДНК в некоторых популяциях. Наблюдается достаточно четкое разграничение популяций. В верхнем поле расположились популяции, в генетическом пуле которых выявлено наибольшее количество западно-евразийских гаплогрупп, — это популяции, относящиеся к финно-угорской языковой семье, а также португальцы, немцы, исландцы, селькупы и кеты. В нижнем поле — популяции, проживающие на территории Алтае-Саянского нагорья, а также эвенки, буряты, монголы, китайцы и две самодийские популяции (ненцы и нганасаны). В генетическом пуле этих популяций в основном присутствуют восточно-евразийские гаплогруппы.

Таким образом, проведенные нами исследования отражают сложную историю населения Сибири. Наличие в генетическом пуле эвенков около 70% восточно-евразийских гаплогрупп, с преобладанием двух C и D (57%), сближает их не только с популяциями Северной Азии и Сибири, но и с некоторыми популяциями Алтае-Саянского нагорья. Из западно-евразийских гаплогрупп самой распространенной у эвенков является гап-

логруппа H (15%), характерная для европеоидных популяций. Выявленные нами результаты согласуются с ранее полученными данными по эвенкам.

Полиморфизм генов *ACE*, *NOS3*, *ADRA2B*, *MTHFR*, *TCF7L2* и *CSK*

Ранее было высказано предположение, что в процессе расо- и этногенеза частоты аллелей и генотипов приобрели свою специфику у разных народов, а также с изменением их образа жизни и диеты; дальнейшие исследования должны включать изучение генов некоторых мультифакториальных заболеваний, таких как инсульт, инфаркт, артериальная гипертензия, диабет и т.д. [19]. В настоящей работе проведено исследование популяции амурских эвенков по шести генам *ACE* (I/D, rs1799752), *NOS3* (4b/4a, rs61722009), *ADRA2B* (I/D, rs28365031), *MTHFR* (C677T, rs1801133), *TCF7L2* (rs7903146) и *CSK* (rs1378942) (табл. 5).

Одним из ключевых звеньев ренин-ангиотензиновой системы является ангиотензинпревращающий (ACE) фермент, активность которого примерно на 50% находится под генетическим контролем. Этот полиморфизм гена *ACE* обусловлен присутствием (инсерцией) или отсутствием (делецией) элемента *Alu* размером 287 пн в интроне 16. Лица, гомозиготные по делеции, имеют более высокий уровень ангиотензинпревращающего фермента в плазме, высокую активность превращения ангиотензина I в ангиотензин II и разрушение вазопротекторного пептида брадикинина [59, 60]. В связи с этим было высказано предположение, что аллель D (делеция) является фактором риска артериальной гипертензии, так как играет важную роль в регуляции кровяного давления и водно-солевого обмена [61, 62]. Анализ гена *ACE* (I/D) показал, что частота встречаемости варианта D (делеция) в исследованной нами выборке в 2 раза ниже, чем варианта I (инсерция), 36.3 и 63.7% соответственно (табл. 5). По частоте генотипа DD (13.5%) амурские эвенки близки к бурятам и шорцам (14.5 и 10.1% соответственно) [19, 63]. У русских его частота колеблется от 20.8 до 32.6%, у мордвы — 25.4% [19, 64].

Полиморфизм гена *NOS3* характеризуется количеством повторов участка в 4-м интроне гена *NOS3* (4a/4b) и ассоциирован с изменением уровня NO в плазме крови и, как было показано, является причиной изменения уровней нитритов и нитратов в плазме крови [65, 66]. Тандемные повторы в интроне 4 (4b/4a) являются одним из изученных маркеров гена *NOS3*. Вариант 4b включает пять повторов (по 27 пн), а редкий вариант 4a связан с делецией одной из трех первых пар оснований. В изученной нами популяции вариант 4b с пятью повторами (95.8%) встречается чаще, чем вариант 4a (4.2%) (табл. 5). В популяциях Восточной Сибири частота гомозиготного генотипа

Таблица 4. Статистически значимые межпопуляционные различия по частотам гаплогрупп мтДНК (F_{ST})

№ п/п	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
1	0.000																											
2	0.033	0.000																										
3	0.054	0.095	0.000																									
4	0.085	0.124	0.020	0.000																								
5	0.074	0.093	0.174	0.200	0.000																							
6	0.085	0.050	0.204	0.238	0.059	0.000																						
7	0.013	0.050	0.055	0.082	0.100	0.115	0.000																					
8	0.032	0.078	0.044	0.049	0.154	0.177	0.039	0.000																				
9	0.048	0.084	0.156	0.182	0.023	0.060	0.088	0.129	0.000																			
10	0.006	0.043	0.064	0.099	0.066	0.082	0.003	0.061	0.055	0.000																		
11	0.050	0.012	0.148	0.184	0.082	0.020	0.084	0.129	0.065	0.060	0.000																	
12	0.024	0.090	0.070	0.110	0.083	0.135	0.033	0.070	0.074	0.015	0.108	0.000																
13	0.030	0.061	0.005	0.017	0.138	0.162	0.031	0.018	0.123	0.041	0.111	0.058	0.000															
14	0.054	0.064	0.154	0.181	0.006	0.030	0.085	0.133	0.010	0.047	0.045	0.080	0.122	0.000														
15	0.096	0.138	0.016	0.004	0.212	0.255	0.100	0.054	0.199	0.117	0.199	0.116	0.021	0.197	0.000													
16	0.008	0.028	0.059	0.103	0.079	0.078	0.017	0.050	0.057	0.008	0.053	0.040	0.036	0.058	0.117	0.000												
17	0.066	0.100	0.005	0.012	0.178	0.213	0.073	0.046	0.160	0.082	0.156	0.089	0.010	0.157	0.008	0.072	0.000											
18	0.037	0.052	0.061	0.075	0.147	0.138	0.046	0.010	0.121	0.057	0.089	0.086	0.033	0.117	0.081	0.045	0.052	0.000										
19	0.079	0.106	0.180	0.212	0.119	0.126	0.120	0.158	0.044	0.106	0.094	0.120	0.148	0.087	0.230	0.074	0.190	0.144	0.000									
20	0.032	0.060	0.139	0.173	0.024	0.047	0.070	0.116	0.000	0.039	0.041	0.056	0.108	0.010	0.189	0.041	0.147	0.105	0.042	0.000								
21	0.100	0.132	0.013	0.030	0.212	0.249	0.109	0.078	0.198	0.120	0.194	0.126	0.027	0.191	0.022	0.097	0.005	0.092	0.222	0.186	0.000							
22	0.028	0.082	0.074	0.137	0.134	0.149	0.031	0.080	0.101	0.019	0.111	0.029	0.062	0.110	0.148	0.014	0.103	0.089	0.107	0.078	0.123	0.000						
23	0.021	0.059	0.003	0.041	0.145	0.160	0.020	0.033	0.124	0.022	0.107	0.042	0.000	0.122	0.045	0.019	0.024	0.047	0.145	0.102	0.035	0.000						
24	0.141	0.201	0.270	0.286	0.038	0.144	0.178	0.259	0.053	0.156	0.180	0.157	0.225	0.055	0.300	0.152	0.277	0.237	0.166	0.071	0.302	0.214	0.246	0.000				
25	0.098	0.141	0.020	0.007	0.220	0.263	0.103	0.056	0.204	0.129	0.203	0.121	0.025	0.199	0.000	0.121	0.014	0.084	0.234	0.191	0.031	0.163	0.055	0.317	0.000			
26	0.083	0.051	0.185	0.219	0.161	0.095	0.125	0.169	0.114	0.120	0.033	0.161	0.147	0.117	0.238	0.086	0.196	0.138	0.092	0.084	0.228	0.138	0.142	0.238	0.237	0.000		
27	0.074	0.135	0.182	0.206	0.019	0.105	0.107	0.135	0.029	0.078	0.128	0.077	0.146	0.030	0.215	0.090	0.186	0.139	0.133	0.039	0.221	0.133	0.154	0.027	0.225	0.204	0.000	
28	0.063	0.060	0.185	0.232	0.038	0.012	0.082	0.151	0.045	0.043	0.037	0.083	0.146	0.020	0.248	0.054	0.203	0.123	0.110	0.030	0.241	0.092	0.130	0.114	0.259	0.121	0.062	0.000

Примечание. 1. т-и татары [47]; 2. казахи [48]; 3. мари [26]; 4. исландцы [49]; 5. эвенки [данное исследование]; 6. буряты [50]; 7. ханты [27]; 8. коми [26]; 9. шорцы [48]; 10. манси [51]; 11. монголы [52]; 12. селькупы [28]; 13. татары [26]; 14. тувинцы [48]; 15. немцы [53, 54]; 16. башкиры [26]; 17. мордва [26]; 18. удмурты [26]; 19. хакасы [48]; 20. алтайцы [48]; 21. финны [42, 55, 56]; 22. кеты [57]; 23. чувашки [26]; 24. тофалары [50]; 25. португальцы [58]; 26. китаецы [31]; 27. ненцы [59]; 28. нганасаны [37].

Таблица 5. Частота встречаемости генотипов и аллелей изученных генов в популяции эвенков

Ген, полиморфизм*	<i>DD</i>	<i>ID</i>	<i>II</i>	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	<i>AA</i>	<i>AC</i>	<i>CC</i>
<i>ACE</i> (230), rs1799752	13.5 (31)	45.7 (105)	40.9 (94)						
<i>NOS3</i> (228), rs61722009	0.0 (0)	8.3 (19)	91.7 (209)						
<i>ADRA2B</i> (230), rs28365031	19.6 (45)	46.1 (106)	34.3 (79)						
<i>MTHFR</i> (230), rs1801133				74.3 (171)	21.7 (50)	3.9 (9)			
<i>TCF7L2</i> (229), rs7903146				63.8 (146)	34.5 (79)	1.7 (4)			
<i>CSK</i> (224), rs1378942							72.3 (162)	23.2 (52)	4.5 (10)
	<i>D</i>	<i>I</i>		<i>C</i>	<i>T</i>		<i>A</i>	<i>T</i>	
<i>ACE</i> (230), rs1799752	36.3 (167)	63.7 (293)							
<i>NOS3</i> (228), rs61722009	4.2 (19)	95.8 (437)							
<i>ADRA2B</i> (230), rs28365031	42.6 (196)	57.4 (264)							
<i>MTHFR</i> (230), rs1801133				85.2 (392)	14.8 (68)				
<i>TCF7L2</i> (229), rs7903146				81.0 (371)	19.0 (87)				
<i>CSK</i> (224), rs1378942							83.9 (376)	16.1 (72)	

Примечание. * В скобках указан размер выборки. Для каждого генотипа и аллеля в скобках указано количество человек.

4a/4a гена *NOS3* составила 15.56% [67]. У шорцев выявлено преобладание генотипа *4b/4b* (82.5%) у коренного населения и 67.7% у некоренного населения [19]. У русских генотип *4a/4a* составил 8.7% [19], в Австралии – 1%, у британцев – 2.9%, у словаков – 5.2% [68, 69]. В азиатских популяциях встречаемость редкого генотипа колеблется от 1.4% у корейцев до 2% у японцев [65, 70]. В исследованной нами выборке редкий генотип не обнаружен.

Активация $\alpha 2B$ -адренергических рецепторов (*ADRA2B*), локализованных в гладкомышечных клетках сосудов, приводит к вазоконстрикции. При исследовании амурских эвенков была выявлена высокая частота аллеля *D* (делеция) (42.6%), который является важным генетическим маркером развития артериальной гипертензии (табл. 5). Самая высокая частота аллеля *D* выявлена у русских (47.6%) и финнов (47.5%), а самая низкая – у

японцев (35%) и корейцев (36%) [19, 71, 72]. У шорцев частота данного полиморфизма составила 39% [19]. Таким образом, по частоте аллеля *D* (42.6%) изученная нами выборка занимает промежуточное положение между японской (35%), с одной стороны, финской (47.5%) и русской (47.6%) популяциями, с другой стороны [19, 71, 72].

Ген *MTHFR* кодирует белок метилентетрагидрофолатредуктазу, участвующий в превращении гомоцистеина в метионин при наличии кофакторов – пиридоксина, цианокобаламина и субстрата – фолиевой кислоты. Гомоцистеин участвует в повреждении эндотелия сосудов: усиливается пролиферация гладкомышечных клеток, в мембранах клеток накапливаются липопротеины низкой и очень низкой плотности, снижается эластичность стенки сосудов [73]. Частота мутантного аллеля *T* у амурских эвенков составляет 14.8% (табл. 5). Самая высокая частота аллеля *T* обнаружена у ис-

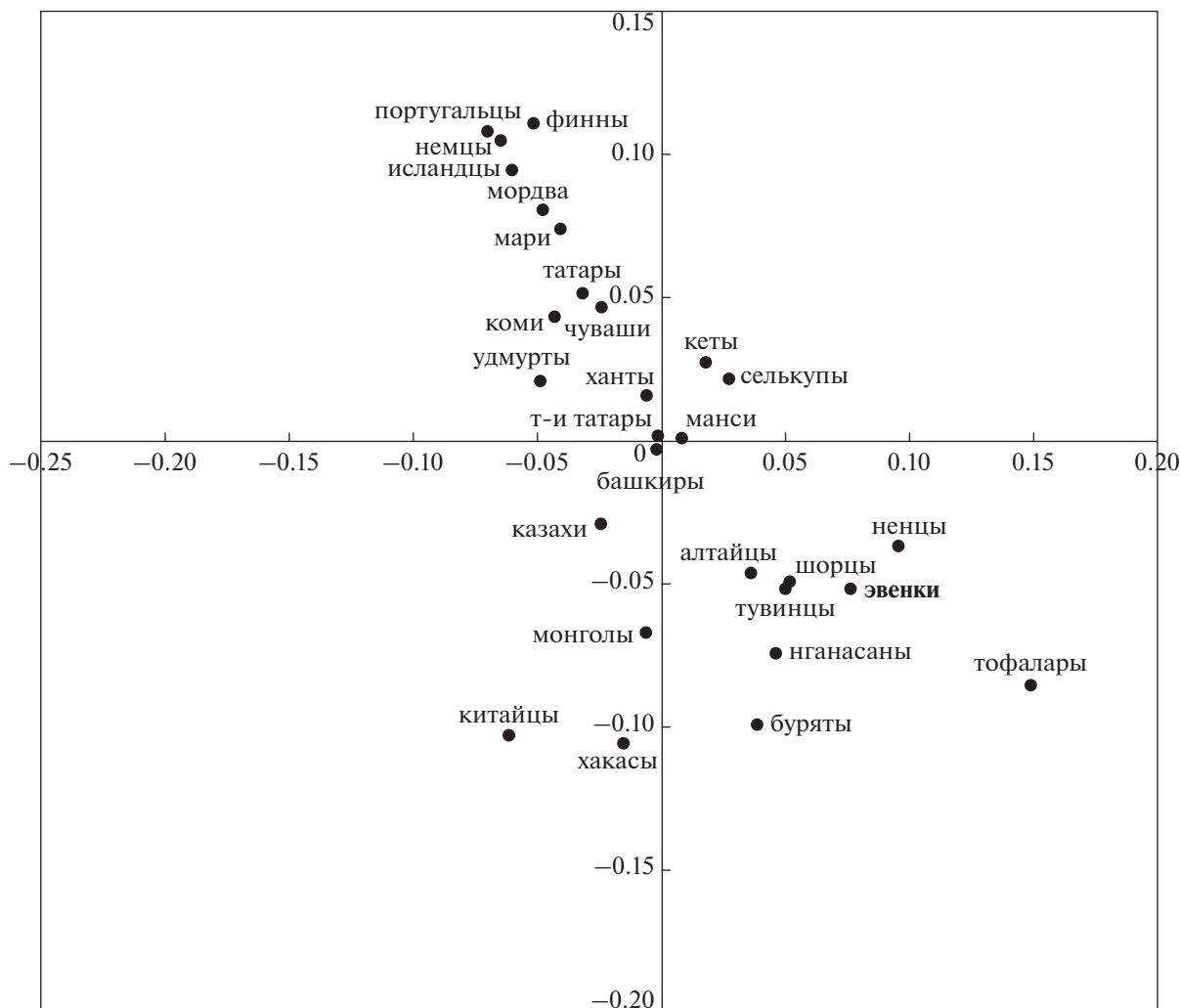


Рис. 1. Многомерное шкалирование попарных генетических расстояний восточно- и западно-евразийских гаплогрупп мтДНК в некоторых популяциях. Мордва, мари, чуваша, татары, коми, удмурты, башкиры [26]; ханты [27]; селькупы [28]; монголы [51]; китайцы [31]; нганасаны [37]; финны [42, 54, 55]; казахи, алтайцы, шорцы, тувинцы, хакасы [47]; т-и татары [46]; тофалары, буряты [49]; кеты [56]; немцы [52, 53]; исландцы [48]; манси [50]; португальцы [57]; ненцы [58].

панцев (55.0%) и самая низкая у индонезийцев (2.0%) [74, 75]. По частоте встречаемости аллеля *T* эвенки наиболее близки к шорцам (12.8%) [19]. В популяции русских его частота варьирует от 25 до 29%, в Западной Азии – 16.4%, в Восточной Азии – 34.2% и в европейских популяциях средняя частота составляет 28.8% [19, 76–81].

Ген *TCF7L2* кодирует Т-клеточный транскрипционный фактор, участвующий в контроле гомеостаза глюкозы в крови. У амурских эвенков редкий аллель *T* был выявлен с частотой 19% (табл. 5). Во всем мире его частота варьирует от 6.9% в Восточной Азии до 35% в Южной Азии, в Европе он встречается с частотой 33% [82]. Исследованная нами выборка занимает промежуточное положение между Восточной Азией, с од-

ной стороны, и Южной Азией и Европой, с другой стороны. В популяции русских его частота 23%, а у татар 35% [83, 84].

Различные семейства тирозинкиназы кодирует ген *CSK* [85]. Тирозинкиназы являются представителями семейства протеинкиназ – натрий-уретических пептидов, катализирующих перенос концевой фосфата с молекулы АТФ на гидроксильную группу остатка тирозина в молекулах клеток-мишеней, которыми представлены сердечно-сосудистая система, почки, эндокринные органы и центральная нервная система [86, 87]. Частота редкого аллеля *T* в популяции эвенков не превышает 16.1% (табл. 5). Ранее высокая частота выявлена в выборках хантов и манси (57.2%) [88]. В популяции русских она колеблется от 41% в

Таблица 6. Проверка соответствия распределению Харди–Вайнберга для шести локусов изученных генов

Гетерозиготность	<i>ACE</i>	<i>NOS3</i>	<i>ADRB2</i>	<i>MTHFR</i>	<i>TCF7L2</i>	<i>CSK</i>
Наблюдаемая	0.47059	0.08597	0.46154	0.22172	0.35294	0.23529
Ожидаемая	0.47010	0.08246	0.48553	0.25143	0.30855	0.27334
<i>P</i> -value	1.00000	1.00000	0.49148	0.10383	0.03008	0.04753

Красноярском крае до 57% в Ханты-Мансийском автономном округе [88, 89]. У корейцев его частота составила 82.8% [90]. Выявленная нами частота в исследованной популяции является самой низкой из всех исследованных групп.

Наблюдаемое распределение частот локусов по четырем генам в исследованной популяции не отличалось от теоретически ожидаемого согласно закону Харди–Вайнберга, исключение составили *TCF7L2* и *CSK* (табл. 6).

Генетическую основу различных заболеваний составляют сочетания полиморфных вариантов различных генов. В связи с вышесказанным нами проведен анализ ассоциации аллелей локусов исследуемых генов. Использован метод оценки неравновесия по сцеплению для локусов, находящихся в трансположении. В табл. 7 представлены данные о неравновесии по парному сцеплению в четырех парах генов (*ACE* и *MTHFR*, *ACE* и *TCF7L2*, *NOS3* и *CSK*, *ADRA2B* и *MTHFR*). Как мы видим, эти четыре пары имеют неравновесие по

сцеплению с вероятностью $P < 10^{-5}$. Нами были взяты эти четыре пары для детальной проверки распределения ди-гетерозигот. В табл. 8 представлены результаты достоверного отклонения от ожидаемого распределения ди-гетерозигот по четырём локусам генов. Выявлено, что наиболее часто встречаются аллели минор–мажор (гетерозиготы) и мажор–мажор (гомозиготы по мажорному аллелю). В каждой паре отмечен определяющий ген, так как он встречается с высокой частотой в сочетании мажор–минор и мажор–мажор. В первых двух парах определяющим геном является *ACE*, в третьей паре – *NOS3* и в четвертой – *ADRA2B*.

На рис. 2 представлен график частот сочетаний аллелей (псевдогаплотипов), оцененных методом максимального правдоподобия. Как мы видим на графике, из 32 псевдогаплотипов только 16 встретились в исследованной выборке 2 и более раз. Самыми распространенными (более 40) оказались пять. Нами было посчитано число аллелей риска, ассоциированных с неблагоприятным эффектом, на каждый псевдогаплотип. Как мы наблюдаем относительно графика линейной регрессии, число аллелей риска в целом пропорционально возрастает с уменьшением частоты встречаемости гаплотипов ($R^2 = 0.5$, $R = 0.7$, $df = 16$, $p < 0.001$). При том, что все аллели риска являются минорными, данная картина ожидаемая, так как число аллелей риска обратно пропорционально численности соответствующего псевдогаплотипа.

Таким образом, проведенные нами исследования амурских эвенков выявили восточно-евразийские гаплогруппы мтДНК, характерные для популяций Северной Азии и Сибири. Полученные результаты по мтДНК согласуются с ранее выявленными данными.

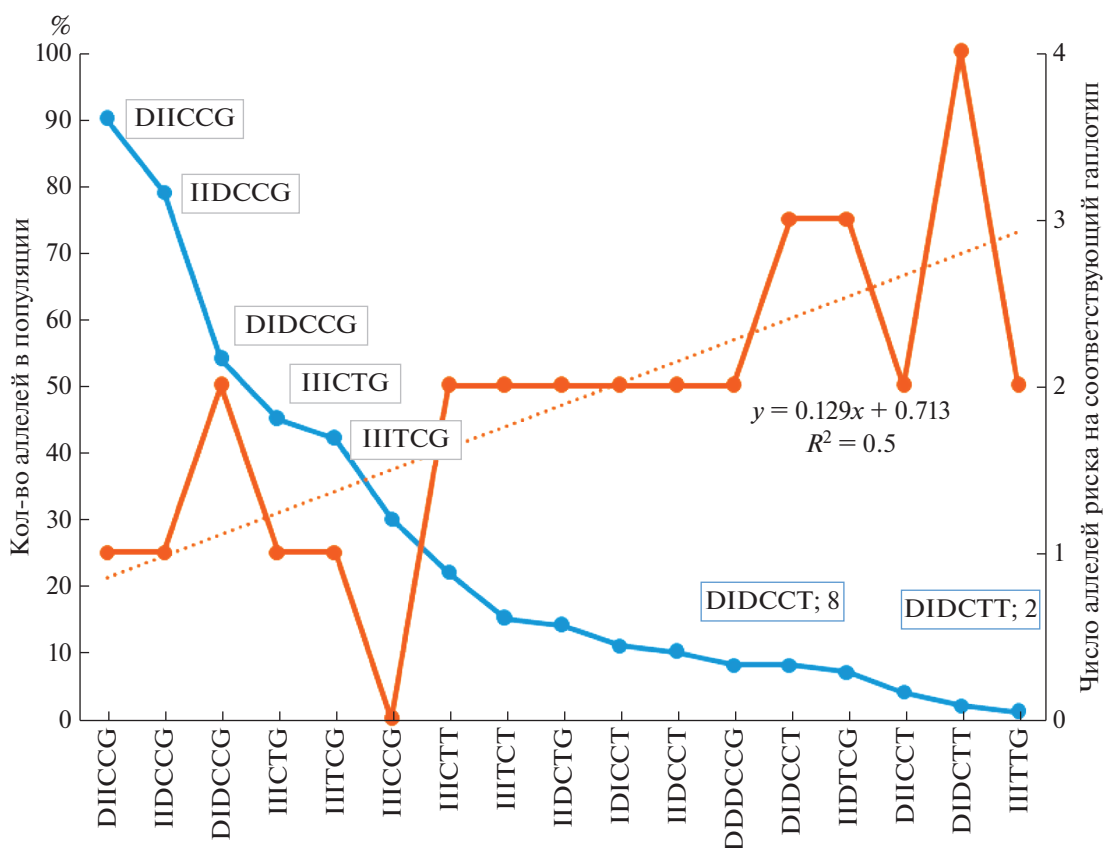
Исследованные шесть полиморфных вариантов ядерных генов, связанных с некоторыми мультифакториальными заболеваниями, такими как гипертензия, атеросклероз, ишемическая болезнь сердца и диабет, выявили, что для популяции эвенков не характерно распространение аллелей генов, предрасполагающих к данным заболеваниям. Возможно, это связано с тем, что амурские эвенки в течение продолжительного времени находились не только в благоприятных условиях окружающей среды, но и в относительной изоляции. В результате исследования сочетаний алле-

Таблица 7. Неравновесие по парному сцеплению

Гены	<i>P</i> -value
<i>ACE, NOS3</i>	0.45846 ± 0.01353
<i>ACE, ADRA2B</i>	0.14076 ± 0.01038
<i>ACE, MTHFR</i>	0.00000 ± 0.00000
<i>ACE, TCF7L2</i>	0.00000 ± 0.00000
<i>ACE, CSK</i>	0.01075 ± 0.00300
<i>NOS3, ADRA2B</i>	0.89541 ± 0.00780
<i>NOS3, MTHFR</i>	0.00880 ± 0.00288
<i>NOS3, TCF7L2</i>	0.00293 ± 0.00164
<i>NOS3, CSK</i>	0.00000 ± 0.00000
<i>ADRA2B, MTHFR</i>	0.00000 ± 0.00000
<i>ADRA2B, TCF7L2</i>	0.17107 ± 0.00969
<i>ADRA2B, CSK</i>	0.18182 ± 0.01201
<i>MTHFR, TCF7L2</i>	0.08407 ± 0.00804
<i>MTHFR, CSK</i>	0.24242 ± 0.01150
<i>TCF7L2, CSK</i>	0.51613 ± 0.01769

Таблица 8. Достоверное отклонение от ожидаемого распределения ди-гетерозигот

Гены	Псевдогаплотипы	Число ди-гетерозигот		χ^2 , <i>P</i> -value
		наблюдаемое	ожидаемое	
<i>ACE</i> , <i>MTHFR</i>	DC	166	139	$\chi^2 = 34.8$, <i>P</i> -value = 0.000001343
	IC	211	232	
	IT	65	41	
	DT	0	26	
<i>ACE</i> , <i>TCF7L2</i>	DC	161	132	$\chi^2 = 115.7$, <i>P</i> -value = 0.0000000001
	DT	5	31	
	IC	197	222	
	IT	79	52	
<i>NOS3</i> , <i>CSK</i>	DG	7	15	$\chi^2 = 8.8$, <i>P</i> -value = 0.31
	DT	12	3	
	IG	363	356	
	IT	60	68	
<i>ADRA2B</i> , <i>MTHFR</i>	DC	171	154	$\chi^2 = 10.64$, <i>P</i> -value = 0.014
	DT	11	27	
	IC	206	222	
	IT	54	39	

**Рис. 2.** График частот псевдогаплотипов, оцененных методом максимального правдоподобия. Число носителей определенного гаплотипа (кол-во человек) — синяя линия; число аллелей, ассоциированных с риском возникновения заболевания, в составе гаплотипа — оранжевая линия.

лей у индивидов показано, что число аллелей, ассоциированных с заболеваниями, пропорционально возрастает с уменьшением частоты встречаемости псевдогаплотипов. Выявленные нами неслучайные сцепления локусов, вероятно, могут отражать такие процессы как гаметическое неравновесие (мейотический драйв). Для выяснения наших предположений необходимо продолжить изучение данного набора генов на других популяциях.

Авторы выражают благодарность Научно-просветительскому Центру палеоэтнологических исследований (Москва) и лично Д.В. Пежемскому за участие в организации и проведении экспедиции в 2016 г.

Работа выполнена при финансовой поддержке Бюджетного проекта: № 0259-2021-0014, гранта МГУ им. М.В. Ломоносова для поддержки ведущих научных школ МГУ “Депозитарий живых систем Московского университета” в рамках Программы развития МГУ, гранта РФФИ, проект № 20-011-00408, в рамках темы НИР “Эволюционный континуум рода Homo”.

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 информационное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Деревянко А.П., Волков П.В., Ли Х.* Селемджинская позднелепалеолитическая культура. Новосибирск: Ин-т археологии и этнографии СО РАН, 1998. 336 с.
2. *Нестеров С.П.* Народы Приамурья в эпоху раннего средневековья. Новосибирск: Изд-во Ин-та археологии и этнографии СО РАН, 1998. 184 с.
3. Всероссийская перепись населения. 2010.
4. *Забяко А.П., Аниховский С.Э., Воронкова Е.А. и др.* Эвенки Приамурья: оленяя тропа истории и культуры / Под ред. Забяко А.П. Благовещенск, 2012. 384 с.
5. История и культура дальневосточных эвенков: историко-этнографические очерки / Под ред. Тураева В.А. СПб.: Наука, 2010. 334 с.
6. *Дебец Г.Ф.* Антропологические исследования в Камчатской области // Тр. Ин-та этнографии АН СССР. Т. XVII. 1951. 264 с.
7. *Левин М.Г.* Этническая антропология и проблемы этногенеза народов Дальнего Востока // Тр. Ин-та этнографии АН СССР. Т. XXXVI. 1958. 359 с.
8. *Баранов В.С., Иващенко Т.Э., Баранова Е.В.* Генетический паспорт — основа индивидуальной и предиктивной медицины. СПб.: Изд-во Н.-Л., 2009. 528 с.
9. *Горбунова В.Н.* Генетика и эпигенетика синтропных заболеваний // Экол. генетика. 2010. Т. 8. № 4. С. 39–43.
10. *Snapić A., Scheinin M., Groop L.C., Orho-Melander M.* The insertion/deletion variation in the $\alpha 2B$ -adrenoceptor does not seem to modify the risk for acute myocardial infarction, but may modify the risk for hypertension in sib-pairs from families with type 2 diabetes // Cardiovasc. Diabetol. 2003. V. 24. № 2. P. 15–21. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-2-15>
11. *Lima J.J., Feng H., Duckworth L. et al.* Association analyses of adrenergic receptor polymorphisms with obesity and metabolic alterations // Metabolism. 2007. V. 56. № 6. P. 757–765. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2007.01.007>
12. *Salimi S., Firoozrai M., Nourmohammadi I. et al.* Endothelial nitric oxide synthase gene intron 4 VNTR polymorphism in patients with coronary artery disease in Iran // Indian J. Med. Res. 2006. V. 124. № 6. P. 683–688.
13. *Lindpaintner K., Pfeiffer M.A., Kreutz R. et al.* A prospective evaluation of an angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease // N. Engl. J. Med. 1995. V. 332. № 11. P. 706–711. <https://doi.org/10.1056/NEJM199503163321103>
14. *Fujimura H., Kawasaki T., Sakata T. et al.* Common C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene increases the risk for deep vein thrombosis in patients with predisposition of thrombophilia // Thromb. Res. 2000. V. 98. № 1. P. 1–8. [https://doi.org/10.1016/s0049-3848\(99\)00231-5](https://doi.org/10.1016/s0049-3848(99)00231-5)
15. *Wang Y., Kikuchi S., Suzuki H. et al.* Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in intron 4 affects the progression of renal failure in non-diabetic renal diseases // Nephrol. Dial. Transplant. 1999. V. 14. № 12. P. 2898–2902. <https://doi.org/10.1093/ndt/14.12.2898>
16. *Avila-Vanzzini N., Posadas-Romero C., Gonzalez-Salazar M. et al.* The ACE I/D polymorphism is associated with nitric oxide metabolite and blood pressure levels in healthy Mexican men // Arch. Cardiol. Mex. 2015. V. 85. № 2. P. 105–110. <https://doi.org/10.1016/j.acmx.2014.12.005>
17. *Rolim T., Cancino J., Zucolotto V.* A nanostructured genosensor for the early diagnosis of systemic arterial hypertension // Biomed. Microdevices. 2015. V. 17. № 1. P. 3–9. <https://doi.org/10.1007/s10544-014-9911-z>
18. *Hu D.C., Zhao X.L., Shao J.C. et al.* Interaction of six candidate genes in essential hypertension // Genet. Mol. Res. 2014. V. 13. № 4. P. 8385–8395. <https://doi.org/10.4238/2014>
19. *Барабаш О.Л., Воевода М.И., Артамонова Г.В. и др.* Генетические детерминанты артериальной гипер-

- тонии в двух национальных когортах Горной Шории // *Терапев. архив*. 2017. Т. 89. № 9. С. 68–77.
20. *Andrews R.M., Kubacka I., Chinnery P.F. et al.* Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA // *Nat. Genet.* 1999. V. 23. № 2. P. 147.
 21. *Nei M., Tajima F.* DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases // *Genetics*. 1981. V. 97. № 1. P. 145–163.
 22. *Excoffier L., Laval G., Schneider S.* Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis // *Evol. Bioinform. Online*. 2005. № 1. P. 47–50.
 23. *Derenko M., Malyarchuk B., Grzybowski T. et al.* Origin and post-glacial dispersal of mitochondrial DNA haplogroups C and D in Northern Asia // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 12. P. 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015214>
 24. *Derenko M., Malyarchuk B., Grzybowski T. et al.* Phylogeographic analysis of mitochondrial DNA in Northern Asian populations // *Am. J. Hum. Gene.* 2007. V. 81. № 5. P. 1025–1041. <https://doi.org/10.1086/522933>
 25. *Starikovskaya E., Sukernik R., Derbeneva O. et al.* Mitochondrial DNA diversity in indigenous populations of the Southern extent of Siberia, and the origins of Native American haplogroups // *Ann. of Hum. Genet.* 2005. V. 69. № 1. P. 67–89. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2003.00127.x>
 26. *Бермишева М., Тамбетс К., Виллемс Р., Хуснутдинова Э.* Разнообразие гаплогрупп митохондриальной ДНК у народов Волго-Уральского региона России // *Мол. биология*. 2002. Т. 36. № 6. С. 990–1001.
 27. *Volodko N.V., Starikovskaya E.B., Mazunin I.O. et al.* Mitochondrial genome diversity in arctic Siberians, with particular reference to the evolutionary history of Beringia and Pleistocene peopling of the Americas // *Am. J. Hum. Genet.* 2008. V. 82. № 5. P. 1084–1100. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.03.019>
 28. *Tanaka M., Cabrera V.M., González A.M. et al.* Mitochondrial genome variation in Eastern Asia and the peopling of Japan // *Genome Res.* 2004. V. 14. № 10A. P. 1832–1850. <https://doi.org/10.1101/gr.2286304>
 29. *Lee H.Y., Yoo J.E., Park M.J. et al.* Mitochondrial DNA control region sequences in Koreans: Identification of useful variable sites and phylogenetic analysis for mtDNA data quality control // *Int. J. Legal Med.* 2006. V. 120. № 1. P. 5–14. <https://doi.org/10.1007/s00414-005-0005-6>
 30. *Kivisild T., Tolk H.-V., Parik Y. et al.* The emerging limbs and twigs of the East Asian mtDNA tree // *Mol. Biol. Evol.* 2002. V. 19. № 10. P. 1737–1751. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003996>
 31. *Yao Y.-G., Kong Q.-P., Bandelt H.-J. et al.* Phylogeographic differentiation of mitochondrial DNA in Han Chinese // *Am. J. Hum. Genet.* 2002. V. 70. № 3. P. 635–651. <https://doi.org/10.1086/338999>
 32. *Yao Y.G., Kong Q.P., Wang C.Y. et al.* Different matrilineal contributions to genetic structure of ethnic groups in the Silk Road region in China // *Mol. Biol. Evol.* 2004. V. 21. № 12. P. 2265–2280. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh238>
 33. *Metspalu M., Kivisild T., Metspalu E. et al.* Most of the extant mtDNA boundaries in south and southwest Asia were likely shaped during the initial settlement of Eurasia by anatomically modern humans // *BMC Genet.* 2004. V. 5. № 26. P. 1–25. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-5-26>
 34. *Wen B., Li H., Gao S. et al.* Genetic structure of Hmong-Mien speaking populations in East Asia as revealed by mtDNA lineages // *Mol. Biol. Evol.* 2005. V. 22. № 3. P. 725–734. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi055>
 35. *Федорова С.А., Бермишева М.А., Виллемс Р. и др.* Анализ гаплотипов митохондриальной ДНК в популяции якутов // *Мол. биология*. 2003. Т. 37. № 4. С. 643–653.
 36. *Губина М.А., Гырголькау Л.А., Бабенко В.Н. и др.* Полиморфизм митохондриальной ДНК в популяциях коренных жителей Дальнего Востока // *Генетика*. 2013. Т. 49. № 7. С. 862–876.
 37. *Гольцова Т.В., Осипова Л.П., Жаданов С.И., Виллемс Р.* Влияние брачной миграции на генетическую структуру популяции нгансан Таймыра: генеалогический анализ по маркерам митохондриальной ДНК // *Генетика*. 2005. Т. 41. № 7. С. 954–965.
 38. *Derbeneva O., Starikovskaya E., Wallace D., Sukernik R.* Traces of early Eurasians in the Mansi of Northwest Siberia revealed by mitochondrial DNA analysis // *Am. J. Hum. Genet.* 2002. V. 70. № 4. P. 1009–1014. <https://doi.org/10.1086/339524>
 39. *Kong Q.P., Yao Y.G., Sun C. et al.* Phylogeny of East Asian mitochondrial DNA lineages inferred from complete sequences // *Am. J. Hum. Genet.* 2003. V. 73. № 3. P. 671–676. <https://doi.org/10.1086/377718>
 40. *Бермишева М.А., Кутуев И.А., Спицын В.А. и др.* Анализ изменчивости митохондриальной ДНК в популяции ороков // *Генетика*. 2005. Т. 41. № 1. С. 78–84.
 41. *Lappalainen T., Laitinen V., Salmela E.* Migration waves to the Baltic Sea region // *Ann. Hum. Genet.* 2008. V. 72. Pt. 3. P. 337–348. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.2007.00429.x>
 42. *Richards M.B., Macaulay V., Hickey E. et al.* Tracing European founder lineages in the Near Eastern mtDNA pool // *Am. J. Hum. Genet.* 2000. V. 67. № 5. P. 1251–1276.
 43. *Sukernik R.I., Volodko N.V., Mazunin I.O. et al.* Mitochondrial genome diversity in the Tubalar, Even, and Ulchi: Contribution to prehistory of native Siberians and their affinities to native Americans // *Am. J. Phys. Anthropol.* 2012. V. 148. № 1. P. 123–138. <https://doi.org/10.1002/ajpa.22050>
 44. *Xu K., Hu S.* Population data of mitochondrial DNA HVS-I and HVS-II sequences for 208 Henan Han

- Chines // *Legal Med.* 2015. V. 17. № 4. P. 287–294.
<https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2015.02.003>
45. *Simoni L., Calafell F., Pettener D. et al.* Geographic patterns of mtDNA diversity in Europe // *Am. J. Hum. Genet.* 2000. V. 66. № 1. P. 262–278.
<https://doi.org/10.1086/302706>
 46. *Наумова О.Ю., Рычков С.Ю., Морозова И.Ю. и др.* Разнообразие митохондриальной ДНК у тобольских сибирских татар // *Генетика.* 2008. Т. 44. № 2. С. 257–268.
 47. *Губина М.А., Дамба Л.Д., Бабенко В.Н. и др.* Гаплогенетическое разнообразие мтДНК и Y-хромосомы в популяциях Алтае-Саянского региона // *Генетика.* 2013. Т. 49. № 3. С. 376–391.
 48. *Helgason A., Sigurdaroottir S., Gulcher J. et al.* mtDNA and the origin of the Icelanders: Deciphering signals of recent population history // *Am. J. Hum. Genet.* 2000. V. 66. № 3. P. 999–1016.
<https://doi.org/10.1086/302816>
 49. *Деренко М.В., Малярчук Б.А., Денисова Г.А. и др.* Молекулярно-генетическая дифференциация этнических групп Южной и Восточной Сибири по данным о полиморфизме митохондриальной ДНК // *Генетика.* 2002. Т. 38. № 10. С. 1409–1416.
 50. *Pimenoff V., Cjmas D., Palo J. et al.* Northwest Siberian Khanty and Mansi in the junction of West and East Eurasian gene pools as revealed by uniparental markers // *Eur. J. Hum. Genet.* 2008. V. 16. № 10. P. 1254–1264.
<https://doi.org/10.1038/ejhg.2008.101>
 51. *Kolman C., Sambuughin N.* Mitochondrial DNA analysis of Mongolian populations and implications for the origin of New World founders // *Genetics.* 1996. V. 142. № 4. P. 1321–1334.
 52. *Lutz S., Weisser H., Heizmann J. et al.* Location and frequency of polymorphic positions in the mtDNA control region of individuals from Germany // *Int. J. Legal Med.* 1998. V. 111. № 2. P. 67–77.
<https://doi.org/10.1007/s004140050117>
 53. *Pfeiffer H., Brinkmann B., Huhne J. et al.* Expanding the forensic German mitochondrial DNA control region database: Genetic diversity as a function of sample size and microgeography // *Int. J. Legal Med.* 1999. V. 112. № 5. P. 291–298.
<https://doi.org/10.1007/s004140050252>
 54. *Lahermo P., Sajantila A., Sistonen P. et al.* The genetic relationship between the Finns and the Finnish Saami (Lapps): Analysis of nuclear DNA and mtDNA // *Am. J. Hum. Genet.* 1996. V. 58. № 6. P. 1309–1322.
 55. *Kittles R., Bergen A., Urbane K. et al.* Autosomal, mitochondrial, and Y Chromosome DNA variation in Finland: Evidence for a male specific bottleneck // *Am. J. Phys. Anthropol.* 1999. V. 108. № 4. P. 381–399.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8644\(199904\)108:4<381::AID-AJPA1>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8644(199904)108:4<381::AID-AJPA1>3.0.CO;2-5)
 56. *Дербенева О.А., Стариковская Е.В., Володько Н.В. и др.* Изменчивость митохондриальной ДНК у кетов и нганасан в связи с первоначальным заселением Северной Евразии // *Генетика.* 2002. Т. 38. № 11. С. 1554–1560.
 57. *Pereira L., Prata M.J., Amorim A.* Diversity of mtDNA lineages in Portugal not a genetic edge of European variation // *An. Hum. Genet.* 2000. V. 64. № 6. P. 491–506.
<https://doi.org/10.1046/j.1469-1809.2000.6460491.x>
 58. *Saillard J., Evseva I., Tranebjaerg L., Norby S.* Mitochondrial DNA diversity among nenets. *Archaeogenetics: DNA and the population prehistory of Europe.* McDonald Institute for archaeological research monograph series / Eds Renfrew C., Boyle K. Cambridge: Cambr. Univ. Press, 2000. P. 255–258.
 59. *Danser A.H., Schalekamp M.A., Bax W.A. et al.* Angiotensin-converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion/insertion polymorphism // *Circulation.* 1995. V. 92. № 6. P. 1387–1388.
<https://doi.org/10.1161/01.cir.92.6.1387>
 60. *Шулутко Б.И.* Артериальная гипертензия. СПб.: Сотис, 2001. С. 98–108.
 61. *Fox C.S., Heard-Costa N.L., Vasan R.S. et al.* Genome-wide linkage analysis of weight change in the framingham heart study // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005. V. 15. № 6. P. 3197–3201.
<https://doi.org/10.1161/01.cir.92.6.1387>
 62. *Караулова Ю.Л., Павлова А.В. Мусеев В.С. и др.* Изучение клинико-генетических детерминант гипертрофии левого желудочка у больных артериальной гипертензией и гипертрофической кардиомиопатией // *Практикующий врач.* 2006. Т. 1. № 2. С. 58–63.
 63. *Бимбаев А.Б.-Ж., Баурова Т.А., Шадрин Н.А. Хойкова О.У.* Системная гипертензия при гломерулонефрите у детей разных этнических групп и ее взаимосвязь с полиморфизмом гена ангиотензинконвертирующего фермента // *Бюлл. ВСНЦ СО РАМН.* 2005. № 5(43). С. 128–133.
 64. *Гончарова Л.Н., Сергутова Н.П., Кузовенкова О.Н. и др.* Показатели центральной гемодинамики и полиморфизм генов ренин-ангиотензивной системы у больных артериальной гипертензией в республике Мордовия // *Мед. вестник Башкортостана.* 2011. Т. 6. № 2. С. 357–361.
 65. *Ichihara S., Yamada Y., Fujimura T. et al.* Association of a polymorphism of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with myocardial infarction in the Japanese population // *Am. J. Cardiol.* 1998. V. 1. № 1. P. 3–6.
[https://doi.org/10.1016/s0002-9149\(97\)10806-2](https://doi.org/10.1016/s0002-9149(97)10806-2)
 66. *Ignarro L.J.* Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein // *Circ. Res.* 1989. V. 65. № 1. P. 1–21.
<https://doi.org/10.1161/01.res.65.1.1>
 67. *Баурова Т.А., Долгих В.В., Бимбаев А.Б.-Ж. и др.* Взаимосвязь полиморфизма гена эндотелиальной синтазы окиси азота и эссенциальной артериальной гипертензии в популяциях Восточной Сибири // *Бюл. Восточно-Сибирского науч. центра СО РАМН.* 2007. № 3(65). С. 64–65.
 68. *Granath B., Taylor R.R., van Bockxmeer F.M., Mamotte C.D.* Lack of evidence for association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and coronary artery

- disease in the Australian Caucasian population // *J. Cardiovasc. Risk*. 2001. V. 8. № 4. P. 235–241.
<https://doi.org/10.1177/174182670100800408>
69. *Milutinović A., Hruskovicova H.* The *eNOS* gene polymorphism does not have a major impact on lipid parameters and premature coronary artery disease in Slovene men (Caucasians) // *Folia Biol. (Praha)*. 2005. V. 51. № 2. P. 47–49.
70. *Kim I.J., Bae J., Lim S.W. et al.* Influence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (786TNC, 4a4b, 894GNT) in Korean patients with coronary artery disease // *Thrombosis Res.* 2007. V. 119. № 5. P. 579–585.
<https://doi.org/10.1016/j.thromres.2006.06.005>
71. *Suzuki N., Matsunaga T., Nagasumi K. et al.* Alpha(2B)-adrenergic receptor deletion polymorphism associates with autonomic nervous system activity in young healthy Japanese // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003. V. 88. № 3. P. 1184–1187.
<https://doi.org/10.1210/jc.2002-021190>
72. *Snapir A., Heinonen P., Tuomainen T.P. et al.* An insertion/deletion polymorphism in the alpha2B-adrenergic receptor gene is a novel genetic risk factor for acute coronary events // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2001. V. 37. № 6. P. 1516–1522.
[https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(01\)01201-3](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(01)01201-3)
73. *Weisberg I., Tran P., Christensen B. et al.* A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity // *Mol. Genet. Metab.* 1998. V. 64. № 3. P. 169–172.
<https://doi.org/10.1006/mgme.1998.2714>
74. *Добролюбов А.С., Липин М.А., Поляков А.В., Фетисова И.Н.* Полиморфизм генов фолатного обмена и болезни человека // *Вестн. новых мед. технологий*. 2006. Т. 13. № 4. С. 71–73.
75. *Botto L.D., Yang Q.* 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: A HuGE review // *Am. J. Epidemiol.* 2000. V. 151. № 9. P. 862–877.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a010290>
76. *Калашишникова Е.А., Кокаровцева С.Н.* Ассоциация наследственных факторов тромбофилии с невынашиванием беременности у женщин в русской популяции // *Мед. генетика*. 2005. Т. 4. № 8. С. 386–391.
77. *Al-Shahrani H., Al-Dabbagh N., Al-Dohayan N. et al.* Association of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism with primary glaucoma in Saudi population // *BMC Ophthalmol.* 2016. V. 16. № 1. P. 156–163.
<https://doi.org/10.1186/s12886-016-0337-7>
78. *Gupta S., Bhaskar P. K., Bhardwaj R.* MTHFR C677T predisposes to POAG but not to PACG in a North Indian population: A case control study // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 7. e103063.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103063>
79. *Micheal S., Qamar R., Akhtar F. et al.* MTHFR gene C677T and A1298C polymorphisms and homocysteine levels in primary open angle and primary closed angle glaucoma // *Mol. Vis.* 2009. № 15. P. 2268–2278.
80. *Nilforoushan N., Aghapour S., Raoofian R. et al.* Lack of association between the C677T single nucleotide polymorphism of the MTHFR gene and glaucoma in Iranian patients // *Acta Med. Iranica*. 2012. V. 50. № 3. P. 208–212.
81. *Zhang L., Chen B.* Correlation between MTHFR polymorphisms and glaucoma: A meta-analysis // *Mol. Genet. Genomic Med.* 2019. V. e5387. № 4. P. 1–7.
<https://doi.org/10.1002/mgg3.538>
82. *Lou L., Wang J., Wang J.* Genetic associations between transcription factor 7 Like 2 rs7903146 polymorphism and type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis of 115,809 subjects // *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 2019. V. 11. № 56. P. 3.
<https://doi.org/10.1186/s13098-019-0451-9>
83. *Самойленко В.А., Петрова Н.В., Бабаджанова Г.Ю. и др.* Роль гена-модификатора *TCF7L2* в возникновении диабета у взрослых больных муковисцидозом // *Пульмонология*. 2014. № 2. С. 33–39.
84. *Авзалетдинова Д.Ш., Шарипова Л.Ф., Кочетова О.В. и др.* Анализ ассоциаций полиморфного маркера rs7903146 гена *TCF7L2* с сахарным диабетом 2 типа в татарской этнической группе, проживающей в Башкортостане // *Сахарный диабет*. 2016. Т. 19. № 2. С. 119–124.
85. *Naik M.U., Caplan J.L., Naik U.P.* Junctional adhesion molecule-A suppresses platelet integrin $\alpha IIb\beta 3$ signaling by recruiting Csk to the integrin-c-*Src* complex // *Blood*. 2014. V. 123. № 9. P. 1393–1402.
<https://doi.org/10.1182/blood-2013-04-496232>
86. *Tintori C., Fallacara A.L., Radi M. et al.* Combining X-ray crystallography and molecular modeling toward the optimization of pyrazolo[3,4-d]pyrimidines as potent c-*Src* inhibitors active *in vivo* against neuroblastoma // *J. Med. Chem.* 2015. V. 58. № 1. P. 347–361.
<https://doi.org/10.1021/jm5013159>
87. *Meng Y., Roux B.* Locking the active conformation of c-*Src* kinase through the phosphorylation of the activation loop // *J. Mol. Biol.* 2014. V. 426. № 2. P. 423–435.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.10.001>
88. *Корнеева Е.В., Воевода М.И., Семаев С.Е., Максимов В.Н.* Ассоциация rs1378942 гена *CSK* с артериальной гипертензией у молодых жителей с метаболическим синдромом, проживающих в северных условиях // *Совр. пробл. науки и образования*. 2019. № 2. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=28646>
89. *Платунова И.М., Никулина С.Ю., Чернова А.А. и др.* Роль гена *CSK* в развитии ишемического инсульта // *Совр. пробл. науки и образования*. 2016. № 6. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view>
90. *Park Y.M., Kwock C.K., Kim K. et al.* Interaction between single nucleotide polymorphism and Urinary Sodium, Potassium, and Sodium-Potassium ratio on the risk of hypertension in Korean // *Nutrients*. 2017. V. 9. № 3. P. 235–249.
<https://doi.org/10.3390/nu9030235>

Polymorphism of Mitochondrial DNA and Six Nuclear Genes in the Amur Evenk Population

M. A. Gubina^{a,*}, V. N. Babenko^a, V. A. Batsevich^b, N. A. Leibova^c, and A. P. Zabayako^d

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

^b Lomonosov Moscow State University, Scientific Research Institute and Museum
of Anthropology, Moscow, 125009 Russia

^c Institute of Ethnology and Anthropology named after N.N. Miklukho-Maclay,
Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

^d Amur State University, Blagoveshchensk, 675000 Russia

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

The analysis of polymorphisms for six genes of the nuclear genome *ACE* (I/D, rs1799752), *NOS3* (4b/4a, rs61722009), *ADRA2B* (I/D, rs28365031), *MTHFR* (C677T, rs1801133), *TCF7L2* (rs7903146) and *CSK* (rs1378942), as well as mitochondrial DNA in the population of Amur Evenks. It was revealed that the Eastern Eurasian mtDNA haplogroups with a predominance of two: C and D (58%), these haplogroups are most typical for the populations of North Asia and Siberia, Among the Western Eurasian haplogroups, the most common is H (15%). The smallest statistically significant differences in mtDNA were found between the Evenks, Turks, and Samoyedians and the largest with the Finno-Ugric populations. The observed distribution of the frequencies of loci for four genes in the studied population did not differ from theoretical expected according to Hardy–Weinberg's law, the exceptions were *TCF7L2* and *CSK*. A statistically significant association was found for gametic imbalance between four pairs of genes (*ACE* and *MTHFR*, *ACE* and *TCF7L2*, *NOS3* and *CSK*, *ADRA2B* and *MTHFR*). The distribution of allele combinations was assessed by the maximum likelihood method. The number of associated alleles was calculated for each pseudo-haplotype. It was found that the number of associated alleles increases proportionally with a decrease in the frequency of occurrence of pseudo-haplotypes ($R^2 = 0.5$, $R = 0.7$, $d.f. = 16$, $p < 0.001$). The data obtained by us, perhaps, are characteristic not only for the studied population and, probably, can reflect such processes as gametic imbalance (meiotic drive). To clarify our assumptions, it is necessary to continue studying this set of genes in other populations.

Keywords: mitochondrial DNA, genes, genotypes, haplotypes, polymorphisms, polymerase chain reaction, restriction.

УДК 575.174.015.3

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ
ГЕНА *ABCBI* СРЕДИ КОРЕННЫХ ПОПУЛЯЦИЙ СИБИРИ© 2022 г. Т. А. Баирова¹, *, Н. В. Немчинова¹, Е. В. Беляева¹,
А. Ю. Самбялова¹, О. А. Ершова¹, Л. В. Рычкова¹¹Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, 664003 Россия

*e-mail: tbairova38@mail.ru

Поступила в редакцию 17.02.2021 г.

После доработки 27.04.2021 г.

Принята к публикации 12.05.2021 г.

Проведен сравнительный анализ распространенности генотипов и аллелей полиморфных вариантов *C3435T* и *C1236T* гена множественной лекарственной устойчивости (*ABCBI*) среди подростков популяций коренных народов Северной Азии: тофаларов, эвенков, сойотов. Выборка включала 86 человек (26 тофаларов, 38 эвенков, 22 сойота). Средний возраст обследованных составил: у сойотов – 14 лет, эвенков – 13 лет, тофаларов – 12 лет. Для идентификации генотипов по изученным полиморфным вариантам использовали метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. *3435CC*-генотип и *1236CC*-генотип *ABCBI* ассоциированы с фармакорезистентностью. В выборках сойотов, эвенков и тофаларов частота *CC*-генотипа составила 31.82, 18.42 и 15.38% соответственно. Частота аллеля *3435C* гена *ABCBI* составила 0.59, 0.46 и 0.52 соответственно. Частота *1236CC*-генотипа *ABCBI* у сойотов составила 22.73%, эвенков – 18.42%, тофаларов – 7.69%. Частота аллеля *1236C* гена *ABCBI* у сойотов, эвенков и тофаларов составила соответственно 0.55, 0.58 и 0.54. Определение вариантов гена имеет значение для прогнозирования чувствительности к ксенобиотикам, в том числе к лекарственной терапии. Сходство частот вариантов *ABCBI* у коренных народов Северной Азии с таковыми в других азиатских и европейских популяциях позволяет рассматривать возможность применения стандартов и схем терапии заболеваний с использованием препаратов – субстратов Р-гликопротеина.

Ключевые слова: ген множественной лекарственной устойчивости, азиаты, коренные народы Северной Азии, *C3435T* (rs1045642), *C1236T* (rs1128503).

DOI: 10.31857/S0016675821110023

Эффективность лекарственной терапии связывают с функционированием продуктов генов множественной лекарственной устойчивости (Multidrug Drug Resistance, *MDR1*, в новой номенклатуре АТР BindingCassette, *ABCBI*) – представителя семейства АВС-транспортеров. К одному из широко представленных в организме АВС-транспортеру относят Р-гликопротеин (Р-gp) – мультиспецифический эффлюксный переносчик эндогенных соединений (стероидные гормоны, липиды, факторы активации тромбоцитов, альдостерон, β-амилоид, пептиды и различные интерлейкины) [1], лекарств и ксенобиотиков с различными структурами: противоопухолевые препараты, антигистаминные препараты, нейролептики, антидепрессанты, противосудорожные препараты, антимикробные и антиретровирусные препараты и др. [1–5]. Р-gp обнаруживают на апикальной мембране эндотелиоцитов гистогематических барьеров [6].

ABCBI кодирует Р-гликопротеин, располагается на 7-й хромосоме, регион q21.12, содержит 28 экзонов [7]. *ABCBI* полиморфен, описано 648 вариантов [8]. Хорошо изучены расположенные в промоторе синонимичные (не связанные с изменениями аминокислотной последовательности) однонуклеотидные замены *C3435T* (rs1045642), *C1236T* (rs1128503) из-за их высокой встречаемости в популяциях, доказанной роли в обеспечении транспорта эндогенных и токсичных экзогенных соединений, гомеостазе иммунокомпетентных клеток, роли в патогенезе заболеваний [9–13].

Данные однонуклеотидные замены связаны с измененной функциональной активностью Р-gp. Так, сотрудниками Техасского университета показано, что носительство *1236TT*-генотипа ассоциировано со снижением экспрессии белка Р-gp в плаценте на 11%, а *3435TT*-генотипа – на 16% в сравнении с носителями *CC*-генотипов [14]. По данным D. Wang с соавт. экспрессия мРНК аллеля

3435C в печени значительно выше, чем у аллеля *3435T* [15].

С другой стороны, результаты метаанализа с участием 1036 пациентов не продемонстрировали корреляции между *C3435T* и измененной фармакокинетикой субстрата Р-gp – иммунодепрессанта циклоспорина [16].

В отношении связи *C1236T* с фармакокинетикой лекарственных препаратов мнения разнятся: если одни исследователи сообщают о наличии ассоциации носительства данного однонуклеотидного полиморфизма с фармакокинетикой [17], то другие отрицают [18].

Не наблюдалось взаимосвязи гаплотипа *3435CT-G2677TA-1236CT* с транспортом субстратов Р-gp – сердечного гликозида дигоксина и цитостатика иматиниба [19]. Результаты исследования о влиянии *C3435T* и *C1236T* на метаболизм лекарственных средств противоречивы; механизм, с помощью которого экспрессия *ABCBI* регулируется, остается неясным [20]. Некоторые авторы основную роль в аллельной изменчивости экспрессии обоих вариантов *ABCBI* определяют изменением вторичной структуры мРНК [15, 20], другие – ее третичной структуры [21, 22].

Распространенность *C3435T* и *C1236T* варьирует в разных этносах и расах, что может определять вариативность терапии лекарственными препаратами, транспорт которых осуществляется Р-gp [23, 24]. Однако не известна распространенность указанных полиморфных вариантов среди некоторых коренных народов Северной Азии. Это побудило нас провести данное исследование.

Цель работы – проведение сравнительного анализа распространенности генотипов и аллелей полиморфных вариантов гена множественной лекарственной устойчивости (*ABCBI*) среди подростков коренных малочисленных популяций Северной Азии: сойотов, эвенков, тофаларов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 86 добровольцев из коренных этногрупп Сибири (тофаларов – 26 человек, эвенков – 38, сойотов – 22), проживающих на территории Иркутской области и Республики Бурятия. Исследованные коренные народы Сибири относятся к монголоидной расе, входят в состав малой североазиатской расы, но принадлежат к разным антропологическим типам: сойты и эвенки – к байкальскому, тофалары – к катаганскому. Эвенки и тофалары относятся к малочисленным народам России (постановление Правительства РФ от 24 марта 2000 г. № 255). Для всех народов характерен традиционный природо-ресурсный тип хозяйствования.

Средний возраст обследованных составил: у сойотов – 14 (12.5–15.5) лет, эвенков – 13 (11–15)

лет, тофаларов – 12 (11.5–15) лет. В проведенное исследование не включали родственников, по крайней мере в трех поколениях. Этническая принадлежность добровольцев устанавливалась на основании оценки генеалогии участника исследования по обеим родительским линиям до третьего поколения с помощью анкетирования.

Экспедиционные работы были проведены в 2009–2015 гг. в населенных пунктах, выбор которых определялся этническим составом населения, согласно данным Всероссийской переписи 2010 г., в том числе:

1) в пос. Орлик, Хужир, Сорок Окинского района Бурятии – территории компактного проживания сойотов. Согласно данным Всероссийской переписи населения (2010 г.) в России проживает 3608 сойотов. Сойоты являются потомками саянских самодийцев – древнейшего населения Восточных Саян. Говорили на вымершем сейчас языке, который относился к самодийской группе уральской языковой семьи. Впоследствии были подвержены тюркизации и перешли на близкий тувинскому сойотско-цаатанский язык.

2) в пос. Алыгжер, Нерха, Верхняя Гутара Нижнеудинского района Иркутской области (Тофаларии) – территории компактного проживания тофаларов. Согласно данным Всероссийской переписи населения (2010 г.) в России проживает 762 тофалара. В настоящее время тофалары проживают на территории Восточных Саян в пределах трех муниципальных образований, объединенных историко-культурным названием Тофалария и расположенных на юге Иркутской области, в труднопроходимой местности. Связи с областным центром г. Иркутском нет. Связь с районным центром г. Нижнеудинском осуществляется посредством малой авиации, сообщение между населенными пунктами – с использованием конного и авиатранспорта. Тофаларский язык принадлежит к саянской ветви восточно-тюркских языков.

3) в пос. Ербогачен Катангского района Иркутской области – территория компактного проживания эвенков, удаленная от областного центра г. Иркутска на расстоянии 1815 км. Связь с областным центром осуществляется посредством малой авиации, однако во время непогоды взлетно-посадочная грунтовая полоса размывается и связь прекращается. Согласно данным Всероссийской переписи населения (2010 г.), в России проживает 38 396 представителей этого этноса, из которых 1272 человек проживают на территории севера Иркутской области, в Катангском, Качугском, Казачинско-Ленском районах. Язык – эвенкийский. Принадлежит к тунгусо-маньчжурской группе алтайской языковой семьи (рис. 1).

В работе с подростками соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации



Рис. 1. Карта Иркутской области с указанием территорий обследованных популяций.

(World Medical Association Declaration of Helsinki 1964 г. в редакции 2013 г. (изменения внесены на 64-й Генеральной Ассамблее ВМАЮ, Бразилия)). Все участники исследования информированы о научной направленности исследования и дали свое согласие на участие в совместной работе.

Материалом для молекулярно-генетического исследования являлась ДНК, экстракцию которой проводили из цельной венозной крови. Образцы крови забирали из локтевой вены натошак в пробирки с антикоагулянтом (6%-й раствор этилендиаминтетрауксусной кислоты; ГОСТ 10652-73). Для выделения ДНК использовали наборы реагентов ДНК-сорб-В (ООО «НекстБио», Россия). Экстракцию ДНК осуществляли согласно протоколу производителя набора реагентов. Типирование полиморфных вариантов *C3435T* и *C1236T* гена *ABCB1* осуществляли с помощью метода полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме «реального времени» на амплификаторе ДТ-Прайм (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). Для амплификации полиморфных вариантов гена *ABCB1* были использованы «Набор реагентов для определения полиморфизма *C1236T MDR1* (rs1128503)» и «Набор реагентов для определения полиморфизма *C3435T MDR* (rs1045642)» (ООО «Синтол», Россия). Амплификацию и детекцию результатов осуществляли в соответствии с протоколом производителя наборов реагентов.

Для обработки полученных данных применяли методы математической статистики, реализованные в лицензионном интегрированном статистическом пакете комплексной обработки данных STATISTICA 6.0. Для оценки соответствия распределения

генотипов ожидаемым значениям использовали равновесие Харди–Вайнберга (онлайн-калькулятор OEGE Hardy–Weinberg Equilibrium). Для сравнения частоты аллелей и генотипов между анализируемыми группами использовали χ^2 -критерий. Различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Распределение частот генотипов и *C*-аллелей полиморфных вариантов *C3435T* и *C1236T* в исследуемых выборках подростков представлено в табл. 1.

Распределение генотипов изученных полиморфных вариантов гена *ABCB1* выявило отклонение от закона Харди–Вайнберга (H_0) в выборках тофаларов (оба полиморфных варианта) и эвенков (полиморфный вариант *C1236T*). Во всех случаях отклонения от соответствия закону H_0 связаны с увеличением частоты гетерозигот. Сравнительный анализ распределения частот генотипов не выявил статистически значимых отличий между изучаемыми выборками как для полиморфного варианта *C3435T* ($\chi^2 = 4.928$; $d.f. = 4$; $p = 0.295$), так и для полиморфного варианта *C1236T* ($\chi^2 = 8.447$; $d.f. = 4$; $p = 0.077$) гена *ABCB1*. При сравнительном анализе частот аллелей статистически значимых отличий также не обнаружено ни для полиморфного варианта *C3435T* ($\chi^2 = 1.913$; $d.f. = 2$; $p = 0.384$), ни для полиморфного варианта *C1236T* ($\chi^2 = 0.244$; $d.f. = 2$; $p = 0.885$) гена *ABCB1*. Результаты сравнительного анализа распространенности *3435C* и

Таблица 1. Распределение частоты генотипов и аллелей полиморфных вариантов *C3435T* и *C1236T ABCBI* в популяционных выборках подростков

Популяционные выборки	<i>N</i>	Генотип <i>CC</i> , абс (%)	Генотип <i>CT</i> , абс (%)	Генотип <i>TT</i> , абс (%)	Аллель <i>C</i> , %	<i>H_e</i>	<i>H_o</i>	χ^2	Соответствие равновесию Харди–Вайнберга
<i>C3435T</i>									
Сойоты	22	7 (31.82)	12 (54.55)	3 (13.64)	59.09	0.4835 ± 0.0305	0.5455 ± 0.1062	0.36	<i>p</i> > 0.05
Эвенки	38	7 (18.42)	21 (55.26)	10 (26.32)	46.05	0.4969 ± 0.0128	0.5526 ± 0.0807	0.44	<i>p</i> > 0.05
Тофалары	26	4 (15.38)	19 (73.08)	3 (11.54)	51.92	0.4993 ± 0.0144	0.7308 ± 0.087	6.59	<i>p</i> < 0.05
<i>C1236T</i>									
Сойоты	22	5 (22.73)	14 (63.64)	3 (13.64)	54.55	0.4959 ± 0.0206	0.6364 ± 0.1026	1.81	<i>p</i> > 0.05
Эвенки	38	7 (18.42)	30 (78.95)	1 (2.63)	57.89	0.4875 ± 0.0198	0.7895 ± 0.0661	14.6	<i>p</i> < 0.001
Тофалары	26	2 (7.69)	24 (92.31)	0	53.85	0.497 ± 0.017	0.9231 ± 0.0523	15.5	<i>p</i> < 0.001

Примечание. *N* – число индивидов в выборке, *H_e* – ожидаемая гетерозиготность, *H_o* – наблюдаемая гетерозиготность, *p* – уровень значимости соответствия равновесию Харди–Вайнберга. Полужирным шрифтом выделены статистически значимые отличия.

I236C гена *ABCBI* в популяциях Азии представлены в табл. 2.

Сравнительный анализ распространенности полиморфных вариантов *C3435T* и *C1236T* гена *ABCBI* свидетельствует о различиях распространенности аллелей между эвенками и узбеками за счет большей частоты встречаемости предкового аллеля *3435C* у узбеков. Распространенность аллеля *I236C* выше среди изучаемых коренных народов Сибири, чем у коренных жителей Узбекистана.

ОБСУЖДЕНИЕ

Мы описали распределение частот генотипов и аллелей полиморфных вариантов *C3435T* и *C1236T* гена *ABCBI* в выборках малых коренных народов Северной Азии: тофаларов, эвенков, сойотов. Выявлено отклонение от равновесия Ха–В в выборках тофаларов и эвенков в сторону увеличения частоты гетерозигот, что, вероятно, обусловлено высокой частотой межэтнических браков и метисацией коренного населения, несмотря на отсутствие указаний респондентов на данный факт. О высокой метисации среди тофаларов указывают сотрудники Института цитологии и генетики СО РАН, свидетельствующие, что доля браков с пришлым населением высока и составляла по состоянию на 1990-й год до 50% [29]. Отсутствие данных по другим изучаемым этносам позволяет нам обратиться к результатам Всероссийской переписи населения, зарегистрировавшей 12% этнически смешанных браков в Российской Федерации [30], что могло отразиться на популяционно-гене-

тических процессах коренных малочисленных народов Северной Азии. Высокая частота гетерозигот позволяет, с одной стороны, стабилизировать генофонд, с другой, поддерживать наследственное разнообразие в малой популяции. Как указывал в 1962 г. Алан Робертсон, гетерозиготное преимущество – это “сила, поддерживающая генетическую изменчивость в популяциях” [31].

Полученные данные по частотам *C*-аллелей полиморфных вариантов *C3435T* и *C1236T* среди коренных популяций Северной Азии находятся в пределах вариаций частот этих аллелей среди представителей разных рас, кроме африканцев, частота предкового *C*-аллеля обоих полиморфных вариантов у жителей достигает 85–91% (*p* > 0.05) [32] (табл. 3).

Имеется малое количество данных о генофонде популяций Сибири, особенно о генофонде малочисленных коренных этнических групп: сойотов, тофаларов, эвенков, в том числе о частотах генов, участвующих в метаболизме ксенобиотиков [33, 34]. Результаты представленного исследования свидетельствуют о сопоставимости частот предковых *C*-аллелей полиморфных вариантов *C1236T* и *C3435T* в изученных выборках с аналогичными данными в популяциях Европы, Латинской Америки и Азии [8]. Однако наши выводы следует считать предварительными из-за малочисленности изученных выборок, тем не менее полученные нами данные указывают на применимость у представителей коренных малочисленных народов Северной Азии стандартных клинических схем лечения с использованием препара-

Таблица 2. Сопоставление частотных характеристик распространенности предковых C-аллелей полиморфных вариантов S3435T и S1236T ABCB1 с аналогичными данными в других популяциях Азии

Популяции [ссылка]	S3435T (%)				S1236T (%)					
	N	C- <i>al.</i> , %	эвенки (46.05)	сойоты (59.90)	тофалары (51.92)	N	C- <i>al.</i> , %	эвенки (57.89)	сойоты (54.55)	тофалары (53.85)
Вьетнам [8]	99	40.4	$z = 0.712$ $p = 0.477$	$z = 2.189$ $p = 0.029$	$z = 1.337$ $p = 0.181$	99	57.6	$z = -0.093$ $p = 0.926$	$z = 0.201$ $p = 0.840$	$z = 0.329$ $p = 0.742$
Япония [8]	104	48.1	$z = 0.172$ $p = 0.863$	$z = 1.256$ $p = 0.209$	$z = 0.338$ $p = 0.736$	104	60.1	$z = 0.199$ $p = 0.842$	$z = 0.512$ $p = 0.609$	$z = 0.662$ $p = 0.508$
Китай, Пекин [8]	103	37.9	$z = 1.102$ $p = 0.270$	$z = 2.518$ $p = 0.012$	$z = 1.681$ $p = 0.093$	103	69.9	$z = 1.756$ $p = 0.079$	$z = 1.792$ $p = 0.073$	$z = 2.029$ $p = 0.042$
Тыва [25]	142	43	$z = 0.346$ $p = 0.729$	$z = 1.933$ $p = 0.053$	$z = 1.036$ $p = 0.299$	142	46	$z = 1.713$ $p = 0.087$	$z = 0.895$ $p = 0.371$	$z = 0.891$ $p = 0.373$
Чукчи [26]	77	39.0	$z = 0.879$ $p = 0.379$	$z = 2.293$ $p = 0.022$	$z = 1.468$ $p = 0.142$	77	40.9	$z = 2.289$ $p = 0.022$	$z = 1.437$ $p = 0.151$	$z = 1.464$ $p = 0.143$
Эвены [26]	48	32.3	$z = 1.684$ $p = 0.092$	$z = 2.896$ $p = 0.004$	$z = 2.156$ $p = 0.031$	48	45.8	$z = 1.422$ $p = 0.155$	$z = 0.780$ $p = 0.436$	$z = 0.763$ $p = 0.445$
Нанайцы [27]	140	55.0	$z = 1.386$ $p = 0.165$	$z = 1.508$ $p = 0.12$	$z = 0.409$ $p = 0.682$	—	—	—	—	—
Северные киргизы [25]	41	43	$z = 0.225$ $p = 0.822$	$z = 1.622$ $p = 0.105$	$z = 0.831$ $p = 0.406$	41	40	$z = 2.089$ $p = 0.037$	$z = 0.377$ $p = 0.169$	$z = 1.391$ $p = 0.164$
Южные киргизы [25]	44	49	$z = 0.220$ $p = 0.826$	$z = 0.997$ $p = 0.319$	$z = 0.159$ $p = 0.874$	44	43	$z = 1.745$ $p = 0.081$	$z = 1.069$ $p = 0.285$	$z = 1.068$ $p = 0.286$
Казахи [26]	100	56.0	$z = 1.345$ $p = 0.179$	$z = 0.305$ $p = 0.761$	$z = 0.371$ $p = 0.711$	100	41.0	$z = 2.381$ $p = 0.017$	$z = 1.474$ $p = 0.141$	$z = 1.508$ $p = 0.132$
Узбеки [28]	60	76.6	$z = 3.568$ $p < 0.001$	$z = 2.373$ $p = 0.018$	$z = 1.656$ $p = 0.096$	60	26.7	$z = 6.595$ $p < 0.001$	$z = 7.644$ $p < 0.001$	$z = 5.593$ $p < 0.001$
Пакистан [8]	96	51.0	$z = 0.595$ $p = 0.552$	$z = 0.899$ $p = 0.369$	$z = -0.039$ $p = 0.969$	96	53.1	$z = 0.574$ $p = 0.566$	$z = 0.006$ $p = 0.995$	$z = -0.061$ $p = 0.952$
Индийцы (Британия) [8]	102	59.3	$z = 1.850$ $p = 0.064$	$z = -0.096$ $p = 0.924$	$z = 0.805$ $p = 0.421$	102	59.3	$z = 0.077$ $p = 0.939$	$z = 0.411$ $p = 0.681$	$z = 0.554$ $p = 0.580$
Бангладеш [8]	86	61.0	$z = 2.05$ $p = 0.04$	$z = -0.040$ $p = 0.968$	$z = 1.005$ $p = 0.315$	86	62.8	$z = 0.620$ $p = 0.536$	$z = 0.855$ $p = 0.393$	$z = 1.030$ $p = 0.303$

Примечание. Полу жирным шрифтом выделены статистически значимые отклонения, $p < 0.001$ (с поправкой Бонферрони).

Таблица 3. Сопоставление частотных характеристик распространенности предковых *C*-аллелей полиморфных вариантов *S3435T* и *S1236T ABCVI* с аналогичными данными в популяциях Европы, Африки и Латинской Америки

Популяции [8]	<i>S3435T</i> (%)					<i>S1236T</i> (%)				
	<i>N</i>	<i>C-al.</i> , %	эвенки (46.05)	сойоты (59.90)	тофалары (51.92)	<i>N</i>	<i>C-al.</i> , %	эвенки (57.89)	сойоты (54.55)	тофалары (53.85)
Европа										
Италия	107	53.3	$z = 0.579$ $p = 0.562$	$z = 0.331$ $p = 0.741$	$z = -0.093$ $p = 0.926$	107	57.9	$z = -0.190$ $p = 0.849$	$z = 0.053$ $p = 0.958$	$z = 0.153$ $p = 0.878$
Британия, Шотландия	91	47.3	$z = -0.064$ $p = 0.949$	$z = 0.823$ $p = 0.410$	$z = 0.193$ $p = 0.847$	91	57.7	$z = -0.176$ $p = 0.861$	$z = 0.028$ $p = 0.978$	$z = 0.125$ $p = 0.900$
Финляндия	99	42.4	$z = 0.193$ $p = 0.847$	$z = 1.254$ $p = 0.210$	$z = 0.648$ $p = 0.517$	99	57.1	$z = -0.109$ $p = 0.913$	$z = -0.020$ $p = 0.984$	$z = 0.075$ $p = 0.940$
Русские	90	57	$z = 0.941$ $p = 0.347$	$z = 0.006$ $p = 0.995$	$z = 0.235$ $p = 0.814$	90	45	$z = 1.139$ $p = 0.255$	$z = 0.566$ $p = 0.571$	$z = 0.573$ $p = 0.566$
Африка										
Нигерия	99	88.3	$z = 5.003$ $p < 0.001$	$z = 2.903$ $p = 0.004$	$z = 3.906$ $p < 0.001$	99	89.9	$z = 4.034$ $p < 0.001$	$z = 3.721$ $p < 0.001$	$z = 4.007$ $p < 0.001$
Гамбия	113	81.0	$z = 3.951$ $p < 0.001$	$z = 1.891$ $p = 0.059$	$z = 2.858$ $p = 0.004$	113	83.6	$z = 3.041$ $p = 0.002$	$z = 2.768$ $p = 0.006$	$z = 3.041$ $p = 0.002$
Кения	99	85.9	$z = 4.593$ $p < 0.001$	$z = 2.520$ $p = 0.012$	$z = 3.505$ $p < 0.001$	99	88.9	$z = 3.846$ $p < 0.001$	$z = 3.538$ $p < 0.001$	$z = 3.821$ $p < 0.001$
Латинская Америка										
Пуэрто-Рико	104	57.2	$z = 0.990$ $p = 0.322$	$z = -0.005$ $p = 0.996$	$z = 0.264$ $p = 0.792$	104	59.6	$z = -0.009$ $p = 0.993$	$z = 0.199$ $p = 0.842$	$z = 0.310$ $p = 0.757$
Мексиканцы (США)	64	52.3	$z = 0.406$ $p = 0.685$	$z = 0.369$ $p = 0.712$	$z = -0.200$ $p = 0.841$	64	53.1	$z = 0.264$ $p = 0.792$	$z = -0.130$ $p = 0.896$	$z = -0.168$ $p = 0.866$
Колумбия	94	55.9	$z = 0.834$ $p = 0.404$	$z = 0.102$ $p = 0.919$	$z = 0.138$ $p = 0.890$	94	57.4	$z = -0.143$ $p = 0.886$	$z = 0.004$ $p = 0.997$	$z = 0.100$ $p = 0.921$
Перу	85	62.4	$z = 1.497$ $p = 0.134$	$z = -0.031$ $p = 0.975$	$z = 0.726$ $p = 0.468$	85	67.1	$z = 0.781$ $p = 0.435$	$z = 0.847$ $p = 0.397$	$z = 0.998$ $p = 0.318$

Примечание. Полу жирным шрифтом выделены статистически значимые отклонения, $p < 0.0015$ (с поправкой Бонферрони).

тов, транспорт которых осуществляется системой P-gp.

Таким образом, сравнительный анализ частот аллелей и генотипов указывает на отсутствие статистически значимых различий встречаемости предковых C-аллелей полиморфных вариантов C1236T и C3435T как между выборками коренных популяций Северной Азии (сойтов, эвенков, тофаларов), так и с популяциями Европы, Азии и Латинской Америки. Сходство частот аллелей коренных народов Северной Азии с азиатскими и европейскими популяциями дает возможность применить использование общепринятых клинических рекомендаций для назначения лекарств – субстратов P-gp у представителей малочисленных коренных народов Северной Азии.

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. *Sharom F.J.* ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance // *Pharmacogenomics*. 2008. V. 9. № 1. P. 105–127. <https://doi.org/10.2217/14622416.9.1.105>
2. *Sarginson J.E., Lazzeroni L.C., Ryan H.S. et al.* ABCB1 (*MDR1*) polymorphisms and antidepressant response in geriatric depression // *Pharmacogenetics and Genomics*. 2010. V. 20. № 8. P. 467–475. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32833b593a>
3. *Sun J., He Z.G., Cheng G. et al.* Multidrug resistance P-glycoprotein: Crucial significance in drug disposition and interaction // *Med. Sci. Monit*. 2004. V. 10. № 1. P. RA5–RA14.
4. *Marques P., Courand P.Y., Gouin-Thibault I. et al.* P-glycoprotein influences urinary excretion of aldosterone in healthy individuals // *J. Hypertension*. 2019. V. 37. № 11. P. 2225–2231. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000002150>
5. *Gameiro M., Silva R., Rocha-Pereira C. et al.* Cellular models and in vitro assays for the screening of modulators of P-gp, MRP1 and BCRP // *Molecules*. 2017. V. 22. № 4. P. 600. <https://doi.org/10.3390/molecules22040600>
6. *Якушева Е.Н., Черных И.В., Бирюкова А.С.* Характеристика гликопротеина-P как белка транспортера лекарственных веществ // *Рос. мед.-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова*. 2011. № 3. С. 142–146.
7. *Callaghan R., Berridge G., Ferry D.R., Higgins C.F.* The functional purification of P-glycoprotein is dependent on maintenance of a lipid-protein interface // *BiochimBiophysActa*. 1997. V. 1328. № 2. P. 109. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(97\)00079-5](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(97)00079-5)
8. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ABCB1&keywords=ABCB1>
9. *Ahmed S.S., Husain R.A., Kumar S., Ramakrishnan V.* Association between *MDR1* gene polymorphisms and Parkinson's disease in Asian and Caucasian populations: a meta-analysis // *J. Neurol. Sci*. 2016. V. 368. P. 255–262. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2016.07.041>
10. *Wang J., Wang B., Bi J. et al.* *MDR1* gene C3435T polymorphism and cancer risk: A meta-analysis of 34 case-control studies // *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. 2012. V. 138. № 6. P. 979–989. <https://doi.org/10.1007/s00432-012-1171-9>
11. *Zaorska K., Zawierucha P., Świerczewska M. et al.* Prediction of steroid resistance and steroid dependence in nephrotic syndrome children // *J. Transl. Med*. 2021. V. 19. № 1. P. 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12967-021-02790-w>
12. *Bosse M., Di Roio A., Caux C., Ménétrier-Caux C.* *MDR1* in immunity: friend or foe? // *OncoImmunology*. 2018. V. 7. № 12. P. e1499388. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1499388>
13. *Marzolini C., Paus E., Buclin T., Kim R.B.* Polymorphisms in human *MDR1* (P-glycoprotein): Recent advances and clinical relevance // *Clin Pharmacol. Ther*. 2004. V. 75. № 1. P. 13–33. <https://doi.org/10.1016/j.clpt.2003.09.012>
14. *Hemauer S.J., Nanovskaya T.N., Abdel-Rahman S.Z. et al.* Modulation of human placental P-glycoprotein expression and activity by *MDR1* gene polymorphisms // *Biochem. Pharmacol*. 2010. V. 79. № 6. P. 921–925. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.10.026>
15. *Wang D., Johnson A.D., Papp A.C. et al.* Multidrug resistance polypeptide 1 (*MDR1*, *ABCB1*) variant 3435C>T affects mRNA stability // *Pharmacogenet. Genomics*. 2005. V. 15. № 10. P. 693–704. <https://doi.org/10.1097/01.fpc.0000178311.02878.83>
16. *Jiang Z.P., Wang Y.R., Xu P. et al.* Meta-analysis of the effect of *MDR1* C3435T polymorphism on cyclosporine pharmacokinetics // *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol*. 2008. V. 103. № 5. P. 433–444. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2008.00300.x>
17. *Qiu F., He X.J., Sun Y.X. et al.* Influence of *ABCB1*, *CYP3A4*18B* and *CYP3A5*3* polymorphisms on cyclosporine A pharmacokinetics in bone marrow transplant recipients // *Pharmacol Rep*. 2011. V. 63. № 3. P. 815–825. [https://doi.org/10.1016/s1734-1140\(11\)70594-1](https://doi.org/10.1016/s1734-1140(11)70594-1)
18. *Haufroid V., Mourad M., Van Kerckhove V. et al.* The effect of *CYP3A5* and *MDR1* (*ABCB1*) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients // *Pharmacogenetics*. 2004. V. 14. № 3. P. 147–154. <https://doi.org/10.1097/00008571-200403000-00002>
19. *Dickens D., Owen A., Alfievic A., Pirmohamed M.* *ABCB1* single nucleotide polymorphisms (1236C>T, 2677G>T, and 3435C>T) do not affect transport activity of human P-glycoprotein // *Pharmacogenet. Genomics*. 2013. V. 23. № 6. P. 314–323. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e3283360d10c>

20. Antonio-Andrés G., Rangel-Santiago J., Tirado-Rodríguez B. et al. Role of Yin Yang-1 (YY1) in the transcription regulation of the multi-drug resistance (*MDR1*) gene // *Leuk. Lymphoma*. 2018. V. 59. № 11. P. 2628–2638. <https://doi.org/10.1080/10428194.2018.1448083>
21. Kimchi-Sarfaty C., Oh J.M., Kim I.W. et al. A “silent” polymorphism in the *MDR1* gene changes substrate specificity // *Science*. 2007. V. 315. № 5811. P. 525–528. <https://doi.org/10.1126/science.1135308>
22. Hung C.C., Chen C.C., Lin C.J., Liou H.H. Functional evaluation of polymorphisms in the human *ABCB1* gene and the impact on clinical responses of antiepileptic drugs // *Pharmacogenet. Genomics*. 2008. V. 18. № 5. P. 390–402. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e3282f85e36>
23. Aneyaw M.M., Regateiro F., Li T. et al. *MDR1* pharmacogenetics: Frequency of the *C3435T* mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity // *Pharmacogenetics*. 2001. V. 11. № 3. P. 217–221. <https://doi.org/10.1097/00008571-200104000-00005>
24. Mirzaev K.B., Fedorinov D.S., Ivashchenko D.V., Sychev D.A. ADME pharmacogenetics: future outlook for Russia // *Pharmacogenomics*. 2019. V. 20. № 11. P. 847–865. <https://doi.org/10.2217/pgs-2019-0013>
25. Pels Y.R., Marusin A.V., Spiridonova M.G., Stepanov V.A. Polymorphism of the human *MDR1* gene in Siberian and Central Asian populations // *Mol. Biol.* 2007. V. 41. № 6. P. 894–900. <https://doi.org/10.1134/S0026893307060040>
26. Игнатъев И.В. Полиморфизм гена *MDR1*: популяционные и фармакогенетические аспекты: Дис. ... канд. биол. наук. М.: ГУНЦ Биомед. технологий РАМН, 2007. 108 с.
27. Sychev D.A., Shuev G.N., Suleymanov S.S. et al. Comparison of *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *ABCB1*, and *SLCO1B1* gene-polymorphism frequency in Russian and Nanai populations // *Pharmgenomics Pers Med*. 2017. V. 10. P. 93–99. <https://doi.org/10.2147/pgpm.s129665>
28. Туычибаева Н.М., Каримов Х.Я., Алимходжаева П.Р. et al. *ABCB1* gene *C3435T* and *C1236T* polymorphisms among patients with pharmaco-resistant epilepsy and healthy individuals // *Intern. J. BioMedicine*. 2014. V. 4. № 4. P. 209–212.
29. Гольцова Т.В., Осипова Л.П. Генетико-демографическая структура популяций коренных народов Сибири в связи с проблемами микроэволюции // *Информ. вестник ВОГиС*. 2006. Т. 10. № 1. С. 126–154.
30. Сороко Е.Л. Этнически смешанные супружеские пары в Российской Федерации // *Демографич. обозрение*. 2014. Т. 1. № 4. С. 96–123.
31. Robertson A. Selection for heterozygotes in small populations // *Genetics*. 1962. V. 47. № 9. P. 1291–1300.
32. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=7:87508829-87509829
33. Bairova T.A., Ershova O.A., Kolesnikov S.I., Kolesnikova L.I. Frequencies polymorphism of *Q192R* of the Paraoxonase I gene of different ethnic groups of Eastern Siberia // *Yakut Med. J.* 2020. № 3. P. 70–73. <https://doi.org/10.25789/YMJ.2020.71.19>
34. Самбялова А.Ю., Баирова Т.А., Беляева Е.В. и др. Полиморфизм генов *CYP2C9*, *CYP4F2*, *VKORC1* в популяции бурят // *Генетика*. 2020. Т. 56. № 12. С. 1426–1433.

The Prevalence of Polymorphic Variants of *ABCB1* Gene among Indigenous Populations of Siberia

T. A. Bairova^{a, *}, N. V. Nemchinova^a, E. V. Belyaeva^a,
A. Yu. Sambyalova^a, O. A. Ershova^a, and L. V. Rychkova^a

^aScientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, 664003 Russia

*e-mail: tbairova38@mail.ru

We compared the frequencies of genotypes and alleles of the *C3435T* and *C1236T* polymorphisms of the multidrug resistance gene (*ABCB1*) among adolescents of the indigenous populations of North Asia: Tofalars, Evenks, Soyots. The sample included 86 people (Tofalars – 26 people, Evenks – 38, Soyots – 22). The average age was: Soyots – 14 [12.5–15.5] years, Evenks – 13 [11–15] years, Tofalars – 12 [11.5–15] years. We used real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) for identify *ABCB1* genotypes. *CC* genotype *C3435T* and *CC*-genotype *C1236T* *ABCB1* gene could be the cause of drug resistance. Frequency of *CC* genotype *C3435T* gene were 31.82, 18.42, and 15.38% in Soyots, Evenks and Tofalars, respectively. The frequency of the *C* allele *C3435T* *ABCB1* gene in Soyots, Evenks, and Tofalars was 0.59, 0.46, and 0.52, respectively. Frequency of *CC*-genotype *C1236T* *ABCB1* gene were 22.73, 18.42, and 7.69% in Soyots, Evenks, and Tofalars, respectively. The frequency of the *C*-allele of the *C1236T* polymorphism of the *ABCB1* was 0.55, 0.58, and 0.54 in Soyots, Evenks, and Tofalars, respectively. Identifying gene variants is important for predicting drug susceptibility. We revealed the similarity of the frequencies of genotypes and alleles of the *C3435T* and *C1236T* *ABCB1* gene in the indigenous peoples of North Asia with other populations around world. This allows the use of clinical guidelines for drugs transported by the P-gp system.

Keywords: multidrug resistance gene, Asians, indigenous peoples of North Asia, *C3435T* (rs1045642), *C1236T* (rs1128503).

ОБЩИЕ И СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ РИСКА РАЗВИТИЯ ТРЕХ РАССТРОЙСТВ С ДЕПРЕССИВНОЙ СИМПТОМАТИКОЙ¹

© 2022 г. Е. И. Рафикова¹, *, Д. В. Шибалёв¹, М. И. Шадрина², П. А. Сломинский²,
А. Б. Гехт³, А. П. Рысков¹, В. А. Васильев¹

¹Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

²Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”,
Москва, 123182 Россия

³Научно-практический психоневрологический центр им. З.П. Соловьева, Москва, 115419 Россия

*e-mail: kat.rafikov@gmail.com

Поступила в редакцию 24.02.2021 г.

После доработки 31.03.2021 г.

Принята к публикации 20.04.2021 г.

Большинство исследований кандидатных генов ранее проводилось с использованием выборок, объединяющих пациентов с разными нозологическими формами депрессии. В настоящей работе были исследованы пациенты с расстройствами, отличающимися выраженной депрессивной симптоматикой ($N = 357$). Они были разделены на три выборки в соответствии с диагнозом: депрессивный эпизод (ДЭ), рекуррентная депрессия (РД) и смешанное тревожное и депрессивное расстройство (СТДР). В контрольную группу было включено 163 человека из восточнославянской популяции Москвы и регионов Центральной России. Было изучено 12 локусов девяти генов, связанных с нейромедиаторными или гормональными системами, влияющими на формирование настроения. Выбранные для изучения локусы, как показано ранее, ассоциированы с уровнем экспрессии гена, активностью белка или депрессивными расстройствами. В данном исследовании показано, что ген *SLC6A3* (локус 40 пн VNTR) ассоциирован со всеми изученными расстройствами, носители генотипа *LL* имеют более низкий риск развития всех изученных заболеваний. Полиморфный вариант 120 пн VNTR в гене *DRD4* ассоциирован с риском РД и СТДР. Также была показана ассоциация локуса rs6311 гена *HTR2A* с риском ДЭ и СТДР. Специфическим для РД генетическим фактором риска в изученных выборках является локус rs53576 гена *OXTR*. Для носителей гомозиготного по минорному аллелю генотипа *AA* риск развития РД оказался ниже, чем для носителей других генотипов. Распределение генотипов изученных полиморфных локусов не коррелирует с тяжестью симптомов депрессии. Локусы rs6311 (ген *HTR2A*) и 120 пн VNTR (ген *DRD4*) ассоциированы с симптомами ситуационной и личностной тревоги. Тяжесть симптомов ситуационной тревоги также ассоциирована с локусами rs53576 гена *OXTR* и *Stin2* гена *SLC6A4*.

Ключевые слова: депрессивные расстройства, тревожные расстройства, полиморфные локусы, генетическая ассоциация, *SLC6A3*, *DAT1*, *DRD4*, *HTR2A*, *OXTR*.

DOI: 10.31857/S0016675822010106

Исследование генетических причин депрессивных и тревожных расстройств продолжается около трех десятилетий. Однако накопленные экспериментальные данные не позволяют прийти к окончательному заключению об ассоциации тех или иных генов с риском заболевания и тяжестью его течения. Для большинства локусов, выбранных в настоящем исследовании, ранее была показана ассоциация с уровнем экспрессии гена

или активностью белкового продукта. Так, была показана ассоциация VNTR-полиморфизма (variable-number tandem repeat, переменное число tandemных повторов) гена дофаминального транспортера *SLC6A3* с длиной повторяющихся фрагментов 40 пн, а также локусов 48 пн VNTR и 120 пн VNTR гена *DRD4* (дофаминовый рецептор D4) с транскрипционной активностью соответствующих генов [1–4]. Исследование *post mortem* показало, что полиморфный локус rs1800497 гена *DRD2* (рецептор дофамина D2) ассоциирован с количеством рецепторов в мозге [5]. Ген *COMT* (катехол-О-метилтрансфераза) содержит в 158-м кодоне по-

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0016675822010106 для авторизованных пользователей

лиморфный локус rs4680, который представляет собой замену нуклеотида *G* на *A*, приводящую к замене аминокислоты валин (Val) на метионин (Met). Этот локус известен также под обозначением Val158Met. Аллели данного локуса отличаются активностью белкового продукта [6]. Уровень экспрессии гена серотонинового транспортера (*SLC6A4/5HTT*) ассоциирован с несколькими локусами. В промоторном регионе расположен полиморфный локус 5-HTTLPR, содержащий 14 или 16 tandemных повторов длиной 20–23 пн. В шестом повторе того же локуса находится замена *A* на *G* (rs25531) [7]. Показано, что длинный аллельный вариант локуса 5-HTTLPR (аллель *L*) ассоциирован с более высоким уровнем экспрессии, но только если в шестом повторе в локусе rs25531 находится аденин (аллель *L_A*). При этом короткий аллель *S* и длинный аллель *L_G* отличаются сниженной транскрипционной активностью [8]. Другой полиморфный локус гена *SLC6A4*, известный под обозначением *Stin2*, расположен в интроне 2 и представляет собой VNTR-полиморфизм с длиной повторяющихся фрагментов 16–17 пн. Количество повторов в данном локусе также коррелирует с транскрипционной активностью гена [9]. Также было показано, что однонуклеотидные замены в генах рецепторов серотонина первого типа *A HTR1A* (локус rs6295), первого типа *B HTR1B* (локус rs6296) и второго типа *A HTR2A* (локус rs6311) ассоциированы с уровнем экспрессии [10–13]. Предыдущие исследования показывают возможную ассоциацию между риском развития депрессивных расстройств и полиморфизмом этих функционально значимых локусов [14–19]. На данный момент не известна функциональная роль полиморфного локуса rs53576 гена окситоцинового рецептора *OXTR*. Однако было показано, что этот локус ассоциирован с объемом гиппокампа у здоровых людей [20], а также с риском униполярной депрессии [21]. Было проведено множество исследований кандидатных генов с использованием выборок, объединяющих пациентов с разными нозологическими формами депрессии под общим диагнозом “большое депрессивное расстройство”, однако результаты остаются противоречивыми [19]. Целью данной работы было проверить, являются ли найденные ранее ассоциации общими для всех расстройств депрессивного спектра или есть локусы, которые ассоциированы с риском развития определенного заболевания. Ранее мы опубликовали результаты анализа ассоциаций между полиморфизмом генов дофаминергической системы и тремя видами расстройств с выраженными симптомами депрессии: депрессивным эпизодом (ДЭ), рекуррентной депрессией (РД) и смешанным тревожным и депрессивным расстройством (СТДР) [22]. В настоящем исследовании мы объединили результаты генотипирования по локусам дофами-

нергической, серотонинергической и эндокринной систем и протестировали их ассоциацию с отдельными заболеваниями депрессивного спектра с использованием нескольких моделей наследования. Кроме того, мы провели анализ ассоциации исследованных нами локусов с тяжестью депрессивной и тревожной симптоматики.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Были исследованы пациенты с расстройствами, отличающимися выраженными симптомами депрессии ($N = 357$). Выборка пациентов была разделена на три группы в соответствии с диагнозом по МКБ-10: 1) F 32.1, депрессивный эпизод ($N = 106$, 58.5% женщин, 41.5% мужчин; средний возраст 31.8 ± 8.5 лет); 2) F 33.1, рекуррентная депрессия ($N = 149$, 67.8% женщин, 32.2% мужчин; средний возраст 34.2 ± 7.3 лет); 3) F 42.1, смешанное тревожное и депрессивное расстройство ($N = 97$, 50.5% женщин, 49.5% мужчин; средний возраст 33.9 ± 7.2 лет). Обследование пациентов и получение образцов крови проводилось в Научно-практическом психоневрологическом центре департамента здравоохранения г. Москвы. Симптомы заболевания проявились у пациентов в возрасте 18–45 лет. В выборку были включены пациенты, соответствующие следующим критериям: восточнославянское происхождение, отсутствие в анамнезе шизофрении, алкоголизма, злоупотребления наркотиками, онкологических заболеваний и неврологических расстройств (деменция, болезнь Паркинсона, инсульт, эпилепсия и др.). У всех пациентов была проведена оценка тяжести симптомов депрессии (опросник Гамильтона), ситуационной и личностной тревоги (опросник Спилберга). В контрольную группу было включено 163 человека из восточнославянской популяции Москвы и регионов Центральной России (62% женщин, 38% мужчин; средний возраст 61.9 ± 9.3 лет). Подробные данные о пациентах и контрольной группе и результаты генотипирования представлены в Приложении (табл. П.1).

От всех пациентов было получено информированное согласие. Исследование было одобрено Этическим комитетом Института молекулярной генетики.

Геномная ДНК была выделена из 250 мкл антикоагулированной венозной крови с использованием набора innuPREP Blood DNA Mini (Analytik Jena AG, Германия), в соответствии с рекомендациями производителя. Генотипирование проводилось с использованием локус-специфичной ПЦР и рестрикции специфичными эндонуклеазами рестрикции по методикам, описанным ранее [23–25].

Таблица 1. Ассоциации между аллельным полиморфизмом изученных генов и риском депрессивного эпизода

Генотип	Контрольная группа, <i>N</i> (%)	ДЭ, <i>N</i> (%)	Модель: LRT, <i>p</i>	ОШ, <i>p</i> , 95% ДИ
Ген <i>SLC6A3/DAT1</i> , локус 40 пн VNTR				
<i>LL</i>	113 (69.3)	59 (55.7)	Кодоминантная: 7.49, 0.024* Доминантная: 5.9, 0.015* Сверхдоминантная: 4.44, 0.035* Аддитивная: 6.41, 0.011*	0.57, 0.032*, 0.35–0.95
<i>LS</i>	46 (28.2)	41 (38.6)		1.56, 0.094+, 0.93–2.61
<i>SS</i>	4 (2.5)	6 (5.7)		2.34, 0.197, 0.64–8.49
Ген <i>HTR2A</i> , локус rs6311				
<i>GG</i>	63 (38.6)	41 (38.7)	Кодоминантная: 7.49, 0.022* Сверхдоминантная: 3.03, 0.081+	1.01, 0.967, 0.61–1.66
<i>AG</i>	72 (44.2)	58 (54.7)		1.52, 0.092+, 0.93–2.48
<i>AA</i>	28 (17.2)	7 (6.6)		0.33, 0.013*, 0.14–0.79

Примечание к табл. 1–4: LRT – тест отношения правдоподобий (likelihood-ratio test); ОШ – отношение шансов, рассчитаны для каждого генотипа против двух других генотипов, ДИ – доверительный интервал; ДЭ – депрессивный эпизод; РД – рекуррентная депрессия; СТДР – смешанное тревожное и депрессивное расстройство; ** выделены значения $p < 0.01$, * выделены значения $p < 0.05$, “+” – выделены значения $p < 0.1$.

Соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга было рассчитано с помощью онлайн-калькулятора (<https://wpcalc.com/en/equilibrium-hardy-weinberg/>). Оценка ассоциации между генотипом и наличием заболевания проводилась методом логистической регрессии.

Были протестированы следующие модели наследования:

1. Кодоминантная. Эта модель предполагает, что каждый генотип ассоциирован с риском заболевания независимо от других.

2. Доминантная. Гомозиготы по распространенному аллелю тестируются против гомо- и гетерозигот по редкому аллелю.

3. Рецессивная. Гомозиготы по редкому аллелю тестируются против гомо- и гетерозигот по распространенному аллелю.

4. Сверхдоминантная. Гетерозиготы противопоставляются всем гомозиготам.

5. Аддитивная. Эта модель предполагает, что наличие двух ассоциированных с заболеванием аллелей увеличивает риск заболевания в 2 раза больше, чем наличие одного такого аллеля. Тест был проведен с использованием логистической регрессионной модели, а генотипы были закодированы как 0, 1 и 2 в зависимости от количества минорного аллеля.

Логистическая регрессия проводилась отдельно для каждой модели наследования. Для анализа ассоциации генотипа с такими количественными

переменными, как тяжесть симптомов тревоги и депрессии, использовался метод отрицательной биномиальной регрессии. Значимость ассоциаций между генотипами и зависимыми переменными оценивалась с помощью теста отношения правдоподобий (likelihood-ratio test, LRT). Подбор наиболее подходящего варианта модели логистической регрессии для каждой модели наследования, как и подбор модели отрицательной биномиальной регрессии для количественных переменных, осуществлялся с помощью информационного критерия Акаике (Akaike information criterion, AIC). Локусы исключались из модели по одному, в порядке от наибольшего значения p -value к наименьшему, затем все варианты моделей сравнивались с помощью AIC и финальной считалась та модель, для которой коэффициент AIC минимален. Таким образом, из каждой статистической модели удалялись все локусы, исключение которых повышало ее качество. В табл. 1–4 приведены все локусы, которые остались в финальных вариантах статистических моделей. Анализ методами логистической и отрицательной биномиальной регрессии проводился с помощью инструментов R-статистики (программа RStudio).

Кроме того, ассоциация между генотипами по изученным локусам и риском расстройства с депрессивной симптоматикой оценивалась с использованием отношений шансов (ОШ) с 95%-ным доверительными интервалами (ДИ) с помощью онлайн-калькулятора (<https://www.medcalc.org/calc/>)

Таблица 2. Ассоциации между аллельным полиморфизмом изученных генов и риском рекуррентной депрессии

Генотип	Контрольная группа, <i>N</i> (%)	РД, <i>N</i> (%)	Модель: LRT, <i>p</i>	ОШ, <i>p</i> , 95% ДИ
Ген <i>SLC6A3/DAT1</i> , локус 40 пн VNTR				
<i>LL</i>	113 (69.3)	85 (57)	Доминантная: 6.63, 0.01* Сверхдоминантная: 6.02, 0.014+ Аддитивная: 5.87, 0.015*	0.59, 0.025*, 0.37–0.94
<i>LS</i>	46 (28.2)	59 (39.6)		1.67, 0.034*, 1.04–2.68
<i>SS</i>	4 (2.5)	5 (3.4)		1.38, 0.636, 0.36–5.24
Ген <i>DRD4</i> , локус 120 пн VNTR				
<i>LL</i>	116 (71.2)	116 (77.9)	Кодоминантная: 8.39, 0.015* Рецессивная: 8.26, 0.004** Аддитивная: 3.38, 0.066+	1.42, 0.178, 0.85–2.38
<i>LS</i>	41 (25.1)	33 (22.1)		0.85, 0.533, 0.5–1.43
<i>SS</i>	6 (3.7)	0		0.08, 0.089+, 0.0045–1.45
Ген <i>HTR1A</i> , локус rs6295				
<i>CC</i>	42 (25.8)	33 (22.1)	Кодоминантная: 4.88, 0.087+ Рецессивная: 2.96, 0.086+	0.82, 0.455, 0.49–1.38
<i>CG</i>	91 (55.8)	98 (65.8)		1.52, 0.073+, 0.96–2.4
<i>GG</i>	30 (18.4)	18 (12.1)		0.57, 0.077+, 0.3–1.06
Ген <i>OXTR</i> , локус rs53576				
<i>GG</i>	68 (41.7)	71 (47.7)	Кодоминантная: 31.49, <0.001** Рецессивная: 30.54, <0.001** Аддитивная: 13.29, <0.001**	1.27, 0.29, 0.81–1.99
<i>GA</i>	67 (41.1)	77 (51.7)		1.53, 0.062+, 0.98–2.4
<i>AA</i>	28 (17.2)	1 (0.7)		0.03, 0.0008**, 0.004–0.24

Таблица 3. Ассоциации между аллельным полиморфизмом изученных генов и риском смешанного тревожного и депрессивного расстройства

Генотип	Контрольная группа, <i>N</i> (%)	СТДР, <i>N</i> (%)	Модель: LRT, <i>p</i>	ОШ, <i>p</i> , 95% ДИ
Ген <i>SLC6A3/DAT1</i> , локус 40 пн VNTR				
<i>LL</i>	113 (69.3)	49 (50.5)	Кодоминантная: 11.9, 0.003** Доминантная: 10.01, 0.001** Рецессивная: 5.55, 0.019* Сверхдоминантная: 5.06, 0.024* Аддитивная: 11.76, 0.0006**	0.48, 0.005**, 0.29–0.8
<i>LS</i>	46 (28.2)	39 (40.2)		1.63, 0.071+, 0.96–2.75
<i>SS</i>	4 (2.5)	9 (9.3)		3.93, 0.026*, 1.18–13.13
Ген <i>HTR2A</i> , локус rs6311				
<i>GG</i>	63 (38.6)	48 (49.5)	Доминантная: 2.8, 0.09+ Рецессивная: 3.47, 0.019* Сверхдоминантная: 5.06, 0.06+ Аддитивная: 3.6, 0.057+	1.47, 0.137, 0.89–2.42
<i>AG</i>	72 (44.2)	40 (41.2)		0.92, 0.73, 0.55–1.51
<i>AA</i>	28 (17.2)	9 (9.3)		0.54, 0.112, 0.25–1.16
Ген <i>DRD4</i> , локус 120 пн VNTR				
<i>LL</i>	116 (71.2)	61 (62.9)	Доминантная: 4.2, 0.04* Сверхдоминантная: 3.64, 0.056+	0.69, 0.169, 0.41–1.17
<i>LS</i>	41 (25.1)	33 (34)		1.53, 0.124, 0.89–2.64
<i>SS</i>	6 (3.7)	3 (3.1)		0.81, 0.768, 0.2–3.31

Таблица 4. Ассоциации между аллельным полиморфизмом изученных генов и тяжестью симптомов тревоги

Шкала	Ген	Полиморфный локус	LRT	<i>p</i>
Ситуационная тревога	<i>HTR1A</i>	rs6295	9.49	0.009**
	<i>HTR2A</i>	rs6311	4.61	0.0998+
	<i>OXTR</i>	rs53576	6.17	0.046*
	<i>SLC6A4 (5HTT)</i>	Stin2	9.16	0.01*
	<i>DRD4</i>	120 пн VNTR	6.18	0.045*
Личностная тревога	<i>HTR1A</i>	rs6295	7.94	0.019*
	<i>DRD4</i>	120 пн VNTR	6.51	0.038*

odds_ratio.php). Результаты считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

Аллели с полиморфизмом вариабельного числа tandemных повторов (VNTR) были классифицированы в соответствии с данными об их транскрипционной активности. Аллели локуса *SLC6A3* 40 пн VNTR были разделены на короткий аллель *S* (<10 повторов) и длинный аллель *L* (≥ 10 повторов), соответственно было изучено распределение генотипов *LL*, *LS* и *SS*. Аллели *DRD4* 48 пн VNTR также были классифицированы как длинные *L* (≥ 7 повторов) и короткие *S* (<7 повторов). При исследовании полиморфизма гена *SLC6A4* учитывались два локуса, 5-HTTLPR и rs25531. Аллели были разделены на *low* (низкий уровень экспрессии, аллели *S* и *L_G*) и *high* (высокий уровень экспрессии, аллель *L_A*). Аллели локуса *SLC6A4* 16–17 пн VNTR были классифицированы как *high* (12 повторов) и *low* (9, 10 повторов) в соответствии с уровнем экспрессии.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Нами были изучены следующие гены дофаминергической, серотонинергической и эндокринной систем: *SLC6A3/DAT1* (локус 40 пн VNTR), *DRD2* (локус rs1800497), *DRD4* (локусы 120 пн VNTR и 48 пн VNTR), *COMT* (локус rs4680), *SLC6A4/5HTT* (локусы 5-HTTLPR + rs25531 и Stin2), *HTR1A* (локус rs6295), *HTR2A* (локус rs6311), *HTR1B* (локус rs6296), *OXTR* (локус rs53576). Распределение аллелей и генотипов всех изученных локусов в наших выборках соответствует равновесию Харди–Вайнберга.

Депрессивный эпизод ассоциирован с полиморфными вариантами генов *SLC6A3/DAT1* и

HTR2A (табл. 1). Остальные локусы были исключены при подборе моделей логистической регрессии. Ассоциация локуса 40 пн VNTR гена *SLC6A3* с ДЭ оказалась значимой в кодоминантной ($p = 0.024$), доминантной ($p = 0.015$), сверхдоминантной ($p = 0.035$) и рецессивной ($p = 0.011$) моделях. Генотипы *SS* и *LS* встречаются значительно чаще у пациентов с ДЭ, а для носителей генотипа *LL* риск развития заболевания оказался ниже, чем для носителей других генотипов (ОШ = 0.57, 0.35–0.95, $p = 0.032$). Локус rs6311 гена *HTR2A* статистически значимо ассоциирован с ДЭ только в кодоминантной модели ($p = 0.022$). Генотип *AA* более распространен в контрольной группе, и было показано, что он может играть защитную роль (ОШ = 0.33, 0.14–0.79, $p = 0.013$).

Генетическими факторами риска для рекуррентной депрессии являются полиморфные варианты генов *SLC6A3* (40 пн VNTR), *DRD4* (120 пн VNTR) и *OXTR* (rs53576) (табл. 2). Ассоциация между РД и локусом VNTR 40 пн гена *SLC6A3* значима в доминантной ($p = 0.01$) и аддитивной ($p = 0.015$) моделях. Носители генотипа *LL* имеют низкий риск развития заболевания (ОШ = 0.59, 0.37–0.94, $p = 0.025$). Для локуса 120 пн VNTR гена *DRD4* была показана ассоциация с РД в кодоминантной ($p = 0.015$) и рецессивной ($p = 0.004$) моделях. Гомозиготный по минорному аллелю генотип *SS* отсутствует в выборке пациентов с РД, в контрольной группе частота генотипа *SS* составила 3.7%. Локус rs53576 гена *OXTR* статистически значимо ассоциирован с риском РД по результатам тестирования кодоминантной, рецессивной и аддитивной моделей ($p < 0.001$). Несмотря на то что генотип *AA* встречается с достаточно высокой частотой в контрольной группе (17.2%), только один

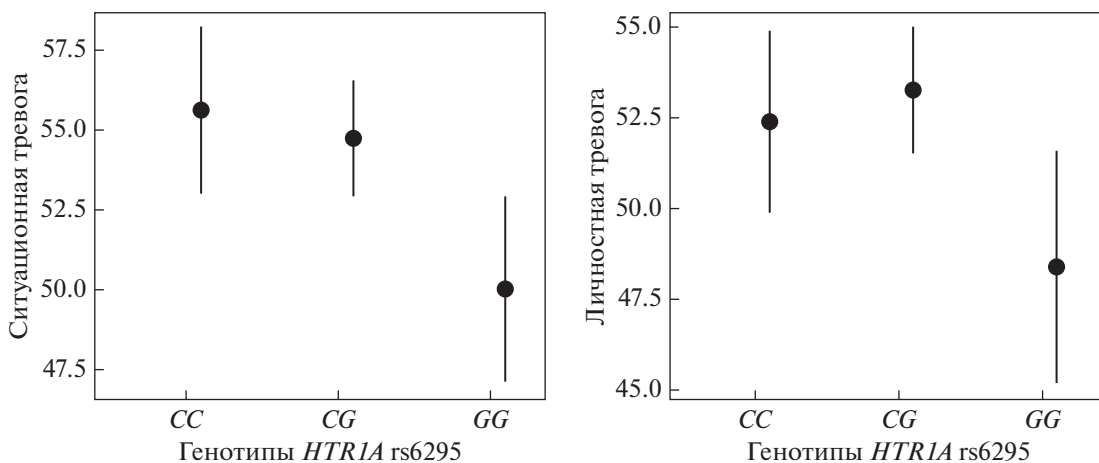


Рис. 1. Ассоциация локуса rs6295 гена *HTR1A* с симптомами личностной и ситуационной тревоги. Для рис. 1–3: по шкале Уотлоуны баллы, полученные в результате тестирования пациентов на тяжесть симптомов тревоги. На шкале X отмечены генотипы по изученным локусам.

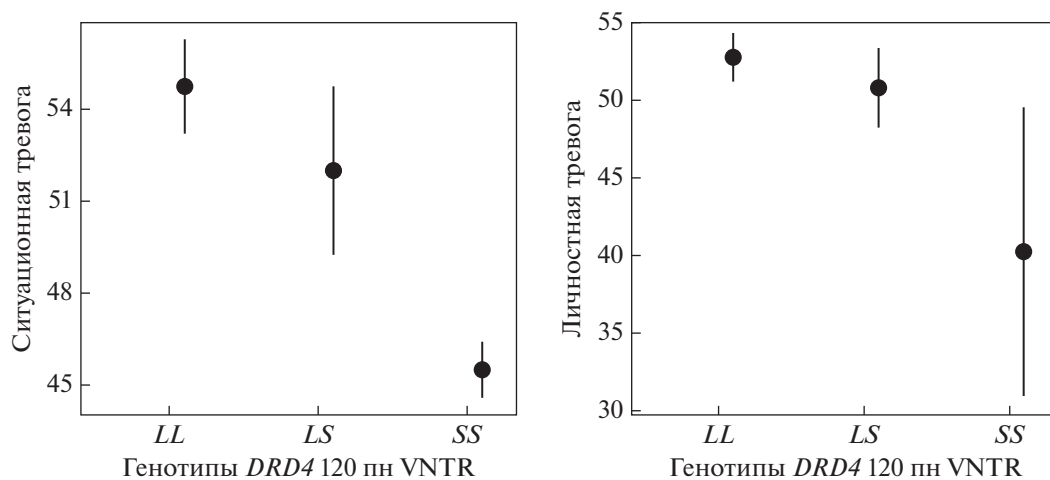


Рис. 2. Ассоциация локуса 120 пн VNTR гена *DRD4* с симптомами личностной и ситуационной тревоги.

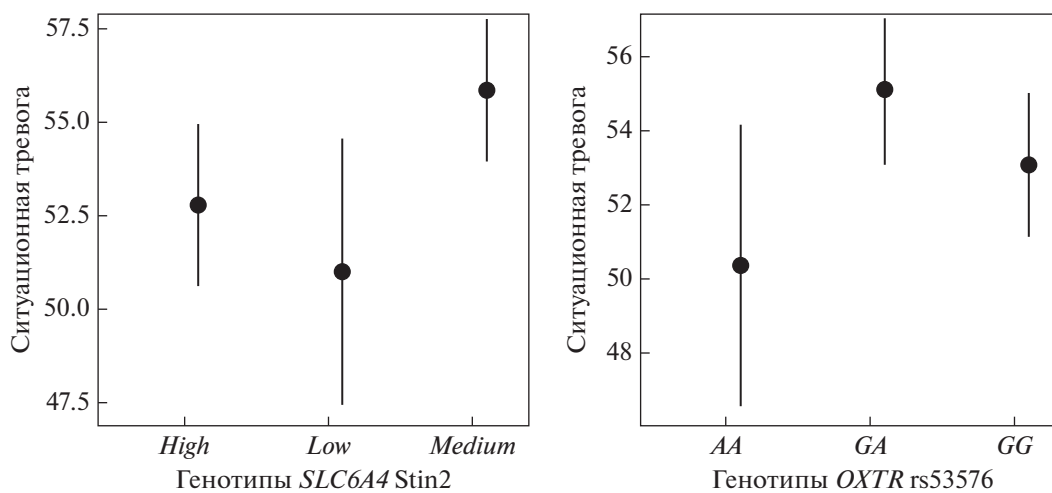


Рис. 3. Ассоциация локусов rs53576 гена *OXTR* и Stin2 гена *SLC6A4* с симптомами ситуационной тревоги.

пациент с РД является носителем этого генотипа, и поэтому он сильно коррелирует с низким риском заболевания (ОШ = 0.03, 0.004–0.24, $p = 0.0008$). При подборе модели логистической регрессии для тестирования кодоминантной и рецессивной моделей наследования локус rs6295 гена *HTR1A* был оставлен в финальной версии, однако корреляция между распределением генотипов этого локуса и РД не была статистически значимой (табл. 2).

Наиболее сильная ассоциация со смешанным тревожным и депрессивным расстройством была показана для локуса 40 пн VNTR гена *SLC6A3*, результат оставался статистически значимым при тестировании любых моделей наследования (табл. 3). Генотип *SS* ассоциирован с высоким риском развития заболевания (ОШ = 3.93, 1.18–13.13, $p = 0.026$), а *LL*-генотип играет защитную роль (ОШ = 0.48, 0.29–0.8, $p = 0.005$). Полиморфный вариант rs6311 в гене *HTR2A* ассоциирован с СТДР при тестировании рецессивной ($p = 0.019$), а локус 120 пн VNTR гена *DRD4* – доминантной ($p = 0.04$) моделей наследования.

Чтобы проверить связаны ли изученные локусы с тяжестью течения заболевания, мы объединили всех пациентов в одну выборку и проанализировали ассоциации между генотипами и тяжестью симптомов депрессии и тревоги (табл. 4). Локусы rs6295 гена *HTR1A* и 120 пн VNTR гена *DRD4* ассоциированы с ситуационной ($p = 0.009$ и 0.045) и личностной ($p = 0.019$ и 0.038) тревогой (рис. 1 и 2). С тяжестью симптомов ситуационной тревоги также ассоциированы локусы rs53576 гена *OXTR* ($p = 0.046$) и *Stin2* гена *SLC6A4* ($p = 0.01$) (рис. 3). Не было обнаружено ассоциаций между изученными генами и тяжестью симптомов депрессии.

ОБСУЖДЕНИЕ

Наше исследование было направлено на поиск генетических факторов риска, общих для разных расстройств с депрессивной симптоматикой и специфичных для определенного заболевания. Мы объединили пациентов в выборки, максимально однородные по диагнозу и этническому происхождению. В настоящем исследовании показано, что полиморфный локус 40 пн VNTR гена *SLC6A3* ассоциирован со всеми изученными заболеваниями. Ранее была показана ассоциация между аллелем *9R* и тяжестью симптомов депрессии [14]. В наших выборках генотип *SS*, представляющий собой любые сочетания аллелей *6R*, *8R* и *9R*, ассоциирован с высоким риском депрессивных заболеваний, но не с тяжестью симптомов депрессии и тревоги. Частота генотипа *LL* (аллели *10R* и *11R*) выше в контрольной группе, чем у пациентов. Результат тестирования доминантной

модели наследования, противопоставляющей генотип *LL* остальным, значим во всех выборках. Анализ ОШ подтверждает, что носители генотипа *LL* имеют сниженный риск развития всех изученных расстройств. Кроме того, для всех заболеваний значим результат тестирования аддитивной модели наследования, что указывает на более высокий риск заболевания у носителей генотипа *SS* по сравнению с носителями только одного аллеля *S*. Аллельный вариант *10R* ассоциирован с более высокой активностью транскрипции по сравнению с аллелем *9R* [1], поэтому наши результаты позволяют предположить, что низкая активность экспрессии гена дофаминового транспортера ассоциирована с риском развития всех изученных расстройств депрессивного спектра. В выборках с РД и СТДР статистически значимые отличия наблюдались в распределении генотипов локуса 120 пн VNTR гена *DRD4*. В опубликованном ранее исследовании, проведенном на выборке пациентов с общим диагнозом “большое депрессивное расстройство”, была обнаружена ассоциация генотипа *LL* с заболеванием [15]. В настоящем исследовании у пациентов с РД генотип *LL*, отличающийся более высокой транскрипционной активностью [4], также встречается чаще, чем в контрольной группе, и ни один пациент не является носителем генотипа *SS*. Самые значимые результаты получены при тестировании рецессивной модели наследования, противопоставляющей редкий генотип *SS* остальным генотипам. Кроме того, анализ ОШ позволяет предположить, что у носителей генотипа *SS*, ассоциированного с низким уровнем экспрессии, ниже риск развития РД. В группе СТДР ассоциация значима только при тестировании доминантной модели наследования, при этом самый распространенный генотип *LL* встречается у пациентов реже, чем в контрольной группе, и не ассоциирован с повышенным риском заболевания. С ДЭ в нашей выборке данный локус не ассоциирован. Кроме того, нами было показано, что этот полиморфный локус коррелирует с тяжестью симптомов ситуационной тревоги. Ввиду низкой встречаемости аллеля *S* эти результаты требуют проверки на больших выборках.

Полиморфный локус rs6311 гена *HTR2A* в изученных выборках ассоциирован с ДЭ и СТДР, но не с РД. Ранее было показано, что аллель *A* ассоциирован с повышенным уровнем экспрессии [13]. В обеих наших выборках генотип *AA* встречается реже, чем в контрольной группе, и, возможно, играет защитную роль. Вклад гена *HTR2A* в риск развития депрессивных расстройств был изучен ранее и, несмотря на результаты отдельных работ, метаанализ не выявил значимых ассо-

циаций [16]. Возможно, дальнейшие исследования, проведенные на однородных по диагнозу выборках большего размера, позволят уточнить эти результаты. Мы также показали возможную ассоциацию локуса rs6295 гена *HTR1A* с РД. Ранее были получены результаты, подтверждающие ассоциацию депрессивных и тревожных расстройств с аллелем *G* локуса rs6295 гена *HTR1A* [17, 18]. В нашем исследовании у пациентов чаще встречается генотип *CG*, но не *GG*, и ассоциация этого локуса с РД не является статистически значимой. Однако этот полиморфный локус оказался ассоциирован с тяжестью симптомов как ситуационной, так и личностной тревоги. Специфический генетический фактор риска был выявлен для РД. В предыдущем исследовании генотип *GG* локуса rs53576 гена *OXTR* был ассоциирован с униполярной депрессией [21], к которой относится в том числе рекуррентная депрессия, изученная нами отдельно. В наших выборках распределение генотипов локуса rs53576 гена *OXTR* не отличается у пациентов с ДЭ и СТДР по сравнению с контрольной группой. Отличия оказались значимыми только у пациентов с РД. Тестирование рецессивной модели наследования, в которой редкий генотип *AA* противопоставлен остальным, и анализ ОШ подтверждают, что риск РД для носителей генотипа *AA* статистически значимо ниже, чем для носителей других генотипов. Кроме того, этот локус ассоциирован с тяжестью симптомов ситуационной тревоги. Распределение генотипов локуса *Stin2* гена *SLC6A4* не ассоциировано в наших выборках с риском изученных заболеваний, но значимо коррелирует с тяжестью симптомов ситуационной тревоги. Исследование трехаллельного комбинированного локуса (5-HTTLPR + rs25531) гена серотонинового транспортера *SLC6A4* с использованием классификации генотипов согласно их транскрипционной активности не подтвердило предположения об ассоциации уровня экспрессии этого гена с риском депрессивных расстройств.

Нами были показаны как общие для всех или некоторых из изученных заболеваний ассоциации, так и специфический генетический фактор риска для РД. Кроме того, были выявлены локусы, которые, возможно, не ассоциированы с риском заболевания у здоровых людей, но коррелируют с тяжестью симптомов у пациентов, уже страдающих от депрессивного или тревожного расстройства. Таким образом, разделение пациентов на группы с одинаковыми диагнозами может быть полезно для понимания того, с каким именно заболеванием ассоциирован тот или иной локус.

Данное исследование имеет ряд ограничений. Оно проведено на небольшой выборке, поэтому

некоторые редкие генотипы отсутствуют или мало представлены в отдельных группах пациентов. Кроме того, в данной работе проводится анализ ассоциации между риском развития депрессивных расстройств и генотипами без учета каких-либо других факторов. Средний возраст пациентов при этом оказался ниже среднего возраста контрольной группы, однако в данной работе этот критерий не влияет на результат. Дальнейшие исследования, проведенные на гомогенных по диагнозу и этническому происхождению выборках, но при этом с большим числом пациентов и с учетом большего числа факторов, требуются для проверки полученных результатов.

Работа была выполнена на базе Центра коллективного пользования Института биологии гена Российской академии наук при поддержке грантов Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) № 19-04-00383, 17-29-02203-ofi-m, 19-015-00380.

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. *VanNess S.H., Owens M.J., Kilts C.D.* The variable number of tandem repeats element in DAT1 regulates *in vitro* dopamine transporter density // *BMC Genet.* 2005. № 6. P. 55. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-6-55>
2. *Inoue-Murayama M., Adachia S., Mishima N. et al.* Variation of variable number of tandem repeat sequences in the 3'-untranslated region of primate dopamine transporter genes that affects reporter gene expression // *Neurosci. Lett.* 2002. V. 334. № 3. P. 206–210. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)01125-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)01125-4)
3. *Schoots O., Van Tol H.H.* The human dopamine D4 receptor repeat sequences modulate expression // *Pharmacogenomics J.* 2003. V. 3. № 6. P. 343–348. <https://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500208>
4. *D'Souza U.M., Russa C., Tahiret E. et al.* Functional effects of a tandem duplication polymorphism in the 5'flanking region of the DRD4 gene // *Biol. Psychiatry.* 2004. V. 56. № 9. P. 691–697. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.08.008>
5. *Noble E.P., Blum K., Ritchie T. et al.* Allelic association of the D2 dopamine receptor gene with receptor-bind-

- ing characteristics in alcoholism // Arch. Gen. Psychiatry. 1991. V. 48. № 7. P. 648–654.
<https://doi.org/10.1001/archpsyc.1991.01810310066012>
6. *Lachman H.M., Papolos D.F., Saito T. et al.* Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: Description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders // Pharmacogenetics. 1996. V. 6. № 3. P. 243–250.
<https://doi.org/10.1097/00008571-199606000-00007>
 7. *Heils A., Mossner R., Lesch K.P. et al.* The human serotonin transporter gene polymorphism – basic research and clinical implications // J. Neural. Transm. (Vienna). 1997. V. 104. № 10. P. 1005–1014.
 8. *Hu X.Z., Lipsky R.H., Zhu G. et al.* Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder // Am. J. Hum. Genet. 2006. V. 78. № 5. P. 815–826.
<https://doi.org/10.1086/503850>
 9. *MacKenzie A., Quinn J.* A serotonin transporter gene intron 2 polymorphic region, correlated with affective disorders, has allele-dependent differential enhancer-like properties in the mouse embryo // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1999. V. 96 № 26. P. 15251–15255.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.26.15251>
 10. *Lemondé S., Turecki G., Bakish D. et al.* Impaired repression at a 5-hydroxytryptamine 1A receptor gene polymorphism associated with major depression and suicide // J. Neurosci. 2003. V. 23. № 25. P. 8788–8799.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-25-08788.2003>
 11. *Czesak M., Lemondé S., Peterson E.A. et al.* Cell-specific repressor or enhancer activities of Deaf-1 at a serotonin 1A receptor gene polymorphism // J. Neurosci. 2006. V. 26 № 6. P. 1864–1871.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2643-05.2006>
 12. *Duan J., Sanders A.R., Molen J.E. et al.* Polymorphisms in the 5'-untranslated region of the human serotonin receptor 1B (HTR1B) gene affect gene expression // Mol. Psychiatry. 2003. V. 8. № 11. P. 901–910.
<https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001403>
 13. *Parsons M.J., D'Souza U.M., Arranz M.J. et al.* The –1438A/G polymorphism in the 5-hydroxytryptamine type 2A receptor gene affects promoter activity // Biol. Psychiatry. 2004. V. 56. № 6. P. 406–410.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.06.020>
 14. *Bielinski M., Jaracz M., Lesiewska N. et al.* Association between COMT Val158Met and DAT1 polymorphisms and depressive symptoms in the obese population // Neuropsychiatr. Dis. Treat. 2017. № 13. P. 2221–2229.
<https://doi.org/10.2147/NDT.S138565>
 15. *Lai J.H., Zhuab Y.S., Huoet Z.H. et al.* Association study of polymorphisms in the promoter region of DRD4 with schizophrenia, depression, and heroin addiction // Brain Res. 2010. № 1359. P. 227–232.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.08.064>
 16. *Zhao X., Sun L., Sun Y.H. et al.* Association of HTR2A T102C and A-1438G polymorphisms with susceptibility to major depressive disorder: a meta-analysis // Neurol. Sci. 2014. V. 35. № 12. P. 1857–1866.
<https://doi.org/10.1007/s10072-014-1970-7>
 17. *Lenze E.J., Shardell M., Ferrell R.E. et al.* Association of serotonin-1A and 2A receptor promoter polymorphisms with depressive symptoms and functional recovery in elderly persons after hip fracture // J. Affect Disord. 2008. V. 111. № 1. P. 61–66.
<https://doi.org/10.1016/j.jad.2008.02.005>
 18. *Molina E., Cervilla J., Rivera M. et al.* Polymorphic variation at the serotonin 1-A receptor gene is associated with comorbid depression and generalized anxiety // Psychiatr Genet. 2011. V. 21. № 4. P. 195–201.
<https://doi.org/10.1097/YPG.0b013e3283457a48>
 19. *Рафикова Е.И., Рысков А.П., Васильев В.А.* Генетика депрессивных расстройств: кандидатные гены и полногеномный поиск ассоциаций // Генетика. 2020. Т. 56. № 8. С. 878–892.
<https://doi.org/10.31857/S001667582008011>
 20. *Na K.S., D'Souza U.M., Arranz M.J. et al.* Interaction effects of oxytocin receptor gene polymorphism and depression on hippocampal volume // Psychiatry Res. Neuroimaging. 2018. V. 282. P. 18–23.
<https://doi.org/10.1016/j.psychres.2018.10.004>
 21. *Costa B., Pini S., Gabelloni P. et al.* Oxytocin receptor polymorphisms and adult attachment style in patients with depression // Psychoneuroendocrinology. 2009. V. 34. № 10. P. 1506–1514.
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.05.006>
 22. *Рафикова Е.И., Рысков А.П., Шадрин М.И., Сломинский П.А., Гехт А.Б., Шибалёв Д.В., Васильев В.А.* Влияние полиморфных вариантов генов дофаминергической системы на риск развития расстройств с депрессивной симптоматикой // Генетика. 2021. Т. 57. № 8. С. 941–948.
 23. *Sukhodolskaya E.M., Fehretdinova D.I., Shibalev D.V. et al.* Polymorphisms of dopamine receptor genes DRD2 and DRD4 in African populations of Hadza and Datoga differing in the level of culturally permitted aggression // Ann. Hum. Genet. 2018. V. 82. № 6. P. 407–414.
<https://doi.org/10.1111/ahg.12263>
 24. *Fehretdinova D.I., Sukhodolskaya E.M., Shibalev D.V. et al.* Polymorphism of the Two Genes Encoding Catecholamine Degradation Enzymes (COMT and MAOA) in the Hadza and Datoga African Ethnic Populations // Mol. Genetics, Microbiol. and Virology. 2018. V. 33. № 3. P. 195–200.
<https://doi.org/10.3103/S0891416818030035>
 25. *Суходольская Е.М., Васильев В.А., Шибалев Д.В.* 3'-UTR полиморфизм гена транспортера дофамина у мужчин хадзы и датоба // Мол. биология. 2014. V. 48. № 2. P. 295–299.

Common and Specific Genetic Risk Factors for Three Disorders with Depressive Symptoms

E. I. Rafikova^{a, *}, D. V. Shibalev^a, M. I. Shadrina^b, P. A. Slominsky^b,
A. B. Guekht^c, A. P. Ryskov^a, and V. A. Vasilyev^a

^a Institute of Gene Biology Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

^b Institute of Molecular Genetics of National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow, 123182 Russia

^c Moscow Research and Clinical Center for Neuropsychiatry of the Healthcare Department, Moscow, 115419 Russia

*e-mail: kat.rafikov@gmail.com

Searching for genetic causes of depressive and anxiety disorders has been going on for about three decades. However, the accumulated experimental data do not allow us to come to a final conclusion about the influence of certain genes on the risk of the disease and the severity of its course. Most studies of candidate genes were carried out using samples of patients with different nosological forms of depression. The aim of our work was to check whether the previously found associations are common for all depressive spectrum disorders or there are loci that specifically affect the risk of developing a certain disease. The study involved patients with disorders characterized by severe depressive symptoms ($n = 357$). Patients were divided into three samples according to the diagnosis: depressive episode (DE), recurrent depression (RD), and mixed anxiety and depressive disorder (MADD). The polymorphic locus *SLC6A3* 40 bp VNTR was associated with all studied disorders; the LL genotype was less common in patients and was associated with a low risk of disease. The *DRD4* polymorphism 120 bp VNTR was associated with RD and MADD. The *HTR2A* rs6311 locus was associated with DE and MADD. A specific genetic risk factor for RD in the studied samples was the *OXTR* rs53576 polymorphism. The genotype homozygous for the minor allele (AA) was associated with a low risk of RD. None of the studied polymorphic loci influenced the severity of depression symptoms. The loci *HTR2A* rs6311 and *DRD4* 120 bp VNTR were associated with symptoms of situational and personality anxiety. The severity of situational anxiety symptoms was also influenced by the *OXTR* loci rs53576 and *SLC6A4* 16–17 bp VNTR.

Keywords: depressive disorders, anxiety disorders, polymorphic loci, genetic association, *SLC6A3*, *DAT1*, *DRD4*, *HTR2A*, *OXTR*.

УДК 575.224:616.006.6

ДЛИНА ТЕЛОМЕР И БАЗОВЫЙ УРОВЕНЬ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ В ЛЕЙКОЦИТАХ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО

© 2022 г. В. Г. Дружинин^{1, *}, Е. Д. Баранова¹, В. П. Волобаев¹, В. И. Иванов³, А. В. Ларионов¹, В. И. Минина^{2, 3}, Ф. Смагулова⁴, Л. Легофф⁴, В. А. Титов⁵, А. Фучич⁶

¹Кемеровский государственный университет, Кемерово, 650000 Россия

²«Федеральный исследовательский центр угля и углехимии
Сибирского отделения Российской академии наук», Кемерово, 650065 Россия

³Кемеровский государственный медицинский университет, Кемерово, 650056 Россия

⁴University Rennes, EHESP, Inserm, Irset
(Institut de recherche en santé, environnement et travail) – UMR_S 1085, Rennes, F-35200 France

⁵Кемеровский областной онкологический диспансер, Кемерово, 650036 Россия

⁶Institute for Medical Research and Occupational Health, Zagreb, 10000 Croatia

*e-mail: druzhinin_vladim@mail.ru

Поступила в редакцию 07.04.2021 г.

После доработки 21.06.2021 г.

Принята к публикации 12.07.2021 г.

Несмотря на большие усилия фундаментальных и клинических исследований рака легкого (РЛ), профилактика и лечение этого вида рака до сих пор далеки от удовлетворительных показателей. Уже признаны сложные механизмы биологии РЛ, но существует значительный пробел в знаниях о взаимодействии ключевых биомаркеров в этиологии и прогрессировании этого заболевания. Настоящее исследование направлено на то, чтобы изучить связь между длиной теломер (ДТ), частотами хромосомных aberrаций (ХА) и микроядер (МЯ) в лейкоцитах первичных больных РЛ. У 67 мужчин с РЛ и 77 контрольных доноров (мужчин) в лейкоцитах крови были определены базовые частоты ХА и МЯ, а также изучена ДТ. В итоге обнаружено значительное увеличение ДТ у пациентов с РЛ по сравнению с контрольными донорами (25.86 ± 2.13 против 15.29 ± 1.22 соответственно; $p = 0.00001$). В лейкоцитах больных РЛ отмечено значимое увеличение базового уровня структурных aberrаций хромосом, а также микроядер, содержащих центромеры. Только в выборке пациентов с РЛ выявлены прямые корреляции ДТ с частотой aberrаций хромосомного типа и с частотой парных фрагментов. В этой же выборке зарегистрированы достоверные обратные корреляции ДТ с частотой двуядерных лейкоцитов, содержащих ядерные протрузии, и с частотой клеток, вступивших в апоптоз. Исследование впервые показало, что увеличение ДТ у пациентов с РЛ связано со структурными повреждениями хромосом, но не с частотой анеуплоидий.

Ключевые слова: рак легкого, лейкоциты, нестабильность генома, длина теломер, хромосомные aberrации, микроядра.

DOI: 10.31857/S0016675822010027

Теломеры поддерживают целостность хромосом, закрывая их концы и обеспечивая защиту от деградации и слияния во время клеточного цикла. Структуры теломер у человека состоят из 1000–2000 повторов последовательностей TTAGGG, связанных с комплексами из шести шелтеринов. С возрастом происходит постепенное истощение теломер и сокращение их длины [1]. Было показано, что более короткие теломеры коррелируют с повышенным уровнем воспаления и окислительно-стресса [2, 3].

Ранее были выявлены корреляции между длиной теломер (ДТ) в лейкоцитах и различными заболеваниями, такими как атеросклероз, сердеч-

ная недостаточность, сахарный диабет 2-го типа, хронический психосоциальный стресс, депрессия, деменция, болезнь Альцгеймера и рак [4–9]. Сложилось мнение, что короткие теломеры в сочетании с другими механизмами канцерогенеза могут приводить к нестабильности генома, что характерно для многих типов рака [10]. Таким образом, ДТ в лейкоцитах периферической крови, по-видимому, является маркером восприимчивости ко многим типам рака: груди, легких, мочевого пузыря, головы и шеи, рака поджелудочной железы [11–14]. Однако недавние эпидемиологические данные показали, что не только короткие,

Таблица 1. Характеристика изученных групп

Показатели	Больные РЛ, <i>n</i> = 67	Контроль, <i>n</i> = 77
Возраст (лет) ($\mu \pm SE$)/min–max	59.64 \pm 9.38/22–73	59.49 \pm 6.61/43–79
Статус курения (%):		
курящие	61.2	52.0
некурящие	38.8	48.0
Тип РЛ* (%):		
плоскоклеточный	52.2	
аденокарцинома	25.4	
мелкоклеточный	10.5	
прочие	11.9	
TNM** (%):		
I, II	29.9	
III, IV	70.1	
Метастазы – (%)	86.6	
Метастазы + (%)	13.4	

* Патоморфологический диагноз; ** стадии РЛ по классификации tumor–node–metastasis.

но и длинные теломеры лимфоцитов могут быть связаны с повышенным риском рака [15, 16].

Корреляции между ДТ и хромосомными аберрациями (ХА) наблюдали в лейкоцитах крови здоровых людей [17], в клетках солидных опухолей [18] и у пациентов с разными типами лейкозов [19, 20]. Нестабильность генома (точечные мутации, структурные и численные нарушения хромосом) является одним из фундаментальных механизмов злокачественной трансформации [21–23] и значимым биомаркером риска рака [24, 25]. Это раннее событие в канцерогенезе, часто обнаруживаемое в клетках вновь диагностированных (нелеченных) пациентов с различными типами рака [26–33]. Было показано, что повышенные частоты ХА и микроядер (МЯ) являются предикторами риска развития рака в популяциях человека [34–37]. Метаанализ частот МЯ в лейкоцитах нелеченных пациентов с различными типами рака показал, что 72% образцов продемонстрировали увеличение базового уровня МЯ по сравнению с контрольными донорами [38]. Аналогичное повышение уровня ХА было зарегистрировано у онкологических больных до начала терапии [39]. Однако возможности обоих биомаркеров для практической оценки риска развития рака и выявления нестабильности генома при прогрессировании рака еще не полностью использованы.

Рак легкого (РЛ) – одна из самых распространенных злокачественных опухолей и одна из основных причин смерти от рака во всем мире. В частности, на смерть от РЛ у мужчин приходится около 1/3 смертей от всех злокачественных новообразований [40]. Этиология РЛ характеризуется анеуплоидией и нестабильностью генома, которые наблюдаются у больных до терапии, но также

оказывают сильное влияние на выживаемость уже пролеченных пациентов [41–44]. Таким образом, исследование нестабильности генома при РЛ имеет большое значение для ранней диагностики и распознавания пациентов высокого риска, а также для отслеживания результатов терапии, особенно в зависимости от типа РЛ, которые, как было показано, имеют различную биологию [45]. В настоящем исследовании мы впервые сравниваем данные о ДТ с базовыми частотами цитогенетических повреждений в лейкоцитах крови у нелеченных больных РЛ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика исследованных групп

Длина теломер, а также базовые частоты ХА и МЯ были изучены в лейкоцитах периферической крови 60 пациентов с первично диагностированным РЛ (только мужчины, средний возраст 59.64 \pm 1.15 лет), поступивших в Кемеровский областной онкологический диспансер, и у 77 здоровых мужчин-доноров, жителей г. Кемерово (средний возраст 59.49 \pm 0.75 лет). Не было значимой разницы в возрасте между больными РЛ и контрольной группой (*p* = 0.09). 61.2% пациентов с РЛ являлись активными курильщиками, в то время как в контрольной выборке было зарегистрировано примерно равное число курящих и некурящих доноров (табл. 1).

Для этого исследования образцы крови у больных РЛ были взяты при поступлении в клинику до выполнения любых диагностических и терапевтических процедур. В выборку вошли пациенты, которые соответствовали следующим крите-

риям: отсутствие инфекционных заболеваний на момент отбора проб и отсутствие профессиональных воздействий ионизирующего излучения или известных химических мутагенов/канцерогенов. Всего у 52.2% пациентов был диагностирован плоскоклеточный РЛ, у 25.4% – аденокарцинома, у 10.5% – мелкоклеточный РЛ и у 11.9% – другие типы РЛ (немелкоклеточный, крупноклеточный, нейроэндокринный, мезенхимальный). Для каждого пациента была определена стадия заболевания на основе классификации TNM (опухоль, узел, метастазы) в соответствии с рекомендацией Goldstraw [46]. Исходя из этого, 41.9% пациентов находились в I–II стадиях, 58.1% – в III–IV стадиях и 14.7% пациентов имели метастазы в отдаленные органы. Описание этой группы представлено в табл. 1.

Все участники были проинформированы о цели, методологии и возможных рисках исследования; информированное согласие было подписано каждым донором. Исследование было выполнено в соответствии с требованиями Этического комитета Кемеровского государственного университета.

Измерение длины теломер

Для изучения относительной длины теломер использовали количественную ПЦР (QPCR) в соответствии с протоколом [47]. В каждом образце определяли отношение количества копий теломерных повторов к числу копий единственного гена (T/S) рибосомного фосфопротеина 36B4и, также известного как *RPLPO*. Это соотношение пропорционально средней длине теломер. Концентрацию исследуемого ДНК предварительно измеряли с помощью флуориметра Quantus (E6150, Promega), используя систему Quantiflor dsDNA (E2670, Promega). Микс для каждой реакции QPCR содержал 5 мкл Syber Green Master Mix (iTag Universal SYBR green Supermix, Biorad), 0.9 мкл свободной от нуклеаз H₂O; 0.05 мкл каждого праймера и 0.4 нг ДНК. Для амплификации теломерных последовательностей использовали праймеры telg 5'-CGG TTT GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT-3' и telc 5'-GGC TTG CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT-3'. Для амплификации однокопийного референсного гена 36B4и использовали праймеры albc 5'-CAG CAA GTG GGA AGG TGT AAT CC-3' и albd 5'-CCC ATT STA TCA TCA ACG GGT ACA A-3' [47]. Условия QPCR были установлены на 95°C в течение трех минут с последующими 40 циклами при 95°C в течение 15 с и 60°C в течение одной минуты, после чего следовал HRM от 65 до 95°C с шагом 0.5°C. ПЦР проводили трижды, для анализа использовали усредненные значения. Результаты QPCR анализировали с использованием программного обеспечения Bio-Rad CFX384 Manager™. Для

каждого образца по обоим генам отмечали пороговый цикл амплификации, в котором интенсивность флуоресценции преодолевала фоновый уровень (Ct). Далее рассчитывали показатель ΔCt как разницу порогового цикла для теломерной пробы и референсной пробы одного и того же образца ($\Delta Ct = Ct^{tel} - Ct^{36B4}$). В итоге определяли относительное количество теломерных повторов к однокопийному гену 36B4и по формуле $T/S = 2^{-\Delta Ct}$.

Анализ хромосомных aberrаций

Образцы цельной гепаринизированной периферической крови культивировали в среде RPMI-1640 (ПанЭко) с добавлением 20%-ной фетальной телячьей сыворотки (Gibco) и 2%-ного фитогемагглютина (ПанЭко) в течение 48 ч при 37°C. За 2 ч до фиксации в культуры добавляли колхицин (0.05 мг/мл) (ПанЭко). По окончании инкубации клеточные культуры обрабатывали гипотоническим раствором 0.55%-ного KCl в течение 20 мин при 37°C. Фиксацию материала проводили в трех сменах охлажденного фиксатора Карнуа (метанол и ледяная уксусная кислота в соотношении 3 : 1). Полученную суспензию раскапывали на чистые охлажденные и смоченные водой предметные стекла. Препараты шифровали и окрашивали с помощью 2%-ного раствора красителя Гимза (Merck).

Учет метафаз, включаемых в анализ, и критерии для регистрации цитогенетических повреждений соответствовали общепринятым рекомендациям [48]. Учитывали следующие показатели: доля aberrантных метафаз, частота aberrаций хроматидного типа (одионочные фрагменты, хроматидные обмены), частота aberrаций хромосомного типа (парные фрагменты, дицентрические и кольцевые хромосомы, атипичные моноцентрики). Ахроматические пробелы в число aberrаций не включали и не учитывали.

Анализ микроядер в культуре лейкоцитов с блоком цитокинеза

Микроядра и другие цитогенетические нарушения определяли по стандартному протоколу CBMN [49], используя модификации, предложенные Ф.И. Ингель [50]. В культуральный флакон, содержащий 3.8 мл культуральной среды (среда RPMI-1640 + 20% сыворотки крупного рогатого скота + 100 ед./мл пенициллина), помещали 0.2 мл цельной крови. Во флаконы добавляли фитогемагглютинин (ПанЭко) в конечной концентрации 6 мкг/мл и культивировали в течение 44 ч при температуре 37°C. Через 44 ч от начала инкубирования в каждую культуру добавляли цитохалазин В (Applichem GmbH) 48 мкл и культивировали еще 24 ч при той же температуре. По окончании цикла клетки фиксировали в соответствии с протоколом, готовые суспензии раскапыва-

ли на охлажденные предметные стекла. Препараты шифровали и окрашивали 2%-ным раствором красителя Гимза (Merck) в течение 15 мин. Анализировали препараты под микроскопом Nikon Eclipse 80i при увеличении $\times 1000$.

На каждом препарате анализировали пролиферативный пул – подсчитывали 500 клеток с различным количеством ядер, а также учитывали клетки, находящиеся на стадии апоптоза и митоза. Затем на других участках стекла подсчитывали еще по 1000 только двуядерных лимфоцитов, в которых регистрировали различные типы цитогенетических повреждений, такие как частоты двуядерных лимфоцитов с МЯ, частоты клеток с нуклеоплазменными мостами, частоты клеток с ядерными протрузиями. Дополнительно рассчитывали показатель числа одноядерных лимфоцитов с МЯ.

Анализ микроядер в культуре лейкоцитов с использованием панцентромерных ДНК-зондов

Для идентификации центромер-положительных (CEN+) или центромер-отрицательных (CEN-) микроядер в лимфоцитах использовали метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с панцентромерными ДНК-зондами. Готовые препараты отмывали в $2\times$ SSC три раза по 5 мин, денатурацию ДНК проводили 5 мин в растворе 0.01%-ного пепсина, затем 10 мин фиксировали в 1%-ном параформальдегиде и 5 мин отмывали в $1\times$ PBS. Препараты обезвоживали проводкой в батарее спиртов восходящей концентрации (70, 90, 100%) по 2 мин и сушили при комнатной температуре. На сухие препараты наносили по 10 мкл зондов, накрывали покровными стеклами и помещали в гибридизатор (ThermoBrite), 5 мин на 75°C , 20 ч на 37°C . После гибридизации снимали покровные стекла и отмывали в растворах WT1 (2 мл $20\times$ SSC + 98 мл воды + 300 мкл Nonidet) 1 мин и WT2 (10 мл $20\times$ SSC + 90 мл воды + 100 мкл Nonidet) 2 мин (кюветы с растворами были помещены в водяную баню, разогретую до $71\text{--}72^{\circ}\text{C}$). Затем 3 мин стекла отмывали в воде и высушивали при комнатной температуре в темноте. На сухие стекла наносили 5 мкл Prolong Gold antifade with DAPI и накрывали покровными стеклами. Контрастное окрашивание после промывок осуществляли DAPI, смешанным с монтажной средой Prolong Gold Antifade (Thermo Fisher Scientific). Предметные стекла хранили в темноте при $4\text{--}10^{\circ}\text{C}$ до микроскопического анализа.

Анализ проводили с помощью флуоресцентного микроскопа (Axioskop-Zeiss), оснащенного фильтрами для DAPI (синий) и FITC (зеленый) и подключенного к компьютеру, оснащенного программным обеспечением ISIS версии 5.0 (MetaSystems) для сбора и анализа объектов с МЯ.

Всего по 1000 двуядерных лейкоцитов были изучены у 38 больных РЛ и 37 контрольных доноров.

Статистический анализ

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью программы StatSoft STATISTICA 7.0. Оценку количественных показателей осуществляли посредством вычисления средних значений (μ) и стандартных ошибок среднего (SE). Проверку распределения частот цитогенетических показателей проводили с помощью теста Колмогорова–Смирнова. Сравнение групп осуществляли с помощью рангового U-теста Манна–Уитни и точного теста Фишера. Корреляцию между показателями для случаев с ненормальным распределением данных рассчитывали с использованием непараметрической статистики при помощи коэффициента корреляции Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Длина теломер в лейкоцитах больных раком легкого и контрольных доноров

Рис. 1 демонстрирует результаты измерения ДТ в лейкоцитах пациентов с РЛ и контрольных доноров. Очевидно, что среднее значение T/S значительно больше у пациентов по сравнению с контролем (25.86 ± 2.13 против 15.29 ± 1.22 ; $p = 0.00001$). При сопоставлении ДТ в подгруппах пациентов с разными патоморфологическими типами РЛ различий между ними выявлено не было. В частности, значения T/S составили у больных плоскоклеточным РЛ – 24.63 ± 3.05 ; аденокарциномой – 29.60 ± 5.13 и мелкоклеточным РЛ – 27.52 ± 5.72 . Больные РЛ с I–II стадиями заболевания согласно TNM-классификации имели среднее значение относительной длины теломер – 26.6 ± 3.39 , а с III–IV стадиями – 25.81 ± 2.74 ($p > 0.05$). Не было различий в ДТ и при сравнении подгрупп пациентов с метастазами в отдаленные органы и без них (30.86 ± 5.79 против 25.54 ± 2.35 ; $p > 0.05$). Наконец, возраст и статус курения никак не влияли на параметры ДТ как в выборке пациентов, так и в контроле.

Базовые частоты хромосомных aberrаций в лейкоцитах больных раком легкого и контрольных доноров

Больные РЛ имели значительное увеличение доли aberrантных метафаз по сравнению с контрольными донорами ($4.4 \pm 0.25\%$ против $2.11 \pm 0.14\%$; $p < 0.0001$). У них также было зарегистрировано достоверное увеличение частоты aberrаций хроматидного типа, таких как одиночные фрагменты ($2.95 \pm 0.24\%$ против $1.46 \pm 0.11\%$; $p < 0.0001$) и хроматидные обмены ($0.1 \pm 0.03\%$ против $0.03 \pm 0.02\%$; $p = 0.003$) по сравнению с контрольной группой.

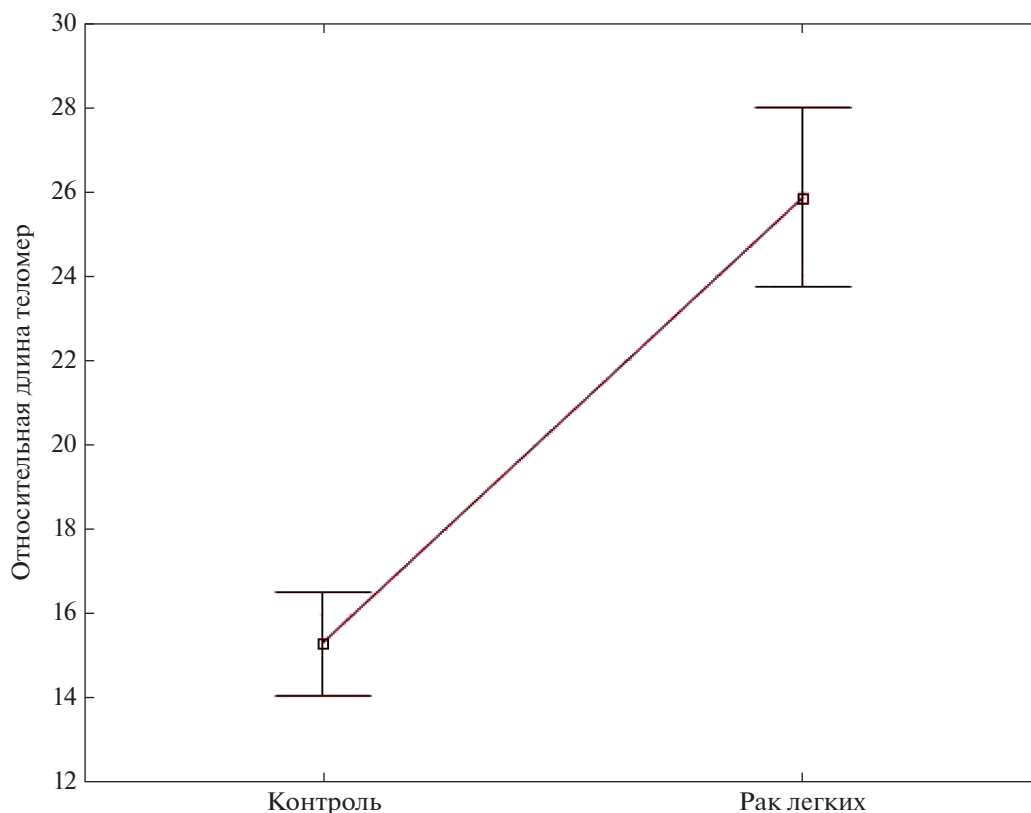


Рис. 1. Результаты измерения длины теломер. $F = 20.24$; $p = 0.00001$.

Наконец, у пациентов с РЛ наблюдается значимое увеличение aberrаций хромосомного типа, таких как парные фрагменты ($1.1 \pm 0.14\%$ против $0.46 \pm 0.06\%$; $p < 0.0001$) и хромосомные обмены ($0.53 \pm 0.08\%$ против $0.26 \pm 0.05\%$; $p = 0.002$) по сравнению с контрольной группой (табл. 2).

Корреляционный анализ показал, что коэффициент Спирмена при сопоставлении частоты ХА с возрастом не был значимым ($p = 0.27$ для пациентов и $p = 0.73$ для контроля). Также не было обнаружено достоверных различий в частотах ХА между подгруппами пациентов с разными гистологическими типами РЛ и стадиями опухолевого процесса. Наконец, доля aberrантных метафаз не была

значимо увеличена в лейкоцитах курящих пациентов с РЛ по сравнению с некурящими ($4.63 \pm 0.32\%$ против $3.98 \pm 0.42\%$; $p = 0.31$) и не различалась между курящими и некурящими контрольными донорами ($2.02 \pm 0.16\%$ против $2.2 \pm 0.23\%$; $p = 0.67$).

Базовые частоты микроядер в лейкоцитах больных раком легкого и контрольных доноров

Итоги микроядерного анализа лимфоцитов, культивированных в условиях цитокинетического блока, суммированы в табл. 3. Как и в случае теста на выявление ХА, были выявлены значимые однонаправленные различия в уровне цитогенети-

Таблица 2. Частоты хромосомных aberrаций в лейкоцитах больных раком легкого и контрольных доноров

Тип aberrаций	Рак легкого ($n = 67$)		Контроль ($n = 77$)	
	$\mu \pm SE, \%$	min–max	$\mu \pm SE, \%$	min–max
Доля aberrантных метафаз	$4.4 \pm 0.25^{**}$	0.5–9.5	2.11 ± 0.14	0–5
Одиночные фрагменты	$2.95 \pm 0.24^{**}$	0–8.5	1.46 ± 0.11	0–3.5
Хроматидные обмены	$0.1 \pm 0.03^*$	0–0.5	0.03 ± 0.02	0–1
Парные фрагменты	$1.1 \pm 0.14^{**}$	0–5.5	0.46 ± 0.06	0–2.5
Хромосомные обмены	$0.53 \pm 0.08^*$	0–4	0.26 ± 0.05	0–2

* $p < 0.01$, ** $p < 0.0001$, отличаются от значения для группы контроля.

Таблица 3. Частоты микроядер и других цитогенетических повреждений ($\mu \pm SD$, %) в лейкоцитах больных раком легкого и контрольных доноров

Группа	Двухядерные клетки с МЯ			Двухядерные клетки с мостами	Двухядерные клетки с протрузиями	Одноядерные клетки с МЯ
	1 МЯ	2 МЯ	всего МЯ			
Рак легкого	1.31 ± 0.1***	0.14 ± 0.02*	1.49 ± 0.11***	0.2 ± 0.02**	1.77 ± 0.14	0.33 ± 0.05
Контроль	0.78 ± 0.05	0.09 ± 0.01	0.86 ± 0.06	0.12 ± 0.02	1.69 ± 0.12	0.23 ± 0.03

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, отличаются от значения для группы контроля.

Таблица 4. Частоты центромер-положительных (CEN+) и центромер-отрицательных (CEN-) микроядер ($\mu \pm SD$, %) в лейкоцитах больных раком легкого и контрольных доноров

Биомаркер	Рак легкого ($n = 38$)			Контроль ($n = 37$)		
	МЯ+	МЯ-	МЯ всего	МЯ+	МЯ-	МЯ всего
Двухядерные клетки с МЯ	0.83 ± 0.08*	0.61 ± 0.04	1.43 ± 0.1*	0.32 ± 0.03	0.58 ± 0.05	0.87 ± 0.07

* $p = 0.00001$, отличается от значения для группы контроля.

ческих маркеров между пациентами и контролем. Больные РЛ демонстрируют повышенную частоту двухядерных лейкоцитов с одним МЯ ($1.31 \pm 0.1\%$ против $0.78 \pm 0.05\%$; $p < 0.0001$), двухядерных лейкоцитов с двумя МЯ ($0.14 \pm 0.02\%$ против $0.09 \pm 0.01\%$; $p < 0.05$) и общую частоту двухядерных клеток с МЯ ($1.49 \pm 0.11\%$ против $0.86 \pm 0.06\%$; $p < 0.0001$) по сравнению с контролем.

Частота одноядерных лейкоцитов с МЯ составила $0.33 \pm 0.05\%$ у пациентов с РЛ, в контрольной группе $0.23 \pm 0.03\%$; $p > 0.05$. Между сопоставляемыми выборками не было также различий в частоте клеток с протрузиями: $1.77 \pm 0.14\%$ у пациентов и $1.69 \pm 0.12\%$ в контроле. Частота двухядерных лейкоцитов с нуклеоплазменными мостами была значимо увеличена у больных РЛ ($0.2 \pm 0.02\%$) по сравнению с контролем ($0.12 \pm 0.02\%$; $p < 0.001$). Кроме того, в общем пуле анализируемых цитологических объектов у пациентов было обнаружено достоверное снижение частоты клеток с признаками апоптоза по сравнению с контролем ($1.32 \pm 0.89\%$ против $2.18 \pm 1.56\%$; $p < 0.003$). Возраст обследуемых, а также фактор курения не влияли на результаты анализа МЯ как в выборке пациентов с РЛ, так и в контрольной группе. Сравнение подгрупп пациентов, имеющих три основные патоморфологические формы РЛ (плоскоклеточный, аденокарцинома, мелкоклеточный), не выявило существенных различий в результатах анализа МЯ.

Для того чтобы оценить дифференцированный вклад CEN+ и CEN- микроядер в суммарный показатель МЯ в лейкоцитах 38 пациентов с РЛ и 37 контрольных доноров был выполнен дополнительный цитогенетический анализ с использованием панцентромерных ДНК-зондов, результаты которого представлены в табл. 4. Суммарная

частота МЯ составила $1.43 \pm 0.1\%$ в группе больных РЛ и $0.87 \pm 0.07\%$ в контроле ($p = 0.00001$). При этом только CEN+ МЯ было достоверно больше в лейкоцитах пациентов по сравнению с контролем ($0.83 \pm 0.08\%$ и $0.32 \pm 0.03\%$; $p = 0.00001$), в то время как частоты CEN- между сравниваемыми выборками достоверно не различались.

Связь между длиной теломер и цитогенетическими повреждениями в лейкоцитах

Связь между ДТ и структурными повреждениями хромосом оценивалась с использованием коэффициента корреляции Спирмена. Не было зарегистрировано связи ДТ с долей aberrантных метафаз в обеих группах: у пациентов ($p = 0.238$) и в контроле ($p = 0.662$). Также не было значимой корреляции ДТ с частотой aberrаций хроматидного типа у пациентов с РЛ ($p = 0.903$) и в контроле ($p = 0.972$). Однако коэффициент корреляции Спирмена для ДТ с aberrациями хромосомного типа оказался значимым в выборке больных РЛ ($R = 0.3$; $p = 0.02$) и незначимым в группе контрольных доноров (рис. 2). Также значимой у пациентов с РЛ была корреляция ДТ с парными фрагментами ($R = 0.36$; $p = 0.004$), в то время как в контрольной группе этого не наблюдалось (рис. 3).

Связи между частотами ДТ и МЯ в лейкоцитах пациентов с РЛ и у контрольных доноров не выявлено ($p > 0.05$). Однако была обнаружена обратная связь между ДТ и частотой двухядерных лейкоцитов с протрузиями ($R = -0.27$; $p = 0.04$) у пациентов с РЛ (рис. 4). Обратная корреляция была также обнаружена для ДТ и частоты клеток с признаками апоптоза ($R = -0.31$; $p = 0.02$) у больных РЛ (рис. 5). Для контрольных доноров не было обнаружено значимых корреляций между этими биомаркерами.

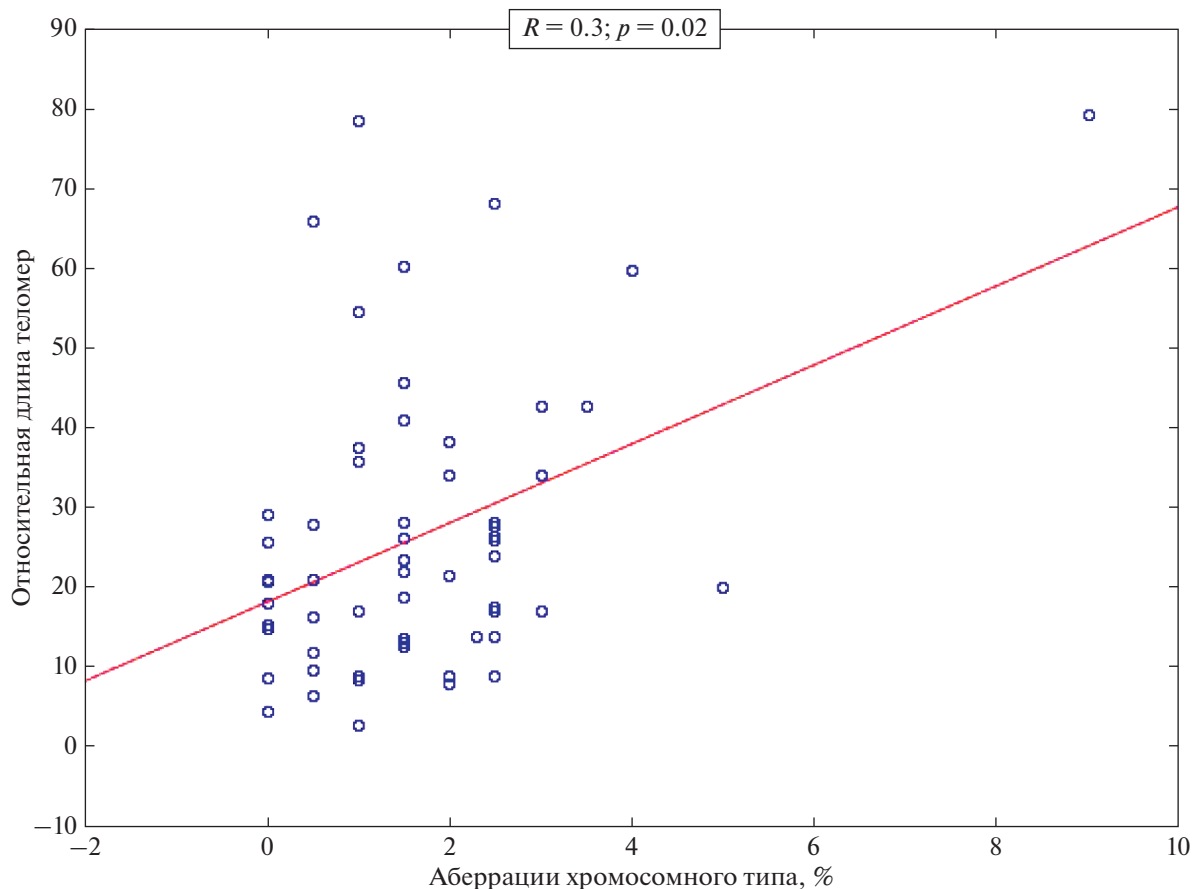


Рис. 2. Связь длины теломер с частотой аберраций хромосомного типа в лейкоцитах больных раком легкого.

ОБСУЖДЕНИЕ

К настоящему времени связь между длиной теломер и риском злокачественных опухолей остается во многом дискуссионной и требует дальнейшего изучения. Сложилось мнение, что не только уменьшение, но и удлинение ДТ может быть связано с риском развития рака. В настоящем исследовании, выполненном в соответствии с дизайном “случай–контроль”, больные РЛ имели значимо более длинные теломеры в лейкоцитах по сравнению со здоровыми донорами. Этот факт соответствует ранее опубликованным результатам когортных исследований курящих мужчин в Финляндии [51], а также некурящих женщин азиатского происхождения [52]. Связь между более длинными теломерами в лейкоцитах была также установлена с риском развития лимфомы и меланомы [9, 51, 53–55].

Не было обнаружено значимых различий в ДТ между пациентами с разными гистологическими подтипами РЛ (плоскоклеточный рак, аденокарцинома и мелкоклеточный рак), разными стадиями рака или разным статусом курения. Однако деление общей выборки на подгруппы приводит к существенному снижению числа сопоставляемых

случаев, что вполне может сказаться на достоверности результатов сравнения. Очевидно (рис. 1), что разброс индивидуальных значений ДТ у пациентов с РЛ больше, чем у контрольных доноров, и это позволяет предположить, что увеличение в будущем сопоставляемых выборок пациентов с разными гистологическими типами РЛ, находящихся на разных этапах заболевания, позволит обнаружить связь ДТ с этими факторами.

Парадокс длины теломер широко обсуждается в последние годы. Известно, что у пожилых людей, у которых теломеры в соматических клетках короче, чем у молодых, повышена предрасположенность к основным видам рака [10]. Однако конститутивно длинные теломеры могут обеспечивать дополнительные раунды деления клеток. Это, в свою очередь, увеличивает риск накопления соматических мутаций, которые блокируют пути к клеточному старению и апоптозу и способствуют онкогенезу. Были предложены различные математические гипотезы и модели для разрешения парадокса длины теломер и его связи с раком [56–58]. Например, было высказано предположение, что роль ДТ варьируется в зависимости от стадии канцерогенеза [15]. Согласно этой гипоте-

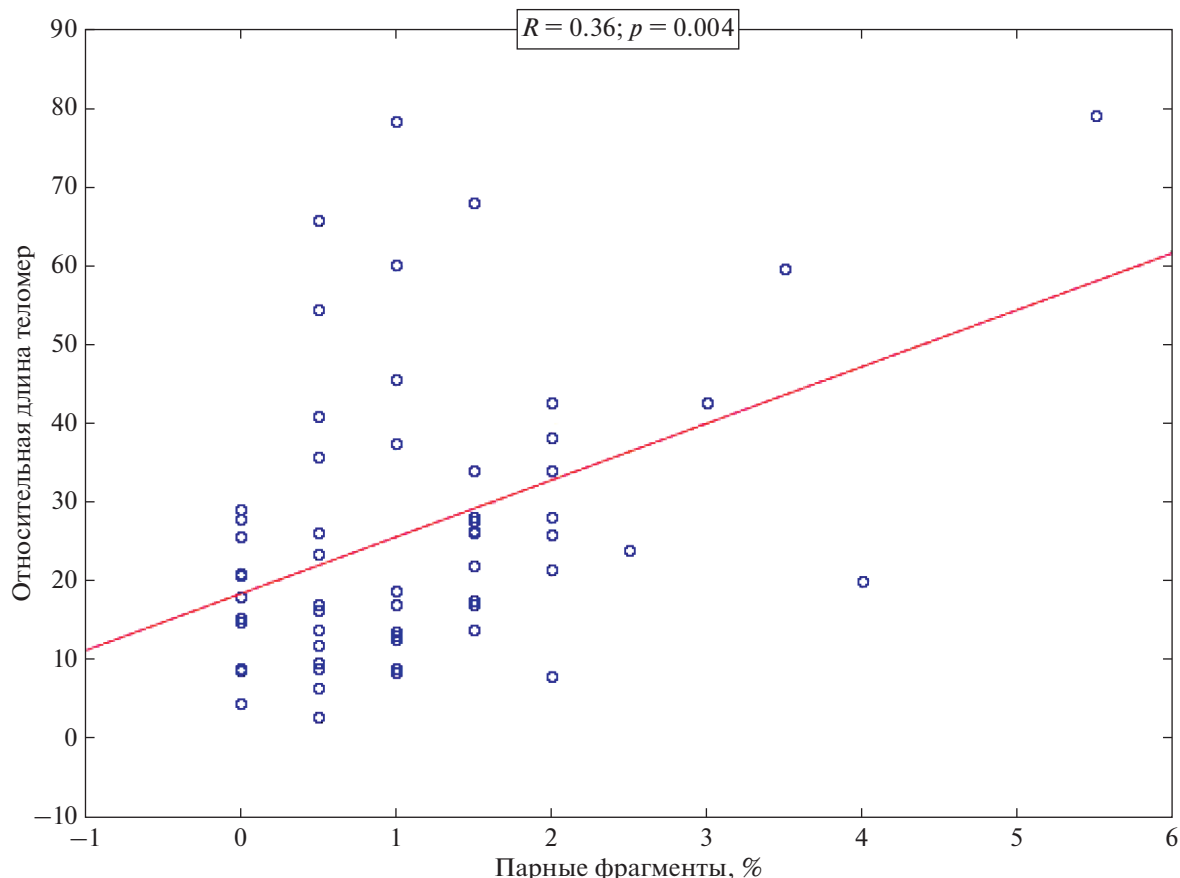


Рис. 3. Связь длины теломер с частотой парных фрагментов в лейкоцитах больных раком легкого.

зе, первый этап в двухэтапной модели канцерогенеза (накопление мутаций в мультипотентных делящихся стволовых клетках) протекает независимо от длины индивидуальных теломер. Вместе с тем длина теломер начинает играть ключевую роль в прогрессировании рака на второй его стадии – клональной экспансии. Таким образом, эта модель подчеркивает, что конститутивно длинные теломеры не вызывают рак, но могут вносить вклад в канцерогенез.

Канцерогенез часто считают результатом серии драйверных мутаций, геномной нестабильности и отбора клеток с репликативным преимуществом [59]. Люди с более длинными теломерами имеют повышенный риск клональной экспансии клеток с повреждением ДНК.

Значимо увеличенные базовые частоты МЯ и ХА в лейкоцитах больных РЛ, показанные в нашем исследовании, согласуются с данными других авторов о нестабильности генома при этом типе рака [33, 42, 60–62]. Вместе с этим использование технологии FISH с панцентромерными ДНК-зондами впервые показало, что в общем пуле цитогенетических нарушений в лимфоцитах больных РЛ значимую роль имеют анеуплоидии (CEN+ микро-

ядра), что является подтверждением значимости мутаций геномного типа в этиологии и патогенезе этого вида рака [63].

Настоящее исследование впервые показало прямую связь между aberrациями хромосомного типа, парными фрагментами и ДТ, которая была обнаружена только для пациентов с РЛ, но не у контрольных доноров. Кроме этого, интересным наблюдением является обратная корреляция между ДТ и частотой лейкоцитов с ядерными протрузиями, а также обратная корреляция ДТ с частотой клеток, вступивших в апоптоз. Можно предположить, что неполная или недостаточная репарация двунитевых разрывов ДНК у больных РЛ проявляется накоплением aberrаций хромосомного типа и протрузий. Что касается наличия обратной связи между ДТ и апоптозом, то оно подтверждает тот факт, что конститутивно длинные теломеры позволяют клеткам с накопленными повреждениями ускользать от систем запрограммированной гибели.

Отсутствие связи между частотой МЯ и ДТ вероятно связано с тем, что увеличение частоты МЯ у пациентов является главным образом следстви-

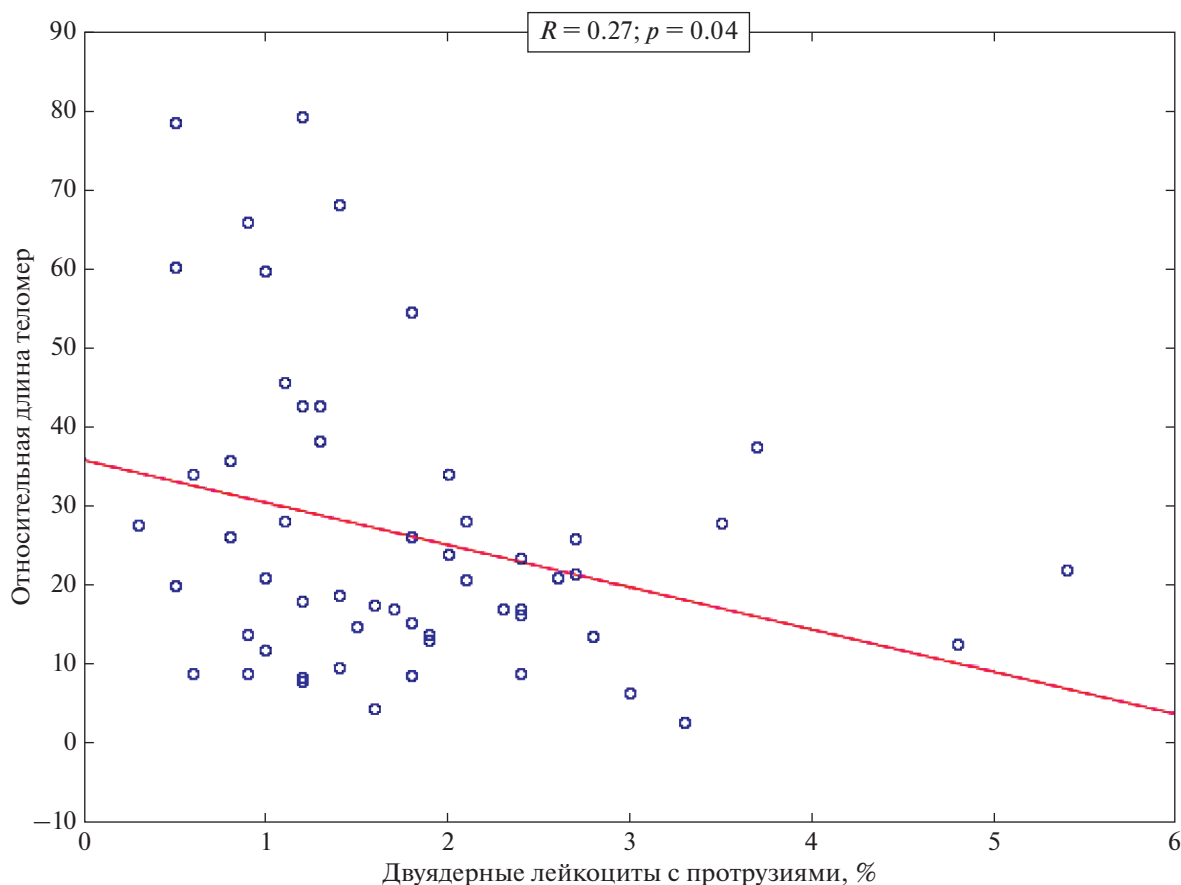


Рис. 4. Связь длины теломер с частотой ядерных протрузий в лейкоцитах больных раком легкого.

ем анеуплоидий, возникающих из-за дефектов в контрольной точке сборки веретена [64].

В группе контрольных доноров не было выявлено связей между ДТ и любыми цитогенетическими повреждениями. Более ранние исследования здоровых мужчин в Норвегии показали, что повышенная частота хромосомных aberrаций в лейкоцитах связана с более короткой длиной теломер [17]. Можно предположить, что у контрольных здоровых субъектов спонтанные хромосомные aberrации и ДТ находятся в равновесии, которое нарушается в тех случаях, когда повреждения генома и другие механизмы канцерогенеза запускают необратимый процесс неопластической трансформации.

Таким образом, наше исследование показывает, что в комплексной биологии РЛ повреждение генома соматических клеток связано с более длинными теломерами. Дальнейшие усилия в этом направлении должны быть сосредоточены на сравнительном изучении репрезентативных выборок пациентов с основными гистологическими формами РЛ, находящихся на разных стадиях заболевания. Можно ожидать, что результаты этих исследований позволят лучше понять значение ДТ

как биомаркера прогрессирования бронхогенного рака.

Авторы выражают благодарность врачам и коллективу Кемеровского областного онкологического диспансера, всем опрошенным лицам, добровольно участвовавшим в этом исследовании, а также сотрудникам Кемеровского государственного университета и Института экологии человека, которые участвовали в организации и проведении этого исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 18-14-00022.

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.

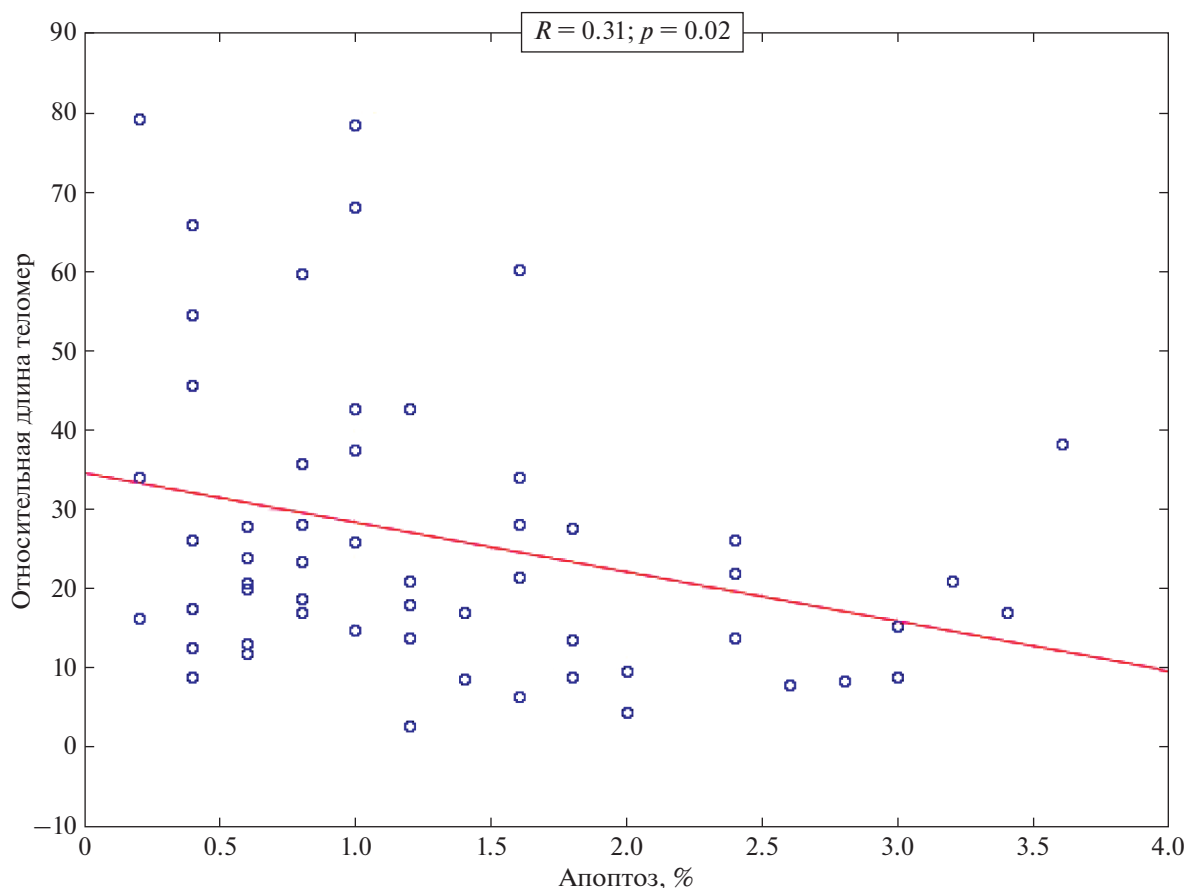


Рис. 5. Связь длины теломер с частотой апоптоза в лейкоцитах больных раком легкого.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Blackburn E.H., Greider C.W., Szostak J.W. Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging // Nat. Med. 2006. V. 12. № 10. P. 1133–1138. <https://doi.org/10.1038/nm1006-1133>
2. Kotrschal A., Ilmonen P., Penn D. Stress impacts telomere dynamics // Biol. Lett. 2007. V. 3. № 2. P. 128–130. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2006.0594>
3. Wong J.Y., Vivo I.D., Lin X. et al. The relationship between inflammatory biomarkers and telomere length in an occupational prospective cohort study // PLoS One. 2014. V. 9. № 1. e87348. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087348>
4. Risques R., Arbeeve K., Yashin A. et al. Leukocyte telomere length is associated with disability in older U.S. Population // J. Am. Geriatr. Soc. 2010. V. 58. № 7. P. 1289–1298. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2010.02948.x>
5. Hochstrasser T., Marksteiner J., Humpel C. Telomere length is age-dependent and reduced in monocytes of Alzheimer patients // Exp. Gerontol. 2012. V. 47. № 2. P. 160–163. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2011.11.012>
6. Epel E.S., Blackburn E.H., Lin J. et al. Accelerated telomere shortening in response to life stress // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. № 49. P. 17312–17315. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407162101>
7. Tyrka A.R., Price L.H., Kao H.T. et al. Childhood maltreatment and telomere shortening: Preliminary support for an effect of early stress on cellular aging // Biol. Psychiatry. 2010. V. 67. № 6. P. 531–534. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.08.014>
8. Kuo C.L., Pilling L.C., Kuchel G.A. et al. Telomere length and aging-related outcomes in humans: A Mendelian randomization study in 261,000 older participants // Aging Cell. 2019. V. 18. № 6:e13017. <https://doi.org/10.1111/accel.13017>
9. Haycock P.C., Burgess S., Nounu A. et al. Association between telomere length and risk of cancer and non-neoplastic diseases: A mendelian randomization study // JAMA Oncol. 2017. V. 3. № 5. P. 636–651. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.5945>
10. Maser R.S., DePinho R.A. Connecting chromosomes, crisis, and cancer // Science. 2002. V. 297. № 5581. P. 565–569. <https://doi.org/10.1126/science.297.5581.565>
11. Jang J.S., Choi Y.Y., Lee W.K. et al. Telomere length and the risk of lung cancer // Cancer Sci. 2008. V. 99. № 7. P. 1385–1389. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00831.x>

12. *Luu H.N., Huang J.Y., Wang R. et al.* Association between leukocyte telomere length and the risk of pancreatic cancer: Findings from a prospective study // *PLoS One*. 2019. V. 14. № 8. e0221697. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221697>
13. *Ennour-Idrissi K., Maunsell E., Diorio C.* Telomere length and breast cancer prognosis: A systematic review // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2017. V. 26. № 1. P. 3–10. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-16-0343>
14. *Machiela M.J., Hsiung C.A., Shu X.O. et al.* Genetic variants associated with longer telomere length are associated with increased lung cancer risk among never-smoking women in Asia: A report from the female lung cancer consortium in Asia // *Int. J. Cancer*. 2015. V. 137. № 2. P. 311–319. <https://doi.org/10.1002/ijc.29393>
15. *Aviv A., Anderson J.J., Shay J.W.* Mutations, cancer and the telomere length paradox // *Trends Cancer*. 2017. V. 3. № 4. P. 253–258. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.02.005>
16. *McNally E.J., Luncsford P.J., Armanios M.* Long telomeres and cancer risk: The price of cellular immortality // *J. Clin. Invest.* 2019. V. 129. № 9. P. 3474–3481. <https://doi.org/10.1172/JCI120851>
17. *Li H., Hilmarsen H.T., Hossain M.B. et al.* Telomere length and LINE1 methylation is associated with chromosomal aberrations in peripheral blood // *Genes Chromosomes Cancer*. 2013. V. 52. № 1. P. 1–10. <https://doi.org/10.1002/gcc.22000>
18. *Stewenius Y., Gorunova L., Jonson T. et al.* Structural and numerical chromosome changes in colon cancer develop through telomere-mediated anaphase bridges, not through mitotic multipolarity // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. № 15. P. 5541–5546. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408454102>
19. *Hartmann U., Brümmendorf T.H., Balabanov S. et al.* Telomere length and hTERT expression in patients with acute myeloid leukemia correlates with chromosomal abnormalities // *Haematologica*. 2005. V. 90. № 3. P. 307–316.
20. *Swiggers S.J., Kuijpers M.A., de Cort M.J. et al.* Critically short telomeres in acute myeloid leukemia with loss or gain of parts of chromosomes // *Genes Chromosomes Cancer*. 2006. V. 45. № 3. P. 247–256. <https://doi.org/10.1002/gcc.20286>
21. *Negrini S., Gorgoulis V.G., Halazonetis T.D.* Genomic instability – an evolving hallmark of cancer // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010. V. 11. № 3. P. 220–228. <https://doi.org/10.1038/nrm2858>
22. *Streffler C.* Strong association between cancer and genomic instability // *Radiat. Environ. Biophys.* 2010. V. 49. № 2. P. 125–131. <https://doi.org/10.1007/s00411-009-0258-4>
23. *Tubbs A., Nussenzweig A.* Endogenous DNA damage as a source of genomic instability in cancer // *Cell*. 2017. V. 168. № 4. P. 644–656. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.002>
24. *Alidousty C., Baar T., Martelotto L.G. et al.* Genetic instability and recurrent MYC amplification in ALK-translocated NSCLC: A central role of TP53 mutations // *J. Pathol.* 2018. V. 246. № 1. P. 67–76. <https://doi.org/10.1002/path.5110>
25. *Jdey W., Thierry S., Popova T. et al.* Micronuclei frequency in tumors is a predictive biomarker for genetic instability and sensitivity to the DNA repair inhibitor AsiDNA // *Cancer Res.* 2017. V. 77. № 16. P. 4207–4216. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2693>
26. *Venkatachalam P., Solomon F.D.P., Mohankumar M.N. et al.* Higher frequency of dicentrics and micronuclei in peripheral blood lymphocytes of cancer patients // *Mutat. Res.* 1999. V. 425. № 1. P. 1–8. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(98\)00238-3](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(98)00238-3)
27. *Jagetia G.C., Jayakrishnan A., Fernandes D., Vidyasagar M.S.* Evaluation of micronuclei frequency in the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients before and after radiation treatment // *Mutat. Res.* 2001. V. 491. № (1-2). P. 9–16. [https://doi.org/10.1016/s1383-5718\(00\)00132-7](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(00)00132-7)
28. *Violot D., M'Kacher R., Adjadj E. et al.* Evidence of increased chromosomal abnormalities in French Polyneesian thyroid cancer patients // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2005. V. 32. № 2. P. 174–179. <https://doi.org/10.1007/s00259-004-1662-2>
29. *Yildirim I.H., Yesilada E., Yoluglu S.* Micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes and exfoliated buccal cells of untreated cancer patients // *Genetika*. 2006. V. 42. № 5. P. 705–710.
30. *Vodicka P., Polivkova Z., Sytarova S. et al.* Chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes of newly diagnosed cancer patients and healthy controls // *Carcinogenesis*. 2010. V. 31. № 7. P. 1238–1241. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq056>
31. *Lloyd S.M., Lopez M., El-Zein R.* Cytokinesis-blocked micronucleus cytome assay and spectral karyotyping as methods for identifying chromosome damage in a lung cancer case-control population // *Genes Chromosomes Cancer*. 2013. V. 52. № 7. P. 694–707. <https://doi.org/10.1002/gcc.22065>
32. *Bolognesi C., Bruzzi P., Gismondi V. et al.* Clinical application of micronucleus test: a case-control study on the prediction of breast cancer risk susceptibility // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 11:e112354. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112354>
33. *Vodenkova S., Polivkova Z., Musak L. et al.* Structural chromosomal aberrations as potential risk markers in incident cancer patients // *Mutagenesis*. 2015. V. 30. № 4. P. 557–563. <https://doi.org/10.1093/mutage/gev018>
34. *Hagmar L., Brøgger A., Hansteen I.L. et al.* Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage // *Cancer Res.* 1994. V. 54. № 11. P. 2919–2922.
35. *Fenech M.* Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer // *Drug Discov. Today*. 2002. V. 7. № 22. P. 1128–1137. [https://doi.org/10.1016/s1359-6446\(02\)02502-3](https://doi.org/10.1016/s1359-6446(02)02502-3)
36. *Bonassi S., Norppa H., Ceppi M. et al.* Chromosomal aberration frequency in lymphocytes predicts the risk of

- cancer: Results from a pooled cohort study of 22358 subjects in 11 countries // *Carcinogenesis*. 2008. V. 29. № 6. P. 1178–1183.
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgn075>
37. *Bonassi S., El-Zein R., Bolognesi C., Fenech M.* Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies // *Mutagenesis*. 2011. V. 26. № 1. P. 93–100.
<https://doi.org/10.1093/mutage/geq075>
38. *Iarmarcovai G., Ceppi M., Botta A. et al.* Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: a meta-analysis // *Mutat. Res.* 2008. V. 659. № 3. P. 274–283.
<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.05.006>
39. *Rossi A., Hansteen M.I., Skjelbred C.F. et al.* Association between frequency of chromosomal aberrations and cancer risk is not influenced by genetic polymorphisms in GSTM1 and GSTT1 // *Environ. Health. Perspect.* 2009. V. 117. № 2. P. 203–208.
<https://doi.org/10.1289/ehp.11769>
40. *Stewart B.W., Wild C.P.* World Cancer Report. Lyon: IARC, 2014.
41. *Richard C., Fumet J.D., Chevrier S. et al.* Exome analysis reveals genomic markers associated with better efficacy of nivolumab in lung cancer patients // *Clin. Cancer Res.* 2019. V. 25. № 3. P. 957–966.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1940>
42. *El-Zein R.A., Abdel-Rahman S., Santee K.J. et al.* Identification of small and non-small cell lung cancer markers in peripheral blood using cytokinesis-blocked micronucleus and spectral karyotyping assays // *Cytogenet. Genome Res.* 2017. V. 152. № 3. P. 122–131.
<https://doi.org/10.1159/000479809>
43. *El-Zein R.A., Etzel C.J., Munden R.F.* The cytokinesis-blocked micronucleus assay as a novel biomarker for selection of lung cancer screening participants // *Transl. Lung Cancer Res.* 2018. V. 7. № 3. P. 336–346.
<https://doi.org/10.21037/tlcr.2018.05.09>
44. *Okamoto T., Kohno M., Ito K. et al.* Clinical significance of DNA damage response factors and chromosomal instability in primary lung adenocarcinoma // *Anticancer Res.* 2017. V. 37. № 4. P. 1729–1735.
<https://doi.org/10.21873/anticancer.11505>
45. *Huang T., Li J., Zhang C. et al.* Distinguishing lung adenocarcinoma from lung squamous cell carcinoma by two hypomethylated and three hypermethylated genes: a meta-analysis // *PLoS One*. 2016. V. 11. № 2:e0149088.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149088>
46. *Goldstraw P.* New staging system: how does it affect our practice? // *J. Clin. Oncol.* 2013. V. 31. № 8. P. 984–991.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2012.42.7922>
47. *Thrivani K., Raju A., Kumar R.V. et al.* Patterns of relative telomere length is associated with hTERT gene expression in the tissue of patients with breast cancer // *Clin. Breast Cancer*. 2019. V. 19. № 1. P. 27–34.
<https://doi.org/10.1016/j.clbc.2018.07.021>
48. *Savage J.R.* Classification and relationships of induced chromosomal structural changes // *J. Med. Genet.* 1976. V. 13. № 2. P. 103–122.
49. *Fenech M.* Cytokinesis-block micronucleus cytome assay // *Nat. Protoc.* 2007. V. 2. № 5. P. 1084–1104.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.77>
50. *Ингель Ф.И.* Перспективы использования микроядерного теста на лимфоцитах крови человека, культивируемых в условиях цитокинетического блока. Часть 1: пролиферация клеток // *Экол. генетика*. 2006. Т. 4. № 3. С. 7–19.
51. *Shen M., Cawthon R., Rothman N. et al.* A prospective study of telomere length measured by monochrome multiplex quantitative PCR and risk of lung cancer // *Lung Cancer*. 2011. V. 73. № 2. P. 33–37.
<https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2010.11.009>
52. *Lan Q., Cawthon R., Gao Y. et al.* Longer telomere length in peripheral white blood cells is associated with risk of lung cancer and the rs2736100 (CLPTM1L-TERT) polymorphism in a prospective cohort study among women in China // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 3:e59230.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059230>
53. *Han J., Qureshi A.A., Prescott J. et al.* A prospective study of telomere length and the risk of skin cancer // *J. Invest. Dermatol.* 2009. V. 129. № 2. P. 415–421.
<https://doi.org/10.1038/jid.2008.238>
54. *Fu X., Wan S., Hann H.W. et al.* Relative telomere length: A novel non-invasive biomarker for the risk of non-cirrhotic hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B infection // *Eur. J. Cancer*. 2012. V. 48. № 7. P. 1014–1022.
<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.02.066>
55. *Gramatges M.M., Telli M.L., Balise R., Ford J.M.* Longer relative telomere length in blood from women with sporadic and familial breast cancer compared with healthy controls // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2010. V. 19. № 2. P. 605–613.
<https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-09-0896>
56. *Tomasetti C., Vogelstein B.* Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions // *Science*. 2015. V. 347. № 6217. P. 78–81.
<https://doi.org/10.1126/science.1260825>
57. *Wu S., Powers S., Zhu W., Hannun Y.A.* Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development // *Nature*. 2016. V. 529. № 7584. P. 43–47.
<https://doi.org/10.1038/nature16166>
58. *Shain A.H., Yeh I., Kovalyshyn I. et al.* The genetic evolution of melanoma from precursor lesions // *N. Engl. J. Med.* 2015. V. 373. № 20. P. 1926–1936.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1502583>
59. *Hanahan D., Weinberg R.A.* Hallmarks of cancer: the next generation // *Cell*. 2011. V. 144. № 5. P. 646–674.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
60. *Lou J., He J., Zheng W. et al.* Investigating the genetic instability in the peripheral lymphocytes of 36 untreated lung cancer patients with comet assay and micronucleus assay // *Mutat. Res.* 2007. V. 617. № 1–2. P. 104–110.
<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.01.004>
61. *Peddireddy V., Badabagni S.P., Gundimeda S.D. et al.* Genetic instability in peripheral lymphocytes as biolog-

- ical marker for non-small cell lung cancer patients in the South Indian state of Andhra Pradesh // *Int. J. Biol. Markers*. 2014. V. 29. № 4: e345–53. <https://doi.org/10.5301/jbm.5000085>
62. Minina V.I., Sinitisky M.Y., Druzhinin V.G. et al. Chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes of lung cancer patients exposed to radon and air pollution. // *Eur. J. Cancer Prev.* 2018. V. 27. № 1. P. 6–12. <https://doi.org/10.1097/CEJ.00000000000027027232209>
63. Sansregret L., Swanton C. The role of aneuploidy in cancer evolution. // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2017. V. 7. № 1: a028373. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028373>
64. Simonetti G., Bruno S., Padella A. et al. Aneuploidy: Cancer strength or vulnerability? // *Int. J. Cancer.* 2019. V. 144. № 1. P. 8–25. <https://doi.org/10.1002/ijc.31718>

Telomere Length and Baseline Length and Baseline Cytogenetic Damage in Lung Cancer Patients

V. G. Druzhinin^{a, *}, E. D. Baranova^a, V. P. Volobaev^a, V. I. Ivanov^c, A. V. Larionov^a, V. I. Minina^{b, c}, F. Smagulova^d, L. Legoff^d, V. A. Titov^e, and A. Fucic^f

^a Kemerovo State University, Kemerovo, 650000 Russia

^b Federal Research Center for Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, 650065 Russia

^c Kemerovo State Medical University, Kemerovo, 650056 Russia

^d University Rennes, EHESP, Inserm, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) – UMR_S 1085, Rennes, F-35200 France

^e Kemerovo Regional Oncological Dispensary, Kemerovo, 650036 Russia

^f Institute for Medical Research and Occupational Health, Zagreb, 10000 Croatia

*e-mail: druzhinin_vladim@mail.ru

Despite the great efforts of basic and clinical research on lung cancer (LC), the prevention and treatment of this type of cancer are still far from satisfactory indicators. The complex mechanisms of the biology of LC are already recognized, but there is a significant gap in knowledge about the interaction of key biomarkers in the etiology and progression of this disease. The present study is aimed at studying the relationship between telomere length (TL), frequencies of chromosomal aberrations (CA) and micronuclei (MN) in leukocytes of primary patients with lung cancer. In sixty-seven men with lung cancer and 77 control donors (men), baseline frequencies of CA and MN were determined in blood leukocytes, and TL was also studied. As a result, a significant increase in TL was found in patients with lung cancer compared with control donors (25.86 ± 2.13 versus 15.29 ± 1.22 , respectively; $p = 0.00001$). In leukocytes of LC patients, a significant increase in the base level of structural aberrations of chromosomes, as well as micronuclei containing centromeres, was noted. Only in the sample of patients with lung cancer there were direct correlations of TL with the frequency of chromosomal aberrations and with the frequency of paired fragments. In the same sample, significant inverse correlations of TL with the frequency of binucleated leukocytes containing nuclear protrusions and with the frequency of cells entering apoptosis were recorded. The study showed for the first time that an increase in TL in patients with lung cancer is associated with structural chromosomal damages, but not with the incidence of aneuploidies.

Keywords: lung cancer, telomere length, baseline genome damage, genome instability, chromosome aberration, micronucleus assay.

ЭВОЛЮЦИЯ ХИЩНИКА В МОДЕЛИ ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ ВИДОВ: К ВОПРОСУ О СУЩЕСТВОВАНИИ ПОЛИМОРФИЗМА ПО РАЗМЕРУ ПОМЕТА В ЕСТЕСТВЕННЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ ПЕСЦОВ¹

© 2022 г. О. Л. Жданова¹ *, Г. П. Неверова¹, Е. Я. Фрисман²

¹Институт автоматизации и процессов управления Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Владивосток, 690041 Россия

²Институт комплексного анализа региональных проблем Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Биробиджан, 679016 Россия

*e-mail: axanka@iacp.dvo.ru

Поступила в редакцию 16.03.2021 г.

После доработки 21.04.2021 г.

Принята к публикации 25.05.2021 г.

Предложена эколого-генетическая модель сообщества “хищник–жертва”, в которой приспособленность хищника определяется генетически одним диаллельным плейотропным локусом. Рассматривается аутосомный локус диплоидной популяции. Различные генотипы хищника, отличаясь по репродуктивному потенциалу, неодинаково приспособлены и к ограничению по пищевым ресурсам, в результате приспособленность генотипа хищника определяется не только его собственным генотипом, но и численностью жертвы. Модель представлена уравнениями с дискретным временем, что позволяет учитывать ярко выраженную цикличность жизненного цикла видов, составляющих сообщество. Данная работа продолжает наши предыдущие исследования, посвященные моделированию эволюции локальной популяции и объяснению существующего генетического разнообразия по размеру помета в различных (естественных и искусственных) популяциях песцов *Allopex lagopus*. Явное включение в модель популяционной динамики жертвы и рассмотрение полного сообщества позволяют оценить возможности поддержания полиморфизма в популяциях песка в более реалистичных условиях. Проведенное исследование показывает, что направление эволюции популяции хищника, как и в более простых моделях, в целом определяется взаимным расположением приспособленностей его генотипов, при этом характер динамики взаимодействующих видов определяется уже набором параметров, характеризующих репродуктивные способности жертвы и хищника, а также характеристиками межвидового взаимодействия. Вместе с тем устойчивое поддержание полиморфизма у хищника возможно даже в отсутствие сверхдоминирования, когда значительные по амплитуде колебания обилия жертвы меняют направление отбора в популяции хищника. При этом различная динамика генетического состава хищника может привести к смене динамического режима в популяции жертвы.

Ключевые слова: эволюция, естественный отбор, динамика сообщества, хищник–жертва, теоретическая популяционная генетика, полиморфизм.

DOI: 10.31857/S0016675822010131

Появившиеся в начале прошлого столетия классические работы А. Лотки [1] и В. Вольтерры [2], рассматривающие динамику взаимодействующих видов, радикально изменили принципы моделирования в экологии. Предложенная ими концепция и ее развитие, реализованное во множестве работ (которые невозможно более-менее полно охарактеризовать в рамках одного обзора (например, [3–7])), по сути сформировали новую теорию математической экологии [8], которая

гармонично объединила в себе разработанные ранее принципы внутривидовой регуляции ([9, 10] и др.) и межвидовых взаимодействий: от простейших двухвидовых сообществ “хищник–жертва” и “паразит–хозяин” до целых пищевых цепочек. Пионерские работы [11–15], объединившие популяционно-генетическую теорию [16–18] и концепцию межвидового взаимодействия [1, 2], долгое время не получали широкого внимания и развития, поскольку считалось, что экологические и эволюционные процессы имеют разные временные шкалы [19] и результирующая микроэволюция не влияет на экологическую динамику. При всей сложности создаваемых моделей межвидо-

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0016675822010131 для авторизованных пользователей

вого взаимодействия долгое время в традиционной экологии не выделяли внутривидовые генетические вариации популяций, составляющих сообщество [3, 4, 20, 21].

Благодаря росту количества экспериментальных работ и наблюдений, подтверждающих то, что биологическая эволюция особенностей жизненного цикла организмов может происходить в масштабе времени, аналогичном динамике их популяций [22–24], относительно недавно появилось понятие “быстрой эволюции” (Rapid Evolution). Это неизбежно привело к пониманию того, что быстрая эволюция может формировать экологическую динамику взаимодействующих видов [25] и необходимо учитывать этот факт при моделировании динамики сообществ.

В результате интерес к эколого-генетическому подходу в моделировании взаимодействующих видов значительно вырос. К настоящему времени синтез эволюционного и экологического подходов представляет собой широкий спектр теоретических и практических работ, однако новая синтетическая теория развивается преимущественно на основе упрощенных моделей эволюции, детально не рассматривающих генетическую динамику. Как правило, моделируется эволюция полигенных непрерывно распределенных признаков (или количественных признаков [26]) (например, [21, 27–31]), а также эволюция клональных систем хищник–жертва (часто эквивалентных гаплоидным генетическим моделям), в которых особи имеют отдельные дискретные значения признаков и идеальное наследование фенотипов, нарушаемое редкими мутациями [21, 27, 30, 32]. Относительно недавно появилась серия работ, моделирующих генетически неоднородное сообщество “хищник–жертва”, в котором один из видов [33–35] или оба [36–38] состоят из двух генетически различимых групп. Этот подход также не предполагает детального описания механизма наследования признаков, при этом популяция одного из взаимодействующих видов формально делится на две группы (называемые генетически различимыми), каждая из которых описывается отдельным уравнением.

Прямой перенос популяционно-генетических уравнений, не упрощающих принципы менделевского наследования, в модели экологического сообщества, реализованный в ранних работах В.А. Костицина [11] и Д. Пиментеля [12, 13], как правило, не используется, и работы, продолжающие именно это направление, крайне редки (например, [39–41]). Причина непопулярности монолокусных моделей, по-видимому, связана с укоренившимся представлением о полигенном контроле фенотипических признаков, а увеличение количества рассматриваемых локусов значительно усложняет модель и быстро лишает возможности адекватно интерпретировать результаты моделирования.

Тем не менее оказалось, что монолокусное наследование важнейших признаков жизненного цикла животных наблюдается в природе. В частности, Т.И. Аксенович с соавт. [42] показали, что механизм наследования размера помета у песцов *Alopex lagopus* соответствует простейшей Менделевской однолокусной модели. Кроме того, песец представляет собой интересный пример вида, участвующего в различных сообществах, взаимодействующих по принципу “хищник–жертва”. Заметим, что естественные популяции песца, населяющие прибрежные и континентальные территории, радикально отличаются по своей репродуктивной стратегии. Прибрежные песцы питаются морскими птицами, рыбой, тюленями и морскими беспозвоночными [43]. Из года в год наблюдаются лишь очень небольшие колебания доступности этих ресурсов. Каждый год прибрежные песцы производят приплод небольшого размера [44]. Континентальные песцы питаются мелкими грызунами, главным образом полевками, численность которых характеризуется циклическими колебаниями [45]. В голодные годы популяции континентальных песцов демонстрируют крайне низкий репродуктивный уровень, а в годы с обильной пищей (когда в популяциях жертвы наблюдается подъем численности) резко увеличивают свою плодовитость [46–48]. Это позволило предположить, что прибрежные песцы однородны по размеру помета, а континентальные неоднородны и представлены особями с разной потенциальной плодовитостью. Полиморфизм по размеру помета наблюдается и у песцов, которых разводят в фермерских звероводческих хозяйствах. Проведенный в работе [42] комплексный сегрегационный анализ типа наследования размера помета в расширенной генеалогии фермерских песцов подтвердил, что данный признак является аутосомным женским признаком, а его наследование можно описать в рамках смешанной модели с основным геном и контролем малого размера помета по рецессивному типу.

В данной работе мы предлагаем эколого-генетическую модель сообщества “хищник–жертва”, которая в явном виде описывает Менделевский механизм наследования одного из признаков жизненного цикла хищника, его репродуктивный уровень. При моделировании мы ориентировались на сообщество “песец–мышевидные грызуны”, представляющее собой пример межвидового взаимодействия типа “хищник–жертва”, при описании которого важно учитывать не только экологические переменные, но и генетическую структуру хищника.

Поскольку один из важнейших признаков жизненного цикла песца – размер помета определяется генетически одним диаллельным локусом, использование однолокусной диаллельной модели наследования в данном случае вполне оправдано. Более того, при ограниченности ресурсов

питания (в данном случае при малой численности мышевидных грызунов – “жертвы”) в больших и малых пометах песцов выживаемость щенков различается, поэтому рассматриваемый локус определяет не только репродуктивный уровень, но и выживаемость потомства в популяции песцов, т.е. его можно считать плейотропным. Вместе с тем выживаемость песцов, особенно в больших пометах, будет существенно зависеть от уровня обеспеченности кормом – от численности “жертвы” – мышевидных грызунов в данном случае. Для моделирования такой ситуации вместо постоянных приспособленностей генотипов, используемых в классических работах [11–13], мы введем функциональную зависимость приспособленностей генотипических групп хищника от численности жертвы. В соответствии с этим текущая абсолютная приспособленность генотипа хищника, представляющая собой произведение рождаемости и выживаемости, определяется теперь не только его собственным генотипом, но и численностью жертвы.

Данная работа продолжает наши предыдущие исследования [49, 50], посвященные моделированию механизма дифференциации репродуктивных стратегий в естественных популяциях песцов. В предыдущих работах мы изучали динамику генетического состава локальной популяции, учитывая циклы кормовой базы с помощью периодически изменяющихся параметров. Такое упрощение позволило оценить степень влияния особенностей наследования размера помета (ограниченность полом этого признака), а также наличие возрастной структуры в популяции на условия существования полиморфизма по рассматриваемому признаку. Оказалось, что изменение цикла кормовой базы может значительно изменять условия существования полиморфизма [51]. При этом реальная динамика жертвы может быть достаточно разнообразна, начиная от стационарной и строго периодической и заканчивая нестрогими (или зашумленными) циклами и даже нерегулярными колебаниями. Явное включение в модель популяционной динамики жертвы и рассмотрение полного сообщества, вместо локальной популяции, позволит избавиться от искусственного циклически изменяющегося параметра, вариация значений которого весьма ограничена, и оценить возможности поддержания полиморфизма в популяциях песца в более реалистичных условиях.

МОДЕЛЬ ДИНАМИКИ СООБЩЕСТВА “ХИЩНИК–ЖЕРТВА”, УЧИТЫВАЮЩАЯ ЕСТЕСТВЕННЫЙ ОТБОР В ПОПУЛЯЦИИ ХИЩНИКА

В качестве базовой модели для описания эволюционной динамики локальной популяции

хищника рассмотрим классическую модель могогенного отбора по признаку, контролируемому одним аутосомным диаллельным локусом с аллеломорфами A и a в диплоидной популяции. Ограничимся случаем F -отбора, действие которого не зависит от численности (плотности населения) популяции хищника, однако при этом влияние плотностно-зависимых факторов, лимитирующих ее рост, учитывается на уровне общей популяционной численности. Обозначив через Y – численность популяции хищника, через p – частоту аллеля A в популяции хищника и через n – сезон размножения, можно получить следующие уравнения эволюционной динамики [52]:

$$\begin{cases} Y(n+1) = \bar{w}(n)Y(n)f(Y(n)) \\ p(n+1) = p(n)(w_{AA}p(n) + w_{Aa}(1-p(n)))/\bar{w}(n). \end{cases} \quad (1)$$

Величина $\bar{w}(n)$ соответствует средней относительной приспособленности в n -ый сезон размножения и определяется следующим образом:

$$\bar{w}(n) = w_{AA}p(n)^2 + 2w_{Aa}p(n)(1-p(n)) + w_{aa}(1-p(n))^2,$$

где w_{ij} – относительная приспособленность ij -го генотипа (индексы i, j могут принимать значения A, a), независящая от уровня численности.

Будем полагать, что при этом есть и плотностное лимитирование популяции, которое осуществляется по линейному закону одинаково для всех генотипов (дискретный аналог модели Ферхюльста): $f(Y_n) = 1 - Y_n/M$, где M – емкость экологической ниши хищника – максимально возможная его численность в сообществе.

Здесь важно отметить, что использование аналога модели Ферхюльста налагает существенные ограничения как на возможные (соответствующие биологическому смыслу задачи) значения параметров модели, так и на диапазоны рассматриваемых в модели численностей. В частности, предполагается, что численность хищника не может превышать величину M .

Для описания динамики локальной популяции жертвы также будем использовать дискретный аналог уравнения Ферхюльста:

$$X(n+1) = bX(n)\left(1 - \frac{X(n)}{K}\right), \quad (2)$$

где X – численность жертвы в n -ый сезон размножения, b – ее репродуктивный потенциал, K – емкость экологической ниши жертвы. При этом предполагается, что численность жертвы не может превышать величину K .

Объединяя модели (1) и (2), будем использовать классические уравнения Лотки–Вольтерры с откликом в виде функции Холлинга II-го типа, учитывающей насыщение хищника. Кроме того, учтем генетическую неоднородность хищника, введя зависимость приспособленности генотипа (w_{ij}) от функции питания $\alpha_{ij}(X)$ так, чтобы по аналогии с концепцией r - K отбора [53, 54] различные

генотипы могли отличаться и по репродуктивному потенциалу (r_{ij}), и по функции питания $\alpha_{ij}(X)$:

$$w_{ij}(X(n)) = r_{ij}\alpha_{ij}(X(n)),$$

где r_{ij} – репродуктивный потенциал – максимально возможное значение коэффициента рождаемости и, соответственно, максимально возможное значение приспособленности ij -го генотипа, а

$$\alpha_{ij}(X(n)) = \frac{X(n)}{C_{ij} + X(n)}.$$

Таким образом, функции питания различных генотипов отличаются только константой C_{ij} , равной численности жертвы, при которой ij -ый генотип имеет приспособленность $r_{ij}/2$, и называемой константой полунасыщения хищника ij -ого генотипа. Учитывая все вышеизложенное, получаем:

$$\left\{ \begin{array}{l} X(n+1) = bX(n)\left(1 - \frac{X(n)}{K}\right) - \hat{\alpha}Y(n)\Psi(n) \\ Y(n+1) = \bar{w}(n)Y(n)(1 - Y(n)/M) \\ p(n+1) = p(n)(w_{AA}(X(n))p(n) + w_{Aa}(X(n))(1 - p(n)))/\bar{w}(n), \end{array} \right. \quad (3)$$

где $\hat{\alpha}$ – среднее максимально возможное количество жертвы, потребляемое за один сезон одним хищником при его полном насыщении,

$$\Psi(n) = X(n)\left(\frac{p(n)^2}{C_{AA} + X(n)} + \frac{2p(n)(1 - p(n))}{C_{Aa} + X(n)} + \frac{(1 - p(n))^2}{C_{aa} + X(n)}\right)$$

– средневзвешенная по генетическому составу хищника доля (от максимально возможного количества) жертвы, потребляемая в данном сезоне одним хищником, учитывающая ограниченный размер популяции жертв, а также тот факт, что различные генотипические группы хищника оказывают неодинаковое давление на популяцию жертвы.

Отметим, что в случае генетически однородной популяции (например, мономорфной по аллелю A) $Y = Y_{AA} = Yp^2$ уравнения динамики численности сообщества преобразуются к виду, эквивалентному классической модели хищник–жертва с плотностным лимитированием составляющих его популя-

ций по модели Ферхюльста и насыщением хищника в виде функции Холлинга II типа [55]:

$$\left\{ \begin{array}{l} Y(n+1) = \frac{r_{AA}X(n)}{C_{AA} + X(n)}Y(n)(1 - Y(n)/M) \\ X(n+1) = bX(n)\left(1 - \frac{X(n)}{K}\right) - \frac{\hat{\alpha}X(n)Y(n)}{C_{AA} + X(n)}. \end{array} \right.$$

После перехода к относительным численностям ($X/K \rightarrow x$, $Y/M \rightarrow y$) и соответствующим параметрам модели ($C_{ij}/K \rightarrow c_{ij}$, $\hat{\alpha}/K \rightarrow \alpha$) получим уравнения динамики сообщества в окончательном несколько упрощенном виде:

$$\left\{ \begin{array}{l} x(n+1) = bx(n)(1 - x(n)) - \alpha y(n)\psi(n) \\ y(n+1) = \bar{w}(n)y(n)(1 - y(n)) \\ p(n+1) = p(n)(w_{AA}(x(n))p(n) + w_{Aa}(x(n))(1 - p(n)))/\bar{w}(n). \end{array} \right. \quad (4)$$

Здесь все переменные $x(n)$, $y(n)$ и $p(n)$ изменяются в пределах от 0 до 1,

$w_{ij}(x(n)) = \frac{r_{ij}x(n)}{c_{ij} + x(n)}$ – функция приспособленности ij -ого генотипа хищника,

$\bar{w}(n) = w_{AA}(x(n))p(n)^2 + 2w_{Aa}(x(n))p(n)(1 - p(n)) + w_{aa}(x(n))(1 - p(n))^2$ – средняя приспособленность популяции хищника,

$$\psi(n) = x(n)\left(\frac{p(n)^2}{c_{AA} + x(n)} + \frac{2p(n)(1 - p(n))}{c_{Aa} + x(n)} + \frac{(1 - p(n))^2}{c_{aa} + x(n)}\right)$$

– средневзвешенная по генетическому составу хищника доля (от максимально возможного ко-

личества) жертвы, потребляемая в данном сезоне одним хищником.

Полученная в результате эколого-генетическая модель (4) позволяет описать характерную особенность сообщества “песец–мышевидные грызуны”, в котором репродуктивный успех хищника зависит от обилия жертвы. Так, генотипы песца, производящие пометы большого размера, имеют большую плодовитость (большой репродуктивный потенциал r_{ij}), но для успешного выживания щенков им требуется больше пищи, т.е. константа полунасыщения для этих генотипов хищника (c_{ij}) тоже будет больше. Соответственно результирующая приспособленность генотипа хищника (w_{ij}) будет определяться совокупностью значений, характеризующих обилие жертвы и репродуктивные способности хищника.

Далее рассмотрим, как меняются приспособленности генотипов хищника в зависимости от численности жертвы при различных распределениях генетических характеристик хищника. Здесь мы ответим на вопрос, может ли меняться взаимное расположение приспособленностей генотипов, а следовательно и направление естественного отбора в популяции хищника при изменении численности жертвы.

Вариации вида зависимостей приспособленностей при изменении численности жертвы

Рассмотрим важные частные случаи зависимостей приспособленностей от численности популяции.

I. *Константы полунасыщения хищников по генотипам не различаются* ($c_{aa} = c_{Aa} = c_{AA} = c^*$).

В этом случае взаимное расположение репродуктивных потенциалов генотипов определяет взаимное расположение приспособленностей и не зависит от численности жертвы (рис. 1,а). Обозначим через $g(x(n)) = x(n)/(c^* + x(n))$ характеристику пищевых ресурсов, тогда приспособленности можно представить в виде: $w_{ij}(x(n)) = r_{ij}g(x(n))$. Можно отметить, что в этом случае действует F-отбор “в чистом виде”, так как относительные приспособленности генотипов постоянны.

II. *Репродуктивные потенциалы хищников с различными генотипами не отличаются* ($r_{aa} = r_{Aa} = r_{AA} = r$).

В этом случае численность жертвы влияет на абсолютное значение приспособленности хищника, однако взаимное расположение приспособленностей не меняется, так как оно полностью определяется взаимным расположением констант полунасыщения хищника следующим образом: наиболее приспособленным генотипом оказывается генотип с наименьшим параметром c_{ij} : $w_{ij}(x(n)) = r x(n)/(c_{ij} + x(n))$ (рис. 1,б).

III. *Константы полунасыщения и репродуктивные потенциалы хищников различны*.

Здесь возникают две принципиально различающиеся ситуации: в первом случае доминирование по репродуктивным потенциалам и константам полунасыщения у генотипов одинаковое ($r_{Aa} > r_{aa} > r_{AA}$ и $c_{Aa} > c_{aa} > c_{AA}$), во втором – обратное ($r_{Aa} > r_{aa} > r_{AA}$ и $c_{Aa} < c_{aa} < c_{AA}$). Отметим, что такой порядок (гетерозигота *Aa* на первом месте, гомозигота *aa* – на втором) выбран для примера, большинство возможных вариантов взаимного расположения приспособленностей можно получить, меняя только обозначения. Нетрудно показать, что во втором случае взаимное расположение приспособленностей определяется взаимным расположением их репродуктивных потенциалов и не меняется с изменением численности жертвы.

Другая ситуация (первый случай, когда $r_{Aa} > r_{aa} > r_{AA}$ и $c_{Aa} > c_{aa} > c_{AA}$) представляется наиболее реалистичной с биологической точки зрения, так как генотип с большим репродуктивным потенциалом скорее будет иметь и большую константу полунасыщения (как у песцов с большим размером помета), поскольку для выживания ему потребуется больше пищи. В этом случае направление отбора может зависеть от численности жертвы. На рис. 1,в приведен пример ситуации, когда при малых значениях численности жертвы в популяции хищника ($x < 0.3$) действует дизруптивный отбор (гетерозигота наименее приспособлена), а при больших ($x > 0.3$) – сверхдоминирование. Несколькое другое соотношение репродуктивных потенциалов и констант полунасыщения генотипов хищника (рис. 1,г) создает ситуацию, в которой при малых значениях численности жертвы в популяции хищника ($x < 0.2$) действует направленный отбор против аллеля *A* (гетерозигота занимает промежуточное положение), а при больших ($x > 0.2$) возникает сверхдоминирование.

Здесь закономерно возникает вопрос к соотношению параметров генотипов (плодовитости (r_{ij}) и константы полунасыщения (c_{ij})): какого преимущества достаточно генотипу для доминирования? Рассмотрим его на примере сверхдоминирования, пусть гетерозигота обладает наибольшей плодовитостью и соответственно наиболее требовательна к обилию пищевых ресурсов: ($r_{Aa} > r_{aa} > r_{AA}$ и $c_{Aa} > c_{aa} > c_{AA}$). Учитывая вид функций приспособленности, запишем:

$$w_{Aa}(x) > w_{ii}(x) \Leftrightarrow \frac{r_{Aa}x}{c_{Aa} + x} > \frac{r_{ii}x}{c_{ii} + x} \Rightarrow \frac{r_{Aa}}{r_{ii}} > \frac{c_{Aa} + x}{c_{ii} + x}$$

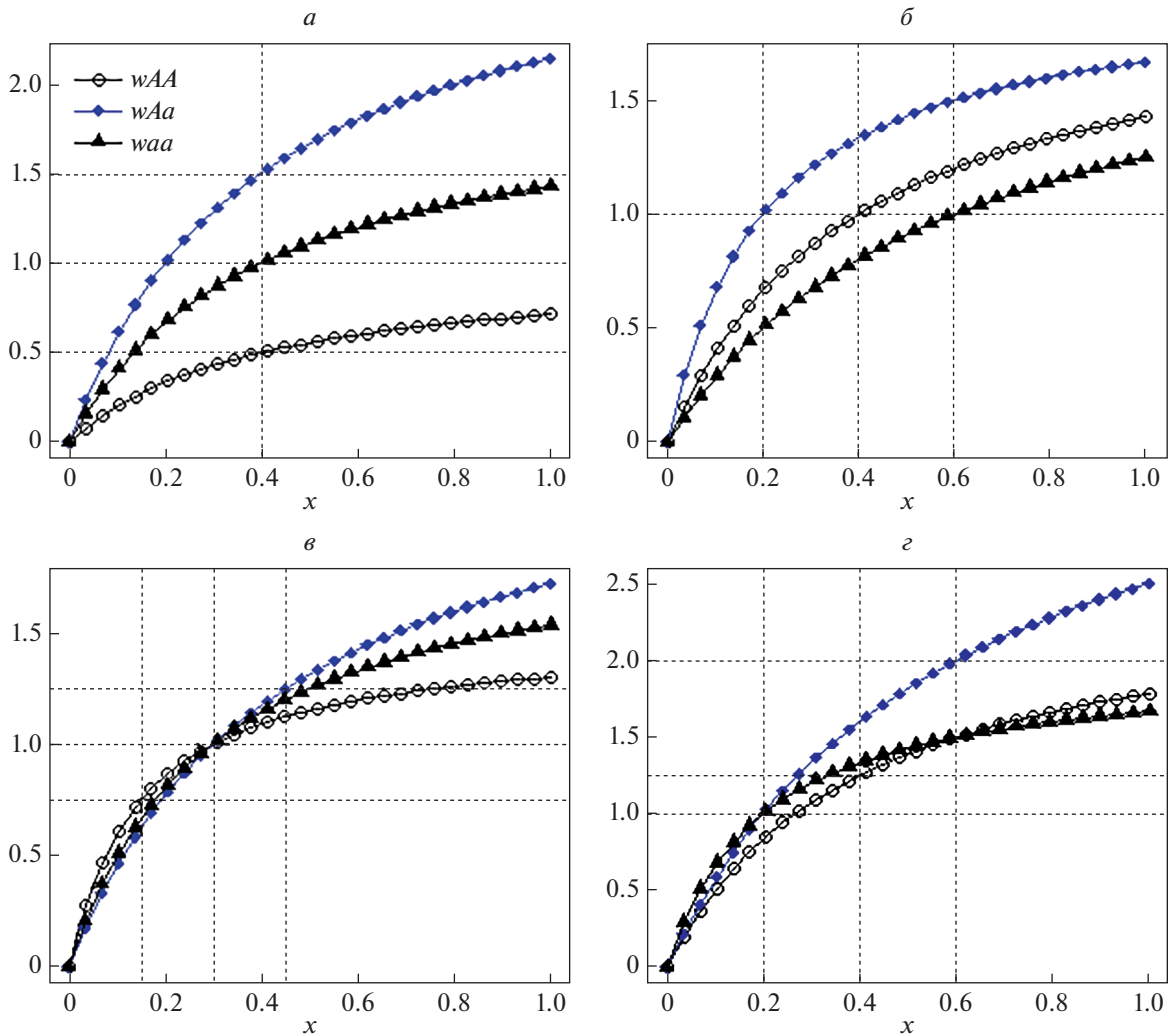


Рис. 1. Примеры зависимости изменений приспособленностей генотипов с ростом численности жертвы. *а* – постоянные относительные приспособленности (F-отбор): $c_{AA} = c_{Aa} = c_{aa} = 0.4, r_{AA} = 1, r_{Aa} = 2, r_{aa} = 3$; *б* – одинаковые репродуктивные потенциалы: $r_{AA} = r_{Aa} = r_{aa} = 2, c_{AA} = 0.6, c_{Aa} = 0.4, c_{aa} = 0.2$; *в, г* – изменение взаимного расположения приспособленностей с изменением численности жертвы: *в* – $c_{Aa} = 0.45, c_{aa} = 0.3, c_{AA} = 0.15, r_{Aa} = 2.5, r_{aa} = 2, r_{AA} = 1.5$; *г* – $c_{Aa} = 0.6, c_{aa} = 0.4, c_{AA} = 0.2, r_{Aa} = 4, r_{aa} = 2.5, r_{AA} = 2$.

Далее обозначим через m_i преимущество по плодовитости гетерозиготы над соответствующей гомозиготой ii : $m_i = r_{Aa}/r_{ii}$, тогда условия доминирования можно записать в следующем виде:

$$w_{Aa}(x) > w_{aa}(x) \Leftrightarrow c_{Aa} < m_a c_{aa} + x(m_a - 1),$$

$$w_{Aa}(x) > w_{AA}(x) \Leftrightarrow c_{Aa} < m_A c_{AA} + x(m_A - 1). \quad (*)$$

Таким образом, для безусловного доминирования генотипу с большей плодовитостью достаточно, чтобы его требования к обилию пищи вырастали в меньшее количество раз, чем имеющееся у него преимущество по плодовитости ($c_{Aa}/c_{ii} < m_i$). Если это не выполняется, то при малых величинах численности жертвы приспособленность наиболее плодовитого генотипа будет меньше, чем у менее плодовитых, а при больших – больше. Значение

численности жертвы (x), в котором меняется доминирование по приспособленностям из-за того, что обилие жертвы ниже его оказывается малым, а выше – достаточным, определяется из соотношений (*). Так, на рис. 1, *в* преимущество по плодовитости у гетерозиготы: $m_a = 1.25, m_A = 5/3$, но ее требования к обилию пищи превосходят эти значения (m_i): $c_{Aa}/c_{aa} = 1.5 > 1.25$ и $c_{Aa}/c_{AA} = 3 > 5/3$. Мы видим, что при малых численностях жертвы гетерозигота уступает по приспособленности обоим гомозиготам. При больших значениях численности жертвы ситуация меняется. Из условий (*) можно получить численность жертвы ($x > 0.3$), при которой ограничения по пищевым ресурсам станут менее значимы, чем преимущество по плодовитости, и установится сверхдоминирование.

Возможные равновесия – стационарные точки модели и условия их устойчивости

При некотором достаточно большом наборе значений параметров и при определенных начальных условиях (начальных значениях переменных) все переменные модели (4) стремятся к конкретным равновесным значениям – стационарным точкам.

Обозначим через \bar{x} – численность жертвы, \bar{y} – численность хищника, а \bar{p} – частоту аллеля A в стационарной точке, тогда приспособленности генотипов хищника в стационарной точке естественно обозначить как $\bar{w}_{ij} = w_{ij}(\bar{x}) = \frac{r_{ij}\bar{x}}{c_{ij} + \bar{x}}$ и среднюю приспособленность популяции хищника как $\bar{w} = \bar{w}(\bar{x}, \bar{p}) = \bar{w}_{AA}\bar{p}^2 + 2\bar{w}_{Aa}\bar{p}(1 - \bar{p}) + \bar{w}_{aa}(1 - \bar{p})^2$.

Несмотря на сложность модели (4) и невозможность найти все ее равновесия аналитически, нам удалось получить классификацию ее стационарных точек, на основе анализа линеаризованной системы провести исследование их асимптотической устойчивости и сделать выводы о направлении эволюционной динамики сообщества для различных областей значений параметров модели. Так, при малом репродуктивном потенциале жертвы ($b < 1$) сообщество вырождается: $\bar{x} = 0$, $\bar{y} = 0$. При большем репродуктивном потенциале жертвы, но при малой равновесной средней приспособленности популяции хищника ($\bar{w} < 1$) в сообществе остается только жертва, а хищник вымирает: $\bar{x} = 1 - 1/b$, $\bar{y} = 0$, причем если репродуктивный потенциал жертвы оказывается достаточно высок, то равновесие ее численности теряет устойчивость и происходят популяционные колебания жертвы, усложняющиеся с ростом репродуктивного потенциала.

Рассмотрим теперь параметрическую область модели, где существует полное сообщество, т.е. хищник не вымирает. Для этого необходимо наложить следующие ограничения на параметры модели: $b > 1$, $\bar{w} > 1$. В этой области модель (4) имеет три стационарные точки, принципиально различающиеся генетической структурой популяции хищника.

I. Мономорфизм по аллелю a : $\bar{p} = 0$.

Стационарная численность жертвы \bar{x} является решением следующего уравнения:

$$-br_{aa}\bar{x}^3 - r_{aa}(bc_{aa} - b + 1)\bar{x}^2 + ((b - 1)c_{aa} - \alpha)r_{aa} + \alpha)\bar{x} + \alpha c_{aa} = 0,$$

стационарная численность хищника: $\bar{y} = 1 - 1/\bar{w}$

$$\text{или } \bar{y} = \frac{r_{aa}\bar{x} - c_{aa} - \bar{x}}{r_{aa}\bar{x}}.$$

Условия существования равновесия: $b > 1$, $\bar{w}_{aa} > 1$; условия устойчивости мономорфизма $\bar{w}_{aa} > \bar{w}_{Aa}$.

II. Мономорфизм по аллелю A : $\bar{p} = 1$.

Стационарная численность жертвы \bar{x} является решением следующего уравнения:

$$-br_{AA}\bar{x}^3 - r_{AA}(bc_{AA} - b + 1)\bar{x}^2 + (((b - 1)c_{AA} - \alpha)r_{AA} + \alpha)\bar{x} + \alpha c_{AA} = 0,$$

стационарная численность хищника: $\bar{y} = 1 - 1/\bar{w}$

$$\text{или } \bar{y} = \frac{r_{AA}\bar{x} - c_{AA} - \bar{x}}{r_{AA}\bar{x}}.$$

Условия существования данного равновесия: $b > 1$, $\bar{w}_{AA} > 1$; условия устойчивости мономорфизма $\bar{w}_{AA} > \bar{w}_{Aa}$.

III. Полиморфизм: $\bar{p} = \frac{\bar{w}_{Aa} - \bar{w}_{aa}}{2\bar{w}_{Aa} - \bar{w}_{aa} - \bar{w}_{AA}}$.

Стационарная численность жертвы \bar{x} в полиморфном равновесии является решением полиномиального уравнения 9-й степени, которое здесь мы не будем приводить из-за его громоздкости, стационарная численность хищника $\bar{y} = 1 - 1/\bar{w}$,

$$\bar{w} = \frac{\bar{w}_{AA}^2 - \bar{w}_{AA}\bar{w}_{aa}}{2\bar{w}_{Aa} - \bar{w}_{AA} - \bar{w}_{aa}}.$$

Условия его существования: $b > 1$, $\bar{w} > 1$; условия устойчивости полиморфизма $\bar{w}_{aa} < \bar{w}_{Aa}$ и $\bar{w}_{AA} < \bar{w}_{Aa}$. Если обе гомозиготы более приспособлены, чем гетерозигота ($\bar{w}_{aa} > \bar{w}_{Aa}$ и $\bar{w}_{AA} > \bar{w}_{Aa}$), то полиморфизм неустойчив и возникает бистабильность мономорфных состояний, в каком из них окажется популяция зависит от начальных условий.

Таким образом, направление эволюции популяции хищника, как и в более простых моделях, в целом определяется взаимным расположением приспособленностей его генотипов, при этом характер динамики определяется уже набором параметров, характеризующих репродуктивные способности жертвы и хищника, а также характеристиками межвидового взаимодействия.

Отметим, что приведенная выше классификация стационарных состояний корректна, когда численности популяций и, следовательно, приспособленности генотипов стабилизируются и их взаимное расположение не меняется. Если стабилизации численностей не происходит, то закономерно меняются и значения приспособленностей. В этом случае нужно рассматривать две принци-

пильно различающиеся ситуации: (i) взаимное расположение приспособленностей не меняется (например, как на рис. 1, *a, б*) и результат отбора не меняют флуктуации численности – тогда классификация финитных состояний остается в силе; (ii) взаимное расположение приспособленностей меняется с изменением численности жертвы (например, как на рис. 1, *в, з*) и тогда в разных фазах динамики жертвы меняется направление отбора и его результат уже не так очевиден, здесь необходимо дополнительное численное исследование.

ДИНАМИКА СООБЩЕСТВА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЕСТЕСТВЕННОГО ОТБОРА В ПОПУЛЯЦИИ ХИЩНИКА

Прежде чем перейдем к анализу результатов действия естественного отбора в популяции хищника подчеркнем, что рассматривается параметрическая область, где существует полное сообщество, т.е. хищник не вымирает и выполняются следующие ограничения на параметры модели: $b > 1$, $\bar{w} > 1.2$.

Численное исследование выполнено путем построения предельных траекторий модели (4) при заданных значениях параметров и начальных условий, также бифуркационных диаграмм и бассейнов притяжения ее альтернативных аттракторов.

Отметим, что в целом область устойчивого существования видов охватывает значительную часть параметрического пространства и не имеет выраженной фрактальности, т.е. при адекватном выборе параметров (достаточном уровне воспроизводства в популяциях жертвы и хищника вне области их чрезмерно высоких значений) траектории модели (4) будут оставаться в области неотрицательных значений на протяжении всего периода расчетов (подробнее в Приложении).

Типы естественного отбора

Сначала рассмотрим ситуации, в которых направление отбора не меняется.

I. *Промежуточное доминирование по приспособленностям* ($\bar{w}_{aa} > \bar{w}_{Aa} > \bar{w}_{AA}$).

В этом случае полиморфного равновесия не существует, так как $\bar{p} = \frac{\bar{w}_{Aa} - \bar{w}_{aa}}{2\bar{w}_{Aa} - \bar{w}_{aa} - \bar{w}_{AA}}$ оказывается меньше нуля или больше единицы. Система (4) имеет только одно устойчивое мономорфное состояние ($\bar{p} = 0$), в котором и должна оказаться популяция хищника вне зависимости от начальных условий, т.е. происходит вытеснение неоптимального аллеля. При этом динамика численно-

сти сообщества зависит как от внутривидовых параметров, так и от характеристик межвидового взаимодействия. С ростом параметра b и \bar{w}_{aa} решение ($\bar{p} = 0$) теряет устойчивость и численность популяций, составляющих сообщество, переходит в колебательный режим в результате реализации сценария Фейгенбаума (рис. 2, слева) или Неймарка-Сакера (рис. 2, справа). В частности, при высоком репродуктивном потенциале жертвы (b) и невысокой приспособленности хищника (w_{aa}) потеря устойчивости сопровождается появлением двугодичных колебаний и их последующим усложнением по сценарию Фейгенбаума (рис. 2, слева). Увеличение же приспособленности хищника (\bar{w}_{aa}) за счет роста его репродуктивного потенциала (r_{aa}) при достаточно высоком уровне воспроизводства в популяции жертвы приводит к бифуркации Неймарка-Сакера и возникновению достаточно сложно организованных колебаний численности (квазипериодических режимов) (рис. 2, справа), не наблюдающихся в моделях локальных популяций без возрастной структуры [52, 56, 57].

II. *Сверхдоминирование* ($\max(\bar{w}_{aa}, \bar{w}_{AA}) < \bar{w}_{Aa}$) или *повышенная приспособленность гетерозигот*.

В этом случае оба мономорфных равновесия системы (4) неустойчивы и популяция остается полиморфной вне зависимости от начальных условий. При этом за счет отбора популяция хищника достигает большего значения средней приспособленности; динамика численности, как и при движущем отборе, определяется совокупностью внутривидовых параметров и характеристик межвидового взаимодействия. При сверхдоминировании увеличение репродуктивного потенциала жертвы или хищника может не только вызвать колебания численности сообщества, но и привести к возникновению устойчивых колебаний генетического состава хищника.

III. *Пониженная приспособленность гетерозигот* ($\min(\bar{w}_{aa}, \bar{w}_{AA}) > \bar{w}_{Aa}$).

В этом случае оба мономорфных состояния модели (4) могут быть устойчивы, и система окажется в одном из них. От начальных условий зависит то, в каком именно из мономорфных равновесий окажется система (рис. 3). Причем зависимость от начальных условий выглядит предельно просто: при $p_0 < p^*$ популяция достигнет генетически мономорфного состояния $p = 0$, при $p_0 > p^*$ – $p = 1$, вне зависимости от начальных численностей сообщества (рис. 3). При этом динамика его численности определяется набором внутривидовых параметров жертвы, хищника (точнее,

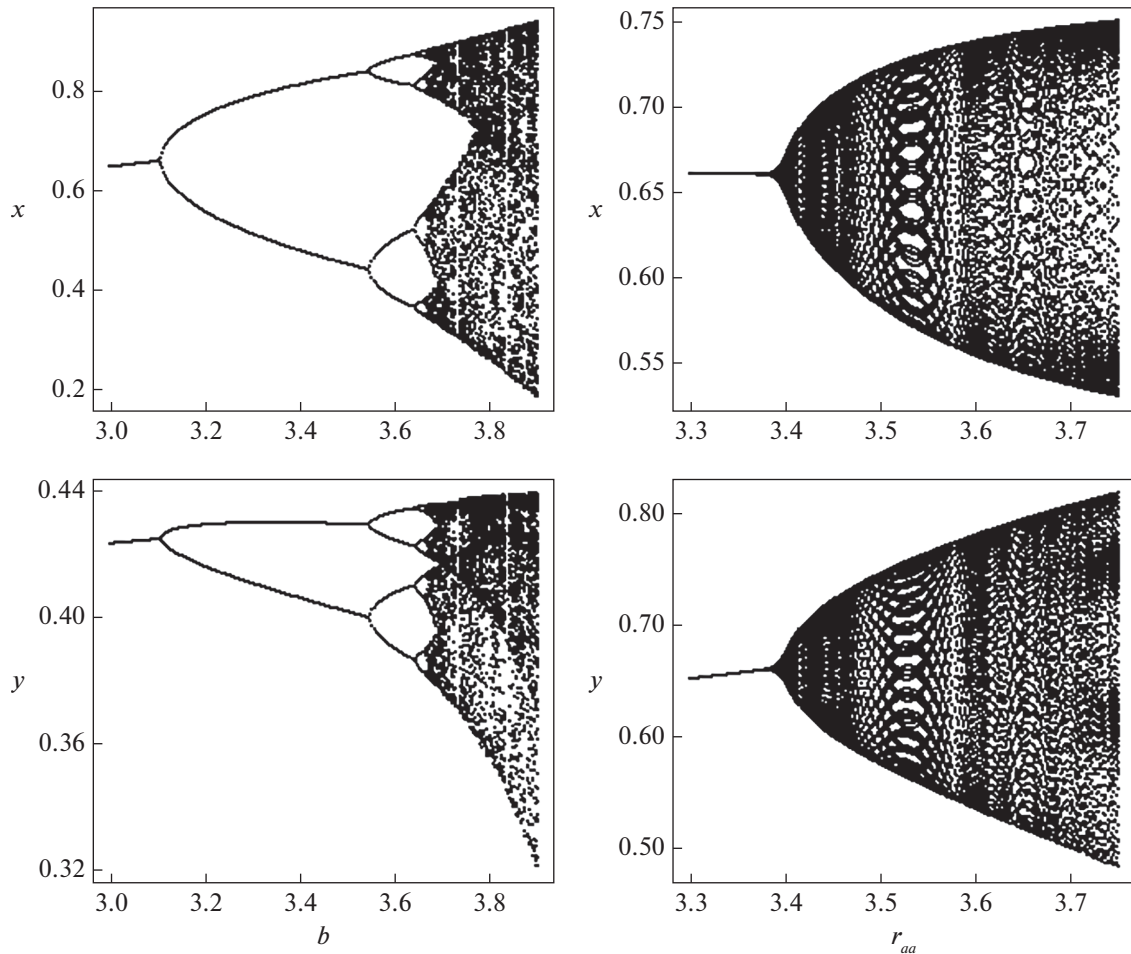


Рис. 2. Мономорфизм aa . Бифуркационная диаграмма численностей жертвы (x) и хищника (y) при фиксированных значениях параметров и начальных условиях: $c_{AA} = 0.1$, $c_{Aa} = 0.1$, $c_{aa} = 0.1$, $r_{AA} = 0.95$, $r_{Aa} = 0.92$, $\alpha = 0.1$, $x_0 = 0.4$, $y_0 = 0.2$, $p_0 = 0.1$; слева $r_{aa} = 2.0$, справа $b = 3.25$.

эволюционно победившего хищника) и характеристик межвидового взаимодействия. Поэтому динамика численности сообщества с генетически различными хищниками может различаться (рис. 3,з). В частности, при выбранных значениях параметров в сообществе наблюдается мультистабильность, представленная тремя различными динамическими режимами численности хищника и жертвы: цикл длины 2 при мономорфизме AA у хищника, а также цикл длины 3 или нерегулярная динамика в случае фиксации аллеля a в популяции хищника. При этом бассейны притяжения различной динамики численности при мономорфизме aa у хищника создают очень сложную (фрактальную) структуру деления фазового пространства (рис. 3,з), поэтому переход от точного 3-цикла к нерегулярной динамике и наоборот может произойти в результате небольшого изменения текущей численности даже одного из видов сообщества.

Изменение типа естественного отбора в процессе эволюции сообщества

Рассмотрим ситуацию, когда направление отбора в популяции хищника зависит от доступности пищевых ресурсов, т.е. меняется с изменением численности жертвы. Причем генотип с большим репродуктивным потенциалом имеет большую константу полунасыщения (как у песцов с большим размером помета), поскольку для выживания ему требуется больше пищи. Пример такой ситуации представлен на рис. 4: при малых значениях численности жертвы ($x < 0.5$) отбор направлен против аллеля A , а при больших ($x > 0.5$) – против аллеля a , при этом приспособленность гетерозиготы занимает промежуточное положение, т.е. вне зависимости от численности жертвы в популяции хищника действует направленный отбор, но его направление может меняться в зависимости от доступности пищевых ресурсов (рис. 4,а).

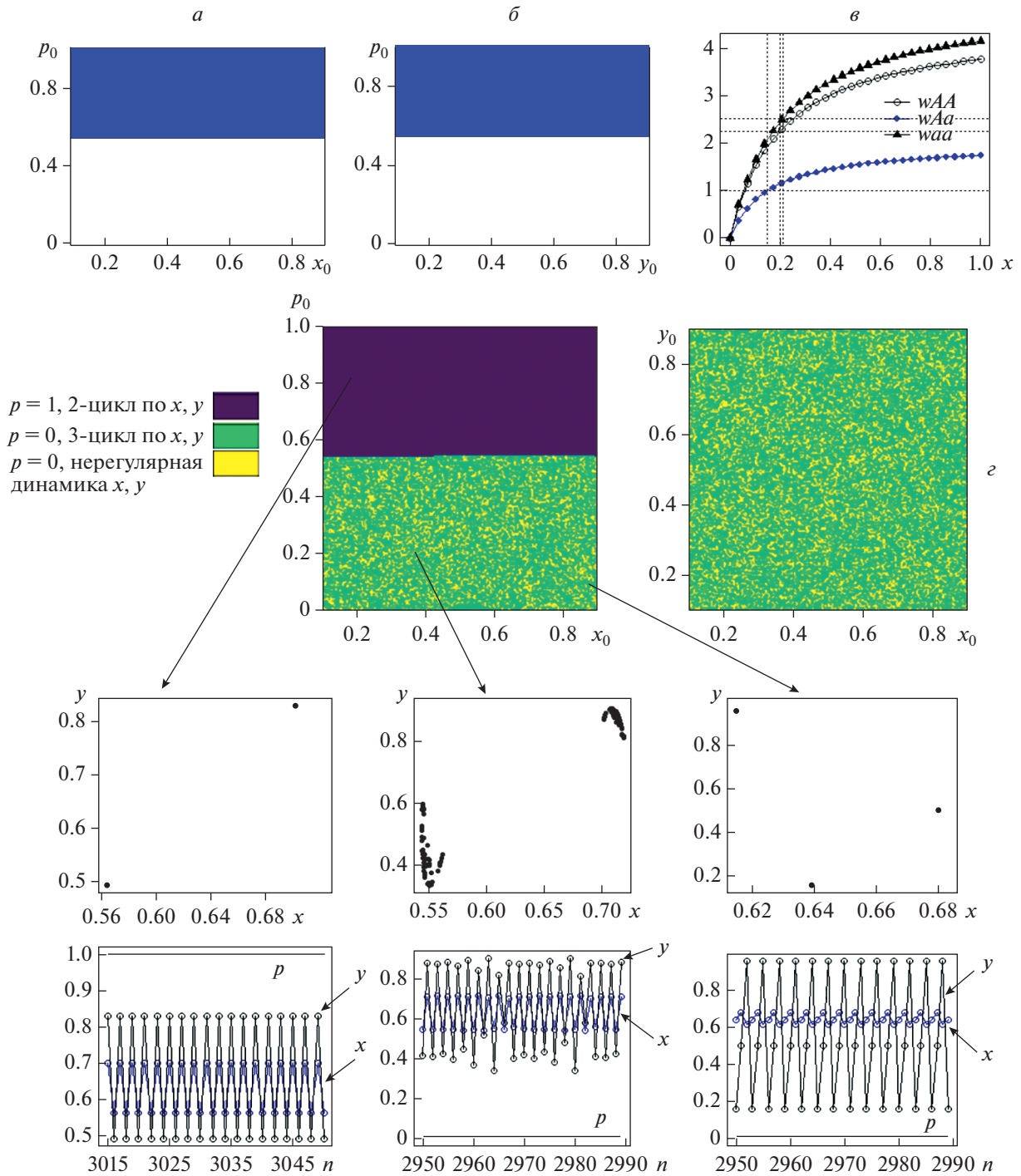


Рис. 3. *a, б* – бассейны притяжения мономорфных состояний модели (4): $p = 1$ – синим цветом, $p = 0$ – белым. Значения параметров и начальные условия: $c_{AA} = 0.2$, $c_{Aa} = 0.15$, $c_{aa} = 0.21$, $r_{AA} = 4.5$, $r_{Aa} = 2.0$, $r_{aa} = 5.005$, $b = 3.0$, $\alpha = 0.1$, $x_0 = 0.1$, $y_0 = 0.8$; $p_0 = 0.35$ (*a*), $p_0 = 0.45$ (*б*); *в* – динамика приспособленностей генотипов при изменении численности жертвы в диапазоне $[0, 1]$; *з* – бассейны притяжения различных динамических режимов модели (4). Темно-синим цветом обозначено мономорфное состояние $p = 1$, в котором реализуется 2-цикл по x, y (нижний ряд, слева), зеленым и желтым цветом – другое мономорфное состояние $p = 0$ с 3-циклом по x, y (нижний ряд, справа) и нерегулярной динамикой численностей популяций сообщества (нижний ряд, центр) соответственно.

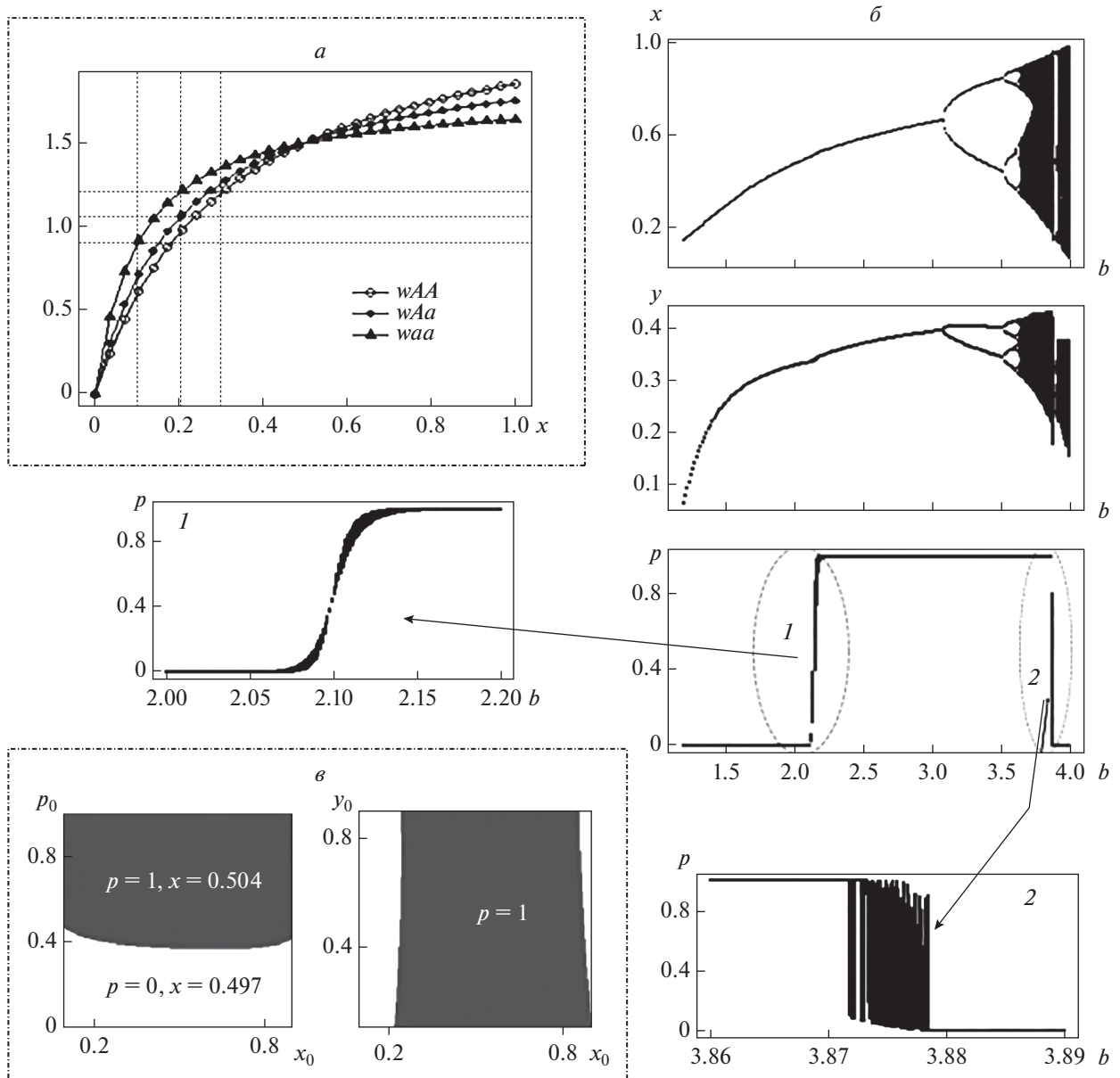


Рис. 4. Изменение типа естественного отбора. *a* – динамика приспособленностей генотипов при изменении численности жертвы в диапазоне $[0, 1]$. Значения параметров: $c_{AA} = 0.3$, $c_{Aa} = 0.2$, $c_{aa} = 0.1$, $r_{AA} = 2.4$, $r_{Aa} = 2.1$, $r_{aa} = 1.8$; *б* – бифуркационная диаграмма численности жертвы (x), хищника (y) и генетического состава хищника (p) с изменением репродуктивного потенциала жертвы (b) при фиксированных значениях параметров ($\alpha = 0.1$, остальные совпадают с фрагментом (*a*)) и начальных условиях: $x_0 = 0.4$, $y_0 = 0.1$, $p_0 = 0.1$; *в* – бассейны притяжения мономорфных равновесий модели при фиксированном значении параметра $b = 2.1$; $y_0 = 0.2$ (слева), $p_0 = 0.1$ (справа).

На бифуркационной диаграмме (рис. 4,б) пример эволюции сообщества в результате роста репродуктивного потенциала жертвы. Можно видеть, что при малых значениях бифуркационного параметра ($b < 2.1$) стационарная численность популяции жертвы оказывается небольшой ($\bar{x} < 0.5$) и у хищника устанавливается мономорфизм *aa*. Рост репродуктивного потенциала жертвы (b) сначала приводит к увеличению ее стационарной численности, что при переходе через значение

$\bar{x} = 0.5$ (при $b > 2.1$) сопровождается изменением направления отбора в популяции хищника, который в результате оказывается мономорфным уже по другому аллелю (*A*). Этот переход характеризуется наличием области бистабильности (участок 1 бифуркационной диаграммы рис. 4,б, при b в небольшой окрестности значения 2.1), где результат отбора в популяции хищника зависит от начальных значений как генетического состава, так и численностей популяций, составляющих сообщество.

щество. В области бистабильности происходит очень медленное вытеснение одного из аллелей (вплоть до 30000 поколений), поэтому на бифуркационной диаграмме можно видеть “след” переходного полиморфизма. Характерной чертой возникающей здесь бистабильности является то, что в каждом из мономорфных равновесий соответствующая гомозигота оказывается наиболее приспособленным генотипом из-за разницы в значениях стационарной численности жертвы (\bar{x}): $\bar{x}|_{p=0} < 0.5$ и $\bar{w}_{aa} > \bar{w}_{Aa} > \bar{w}_{AA}$, а $\bar{x}|_{p=1} > 0.5$ и ситуация меняется на обратную $\bar{w}_{aa} < \bar{w}_{Aa} < \bar{w}_{AA}$. Отметим, что оба мономорфных равновесия здесь устойчивы, но оптимальным по приспособленности является равновесие $p = 1$, которое оказывается недостижимо из-за значительной области начальных значений. Пример бассейнов притяжения двух генетически различных состояний при фиксированном значении $b = 2.1$ приведен на рис. 4, в. Дальнейшее увеличение репродуктивного потенциала жертвы приводит к росту стационарных значений x и установлению мономорфизма AA в популяции хищника, вне зависимости от начальных условий. Еще большее увеличение бифуркационного параметра сопровождается потерей устойчивости мономорфного равновесия и возникновением колебаний численности популяций сообщества, при этом значительное увеличение амплитуды колебаний численности жертвы в результате реализации сложных нерегулярных режимов ее динамики создает условия для поддержания полиморфизма у хищника (участок 2 бифуркационной диаграммы рис. 4, б, при b между 3.87 и 3.88). Хотя внешне этот участок напоминает область бистабильности 1 (рис. 4, в), это уже не переходящий полиморфизм и он сохраняется вне зависимости от начальных условий (рис. 5). При этом колебания генетического состава представляют собой сумму двух колебательных процессов: короткопериодические колебания с маленькой амплитудой и длиннопериодический тренд с большой амплитудой. В результате в течение нескольких десятков поколений можно видеть популяцию хищника, почти достигшую мономорфного состояния aa или AA , но окончательного вытеснения редкого аллеля не происходит, эволюционный процесс меняет направление и способствует накоплению редкого аллеля с закономерным вытеснением генетического конкурента, пока он не потеряет количественное преимущество, а далее процесс опять поменяет направление на противоположное. Причем накопление аллеля A (с большим репродуктивным потенциалом и соответственно большими требованиями к обилию пищи) в популяции хищника происходит значительно медленнее, чем его вы-

теснение (рис. 5). Характер динамики жертвы (и хищника) визуально отличается при накоплении и вытеснении этого аллеля. Так, в течение относительно короткого (около 150 поколений) времени вытеснения аллеля A наблюдаются колебания численности жертвы в виде зашумленного 3-цикла с большой амплитудой и резким падением ее численности; более длительный процесс накопления этого аллеля (A) происходит на фоне нерегулярных колебаний численности жертвы, причем низкие значения ее численности ($x < 0.5$) в среднем встречаются реже, чем один раз в три года.

Возвращаясь к нашему модельному примеру — сообществу “песец—мышевидные грызуны”, отметим, что именно такой необычный тип полиморфизма, по-видимому, может поддерживаться в естественных популяциях континентальных песцов, поскольку в отсутствие сверхдоминирования (при рецессивном типе наследования больших пометов) значительные колебания численности мышевидных грызунов интенсивно меняют условия естественного отбора у своего хищника и в результате ни один из имеющихся аллелей не исчезает. В свою очередь, неодинаковое давление хищника на популяцию жертвы в разных фазах динамики его генетического состава может влиять уже на характер динамики самой жертвы. И это влияние может быть одной из причин наблюдаемой смены динамического режима в природных популяциях грызунов, сообщения о которых неоднократно появлялись в печати (например, [58, 59]).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе предложена эколого-генетическая модель сообщества “хищник—жертва”, в которой приспособленность хищника определяется генетически одним диаллельным локусом. Предполагается, что различные генотипы хищника, отличаясь по репродуктивному потенциалу, неодинаково приспособлены и к ограничению по пищевым ресурсам, т.е. приспособленности не являются постоянными, а функционально зависят от численности жертвы. Модель представлена уравнениями с дискретным временем, что позволяет учитывать ярко выраженную цикличность жизненного цикла видов, составляющих сообщество.

При моделировании воспроизводится ситуация, характерная для естественного сообщества “песец—мышевидные грызуны”, в котором мышевидные грызуны, являясь основной пищей для континентальных популяций песцов и обладая циклической динамикой численности, значительно влияют на репродуктивный уровень хищ-

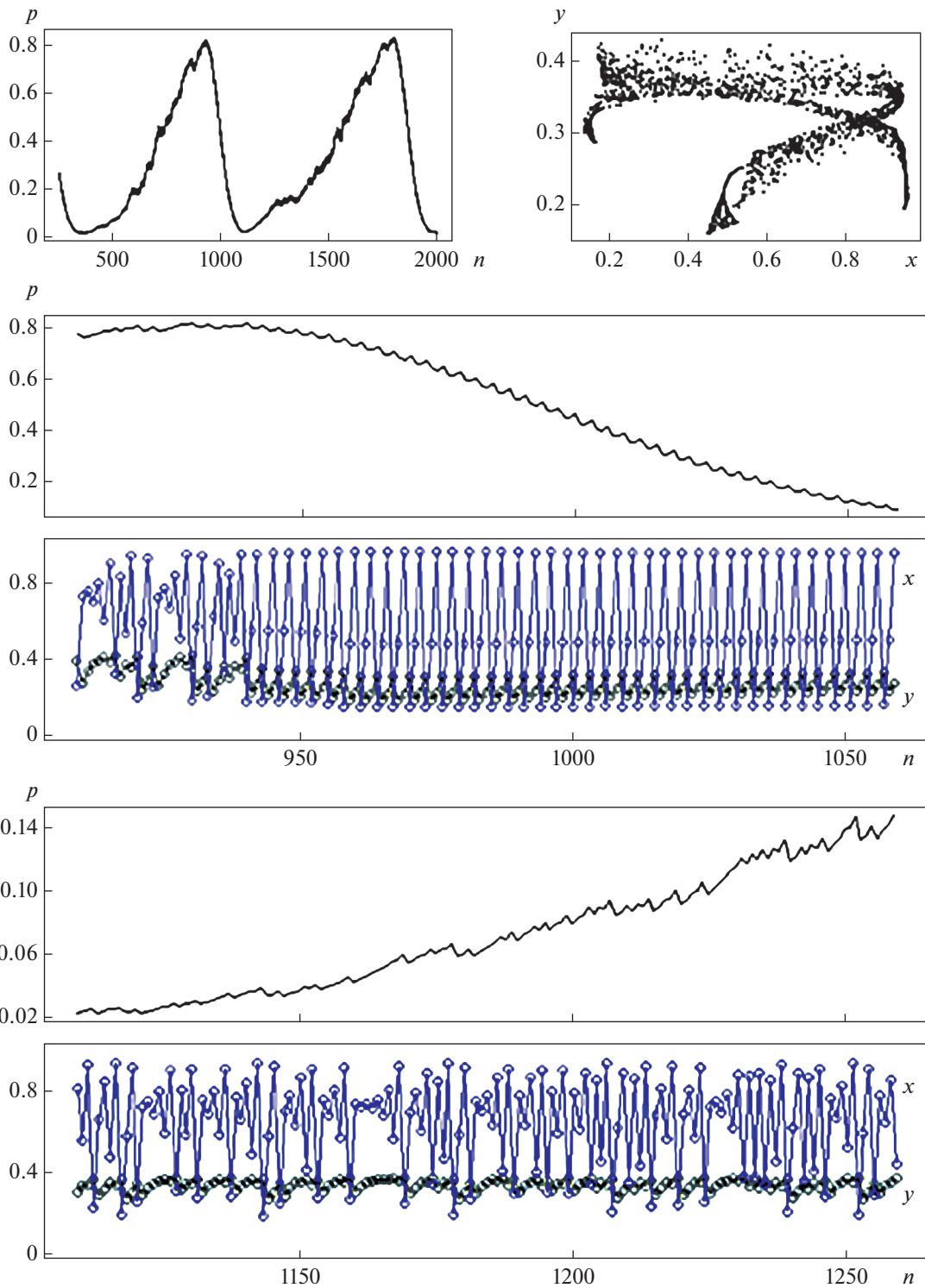


Рис. 5. Полиморфизм хищника и смена динамического режима в популяции жертвы. Значения параметров совпадают с рис. 4, $a. b = 3.876, x_0 = 0.1, y_0 = 0.2, p_0 = 0.31$.

ника. Причем эта важнейшая характеристика жизненного цикла песца определяется одним дигетерозиготным локусом.

Проведено аналитическое и численное исследование предложенной модели. Показано, что направление эволюции популяции, как и в классической модели отбора по одному локусу с постоянными приспособленностями генотипов, определяется взаимным расположением приспособленностей генотипов хищника, при этом характер динамики определяется уже набором параметров, характеризующих репродуктивные способности жертвы и хищника, а также характеристиками межвидового взаимодействия. То есть при повышенной приспособленности гетерозиготы устанавливается полиморфизм, при промежуточной под действием направленного отбора происходит планомерное вытеснение неоптимального генотипа, а в случае пониженной приспособленности гетерозиготы наблюдается бистабильность двух мономорфных равновесий, в каждом из которых может оказаться популяция, в зависимости от начальных условий. Причем при нестационарной динамике жертвы (что весьма характерно для естественных популяций) область бистабильности в генетически различных мономорфных состояниях хищника характеризуется различной динамикой популяций, составляющих сообщество. При этом бассейны притяжения мономорфных равновесий обладают фрактальной структурой (рис. 3,2), т.е. небольшое изменение численности хищника или жертвы за счет случайных факторов может привести к закреплению другого аллеля в популяции хищника и смене динамического режима численности сообщества.

Возможность нарушения реализации классических эволюционных сценариев (приведенных выше) связана с тем, что приспособленности генотипов зависят от текущей численности жертвы, которая может стабилизироваться в стационарном состоянии или флуктуировать, не достигая его и изменяя значения приспособленностей различных генотипов хищника. И если хищник неоднороден по плодовитости и приспособленности к ограничению пищевых ресурсов, то в разных фазах динамики жертвы меняется направление отбора в популяции хищника. Таким образом, флуктуации обилия жертвы порождают разнонаправленный естественный отбор у хищника, при котором взаимное расположение приспособленностей его генотипов меняется. Здесь появляются радикально различающиеся сценарии эволюции хищника, обусловленные различными репродуктивными способностями жертвы (рис. 4, 5). Отметим, что этот эффект возникает в естественной ситуации,

когда более плодовитые генотипы хищника более требовательны к обилию пищевых ресурсов (как у песцов). Так, при небольшом уровне воспроизводства в популяции жертвы происходит вытеснение гомозигот с большим репродуктивным потенциалом и требованиями к пищевым ресурсам, что приводит к установлению мономорфизма; при большем репродуктивном потенциале жертвы отбор идет уже против гомозигот, побеждавших в предыдущих условиях; а жертва с еще большей плодовитостью (приводящей к значительным флуктуациям ее популяционной численности) создает хищнику условия, в которых он сохраняет оба аллеля; для такого полиморфизма характерны долгие процессы вытеснения и накопления аллелей, не приводящие к полной потере ни одного из них, и значительно отличающаяся визуально динамика численности в разных фазах этого процесса, что может распознаваться наблюдателем как смена динамического режима в популяции любого из видов сообщества. При этом приспособленность гетерозиготы занимает промежуточное положение, т.е. при больших и малых численностях жертвы максимальными являются приспособленности противоположных гомозигот, и в рамках классической теории естественного отбора установление полиморфизма при таких условиях было бы невозможно.

Отметим, что подобный флуктуирующий полиморфизм может существовать в естественных популяциях континентальных песцов, поскольку в отсутствие сверхдоминирования (из-за рецессивного типа наследования пометов большого размера у песца) значительные колебания численности мышевидных грызунов, являющихся их основным пищевым ресурсом, интенсивно меняют условия естественного отбора для своего хищника и в результате ни один из имеющихся аллелей не исчезает. В свою очередь, неодинаковое давление хищника на популяцию жертвы в разных фазах динамики его генетического состава может влиять уже на характер динамики самой жертвы. И это влияние может быть одной из причин наблюдаемой смены динамического режима в природных популяциях грызунов, сообщения о которых неоднократно появлялись в печати, например изменение цикла в популяциях лемминга *Lemmus lemmus* на юге Норвегии [59] и красно-серой полевки *Clethrionomys rufocanus*, обитающей в Финляндии [58].

Работа выполнена в рамках государственных заданий Института автоматики и процессов управления ДВО РАН, Института комплексного анализа региональных проблем ДВО РАН.

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

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lotka A.J.* Elements of Physical Biology. Baltimore: Williams and Wilkins, 1925. 460 p.
2. *Volterra V.* Leçons sur la théorie mathématique de la lutte pour la vie. Paris: Gauthiers–Villars, 1931. 214 p.
3. *Базыкин А.Д.* Математическая биофизика взаимодействующих популяций. М.: Наука, 1985. 181 с.
4. *Базыкин А.Д.* Нелинейная динамика взаимодействующих популяций. М.; Ижевск: Ин-т компьютерных исследований, 2003. 368 с.
5. *Kingsland S.E.* Modeling Nature: Episodes in the History of Population Ecology. 2nd ed. Chicago: Univ. Chicago Press, 1995. 306 p.
6. *Kingsland S.* Alfred J. Lotka and the origins of theoretical population ecology // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2015. V. 112. №. 31. P. 9493–9495.
7. *Фрисман Е.Я., Кулаков М.П., Ревуцкая О.Л. и др.* Основные направления и обзор современного состояния исследований динамики структурированных и взаимодействующих популяций // Компьютерные исследования и моделирование. 2019. Т. 11. № 1. С. 119–151.
8. *Morozov A.* Mathematical modelling in theoretical ecology: introduction to the special issue // Mathem. Modelling of Natural Phenomena. 2013. V. 8. № 6. P. 1–4.
9. *Malthus T.R.* An Essay on the Principle of Population. London, UK: J. Johnson, 1798. 432 p.
10. *Verhulst P.F.* Notice sur la loi que la population suit dans son accroissement // Corresp. Math. Phys. 1838. V. 10. P. 113–126.
11. *Kostitzin V.A.* Biologie mathématique. Paris: Librairie Armand Colin, 1937. 223 p.
12. *Pimentel D.* Animal population regulation by the genetic feed-back mechanism // American Naturalist. 1961. V. 95. P. 65–79.
13. *Pimentel D.* Population regulation and genetic feedback // Science. 1968. V. 159. P. 1432–1437.
14. *Levin S.A., Udovic J.D.* A mathematical model of coevolving populations // Am. Naturalist. 1977. V. 111. P. 657–675.
15. *Schaffer W.M., Rosenzweig M.L.* Homage to the Red Queen. I. Coevolution of predators and their victims // Theor. Popul. Biol. 1978. V. 14. P. 135–157.
16. *Fischer R.A.* The Genetical Theory of Natural Selection. Oxford: Clarendon Press, 1930. 360 p.
17. *Haldane J.B.S., Jayakar S.D.* Polymorphism due to selection of varying direction // J. Genetics. 1963. V. 58. № 2. P. 237–242.
18. *Wright S.* Evolution in Mendelian populations // Genetics. 1930. V. 16. P. 97–159.
19. *Carroll S.P., Hendry A.P., Reznick D.N., Fox C.W.* Evolution on ecological time-scales // Func. Ecol. 2007. V. 21. № 3. P. 387–393.
20. *Fussmann G.F., Loreau M., Abrams P.A.* Eco-evolutionary dynamics of communities and ecosystems // Functional Ecology. 2007. V. 21. № 3. P. 465–477.
21. *Yamamichi M.* Effects of rapid evolution on population cycles and extinction in predator–prey systems // Diversity of Functional Traits and Interactions. Theoretical Biology / Eds Mougi A. Singapore: Springer, 2020. https://doi.org/10.1007/978-981-15-7953-0_2
22. *Thompson J.N.* Rapid evolution as an ecological process // Trends Ecol. Evol. 1998. V. 13. P. 329–332.
23. *Duffy M.A., Sivars-Becker L.* Rapid evolution and ecological host-parasite dynamics // Ecol. Lett. 2007. V. 10. P. 44–53.
24. *Ellner S.P., Geber M.A., Hairston N.G.* Does rapid evolution matter? Measuring the rate of contemporary evolution and its impacts on ecological dynamics // Ecol. Lett. 2011. V. 14. P. 603–614.
25. *Yoshida T., Jones L.E., Ellner S.P. et al.* Rapid evolution drives ecological dynamics in a predator-prey system // Nature. 2003. V. 424. P. 303–306.
26. *Гунзбург Э.Х.* Описание наследования количественных признаков. Новосибирск: Наука, 1984. 250 с.
27. *Abrams P.A., Matsuda H.* Prey adaptation as a cause of predator-prey cycles // Evolution. 1997. V. 51. № 6. P. 1742–1750.
28. *Morozov A. Yu., Pasternak A.F., Arashkevich E.G.* Revisiting the role of individual variability in population persistence and stability // PLoS One. 2013. V. 8. № 8. e70576. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070576>
29. *Farkas J.Z., Morozov A.Y.* Modelling effects of rapid evolution on persistence and stability in structured predator–prey systems // Mathem. Modelling of Natural Phenomena. 2014. V. 9. № 3. P. 26–46.
30. *Cortez M.H., Weitz J.S.* Coevolution can reverse predator–prey cycles // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2014. V. 111. № 20. P. 7486–7491.
31. *Букин Ю.С.* Процессы коэволюции в системе “хищник–жертва”. Эколого-генетическая модель // Вавил. журн. генетики и селекции. 2015. Т. 18. № 2. С. 320–328.
32. *Mougi A.* Rapid evolution of prey maintains predator diversity // PLoS One. 2019. V. 14. № 12. e0227111. <https://doi.org/10.1371/journal>
33. *Venturino E.* An ecogenetic model // Appl. Math. Lett. 2012. V. 25. P. 1230–1233.

34. *Viberti C., Venturino E.* An ecosystem with HTII response and predators' genetic variability // *Math. Model. Anal.* 2014. V. 19. P. 371–394.
35. *Rahman M.D.* Modelling of an eco-genetic system: A mathematical model // *Int. J. Ecol. Econ. Stat.* 2016. V. 37. P. 102–119.
36. *Castellino L., Peretti S., Rivoira S., Venturino E.* A mathematical ecogenetic predator-prey model where both populations are genetically distinguishable // *AIP Conf. Proc.* 2016. V. 1776. 020006.
37. *Azzali I., Marcaccio G., Turrisi R., Venturino E.* A genetically distinguishable competition model // *Modern Mathematical Methods and High Performance Computing in Science and Technology / Eds Singh V. et al.* Singapore: Springer. 2016. V. 171. P. 129–140.
38. *Wang L., Zhao J.* A predator-prey model with genetic differentiation both in the predator and prey // *Mathem. Biosciences and Engineering.* 2020. V. 17. № 3. P. 2616–2635.
39. *Tyutyunov Yu., Zhadanovskaya E., Bourguet D., Arditi R.* Landscape refuges delay resistance of the European corn borer to Bt-maize: A demogenetic dynamic model // *Theoret. Population Biology.* 2008. V. 74. № 1. P. 138–146.
40. *Tyutyunov Y.V., Kovalev O.V., Titova L.I.* Spatial demogenetic model for studying phenomena observed upon introduction of the ragweed leaf beetle in the South of Russia // *Mathem. Modelling of Natural Phenomena.* 2013. V. 8. № 6. P. 80–95.
41. *Тимова Л.И., Тютюнов Ю.В., Ковалёв О.В.* Демогенетическая модель естественного отбора признаков, определяющих подвижность животных // Математическое моделирование в экологии: Материалы Пятой Национальной науч. конф. с межд. участием. Пушино. 2017. С. 223–224.
42. *Axenovich T.I., Zorkoltseva I.V., Akberdin I.R. et al.* Inheritance of litter size at birth in farmed arctic foxes (*Alopex lagopus*, Canidae, Carnivora) // *Heredity.* 2007. V. 98. P. 99–105.
43. *Володин И.А., Калашикова М.В., Клишкова Е.С. и др.* Структура поселения песца *Alopex lagopus beringensis* на северной оконечности острова Беринга // *Зоол. журн.* 2012. Т. 91. № 10. С. 1231–1236.
44. *Hersteinsson P., Macdonald D.W.* Diet of Arctic foxes (*Alopex lagopus*) in Iceland // *J. Zool.* 1996. V. 240. P. 457–474.
45. *Angerbjörn A., Tannerfeldt M., Erlinge S.* Predator-prey relationships: Arctic foxes and lemmings // *J. Anim. Ecol.* 1999. V. 68. P. 34–49.
46. *Tannerfeldt M., Angerbjörn A.* Fluctuating resources and the evolution of litter size in the arctic fox // *Oikos.* 1998. V. 83. P. 545–559.
47. *Tannerfeldt M., Angerbjörn A.* Life history strategies in a fluctuating environment: establishment and reproductive success in the arctic fox // *Ecography.* 1998. V. 19. P. 209–220.
48. *Elmhagen B., Tannerfeldt M., Verucci P., Angerbjörn A.* The arctic fox (*Alopex lagopus*) – an opportunistic specialist // *J. Zool.* 2000. V. 251. P. 139–149.
49. *Жданова О.Л., Фрисман Е.Я.* Математическое моделирование механизма дифференциации репродуктивных стратегий в естественных популяциях (на примере песцов, *Alopex lagopus*) // Компьютерные исследования и моделирование. 2016. Т. 8. № 2. С. 213–228.
50. *Жданова О.Л., Фрисман Е.Я.* Математическое моделирование отбора по ограниченному полом признаку: к вопросу о существовании полиморфизма по размеру помета в естественных популяциях песцов // *Генетика.* 2021. Т. 57. № 2. С. 229–240. <https://doi.org/10.31857/S0016675821020156>
51. *Zhdanova O.L., Frisman E.Ya.* Genetic polymorphism under cyclical selection in long-lived species: the complex effect of age structure and maternal selection // *J. Theoret. Biology.* 2021. V. 512. 110564. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2020.110564>
52. *Фрисман Е.Я., Жданова О.Л., Неверова Г.П.* Эколого-генетические модели в популяционной биофизике // *Биофизика.* 2020. Т. 65. № 5. С. 949–966. <https://doi.org/10.31857/S0006302920050130>
53. *Charlesworth B.* Selection in density-regulated populations // *Ecology.* 1971. V. 52. P. 469–474.
54. *Rougharden J.* Density dependent natural selection // *Ecology.* 1971. V. 52. P. 453–468.
55. *Неверова Г.П., Жданова О.Л., Абакумов А.И.* Дискретная модель сезонного цветения планктона // *Математ. биология и биоинформатика.* 2020. № 2. С. 235–250. <https://doi.org/10.17537/2020.15.235>
56. *Жданова О.Л., Фрисман Е.Я.* Проявление мультирежимности в простейшей эколого-генетической модели эволюции популяций // *Генетика.* 2016. Т. 52. № 8. С. 975–984.
57. *Zhdanova O.L., Frisman E.Ya.* Alternative attractors in an ecological-genetic model of populations with non-overlapping generations // *Ecol. Complexity.* 2017. V. 31. P. 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.ecocom.2017.06.009>
58. *Henttonen H., Wallgren H.* Small rodent dynamics and communities in the birch forest zone of northern Fennoscandia // *Nordic Mountain Birch Ecosystems / Ed. Wielgolaski F.E.* N.Y.: Parthenon, 2001. P. 262–278.
59. *Kausrud K.L., Mysterud A., Steen H. et al.* Linking climate change to lemming cycles // *Nature.* 2008. V. 456. P. 93–97.

Predator Evolution in a Model of Interacting Species: To the Question about Maintaining Polymorphism by Litter Size in Natural Populations of Arctic Fox

O. L. Zhdanova^{a, *}, G. P. Neverova^a, and E. Ya. Frisman^b

^a *Institute for Automation and Control Processes, Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690041 Russia*

^b *Complex Analysis and Regional Problems Institute, Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences, Birobidzhan, 679016 Russia*

*e-mail: axanka@iacp.dvo.ru

We propose an eco-genetic model of “prey-predator” community with predator fitness determined genetically by a single autosomal diallelic pleiotropic locus in the case of diploid population. Predator genotypes with different reproductive potential are unequally adapted to food resource limitation; therefore, the fitness of a predator’s genotype is determined by not only its own genotype, but also the prey abundance. We use discrete-time equations for modeling, which allows considering features of the community species’ lifecycle. The paper extends our previous studies modeling evolution of a local population to explain existing genetic diversity by litter size in various (natural and artificial) populations of Arctic foxes (*Alopex lagopus*). Explicit inclusion of prey population dynamics in the model of community allows to analyze maintenance of polymorphism in arctic fox populations under more realistic conditions. Similar to simpler models, evolution direction of predator population is shown by the study to be generally determined by the mutual arrangement of its genotype fitnesses, while a parameter set characterizing birth rates of the prey and the predator, as well as the characteristics of interspecific interaction, determine the dynamic mode of interacting species abundances. At the same time, even without overdominance a predator can maintain a stable polymorphism due to fluctuations in the abundance of prey with large amplitude changing the natural selection direction in the predator population. In addition, evolution of dynamics of the predator genetic composition can change the dynamic mode of the prey abundance.

Keywords: evolution, natural selection, community dynamics, prey–predator, theoretical population genetics, polymorphism.

МАРКЕРЫ ХЛОРОПЛАСТНОЙ ДНК ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ РЕДКИХ ВИДОВ РОДОДЕНДРОНОВ ВОСТОЧНОЙ АЗИИ

© 2022 г. М. А. Полежаева¹, Д. Р. Юнусова^{1, *}, Н. А. Тихонова²,
А. Н. Полежаев³, М. Н. Колдаева⁴

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

²Институт леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения Российской академии наук, Красноярск, 660036 Россия

³Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Магадан, 685000 Россия

⁴Ботанический сад-институт Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, 690024 Россия

*e-mail: dianaiyunusova@mail.ru

Поступила в редакцию 02.04.2021 г.

После доработки 27.05.2021 г.

Принята к публикации 28.05.2021 г.

Проведен анализ изменчивости двух фрагментов хлоропластной ДНК (*trnH-psbA*, TabCD) в шести выборках *Rhododendron adamsii* с территории Магаданской обл., о. Сахалина, Якутии, Бурятии, Западного Саяна и в двух выборках *Rhododendron parvifolium* из Хабаровского края и Бурятии. Выявлено шесть гаплотипов: у *R. parvifolium* изменчивость отсутствует, присутствует один специфический гаплотип; у *R. adamsii* распространение гаплотипов структурировано географически – образцы из Бурятии образуют гомогенный кластер, в дальневосточной части ареала выявлен полиморфизм. Анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) в пределах *R. adamsii* показал, что около 98% генетического разнообразия приходится на межпопуляционные различия ($F_{ST} = 0.98$, $p < 0.001$). Проведено сравнение с близкородственными видами по последовательностям из Генбанка. Данные фрагменты можно рекомендовать для видовой идентификации и изучения популяционной структуры краснокнижного вида *R. adamsii*.

Ключевые слова: генетическая изменчивость, популяционная структура, хпДНК, *Rhododendron adamsii*, *Rhododendron parvifolium*, *trnH-psbA*, TabCD.

DOI: 10.31857/S0016675822010088

Динамика состава растительных сообществ и ареалов отдельных видов растений обусловлена различными факторами, включающими хозяйственную деятельность человека, климатические флуктуации, специфические требования видов к условиям местообитаний. Все это отражается на генетическом разнообразии популяций – основе их эволюционного потенциала и устойчивости. Таким образом, эффективные стратегии оценки биологического разнообразия и сохранения редких видов должны основываться на знаниях об их генетической структуре. Особенно это актуально в отношении лекарственных растений. Даже будучи внесенными в реестр Красной книги, они оказываются под угрозой снижения численности из-за бессистемной заготовки сырья. Разработка видоспецифичных генетических маркеров – инструмент, позволяющий не только идентифици-

ровать растение, определить место сбора редкого вида в случае незаконной заготовки, но и изучить его генетическую структуру на всем ареале.

Rhododendron adamsii Rehd. – низкорослый вечнозеленый кустарник, образующий заросли в альпийском и субальпийском поясах на высоте 1200–2500 м над уровнем моря в горах Восточной Сибири и Дальнего Востока, а также Монголии [1]. Вид занесен в красные книги во всех регионах произрастания [2]. Это растение широко используется в индо-тибетской, монгольской и бурятской медицине. В настоящее время *R. adamsii* не включен в официальный список фармакопейных растений России, однако вид считается перспективным для внедрения в медицинскую практику и активно исследуется с биохимической точки зрения [3–5]. Неконтролируемый сбор в качестве пищевого и лекарственного сырья, приуроченность

к особым условиям произрастания (факультативная кальцефилия) и медленный рост [1] – все это ставит под угрозу существование некоторых популяций вида. Особенный антропогенный пресс оказывается в прибайкальских районах, где заготовки осуществляются в коммерческих целях.

Морфологической изменчивости вида посвящено мало работ [3, 6], а популяционно-генетические исследования вовсе не проводились. Очевидно, что необходима разработка маркеров для целей природоохранного мониторинга, а также позволяющих эффективно проводить идентификацию сырья: отличать его от близкородственного схожего морфологически вида *R. parvifolium*, с которым он нередко сосуществует в одних местообитаниях и даже образует гибриды ($\times R. burjaticum$) [1, 7]. Кроме практического применения, знания о генетической структуре вида представляют фундаментальный интерес, направленный на выявление центральноазиатских флористических связей высокогорной флоры Восточной Сибири. Близкородственные виды *R. adamsii* произрастают в Гималаях (*R. anthopogon* D. Don), Афганистане (*R. colletianum* Aith. Et Hemsl.), в Центральном Китае (*R. anthopogonoides* Maxim., *R. cephalanthum* Franch.) [1].

Цель настоящей работы – изучение уровня генетического разнообразия и популяционно-генетической структуры *R. adamsii*, а также выявление маркера, пригодного для идентификации сырья.

Проанализировано 50 растений рододендрона Адамса из природных популяций с территории Западного Саяна, Бурятии, Якутии, Магаданской обл. и о. Сахалин, а также 23 растения рододендрона мелколистного из Бурятии и Хабаровского края (табл. 1). ДНК выделяли по стандартному протоколу для растительных тканей (СТАВ-метод) [8] из высушенных в силикагеле листьев. Выборка из Магаданской обл. выделена из гербарных образцов ИБПС ДВО РАН (индекс гербария МАГ, номера: 0009893, 0009891, 0009902, 0009897, 0009898, 0009909, 0009903, 0009904, 0009905, 009910, 0009915, 0009920). На первом этапе на нескольких образцах была проведена амплификация с универсальными праймерами для девяти маркерных хлоропластных фрагментов. Согласно протоколу и температурному профилю ПЦР, рекомендованными авторами, проведена амплификация части фрагментов *trnK-matK* [9] и *psbC-trnS* [10]; трех участков *trnT-trnF* (TabAB, TabCD, TabEF) [11]; *trnF-TrnV* [12]; *trnH-psbA*, *trnS-trnG* [13] и *atpH-atpI* [14]. Для фрагментов со стабильной амплификацией методом прямого секвенирования на генетическом анализаторе ABI 3130 (Applied Biosystems, USA) были определены последовательности и выявлены варибельные сай-

ты. Для анализа всего материала были отобраны маркерные фрагменты, в которых обнаружено больше трех варибельных сайтов: *trnH-psbA* и TabCD. Выравнивание последовательностей проводили вручную в программе BioEdit [15]. Расчет уровня дифференциации и распределения генетической изменчивости внутри и между популяциями (анализ молекулярной дисперсии, AMOVA) проводили в программе Arlequin v. 3.5.1.2 [16]. Дерево отношений гаплотипов хпДНК построено в программе Network v. 4.6.1.2 [17]. Каждая мутация (моноклеотидная замена или индел, независимо от размера), кодировалась как единичное мутационное событие. Филогенетическое дерево для всех образцов построено с использованием байесовского анализа в программе MrBayes v. 3.1.2 [18] на основе модели нуклеотидных замен GTR + G + I. При построении деревьев включены данные из генбанка для близкородственных видов: по фрагменту *trnH-psbA* для *R. anthopogon* (номера в Генбанке – KM605665.1, KM605664.1, KM605663.1) и *R. cephalantum* (номера в Генбанке – JN046777.1, JN046776.1, KM605536.1, JN046775.1); по фрагменту TabCD для *R. lapponicum* (номера в Генбанке – GQ245396.1, DQ860601.1). В качестве внешней группы использовали образец подрода *Terorhodion* – *Rhododendron camtschaticum*.

Длина объединенной последовательности по двум фрагментам составила 755 пн (TabCD 1–387; *trnH-psbA* 388–755). Выявлено десять варибельных сайтов (табл. 2), из них во фрагменте TabCD – три замены и два микросателлита во фрагменте; *trnH-psbA* – четыре моноклеотидных замены и один индел; изменчивость сгруппировалась в шесть гаплотипов (h1–h6). Последовательности фрагментов для каждого гаплотипа размещены в Генбанк (GenBank) под номерами доступа MW888399–MW888409. Образцы из Генбанка закодированы как гаплотип h8 для *R. lapponicum* и h9–h11 для *R. cephalantum* и *R. anthopogon*.

Распределение гаплотипов в изученных образцах отображено на рис. 1, б. В выборках *R. parvifolium* присутствует один видоспецифичный гаплотип h6. У *R. adamsii* обнаружено пять гаплотипов, причем их распределение структурировано географически. Гаплотип h1 распространен на востоке ареала – в выборках из Магаданской обл. и Якутии. Здесь также выявлены редкие гаплотипы h2 и h3. В выборке из центральной части Сахалина фиксирован гаплотип h4. Гаплотип h5 фиксирован в западной части ареала на территории Бурятии. Для родственных реконструкций изученные образцы были сгруппированы с образцами из Генбанка. Медианная сеть генеалогических связей между гаплотипами (рис. 1, а) выявила две гаплогруппы, соответствующие двум секциям, к которым относятся изученные виды: *R. parvifolium* и

Таблица 1. Географические координаты мест сбора и выявленные гаплотипы хпДНК в изученных выборках *R. adamsii* и *R. parvifolium*

	Популяции	Коорд., с.ш./в.д.	Число особей	Гаплотип (N)
1	<i>R. adamsii</i> . Магаданская обл. (образцы из гербария с индексом МАГ)	—	12	h1 (11) h3 (1)
2	<i>R. adamsii</i> . Сахалинская обл., Смирныховский р-н, гора Вайда	49°52'/143°27'	10	h4 (10)
3	<i>R. adamsii</i> . Респ. Саха (Якутия), Усть-Майский р-н, пос. Усть-Юдома, гора Иченэ	59°24'/135°06'	9	h1 (8) h2 (1)
4	<i>R. adamsii</i> . Бурятия, Тункинский р-н, окр. пос. Аршан	51°55'/102°24'	4	h5 (4)
5	<i>R. adamsii</i> . Бурятия, Тункинский р-н, окр. пос. Монды	51°44'/101°04'	9	h5 (9)
6	<i>R. adamsii</i> . Красноярский край, Ермаковский р-н, гора Тушканчик (Западный Саян)	52°49'/93°23'	6	h5 (6)
7	<i>R. parvifolium</i> . Хабаровский край, Нанайский р-н, южный склон Тордоки-Яни	48°52'/138°02'	11	h6 (11)
8	<i>R. parvifolium</i> . Бурятия, Тункинский р-н, окр. пос. Монды	51°44'/101°04'	12	h6 (12)

Примечание. а – GAAAGGTATATAAATG.

Таблица 2. Сегрегирующие сайты для семи гаплотипов хпДНК. Референсный гаплотип h1

Гаплотип	Позиция нуклеотида									
	trnL-trnF (TabCD)					trnH-psbA				
	54	68	80	151	258	515	548	542–557	622	702
h1	T	A	A	C	—	A	T	—	T	T
h2	T	A	A	C	—	A	G	—	T	T
h3	G	—	A	C	—	A	G	—	T	T
h4	T	A	A	C	—	A	T	—	T	C
h5	G	—	A	C	T	A	G	—	T	T
h6	T	—	G	T	—	C	—	a	A	T

R. lapponicum (h6, h8) к секции *Rhododendron*; *R. adamsii*, *R. anthopogon*, *R. cephalantum* (h1–h5, h9–h11) к секции *Pogonanthum* [19]. На филогенетическом древе, построенном байесовским методом (рис. 1,б), образцы разных популяций сгруппированы в соответствии с секционной таксономической принадлежностью с высокой статистической поддержкой (PP -value = 1.00). В пределах клады секции *Pogonanthum*, подклады выделены с меньшими поддержками (PP -value = 0.72–0.93), однако с четкой структурой по регионам в пределах *R. adamsii*. По результатам AMOVA коэффициент дифференциации между выборками двух видов – *R. parvifolium* и *R. adamsii*, составил $F_{ST} = 0.985$, ($P < 0.0001$); между выборками в пределах *R. ad-*

amsii $F_{ST} = 0.923$ ($P < 0.0001$), еще выше с учетом родства гаплотипов, $F_{ST} = 0.961$ ($P < 0.0001$).

Таким образом, дифференциация по данным изменчивости хпДНК соответствует двум описанным видам. Отметим, что ранее для *R. parvifolium* и *R. adamsii* были определены идентичные последовательности по ядерному маркеру ITS (internal transcribed spacer) [20], который широко используется для видовой идентификации. Используемые нами маркеры хлоропластной ДНК показали большую эффективность. Любой из фрагментов может быть успешно применен на практике для определения вида – *R. parvifolium* или *R. adamsii* – методом ПЦР-диагностики. Хотя эти виды имеют отчетливые морфологические признаки (наиболее яркий из которых – соцвет-

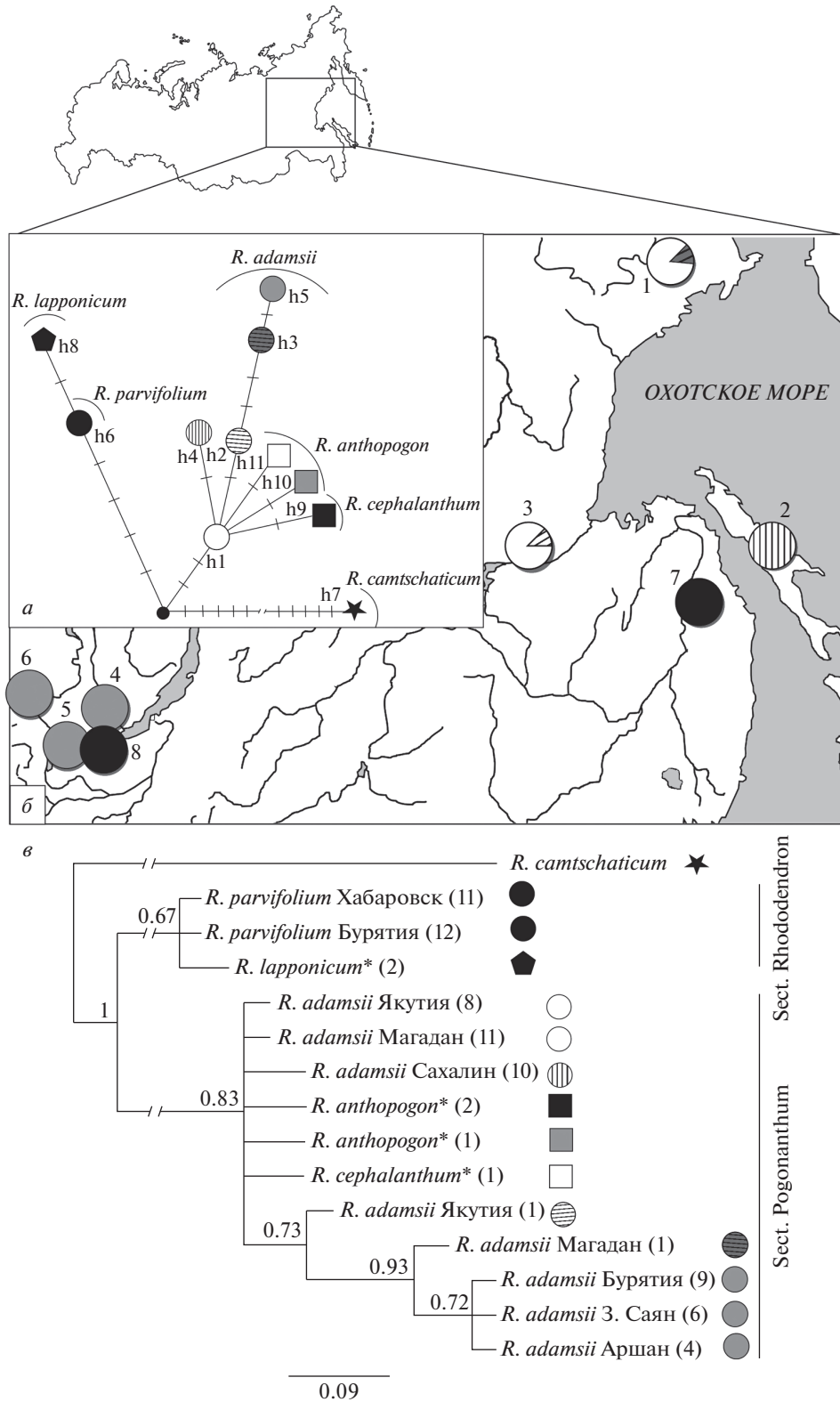


Рис. 1. а – местоположение изученных выборок, распределение обнаруженных гаплотипов хлДНК. б – дерево гаплотипов хлДНК (h1–h11). Поперечные штрихи на ветвях дерева – мутационные события. Гаплотип h7 составлен по последовательностям соответствующих межгенных спейсеров для образца внешней группы *R. camtschaticum*; гаплотипы h8–h11 – по данным из Генбанка для видов *R. lapponicum*, *R. anthopogon*, *R. cephalanthum*. в – филогенетическое дерево изученных образцов. (*) отмечены образцы, последовательности для которых взяты из Генбанка, в скобках указано количество особей, у которых встретился данный гаплотип.

тия) — из 5–10 воронковидно-колокольчатых цветков с ярко выраженной трубчатой частью у *R. adamsii* и из 2–5 широко-колокольчатых цветков у *R. parvifolium* — окрас венчика у обоих видов варьирует от белого до розового и, в целом, они имеют схожий облик [1, 3, 21, 22]. Морфологическая схожесть, способность к скрещиванию, а также генетическая близость по ITS-маркеру ставила под сомнение даже правомерность разнесение данных видов по разным подсекциям [23]. При видовой идентификации в отсутствии генеративных органов, как например высушенных листьев, представляющих пищевое сырье, или в гербарии без цветов, их часто можно спутать. Так, известна работа по определению подлинности сырья на основе анатомических признаков листьев и гистохимической реакции на локализацию действующих веществ [3]. Диагностика с помощью генетического маркера — наиболее простое и оптимальное решение проблемы видового определения.

Использование обоих фрагментов позволяет с большой вероятностью уточнить район произрастания *R. adamsii*. По нашим данным популяционно-генетическая структура этого вида представляет два кластера (рис. 1): мономорфный западный и более разнообразный восточный. Различия между западной и восточной частями ареала также наблюдаются по данным морфологической изменчивости. Линейные параметры листовых пластинок и черешков у тувинской популяции (западная часть ареала) отличались низким уровнем изменчивости по сравнению с якутской популяцией (восточная часть ареала), образцы из этих популяций имели четкое разделение не только по линейным размерам листа, но и по окраске венчика [21].

Особого обсуждения заслуживает сравнение изученных нами видов с близкородственными видами по данным из Генбанка. *R. parvifolium* и *R. lapponicum* часто указываются в качестве синонимов [1, 24]. Эти виды слабо различимы морфологически и, скорее, выделяются исключительно за счет географической отдаленности. В широком смысле рододендрон мелколистный имеет обширный ареал, захватывающий кроме Сибири и Дальнего Востока, Скандинавию, Гренландию и Северную Америку [24]. Очевидно, что на таком обширном ареале он вряд ли будет однородным, и вопрос о его генетической структуре и таксономическом делении остается открытым. В нашем исследовании не было выявлено различий между выборками из Бурятии и Хабаровского края, два образца из Генбанка происходящие из Норвегии, также не отличались между собой, но отличались от наших образцов на одну мутацию во фрагменте TabCD.

За схожую морфологию образцы *R. adamsii* из Сибири были изначально отнесены к виду *R. anthopogon*, произрастающему в Гималаях, что позже было признано ошибочным [26]. Сравнение наших образцов с несколькими последовательно взятыми *trnH-psbA* двух близкородственных видов — *R. anthopogon* и *R. cephalantum* — указывает на их тесное родство. Ранее сравнение этих видов генетическими маркерами не проводилось. В нашем древе (рис. 1, в) они образуют ветви с поддержками на уровне внутривидовой изменчивости. С одной стороны, это может быть связано с неравномерными выборками, так как даже если несколько образцов из Генбанка имеют разные гаплотипы, то сравнение полноразмерных выборок с большой вероятностью позволило бы выявить более четкую структуру. Другая причина может быть в том, что данный тип маркера обладает недостаточной разрешающей способностью именно в пределах секции Pogonanthum.

Полученные молекулярно-генетические данные могут быть использованы для разработки программ мониторинга и сохранения этих редких видов, а также для разработки мероприятий по рациональному природопользованию. Фрагменты хлоропластной ДНК *trnH-psbA*, TabCD подходят для различения видов *R. adamsii* и *R. parvifolium* в случае, когда это затруднительно сделать по морфологическим признакам. Для выявления наиболее четкой генетической структуры в пределах западной части ареала *R. adamsii*, где выражен антропогенный пресс, необходимы дальнейшие исследования с применением мультилокусного генетического анализа. Подтверждено родство *R. adamsii* другими видами (*R. anthopogon* и *R. cephalantum*) секции Pogonanthum.

Авторы выражают благодарность Н.К. Бадмаевой, Т.А. Поляковой, А.П. Ефимовой, Е.А. Мудрик, И.В. Фролову за помощь по сбору образцов для исследования, а также М.Г. Хоревой за помощь в работе с гербарием ИБПС ДВО РАН (MAG).

Работа (сбор образцов) выполнена в рамках государственного задания Института экологии растений и животных УрО РАН, проведение молекулярно-генетического анализа поддержано грантом РФФИ № 20-04-00417.

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. *Александрова М.С.* Рододендроны природной флоры СССР. М.: Наука, 1975. 112 с.
2. Плантариум: открытый онлайн атлас-определитель растений и лишайников России и сопредельных стран. 2007–2021. <https://www.plantarium.ru/page/view/item/31845.html>
3. *Мирович В.М., Левента А.И., Федосеева Г.М., Усов Л.А.* К морфолого-анатомическому изучению рододендрона Адамса – перспективного растения Восточной Сибири // Сибир. мед. журн. 1997. № 4. С. 34–37.
4. *Мирович В.М.* Изучение химического состава надземных органов рододендрона Адамса методом ВЭЖХ // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. 2005. № 7. С. 164–167.
5. *Razgonova M., Zakharenko A., Ercisli S. et al.* Comparative analysis of Far East Sikhotinsky rhododendron (*Rh. sichotense*) and East Siberian rhododendron (*Rh. adamsii*) using supercritical CO₂-extraction and HPLC-ESI-MS/MS spectrometry // *Molecules*. 2020. V. 25(17). P. 3774. <https://doi.org/10.3390/molecules25173774>
6. *Каракулов А.В.* Межпопуляционная изменчивость морфологических признаков у *Rhododendron adamsii* Rehd. (Ericaceae DC) // Мат. VIII междунар. форума “Охрана и рациональное использование лесных ресурсов”. Благовещенск: ДГАУ, 2015. С. 71–74.
7. *Мальшиев Л.И.* О новых и редких видах с Восточного Саяна // Ботанические материалы гербария ботанического ин-та АН СССР. Т. 21. М.-Л.: АН СССР, 1961. С. 451–467.
8. *Devey M.E., Bell J.C., Smith D.N. et al.* A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD and microsatellite markers // *Theor. Appl. Genet.* 1996. V. 92. P. 673–679. <https://doi.org/10.1007/BF00226088>
9. *Johnson L.A., Soltis D.E.* Phylogenetic inference in Saxifragaceae sensu stricto and *Gilia* (Polemoniaceae) using matK sequences // *Ann. Mol. Bot. Gard.* 1995. V. 82. P. 149–175. <https://doi.org/10.2307/2399875>
10. *Demesure B., Sodzi N., Petit R.J.* A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants // *Mol. Ecol.* 1995. V. 4. P. 129–134. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1995.tb00201.x>
11. *Taberlet P.T., Geilly L., Patou G., Bouvet J.* Universal primers for amplification of three noncoding regions of chloroplast DNA // *Pl. Mol. Biol.* 1991. V. 17. P. 1105–1109. <https://doi.org/10.1007/BF00037152>
12. *Dumolin-Lapegue S., Pemonge M.-H., Petit R. J.* An enlarged set of consensus primers for the study of organellar DNA in plants // *Mol. Ecol.* 1997. V. 6. P. 393–397. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1997.00193.x>
13. *Hamilton M.B.* Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation // *Mol. Ecol.* 1999. V. 8. P. 521–523.
14. *Grivet D., Heinze B., Vendramin G.G., Petit R.J.* Genome walking with consensus primers: Application to the large single copy region of chloroplast DNA // *Mol. Ecol. Not.* 2001. V. 1. P. 345–349. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8278.2001.00107.x>
15. *Hall T.A.* Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // *Nucl. Ac. Symp. Ser.* 1999. V. 41. P. 95–98. <https://doi.org/10.1111/jbi.12867>
16. *Excoffier L., Lischer H.* Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // *Mol. Ecol. Res.* 2010. V. 10. P. 564–567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
17. *Bandelt H.J., Forster P., Rohl A.* Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // *Mol. Biol. Evol.* 1999. V. 16 P. 37–48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
18. *Ronquist F., Huelsenbeck J.P.* MrBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // *Bioinformatics*. 2003. V. 19. № 12. P. 1572–1574. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>
19. *Chamberlain D.F., Hyam R., Argent G., Fairweather G., Walter K.S.* The genus *Rhododendron*, its classification and synonymy. Oxford: Royal Botanic Garden Edinburgh, 1996. 181 p.
20. *Баранова Т.В., Календарь Р.Н., Калаев В.Н.* К вопросу филогении видов рода *Rhododendron* L. на основании исследований последовательности спейсеров ITS1–ITS2 // Сибир. лесной журн. 2014. № 6. С. 29–45.
21. *Каракулов А.В.* Межпопуляционная изменчивость морфологических признаков у *Rhododendron adamsii* Rehd. (Ericaceae DC) // Мат. VIII междунар. форума “Охрана и рациональное использование лесных ресурсов”. Благовещенск: ДГАУ, 2015. С. 71–74.
22. *Каракулов А.В., Карпова Е.А., Васильев В.Г.* Эколого-географическая изменчивость морфометрических показателей и состава флавоноидов *Rhododendron parvifolium* // *Turczaninowia*, 2018. Т. 21. № 2. С. 133–144. <https://doi.org/10.14258/turczaninowia.21.2.14>
23. *Куцев М.Г., Каракулов А.В.* Реконструкция филогении рода *Rhododendron* L. (Ericaceae) флоры России на основе последовательности спейсеров ITS1–ITS2 // *Turczaninowia*. 2010. Т. 13. № 3. С. 59–62.
24. *Сосудистые растения советского Дальнего Востока.* Т. 5 / Отв. ред. Харкевич С.С. СПб.: Наука, 1991. 390 с.
25. *Флора Сибири и Дальнего Востока.* Вып. 2. Двудольные. Ericaceae (в обработке Е. Буш). СПб.: Гос. типография, 1915. 364 с.
26. *Wilson E.H.* The rhododendrons of Northeastern Asia exclusive of those belonging to the subgenus *Anthodendron* // *J. Arnold Arboretum*. 1923. V. 4. № 1. P. 33–56.

Genetic Identification of Closely Related Endangered *Rhododendron* Species from East Asia

M. A. Polezhaeva^a, D. R. Iunusova^a, *, N. A. Tikhonova^b, A. N. Polezhaev^c, and M. N. Koldaeva^d

^a Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, 620144 Russia

^b Sukachev Institute of Forest, Siberian Branch Russian Academy of Science, Krasnoyarsk, 660036 Russia

^c Institute of Biological Problems of the North, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Magadan, 685000 Russia

^d Botanical Institute-Garden Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690024 Russia

*e-mail: dianaiunusova@mail.ru

In the present study two chloroplast DNA markers (*trnH-psbA*, TabCD) were used to analyze genetic differentiation of six populations of *Rhododendron adamsii* from Sakhalin, Yakutia, Buryatia, Western Sayan, Magadan region and two populations of *Rhododendron parvifolium* from Buryatia and Khabarovsk region. A total of 6 haplotypes were found. While *R. parvifolium* with a single unique haplotype didn't possess any genetic variability, *R. adamsii* exhibited geographically determined distribution of cpDNA haplotypes. The samples from Buryatia were grouped into one homogeneous clade and the samples from the Far Eastern part of the range were grouped into another, showing a moderate genetic diversity within populations. Analysis of molecular variance (AMOVA) detected high genetic differentiation among *R. adamsii* populations ($F_{ST} = 0.98, p < 0.001$). GenBank sequences of closely related species were obtained for the estimation of the phylogenetic relationships of these species. We suggest *trnH-psbA* and TabCD markers to be applicable for the species identification and for the elucidation of population structure of rare *R. adamsii*.

Keywords: genetic differentiation, population structure, cpDNA, *Rhododendron parvifolium*, *Rhododendron adamsii*, *trnH-psbA*, TabCD.