

СОДЕРЖАНИЕ

Том 57, номер 4, 2021

Обзорные и теоретические статьи

Толерантность к повреждениям ДНК у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Е. А. Алексеева, В. Г. Королев

371

Интрогрессивная гибридизация мягкой пшеницы:
результаты и перспективы

И. Г. Адонина, Е. М. Тимонова, Е. А. Салина

384

Генетика растений

Изучение полиморфизма генов семейства *ipiO* оомицета *Phytophthora infestans* (Mont.) de Byu в популяции Московской области при помощи SSCP-анализа

В. В. Мартынов, В. К. Чижик

403

Изучение генетического разнообразия и дифференциации северных
и южной популяций карельской березы

Л. В. Ветчинникова, А. Ф. Титов, Л. В. Топчиева

412

Генетика животных

Оценка генетического разнообразия кыргызской породы лошадей
с использованием микросателлитных маркеров – расширенное
генеографическое исследование

*Ж. Т. Исакова, М. А. Исаев, В. Н. Кипень, Л. В. Калинин,
К. А. Айтбаев, М. А. Арзыбаев, С. Б. Мукеева,
Осмонкул кызы Мээрим, Н. М. Алдашева*

420

Генетическая гетерогенность серебряного карася *Carassius gibelio* (Cyprinidae)
в бассейне средней Оби

*М. А. Побединцева, С. Н. Решетникова, Н. А. Сердюкова,
А. Бишани, В. А. Трифонов, Е. А. Интересова*

429

Генетическая структура популяции голштинизированного черно-пестрого
скота на территории Урала

М. В. Модоров, И. В. Ткаченко, А. А. Грин, М. Ю. Севостьянов, Н. Н. Зезин

437

Исследование разнообразия гидробионтов Лиственничного залива
озера Байкал с использованием ДНК-метабаркодинга

*Л. С. Кравцова, Т. Е. Перетолчина, Т. И. Трибой, И. А. Небесных,
А. Б. Купчинский, А. Е. Тупикин, М. Р. Кабилов*

445

Нейтральная изменчивость цитохрома *b* у балобана *Falco cherrug* Grey,
1834 и кречета *Falco rusticolus* L.

*Д. Н. Рожкова, Л. С. Зиневич, И. В. Карякин,
А. Г. Сорокин, В. Г. Тамбовцева, А. М. Куликов*

454

Генетика человека

Y-гаплогруппы костных останков из курганных погребений хазарского времени на территории юга России

*И. В. Корниенко, Т. Г. Фалеева, Т. Г. Шурр, О. Ю. Арамова,
М. А. Очир-Горяева, Е. Ф. Батиева, Е. В. Вдовченков,
Н. Е. Мошков, В. В. Куканова, И. Н. Иванов,
Ю. С. Сидоренко, Т. В. Татарина*

464

Математические модели и методы

ДНК-штрихкодирование: области применения

Д. М. Шадрин

478

Contents

Vol. 57, No. 4, 2021

Reviews and Theoretical Articles

The DNA Damage Tolerance in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*

E. A. Alekseeva and V. G. Korolev

371

Wheat–Alien Introgression Breeding: Current Status and Prospects

I. G. Adonina, E. M. Timonova, and E. A. Salina

384

Plant Genetics

The Study of Polymorphism of the *ipiO* Gene Family in Oomycete *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary in the Moscow Region Population Using SSCP Analysis

V. V. Martynov and V. K. Chizhik

403

A Study of the Genetic Diversity and Differentiation of Northern and Southern Curly Birch Populations

L. V. Vetchinnikova, A. F. Titov, and L. V. Topchieva

412

Animal Genetics

Genetic Diversity of the Kyrgyz Horse Breed Using Microsatellite Markers – Extended Genogeographic Study

Zh. T. Isakova, M. A. Isaev, V. N. Kipen, L. V. Kalinkova, K. A. Aitbaev, M. A. Arzybaev, S. B. Mukeeva, Osmoykul k. Meerim, and N. M. Aldasheva

420

Genetic Diversity of the Prussian Carp, *Carassius gibelio* (Cyprinidae), in the Middle Ob Basin

M. A. Pobedintseva, S. N. Reshetnikova, N. A. Serdyukova, A. Bishani, V. A. Trifonov, and E. A. Interesova

429

Population Genetic Structure of Ural Black Pied Cattle

M. V. Modorov, I. V. Tkachenko, A. A. Grin, M. Yu. Sevost'yanov, and N. N. Zezin

437

The Study of the Hydrobionts Diversity from Listvennichny Bay of the Lake Baikal by DNA Metabarcoding

L. S. Kravtsova, T. E. Peretolchina, T. I. Triboy, I. A. Nebesnykh, A. B. Kupchinskiy, A. E. Tupikin, and M. R. Kabilov

445

Non-Neutral Cytochrome *b* Variability in the Saker *Falco cherrug* Grey, 1834 and Gyrfalcon *Falco rusticolus* L.

D. N. Rozhkova, L. S. Zinevich, I. V. Karyakin, A. G. Sorokin, V. G. Tambovtseva, and A. M. Kulikov

454

Human Genetics

Y-Chromosome Haplogroup Diversity in Khazar Burials from Southern Russia

*I. V. Kornienko, T. G. Faleeva, T. G. Schurr, O. Yu. Aramova,
M. A. Ochir-Goryaeva, E. F. Batiava, E. V. Vdovchenkov,
N. E. Moshkov, V. V. Kukanova, I. N. Ivanov,
Yu. S. Sidorenko, and T. V. Tatarinova*

464

Mathematical Models and Methods

DNA Barcoding: Applications

D. M. Shadrin

478

ОБЗОРНЫЕ
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 575.223:582.282.23

ТОЛЕРАНТНОСТЬ К ПОВРЕЖДЕНИЯМ ДНК
У ДРОЖЖЕЙ *Saccharomyces cerevisiae*

© 2021 г. Е. А. Алексеева¹ *, В. Г. Королев¹

¹Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”, Ленинградская область, Гатчина, 188300 Россия

*e-mail: alekseeva_ea@npi.nrcki.ru

Поступила в редакцию 23.12.2019 г.

После доработки 27.10.2020 г.

Принята к публикации 03.11.2020 г.

У эукариот толерантность к повреждениям ДНК (ТПД) обеспечивается двумя механизмами. Первый опосредован белками гомологичной рекомбинационной репарации. Второй находится под контролем *RAD6*-эпистатической группы генов и разделяется еще на два пути: безошибочный и склонный к ошибкам. Склонный к ошибкам механизм, который называют синтез ДНК в обход повреждений (TLS – Translesion Synthesis), осуществляется при участии специализированных TLS ДНК-полимераз. TLS является существенным источником мутационных изменений в ДНК. Напротив, при реализации *RAD6*-зависимого безошибочного механизма ТПД относительно более высокая точность синтеза ДНК обеспечивается благодаря использованию неповрежденной сестринской хроматиды или гомологичной хромосомы в качестве матрицы для продолжения репликации. При этом после остановки вилки репликации на повреждении 3'-конец синтезируемой нити переносится на неповрежденную гомологичную молекулу ДНК, синтез продолжается на некотором протяжении на новой матрице и затем удлиненная нить переносится обратно на исходную хроматиду. Инактивация большинства генов, контролирующих безошибочный механизм ТПД, либо не влияет на уровень УФ-индуцированного мутагенеза, либо его понижает. К исключениям можно отнести гены, входящие в эпистатическую группу *HSM3*. Мутации в генах этой группы приводят к существенному повышению частоты УФ-индуцированного мутагенеза. В данном обзоре авторы рассматривают безошибочную ветвь ТПД и делают попытку обосновать роль генов *HSM3*-эпистатической группы в ряду молекулярных событий, которые ведут к безошибочному обходу повреждений, блокирующих репликацию у почкующихся дрожжей.

Ключевые слова: толерантность к повреждениям ДНК, пострепликативная репарация, репликация, повреждения ДНК, УФ-индуцированный мутагенез.

DOI: 10.31857/S0016675821040020

В норме репликация ДНК завершается точным копированием генетического материала. Однако репликативная вилка часто сталкивается с множеством структурных препятствий, таких как повреждения ДНК, сшивки белок–ДНК и пр. Повреждения часто генерируются при нормальных условиях роста клетки [1], а также индуцируются экзогенными генотоксическими агентами химической или физической природы. В течение эволюции клетки приобрели такие механизмы, как эксцизионная репарация нуклеотидов и эксцизионная репарация поврежденных оснований, которые устраняют большинство повреждений ДНК [2]. Тем не менее некоторые повреждения сохраняются в ДНК и во время репликации, что приводит к остановке репликативного комплекса. Репликативный комплекс не может подставлять нуклеотиды напротив поврежденных нуклеотидов, и если повреждение не обойти или не

устранить, то это может привести к гибели клетки. Для решения этой проблемы клетки выработали механизм, позволяющий преодолевать возникшие препятствия благодаря обходу повреждений специализированными TLS ДНК-полимеразами (от англ. Translesion Synthesis – синтез ДНК в обход повреждений) или посредством смены поврежденной матрицы на гомологичную неповрежденную и продолжать процесс синтеза ДНК.

Данный механизм, позволяющий обходить повреждения ДНК, возникшие во время репликации, первоначально называли пострепликативной репарацией (ПРР). Это связано с тем, что УФ-облучение клеток почкующихся дрожжей приводило к образованию однонитевых брешей (ОНБ) в реплицирующейся ДНК [3]. Также было отмечено, что УФ-индуцированные димеры пиримидина, вызывающие ОНБ, часто сохраняются по-

сле завершения клеточного цикла [4–6]. Репраймирование и пострепликативное заполнение брешей позже было подтверждено экспериментами, показавшими, что *RAD6*-зависимый путь обхода повреждений у дрожжей активен в G2/M фазах клеточного цикла [7, 8]. Так как в то время считали, что процесс репарации происходит после процесса репликации, то данный механизм был назван ПРР. Но в отличие от других механизмов репарации ПРР фактически не устраняет повреждения ДНК, а обеспечивает временную устойчивость к ним. Исходя из этого, в настоящее время данный механизм называют толерантностью к повреждениям ДНК (ТПД) [9].

ТПД обеспечивается двумя механизмами: первый осуществляется за счет белков гомологичной рекомбинационной репарации (ГРР); второй контролируется *RAD6*-эпистатической группой генов. В свою очередь второй механизм подразделяется на два пути: безошибочный и склонный к ошибкам.

Склонный к ошибкам путь (TLS-путь) осуществляется за счет работы специализированных TLS ДНК-полимераз. К TLS ДНК-полимеразам у почкующихся дрожжей относятся полимеразы Rev1 и Pol η , принадлежащие к Y-семейству, а также полимеразы Pol ζ , принадлежащая к B-семейству полимераз [10]. TLS-путь является источником большого количества мутационных изменений в ДНК, вносимых в ходе матричного синтеза ДНК TLS ДНК-полимеразами, обладающими относительно низкой точностью.

Безошибочный путь ТПД, контролируемый *RAD6*-эпистатической группой генов, в свою очередь осуществляется благодаря использованию неповрежденной сестринской хроматиды или гомологичной хромосомы в качестве матрицы для продолжения репликации и поэтому является более точным по сравнению с TLS. Кроме того, относительно высокая точность этого процесса достигается за счет привлечения к синтезу ДНК репликативных ДНК-полимераз, обладающих большей точностью по сравнению с TLS ДНК-полимеразами. К репликативным ДНК-полимеразам почкующихся дрожжей относятся: Pol α , Pol δ и Pol ϵ . В ТПД у почкующихся дрожжей большую роль в безошибочном обходе повреждений ДНК играет Pol δ .

Выбор пути, по которому будет осуществляться обход повреждения ДНК, в основном зависит от типа посттрансляционной модификации ядерного антигена пролифелирующих клеток (PCNA) (рис. 1) [11]. PCNA (субъединицы которого кодируются геном *POL30*) является важным компонентом реплисомы, а также участвует в таких процессах как репарация ДНК, метилирование ДНК, ремоделирование хроматина и регуляция клеточного цикла [12]. Моноубиквитинирование PCNA комплексом Rad6/Rad18 активирует склонный к ошибкам

путь TLS. А полиубиквитинирование PCNA стимулирует переход к безошибочному обходу повреждений ДНК [13].

ОСТАНОВКА КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА В ОТВЕТ НА ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК

В обеспечении толерантности к повреждениям ДНК ключевую роль играет остановка клеточного цикла в ответ на повреждение ДНК (DDR от англ. DNA Damage Response), так как DDR является отправной точкой начала процесса обхода повреждения ДНК. Ведь именно в момент ареста клеточного цикла, вызванного повреждениями ДНК, клеткой принимается решение продолжить синтез ДНК или уйти в апоптоз, в случае если повреждение не будет устранено и репликация не возобновится.

Основные функции DDR – остановка движения по клеточному циклу и активация процессов репарации поврежденной ДНК. При нормальных условиях роста клеток ответ на повреждения глобально не индуцируется. Однако локальное привлечение белков, специфических для этого ответа, может происходить при столкновении репликативной машины со спонтанными повреждениями ДНК. Индукция глобального ответа на повреждения, приводящего к аресту клеточного цикла, происходит при появлении в ДНК значительного числа повреждений. При большом количестве повреждений ДНК при репликации накапливается большое число ОНБ. У почкующихся дрожжей именно одонитевая ДНК (онДНК) является сигналом для запуска процессов, приводящих к аресту клеточного цикла, которые опосредованы активацией киназы Mec1. Это происходит, когда комплекс Mec1/Ddc2 связывается с онДНК через физическое взаимодействие Ddc2 с RPA. После образования тройного комплекса Mec1/Ddc2/RPA происходит освобождение активной формы киназы Mec1, которая активирует одну из важнейших своих мишеней – эффекторную киназу Rad53 [14]. Rad53 регулирует множество аспектов ответа на повреждения, включая подавление активации поздних ориджинов, контроль синтеза дезоксирибонуклеотидов, регуляцию транскрипции, индуцированную повреждениями, и задержку клеточного цикла [15].

Таким образом, после активации Rad53 происходят события, способствующие возобновлению репликации и дальнейшему движению по клеточному циклу. Одним из таких событий является инициация ТПД, которая способствует обходу повреждений ДНК и предотвращает гибель клетки.

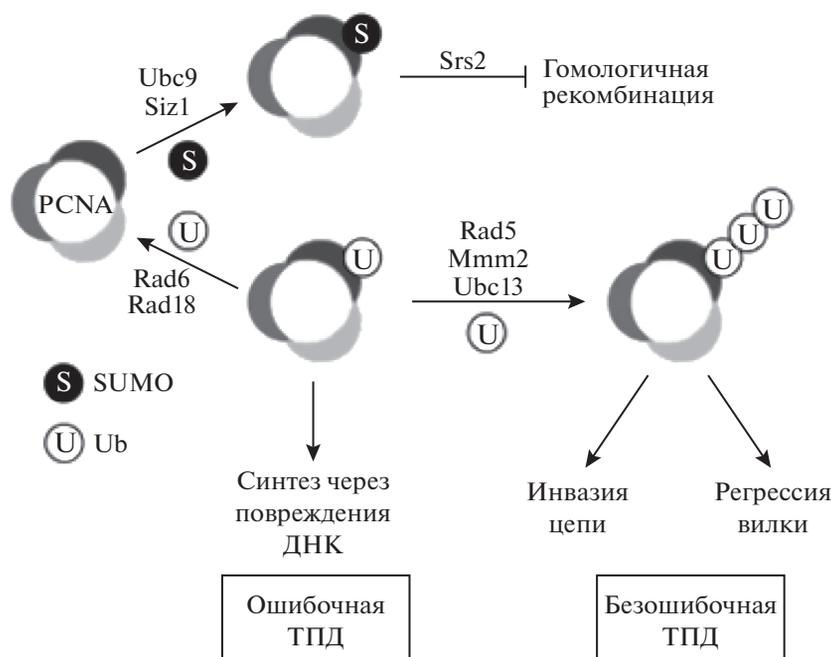


Рис. 1. Роль посттрансляционной модификации PCNA в обеспечении толерантности к повреждению ДНК у *S. cerevisiae*. После присоединения одного Ub PCNA может быть дополнительно последовательно модифицирована путем добавления Lys63-связанной цепи полиубиквитина. Моноубиквитинирование PCNA привлекает подверженные ошибкам и безошибочные TLS-полимеразы для прямого обхода повреждения ДНК. Полиубиквитинирование PCNA является сигналом для активации безошибочного механизма обхода повреждения ДНК с использованием переключения матрицы. Сумоилирование PCNA рекрутирует геликазу Srs2 в вилку репликации, которая предотвращает образование филаментов Rad51-онДНК и тем самым предотвращает нежелательную гомологичную рекомбинацию [11].

ИНИЦИАЦИЯ ТПД У ДРОЖЖЕЙ *Saccharomyces cerevisiae*

Долго полагали, что у эукариот лидирующая нить копируется непрерывно и инициация синтеза лидирующей нити происходит исключительно в ориджинах репликации. Непрерывность синтеза на поврежденной матрице объяснялась процессом, названным синтезом ДНК в обход повреждения (TLS) [16]. Накопление ОНБ и их медленное устранение связывали с низкой скоростью TLS. Но в работе [6] было показано, что у почкующихся дрожжей после облучения их УФ наблюдается прерывистость синтеза на обеих нитях ДНК. В других работах [6, 8] было показано, что репраймирование на лидирующей цепи приводит к образованию длинных ОНБ. Таким образом, ОНБ могут существовать достаточно продолжительное время. ОНБ являются опасными для ДНК, так как эндо- и экзонуклеазы, присутствующие в клетке, могут привести к деградации незащищенных концов ОНБ ДНК и двунитевым разрывам ДНК. В связи с этим оба конца ДНК, ограничивающие ОНБ, нуждаются в защите от деградации. С 3'-стороны бреши защита осуществляется репликативным комплексом, который стабилизируется фосфорилированием киназой Rad53. Однонитевой участок бреши защищает от атаки экзонуклеаз комплекс RPA. Одновременно RPA,

связанный с ДНК, активно привлекает погрузчик Rad24 к 5'-стороне бреши, где происходит загрузка на ДНК комплекса 9–1–1 (Rad17/Mec3/Ddc1), являющегося альтернативным фактором процессивности [14, 17], данный комплекс связывается с участком повреждения ДНК и приводит к активации киназы Rad53. Комплекс 9–1–1 служит защитой 5'-стороны ОНБ от экзонуклеазной активности. Организованная таким образом ОНБ служит субстратом для белков, иницирующих ТПД. Ключевую роль при склонном к ошибкам обходе повреждений играют специализированные ДНК-полимеразы Rev1, Polη и Polζ (TLS) [18, 19], а безошибочный (рекомбинационный) обход повреждений находится под контролем комплекса Mms2/Ubc13/Rad5 и ГРР [20, 21].

ОБХОД ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК ПО МЕХАНИЗМУ TLS

Генетические исследования на модели дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* показали критическую роль убиквитин-конъюгирующего ферментативного комплекса Rad6/Rad18 в контроле репликации через повреждение ДНК [7, 22, 23]. Связывание этого комплекса с ДНК в районе ОНБ является первым этапом ТПД. Способность белка Rad18 связываться с однонитевой ДНК служит сред-

ством доставки белка Rad6 к заблокированной повреждением репликационной вилке, где Rad6 ковалентно модифицирует PCNA, присоединяя одну молекулу убиквитина (Ub) к Lys164 (рис. 1). Когда PCNA моноубиквитинирован, белки TLS могут быть привлечены для прямого обхода повреждения ДНК [24]. Эта модификация PCNA резко повышает сродство комплекса к связыванию двух TLS ДНК-полимераз Pol η и Rev1, но не влияет на эффективность связывания ДНК-полимераз Pol δ и Pol ζ [25].

Pol η является уникальной среди эукариотических TLS ДНК-полимераз. Она способна осуществлять эффективный и безошибочный синтез ДНК на матричной цепи, содержащей циклобутановые пиримидиновые димеры, образующиеся в результате воздействия УФ-излучения [18], однако как и другие TLS ДНК-полимеразы Pol η с низкой точностью копирует неповрежденную ДНК. Pol η не только способна эффективно подставлять два адениновых нуклеотида напротив димера ТТ, но и обеспечивает сохранение рамки считывания. Более того, когда димер выходит из активного сайта полимеразы, стерические препятствия гарантируют, что ДНК освободится от фермента. Диссоциация полимеразы происходит после того, как за повреждением будут встроены три нуклеотида [26]. Это спасает клетки от синтеза протяженных участков ДНК при помощи часто ошибающейся Pol η . Поэтому у дрожжей мутанты по гену *RAD30*, кодирующему Pol η , проявляют повышенную чувствительность к летальному, но не мутагенному действию УФ [27]. В отличие от дрожжей инактивация Pol η в человеческих клетках приводит к повышенному УФ-индуцированному мутагенезу и определяет предрасположенность к вариантной форме пигментной ксеродермы и раку кожи [28–31].

В отличие от Pol η Pol ζ способна продолжать синтез от нуклеотида, встроенного напротив повреждения другими ДНК-полимеразами, что, как правило, сопровождается мутагенезом [32, 33]. Pol ζ является мультисубъединичным комплексом, состоящим из четырех белков Rev3/Rev7/Pol31/Pol32 [10]. В нуклеоплазме этот комплекс чаще всего представлен двумя субъединицами – каталитической Rev3 и вспомогательной Rev7. Для сборки остальных субъединиц TLS-полимеразы Pol ζ , вероятно, служит платформа, состоящая из белка Rev1p, связанного с PCNA и Rad5p. Белок Rev1 является dСМР-трансферазой и дополнительно обладает некаталитическими функциями в TLS. Rev1 имеет повышенное сродство к моноубиквитинированному PCNA и стабильно взаимодействует с Rad5 через С-терминальный домен Rev1 и N-терминальный домен Rad5 [34]. Комплекс Rev3/Rev7/Pol31/Pol32, возможно, при взаимодействии с репликативной полимеразой Pol δ осуществляет склонный к ошибкам обход повреждений ДНК. Так как кон-

центрация белка Rev1 в нуклеоплазме очень низкая [34], можно предположить, что Pol η будет выигрывать у Rev1 конкуренцию за связывание с моноубиквитинированным PCNA. В результате первая стадия обхода пиримидиновых димеров будет осуществляться в основном Pol η .

РЕКОМБИНАЦИОННЫЙ ПУТЬ ТПД

Полиубиквитинирование PCNA является сигналом для инициации безошибочного механизма ТПД [35]. Этот механизм осуществляется при помощи репликативных ДНК-полимераз, у почкующихся дрожжей он в основном осуществляется за счет работы Pol δ .

Безошибочный механизм ТПД может осуществляться по двум различным путям: один контролируется генами гомологичной рекомбинации (ГР), второй контролируется генами *RAD5*-группы.

Полиубиквитинирование PCNA осуществляет комплекс Rad5/Mms2/Ubc13. Механизм ТПД, контролируемый генами *RAD5*, *MMS2* и *UBC13*, обеспечивает обход повреждения путем временного переключения синтеза с поврежденной нити на сестринскую хроматиду (переключение матрицы). В экспериментах *in vitro* было показано, что этот процесс может инициироваться благодаря изомеризации репликативной вилки, генерируемой белком Rad5 [36]. Белок Rad5 не только входит в состав комплекса, обеспечивающего моноубиквитинирование PCNA, но и выполняет функцию сборки комплекса для последующей модификации PCNA. Rad5 физически взаимодействует с двумя белками Mms2 и Ubc13, составляющими единый комплекс. Этот комплекс может функционировать *in vitro* как убиквитин лигаза E2 для синтеза поли-Ub-цепей, связанных с Lys63 PCNA [37, 38]. Mms2 напоминает фермент E2, но в его активном сайте отсутствует остаток Cys [35]. Образование комплекса Mms2/Ubc13 приводит к тому, что образуется уникальный активный сайт для катализа реакции образования только Ub-цепей, связанных с Lys63 [37, 39–41]. Rad5 взаимодействует с Ubc13, обеспечивая роль комплекса Mms2/Ubc13 в качестве фермента E3 [11, 42–46]. В соответствии с этим комплекс Rad5/Mms2/Ubc13 имеет все необходимое для полиубиквитинирования PCNA [45].

В работе Янга с сотрудниками [11] в определенной мере раскрывается функциональная роль полиубиквитинирования PCNA в сигнальном механизме ТПД. В ней было показано, что моноубиквитинированный PCNA стимулировал TLS напротив апурин-апиримидиновых сайтов с помощью Pol η . Однако эффективность включения нуклеотидов напротив повреждения снижалась по мере того, как длина убиквитиновой цепи росла от моно- до тетра-Ub. На основании проведенных

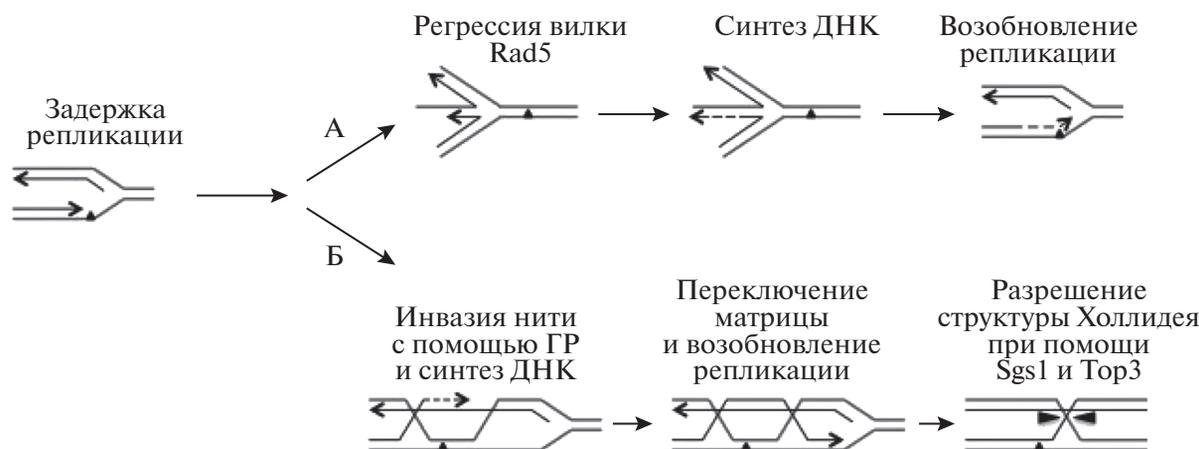


Рис. 2. Модель молекулярного механизма переключения матрицы и/или регрессии вилки репликации, реализуемого в ходе безошибочного пути ТПД. *a* – задержка репликации из-за повреждения в матричной цепи ДНК приводит к накоплению онДНК, это является сигналом для Rad6/Rad18-зависимой активации ТПД, опосредованной моноубиквитинированием PCNA; *b* – комплекс Rad5–Ubc13–Mms2 полиубиквитинирует PCNA, что активирует безошибочную ветвь ТПД. Rad5 способен осуществлять регрессию вилки репликации благодаря своей геликазной активности, что приводит к формированию структуры “куриные лапки”. Факторы гомологичной рекомбинации (ГР) опосредуют инвазию цепи и переключение матрицы на вновь синтезированную сестринскую хроматиду [11].

экспериментов авторы пришли к заключению, что полиубиквитинирование PCNA подавляет TLS, уменьшая активность полимераз в месте повреждения. Кроме того, полиубиквитинирование PCNA ослабляет связь Pol η с PCNA, что способствует их диссоциации и предотвращает образование нового комплекса Pol η /PCNA [11]. Таким образом, предполагается, что полиубиквитинирование PCNA служит в качестве сигнала, блокирующего репликацию, посредством предотвращения доступа полимераз семейства В и Y в вилку репликации.

Современные генетические и биохимические данные способствовали созданию двух моделей, объясняющих безошибочный обход поврежденной ДНК. Первая модель рассматривает в качестве основного механизма регрессии вилки репликации (рис. 2) [11]. Согласно этой модели вилка репликации останавливается, когда сталкивается с повреждением в матричной цепи ДНК во время синтеза лидирующей нити. Это ведет к нарушению координации синтеза ведущей и отстающей нитей [47]. Синтез отстающей нити продолжается, что ведет к генерации ОНБ, которая может служить субстратом для связывания гетеродимера Rad6/Rad18. Последний будет моноубиквитинировать PCNA. Взаимодействие белка Rad18 с Rad5 приведет к регрессии вилки репликации в результате активации геликазной активности последнего. При этом родительская и вновь синтезированная нити раскрываются и отжигаются в структуру “куриных лапок”. Благодаря формированию такой структуры вновь синтезированная нить будет служить матрицей для восстановления информации о поврежденной области в роди-

тельской нити и с 3'-конца будет инициирован нормальный процесс репликации.

Вторая модель предполагает, что механизм переключения матриц для безошибочного механизма ТПД включает процесс обмена нитями, осуществляемый при участии факторов гомологичной рекомбинации (ГР) (рис. 2) [11]. После диссоциации полимеразы Pol η в результате полиубиквитинирования PCNA 3'-конец вновь синтезированной ДНК подвергается деградации под действием экзонуклеазной активности белкового комплекса MRX, который активно привлекается к блокированной вилке [48–50]. При этом степень деградации ДНК находится под контролем белка Rad51. В отсутствие Rad51 ДНК подвергается обширной деградации, которую возможно осуществляет геликаза Pif1 при содействии флэп-эндонуклеазы Fen1 [50]. Предполагается, что Mre11 и Rad51 находятся в динамическом равновесии на онДНК и противодействуют активности друг друга [49]. Роль Pif1 в данном процессе, по-видимому, сводится к процессингу ОНБ и подготовке свободного однонитевого 3'-конца ДНК для последующих этапов [50]. Свободный однонитевой 3'-конец ДНК служит для инициации рекомбинационного процесса путем образования D-петли (Displacement-loop (D-loop)) (рис. 3). Инактивация каждого из трех белков (Mre11, Rad51, Pif1) нарушает безошибочный механизм ТПД, опосредованный рекомбинацией [50].

Физические доказательства участия процессов рекомбинации в механизме безошибочной ТПД получены в результате визуализации специфических структур – X-ДНК (X-образной двухцепочечной ДНК) [51] (рис. 4). Обработка клеток лю-



Рис. 3. D-петля.

бого из мутантов *sgs1*, *top3*, *ubc9* или *mms21* ДНК-повреждающим агентом приводит к накоплению структур Х-ДНК, которые можно визуализировать с помощью 2D гель-электрофореза [52, 53]. Поскольку ген *RAD51*, кодирующий один из основных белков рекомбинации, абсолютно необходим для накопления структур Х-ДНК [51], это подтверждает связь между безошибочным механизмом ТПД и гомологичной рекомбинацией.

Участие генов ГРР в безошибочной ТПД также было подтверждено в недавнем исследовании роли гена *RAD5* в завершении репликации после повреждения ДНК [53]. В данном исследовании использовался ДНК-алкилирующий агент адозелезин. Использование адозелезина позволило авторам изучить остановленную репликацию в определенных местах хромосомы. У мутанта *rad5* обработка клеток адозелезином приводила к замедлению репликации и образованию структур Х-ДНК в результате остановки репликативной вилки [54]. Х-ДНК по сути представляли собой структуры Холлидея, для образования которых требовались функциональные продукты генов *RAD51*, *RAD52*, *RAD54* и *RAD55*. Полученные данные подтверждают связь между безошибочным механизмом ТПД, инициируемым Rad5, и ГРР. Наконец, выявление эпистатического взаимодействия между генами, участвующими в ГРР и ТПД, также указывает на наличие связи между ними [55].

Решающую роль в выборе между Rad5-зависимым ТПД и ГРР определяют события, происходящие в D-петле, промежуточном продукте ГР (рис. 3). В ходе Rad5-зависимого пути ТПД происходит синтез относительно коротких фрагментов ДНК, способных перекрыть повреждение на материнской молекуле. При реализации *RAD52*-зависимого механизма осуществляется синтез более протяженных участков ДНК. На первых порах после возникновения D-петли представляют собой неустойчивые структуры, которые нуждаются в стабилизации при помощи специфических белков.

Одним из таких белков является Hmo1. Было показано, что он контролирует образование промежуточных продуктов рекомбинации, в том числе D-петли, при инициации безошибочного механизма ТПД, так как Hmo1 демонстрирует высокое сродство к крестообразным структурам ДНК и

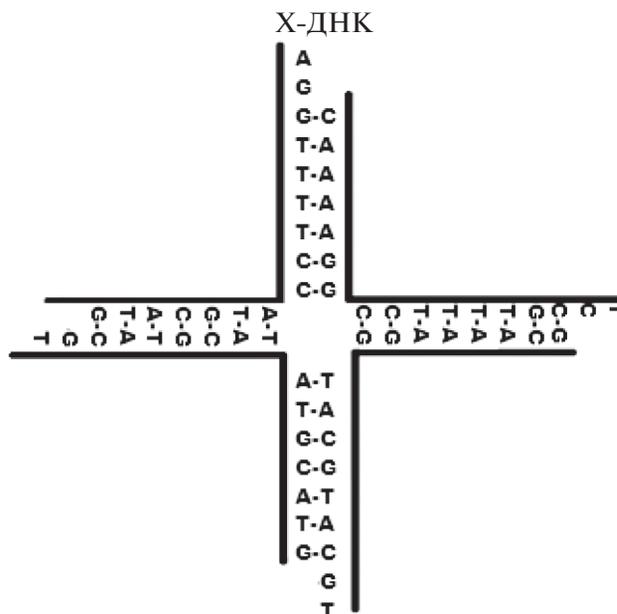


Рис. 4. Структура Х-ДНК.

измененным конформациям онДНК [56, 57]. Делеция гена *HMO1* дестабилизирует D-петли, что приводит к снижению чувствительности мутантов *rad5Δ*, *mms2Δ* и *ubc13Δ* к ММС. Снижение чувствительности данных мутантов происходит в результате разрушения продуктов ГР (*RAD52*-зависимый путь), образование которых в большом количестве оказывает цитотоксическое действие на клетку [56].

Белковый комплекс, известный как SHU-комплекс, также играет определенную роль в ГРР, стабилизируя D-петли [58, 59]. Гены *CSM2*, *PSY3*, *SHU1* и *SHU2*, кодирующие все четыре субъединицы данного комплекса, были выделены в полногеномном синтетическом скрининге генетического массива и могут играть роль в безошибочном механизме ТПД [55]. Субъединица Csm2 комплекса SHU стимулирует ГРР путем физического взаимодействия с гетеродимером Rad55/Rad57. Последний привлекает комплекс SHU в остановленную репликативную вилку, таким образом облегчая образование филамента Rad51 на онДНК [60, 61]. Противоположную роль у почкующихся дрожжей играет геликаза Srs2, которая дестабилизирует D-петли и является ингибитором ГР [62]. Геликаза Srs2 разрушает рекомбинационные интермедиаты, удаляя белок Rad51 из нуклеопротеинового комплекса. Ген *SRS2* был открыт как супрессор УФ чувствительности мутантов *rad6Δ* и *rad18Δ* и в независимом скрининге мутантов с сверхвысоким уровнем рекомбинации [18, 22]. Мутации в гене *SRS2* в большой степени снижают УФ-индуцированный мутагенез в клетках дрожжей [20]. Продукт еще одного гена связан с дестабилизацией

D-петель. Это АТФ-зависимая ДНК-геликаза с 3'–5'-поляризованностью, которая кодируется геном *MPH1* [62, 63]. Продукт этого гена вовлечен в диссоциацию D-петель независимо от геликазы *Srs2* для того, чтобы подавлять избыточное образование кроссоверных событий [64]. Таким образом, в отличие от белков комплекса SHU и Hmo1, которые стабилизируют D-петли, геликазы *Mph1* и *Srs2* разрушают вновь образованные рекомбинационные интермедиаты.

Ген *HMO1* (*HSM2*) входит в *HSM3*-группу генов, которая принимает участие в контроле безошибочного механизма ТПД [65].

РОЛЬ *HSM*-ГРУППЫ ГЕНОВ В БЕЗОШИБОЧНОЙ ВЕТВИ ТПД

Ранее были выделены мутанты почкующихся дрожжей *hsm*, которые отличаются высокой частотой индуцированного мутагенеза и практически неизменной устойчивостью к летальному действию мутагенов [66, 67], а также характеризуются повышенной частотой спонтанных мутаций устойчивости к канаванину. Выраженность мутаторного фенотипа варьировала от двукратного повышения частоты спонтанных мутаций для *hsm1* до десятикратного для *hsm2* по сравнению с диким типом [68, 69]. Исследование этих мутантов выявило шесть неаллельных мутаций (*hsm1–hsm6*), которые приводят к повышению спонтанного и УФ-индуцированного мутагенеза и не изменяют чувствительности клеток к УФ- и гамма-лучам, а также метилметансульфонату. Кроме того, были выделены мутанты *him* по признаку повышенного уровня мутагенеза, индуцированного азотистой кислотой, которые оказались еще и спонтанными мутаторами. Эти мутанты обладали повышенным уровнем УФ-индуцированного мутагенеза [66]. Генетический анализ позволил разделить обе коллекции мутантов на четыре эпистатические группы. В первую группу попали четыре мутанта *hsm2Δ*, *hsm3Δ*, *hsm6Δ* и *him1Δ* [69]. Наиболее важным для данного обзора свойством мутантов по генам *HSM2*, *HSM3*, *HSM6* и *HIM1* является их влияние на частоту индуцированной митотической рекомбинации. Показано, что частота кроссинговера у всех мутантов значительно уменьшена, а частота генной конверсии наоборот увеличена [68, 70, 71]. Это доказывает, что изучаемые мутации влияют негативно на длину гибридной ДНК, возникающей в течение репарационного синтеза в D-петлях [72]. Таким образом, все четыре гена имеют отношение к контролю рекомбинационного процесса. Мутанты по этим генам обладали выраженным мутаторным фенотипом, который зависел от гена *REV3*, что позволило отнести их к пострепликативному типу репарации и более определенно к генам, контролирующим безошибочный механизм ТПД [65]. Этот результат оказался неожиданным, так как практически все известные гены этого пути отличаются либо неизменным, либо пониженным УФ-индуцированным мутагенезом. Более того, биохимические функции четырех изучаемых генов, выявленные или предполагаемые, предполагают участие соответствующих белков в различных процессах метаболизма хроматина [67]. Эти данные позволяют выдвинуть предположение, что причиной повышенного индуцированного мутагенеза у рассматриваемых мутантов является нарушение сборки хроматина в ходе репарационного процесса.

Среди обсуждаемых мутантов наибольшим влиянием на скорость спонтанного мутагенеза обладали мутанты по гену *HSM2* [68]. Было показано, что мутация *hsm2-1* является аллелем гена *HMO1*. Продукт этого гена относится к семейству НМГ-белков, ассоциированных с хроматином и участвующих в поддержании стабильности генома [73].

Белок Hsm3 физически взаимодействует с белками Nat1, Nat2 и Hif1 – субъединицами гистонацетилтрансферазного комплекса NuB4, принимающего участие в модификации и сборке хроматина [74, 75]. С другой стороны, в ряде работ показано, что белок Hsm3 участвует в сборке протеасомного комплекса S26 [76, 77]. Для нахождения ответа на вопрос о связи процессов сборки протеасомы и мутагенеза были проведены исследования доменной структуры белка Hsm3 и показано, что за регуляцию мутационного процесса отвечает С-терминальный домен белка, а за сборку протеасом – центральный домен [78].

Ген *HSM6* был картирован на левом плече хромосомы II в районе локализации гена *PSY4*. Функциональный тест на аллелизм показал, что мутация *hsm6-1* является аллелем гена *PSY4* [79]. Белок Psy4 является третьей субъединицей фосфатазного комплекса PPH3, который дефосфорилирует гистон γ H2A [79].

Ген *HIM1* был картирован на правом плече хромосомы IV; биохимическая функция белка, кодируемого данным геном, в настоящее время неизвестна. Известно, что делеция гена *HIM1* приводит к дестабилизации D-петли [80].

Изучаемые мутации негативно влияют на длину гибридной ДНК, возникающей в ходе удлинения D-петли ДНК-полимеразами. Это подтверждается данными генетического анализа о взаимодействии мутаций *him1Δ*, *hsm3Δ* и *hsm2Δ* с мутацией *srs2Δ*, которая влияет на процессинг D-петли. У двойных мутантов *him1Δ srs2Δ*, *hsm3Δ srs2Δ* и *hsm2Δ srs2Δ* уровень мутагенеза оказался ниже, чем у всех одиночных мутантов [69, 70, 80]. Подобный результат был получен в экспериментах с двойными мутантами *him1Δ mph1Δ* и *hsm3Δ mph1Δ* [80, 81]. Основываясь на этих результатах, было сделано предположение, что, по крайней мере, мутации *him1Δ*,

hsm3Δ и *hsm2Δ* дестабилизируют D-петли, что и приводит к повышенному мутагенезу. Это предположение было доказано прямыми биохимическими экспериментами с мутантами по гену *HMO1* (*HSM2*) [56, 57]. *Hmo1* может способствовать рекомбинационному процессу, помогая образованию сестринских хроматидных соединений посредством изгиба ДНК [82]. Известно, что белковый комплекс SHU, в состав которого входит субъединица *Shu1*, также стабилизирует вновь образованные D-петли, препятствуя работе антирекомбинационной геликазы *Srs2* [83]. Как показали эксперименты, мутация *shu1Δ* приводит к резкому увеличению уровня УФ-индуцированного мутагенеза по сравнению с клетками дикого типа, что подтверждает высказанное выше предположение о роли стабилизации D-петли в предотвращении УФ-индуцированного мутагенеза [81].

Удивительные данные были получены при изучении взаимодействия мутаций генов *HSM3*-группы между собой. Двойной мутант *him1Δ hsm2Δ* показал уровень УФ-индуцированного мутагенеза, равный аналогичному показателю у штамма дикого типа [70]. Примерно такой же эффект наблюдался у двойного мутанта *hsm2Δ hsm3Δ* [84]. С другой стороны, у двойного мутанта *him1Δ hsm3Δ* уровень мутагенеза соответствовал уровню одиночного мутанта *hsm3Δ*, что указывает на эпистатическое взаимодействие между соответствующими генами.

Ранее было показано, что блок репарации неспаренных оснований у мутантов группы *HSM3* приводит к синергическому увеличению частоты УФ-индуцированного мутагенеза, в частности у двойных мутантов *pms1Δ him1Δ*, *pms1Δ hsm2Δ* и *pms1Δ hsm3Δ* [65, 69, 70]. Это кажется странным, так как пиримидиновые димеры, возникающие при действии УФ-лучей, не являются субстратом белков репарации неспаренных оснований, следовательно мутации *HSM3*-группы генов инициируют образование ошибочно спаренных оснований на неповрежденной матрице, которые и являются субстратом *Pms1*-зависимой системы репарации. Интересный результат был получен в эксперименте с тройным мутантом *pms1Δ him1Δ hsm2Δ*. УФ-индуцированный мутагенез у тройного мутанта оказался таким же, как у одиночного *hsm2Δ*. Эти результаты позволяют сделать предположение, что причиной появления ошибочно спаренных оснований является работа склонных к ошибкам полимераз и что мутации в генах *HSM3*-группы приводят к переключению высокоточных ДНК-полимераз на TLS ДНК-полимеразы в ходе репарационного синтеза ДНК. Это скорее всего и влияет на фенотип мутантов по генам *HSM3*-группы. Пока неизвестно какие именно полимеразы участвуют в данном процессе.

На какой стадии процесса ТПД принимают участие гены *HSM3*-группы? В безошибочной ветви

ТПД можно рассматривать два механизма: ГРР и Rad5-зависимый механизм. Для установления на какой из этих механизмов оказывают влияние *HSM*-мутанты были использованы мутанты по генам *SRS2* и *MPH1*. Известно, что на Rad5-зависимом пути активно работает геликаза *Mph1*, которая способна разрушать D-петли, возвращая внедрившийся в сестринскую хроматиду однонитевой “хвост” на материнскую нить [84, 85]. У двойных мутантов *him1Δ srs2Δ*, *mph1Δ him1Δ* и *hsm3Δ srs2Δ*, *mph1Δ hsm3Δ* практически все возникшие D-петли будут процессироваться по механизму ГРР.

Для того чтобы разрешить гибридную структуру D-петли, необходимо вмешательство резолваз. Было сделано предположение, что на эту роль вполне может претендовать эндонуклеаза *Mus81/Mms4*. Эта структурно-специфическая эндонуклеаза требуется для подавления накопления летальных рекомбинационных интермедиатов, возникающих в процессе репликации поврежденной ДНК [4, 6–8, 18]. *Mus81/Mms4* используется клеткой в процессинге рекомбинационных интермедиатов, которые возникают при репарации поврежденных репликативных вилок.

При исследовании УФ-индуцированного мутагенеза у двойного мутанта *hsm3Δ mms4Δ* было показано, что двойной мутант не отличался от штамма дикого типа по уровню индуцированного мутагенеза [81]. Следовательно, можно предположить, что основным ферментом, осуществляющим завершение процесса обмена матриц, является эндонуклеаза *Mus81/Mms4*. Таким образом, скоординированное действие геликазы *Mph1* и эндонуклеазы *Mus81/Mms4* может обеспечить необходимую длину вновь синтезированной ДНК в D-петле, чтобы перекрыть брешь, образованную вокруг повреждения.

Суммируя представленные результаты, можно сделать заключение, что причиной высокого индуцированного мутагенеза у мутантов по генам *HSM2*, *HSM3* и *HIM1* является преждевременное вытеснение онДНК из D-петли и заполнение оставшейся брешки полимеразой, склонной к ошибкам.

Большое количество ОНБ, оставшихся в ДНК после завершения репликации, приводит к индукции ареста клеточного цикла и активации киназы *Rad53*. Одной из основных биохимических функций *Rad53* является контроль за эффективностью индукции комплекса RNR и, как следствие, концентрации дезоксинуклеотидов (дНТФ) [86]. При активации чекпойнта концентрация дНТФ в нуклеоплазме возрастает в 8 раз по сравнению с уровнем G₀-фазы [87]. До настоящего времени остается нерешенным вопрос: для чего необходимо такое увеличение концентрации дНТФ? Единственное, что удалось показать, это то, что высокие

концентрации дезоксирибонуклеотидов значительно повышают скорость синтеза ДНК. В клетках дикого типа максимальная активность Rad53 и высокий уровень дНТФ достигаются перед началом активной работы механизма ТПД [87]. Однако при этом мы не видим высокого уровня мутагенеза, характерного для мутантов *him1Δ* и *hsm3Δ*. Такой же результат мы наблюдаем в клетках дикого типа при быстром выходе из ареста клеточного цикла и быстром снижении уровня дНТФ. Отсюда следует, что, по-видимому, промежуточные концентрации дНТФ могут быть причиной высокого мутагенеза у мутантов по генам *HSM3* эпистатической группы.

Гены *HSM3* эпистатической группы еще не полностью изучены, и поэтому мы не можем достаточно подробно описать механизм их работы в безошибочной ветви ТПД.

Однако за последнее десятилетие произошел большой прогресс в понимании молекулярных механизмов толерантности клеток к повреждению генетического материала. Теперь стало известно большинство ферментативных стадий в процессах безошибочного и склонного к ошибкам механизмов ТПД.

Авторы надеются, что в дальнейшем роль генов *HSM3*-группы будет более подробно изучена и приведенная в данном обзоре информация поможет в изучении механизмов ТПД.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-34-00540 мол_а, а также работа выполнена при финансовой поддержке “Курчатовского геномного центра – ПИЯФ” программой развития центров генетических исследований мирового уровня, Соглашение № 075-15-2019-1663.

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. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA // *Nature*. 1993. V. 362. P. 709–715. <https://doi.org/10.1038/362709a0>
2. Freidberg E.C., Walker G.C., Siede W. et al. DNA Repair and Mutagenesis. 2nd ed. Washington: ASM Press, 2006. 1161 p.
3. Prakash L. Characterization of postreplication repair in *Saccharomyces cerevisiae* and effects of *rad6*, *rad18*, *rev3* and *rad52* mutations // *Mol. Gen. Genet.* 1981. V. 184. № 3. P. 471–478. <https://doi.org/10.1007/bf00352525>
4. Bridges B.A., Munson R.J. Mutagenesis in *Escherichia coli*: evidence for the mechanism of base change mutation by ultraviolet radiation in a strain deficient in excision-repair // *Proc. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci.* 1968. V. 171. P. 213–226. <https://doi.org/10.1098/rspb.1968.0065>
5. Ganesan A.K. Persistence of pyrimidine dimers during post-replication repair in ultraviolet light-irradiated *Escherichia coli* K12 // *J. Mol. Biol.* 1974. V. 87. P. 103–119. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(74\)90563-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(74)90563-4)
6. Lopes M., Foiani M., Sogo J.M. Multiple mechanisms control chromosome integrity after replication fork uncoupling and restart at irreparable UV lesions // *Mol. Cell.* 2006. V. 21. P. 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.11.015>
7. Daigaku Y., Davies A.A., Ulrich H.D. Ubiquitin-dependent DNA damage bypass is separable from genome replication // *Nature*. 2010. V. 465. P. 951–955. <https://doi.org/10.1038/nature09097>
8. Karras G.I., Jentsch S. The *RAD6* DNA damage tolerance pathway operates uncoupled from the replication fork and is functional beyond S phase // *Cell*. 2010. V. 141. № 2. P. 255–267. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.028>
9. Andersen P., Xu F., Xiao W. Eukaryotic DNA damage tolerance and translesion synthesis through covalent modifications of PCNA // *Cell Res.* 2008. V. 18. P. 162–173. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.114>
10. Pages V., Fuchs R.P. Uncoupling of leading- and lagging-strand DNA replication during lesion bypass *in vivo* // *Science*. 2003. V. 300. P. 1300–1303. <https://doi.org/10.1126/science.1083964>
11. Yang K., Gong P., Gokhale P., Zhuang Z. Chemical protein polyubiquitination reveals the role of a noncanonical polyubiquitin chain in DNA damage tolerance // *ACS Chem. Biol.* 2014. V. 9. № 8. P. 1685–1691. <https://doi.org/10.1021/cb500133k>
12. Choe K.N., Moldovan G.-L. Forging ahead through darkness: PCNA, still the principal conductor at the replication fork // *Mol. Cell.* 2017. V. 65. № 3. P. 380–392. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.12.020>
13. Amara F., Colombo R., Cazzaniga P. et al. *In vivo* and *in silico* analysis of PCNA ubiquitylation in the activation of the post replication repair pathway in *S. cerevisiae* // *BMC Syst. Biol.* 2013. 7:24. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-7-24>
14. Majka J., Binz S.K., Wold M.S., Burgers P.M.J. Replication protein A directs loading of the DNA damage checkpoint clamp to 5'-DNA junctions // *JBC*. 2006. V. 281. P. 27855–27861. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605176200>
15. Pardo B., Crabbe L., Pasero P. Signaling pathways of replication stressing yeast // *FEMS Yeast Res.* 2017. V. 17. № 2. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow101>
16. Goodman M.F., Woodgate R. Translesion DNA polymerases // *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* 2013. V. 5. № 10. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010363>
17. Zou L., Liu D., Elledge S.J. Replication protein A-mediated recruitment and activation of Rad17 complexes //

- PNAS. 2003. V. 100. P. 13827–13832.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2336100100>
18. Johnson R.E., Prakash S., Prakash L. Efficient bypass of a thymine-thymine dimer by yeast DNA polymerase Pol η // Science. 1999. V. 283. P. 1001–1004.
<https://doi.org/10.1126/science.283.5404.1001>
 19. Nelson J.R., Lawrence C.W., Hinkle D.C. Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA polymerase zeta // Science. 1996. V. 272. P. 1646–1649.
<https://doi.org/10.1126/science.272.5268.1646>
 20. Torres-Ramos C., Prakash S., Prakash L. Requirement of RAD5 and MMS2 for postreplication repair of UV-damaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae* // Mol. Cell. Biol. 2002. V. 22. P. 2419–2426.
<https://doi.org/10.1128/MCB.22.7.2419-2426.2002>
 21. Gangavarapu V., Prakash S., Prakash L. Requirement of RAD52 group genes for postreplication repair of UV-damaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae* // Mol. Cell. Biol. 2007. V. 27. P. 7758–7764.
<https://doi.org/10.1128/MCB.01331-07>
 22. Bailly V., Lamb J., Sung P. et al. Specific complex formation between yeast RAD6 and RAD18 proteins: a potential mechanism for targeting RAD6 ubiquitin-conjugating activity to DNA damage sites // Genes Dev. 1994. V. 8. P. 811–820.
<https://doi.org/10.1101/gad.8.7.811>
 23. Broomfield S., Hryciw T., Xiao W. DNA postreplication repair and mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae* // Mutat. Res. 2001. V. 486. P. 167–184.
[https://doi.org/10.1016/s0921-8777\(01\)00091-x](https://doi.org/10.1016/s0921-8777(01)00091-x)
 24. Bienko M., Green C.M., Crosetto N. et al. Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis // Science. 2005. V. 310. P. 1821–1824.
<https://doi.org/10.1126/science.1120615>
 25. Garg P., Burgers P.M. Ubiquitinated proliferating cell nuclear antigen activates translesion DNA polymerases η and REV1 // PNAS. 2005. V. 102. P. 18361–18366.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0505949102>
 26. Biertümpfel C., Zhao Y., Kondo Y. et al. Structure and mechanism of human DNA polymerase eta // Nature. 2010. V. 465. № 7301. P. 1044–1048.
<https://doi.org/10.1038/nature09196>
 27. McDonald J.P., Levine A.S., Woodgate R. The *Saccharomyces cerevisiae* RAD30 gene, a homologue of *Escherichia coli* *dinB* and *umuC*, is DNA damage inducible and functions in a novel error-free postreplication repair mechanism // Genetics. 1997. V. 147. P. 1557–1568.
 28. Stry A., Kannouche P., Lehmann A.R., Sarasin A. Role of DNA polymerase η in the UV mutation spectrum in human cells // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 18767–18775.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M211838200>
 29. Johnson R.E., Kondratieck C.M., Prakash S., Prakash L. hRAD30 mutations in the variant form of xeroderma pigmentosum // Science. 1999. V. 285. P. 263–265.
<https://doi.org/10.1126/science.285.5425.263>
 30. Masutani C., Kusumoto R., Yamada A. et al. The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase η // Nature. 1999. V. 399. P. 700–704.
<https://doi.org/10.1038/21447>
 31. Johnson R.E., Haraeska L., Prakash S., Prakash L. Role of DNA polymerase η in the bypass of a (6-4) TT photoproduct // Mol. Cell. Biol. 2001. V. 21. P. 3558–3563.
<https://doi.org/10.1128/MCB.21.10.3558-3563.2001>
 32. Johnson R.E., Washington M.T., Haraeska L. et al. Eukaryotic polymerases τ and ζ act sequentially to bypass DNA lesions // Nature. 2000. V. 406. P. 1015–1019.
<https://doi.org/10.1038/35023030>
 33. Kuang L., Kou H., Xie Z. et al. A non-catalytic function of Rev1 in translesion DNA synthesis and mutagenesis is mediated by its stable interaction with Rad5 // DNA Repair. 2013. V. 12. P. 27–37.
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2012.10.003>
 34. Blastyák A., Pintér L., Unk I. et al. Yeast Rad5 protein required for postreplication repair has a DNA helicase activity specific for replication fork regression // Mol. Cell. 2007. V. 28. P. 167–175.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.07.030>
 35. Eddins M.J., Carlile C.M., Gomez K.M. et al. Mms2-Ubc13 covalently bound to ubiquitin reveals the structural basis of linkage-specific polyubiquitin chain formation // Nat. Struct. Mol. Biol. 2006. V. 13. P. 915–920.
<https://doi.org/10.1038/nsmb1148>
 36. Hofmann R.M., Pickart C.M. Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair // Cell. 1999. V. 96. P. 645–653.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80575-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80575-9)
 37. VanDemark A.P., Hofmann R.M., Tsui C. et al. Molecular insights into polyubiquitin chain assembly: crystal structure of the Mms2/Ubc13 heterodimer // Cell. 2001. V. 105. P. 711–720.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00387-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00387-7)
 38. Broomfield S., Chow B.L., Xiao W. MMS2, encoding a ubiquitin-conjugating-enzyme-like protein, is a member of the yeast error-free postreplication repair pathway // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 5678–5683.
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.10.5678>
 39. McKenna S., Spyropoulos L., Moraes T. et al. Noncovalent interaction between ubiquitin and the human DNA repair protein Mms2 is required for Ubc13-mediated polyubiquitination // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 40120–40126.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M102858200>
 40. Moraes T.F., Edwards R.A., McKenna S. et al. Crystal structure of the human ubiquitin conjugating enzyme complex, hMms2-hUbc13 // Nat. Struct. Biol. 2001. V. 8. P. 669–673.
<https://doi.org/10.1038/90373>

41. Ulrich H.D., Jentsch S. Two RING finger proteins mediate cooperation between ubiquitin-conjugating enzymes in DNA repair // *EMBO J.* 2000. V. 19. P. 3388–3397.
<https://doi.org/10.1093/emboj/19.13.3388>
42. Hoegge C., Pfander B., Moldovan G.L. et al. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO // *Nature.* 2002. V. 419. P. 135–141.
<https://doi.org/10.1038/nature00991>
43. Ulrich H.D. Protein–protein interactions within an E2–RING finger complex. Implications for ubiquitin-dependent DNA damage repair // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 7051–7058.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M212195200>
44. Carlile C.M., Pickart C.M., Matunis M.J., Cohen R.E. Synthesis of free and proliferating cell nuclear antigen-bound polyubiquitin chains by the RING E3 ubiquitin ligase Rad5 // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. P. 29326–29334.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.043885>
45. Parker J.L., Ulrich H.D. Mechanistic analysis of PCNA poly-ubiquitylation by the ubiquitin protein ligases Rad18 and Rad5 // *EMBO J.* 2009. V. 28. P. 3657–3666.
<https://doi.org/10.1038/emboj.2009.303>
46. Zhang W., Qin Z., Zhang X., Xiao W. Roles of sequential ubiquitination of PCNA in DNA-damage tolerance // *FEBS Lett.* 2011. V. 585. P. 2786–2794.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.04.044>
47. Trenz K., Smith E., Smith S., Costanzo V. ATM and ATR promote Mre11 dependent restart of collapsed replication forks and prevent accumulation of DNA breaks // *EMBO J.* 2006. V. 25. P. 1764–1774.
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601045>
48. Bentsen I.B., Nielsen I., Lisby M. et al. MRX protects fork integrity at protein–DNA barriers, and its absence causes checkpoint activation dependent on chromatin context // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41. P. 3173–3189.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt051>
49. Hashimoto Y., Chaudhuri A.R., Lopez M., Costanzo V. Rad51 protects nascent DNA from Mre11 dependent degradation and promotes continuous DNA synthesis // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2010. V. 17. P. 1305–1311.
<https://doi.org/10.1038/nsmb.1927>
50. Garcia-Rodrigues N., Wong R.P., Ulrich H.D. The helicase Pif1 functions in the template switching pathway of DNA damage bypass // *Nucl. Acids Res.* 2018. V. 46. № 16.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky648>
51. Liberi G., Maffioletti G., Lucca C. et al. Rad51-dependent DNA structures accumulate at damaged replication forks in *sgs1* mutants defective in the yeast ortholog of BLM RecQ helicase // *Genes Dev.* 2005. V. 19. P. 339–350.
<https://doi.org/10.1101/gad.322605>
52. Branzei D., Sollier J., Liberi G. et al. Ubc9- and mms21-mediated sumoylation counteracts recombinogenic events at damaged replication forks // *Cell.* 2006. V. 127. P. 509–522.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.050>
53. Minca E.C., Kowalski D. Multiple Rad5 activities mediate sister chromatid recombination to bypass DNA damage at stalled replication forks // *Mol. Cell.* 2010. V. 38. P. 649–661.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.03.020>
54. Ball L.G., Zhang K., Cobb J.A. et al. The yeast Shu complex couples error-free post-replication repair to homologous recombination // *Mol. Microbiol.* 2009. V. 73. P. 89–102.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06748.x>
55. Gonzalez-Huici V., Szakal B., Urulangodi M. et al. DNA bending facilitates the error-free DNA damage tolerance pathway and upholds genome integrity // *EMBO J.* 2014. V. 33. P. 327–340.
<https://doi.org/10.1002/embj.201387425>
56. Kamau E., Bauerle K.T., Grove A. The *Saccharomyces cerevisiae* high mobility group box protein HMO1 contains two functional DNA binding domains // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 55234–55240.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M409459200>
57. Shor E., Weinstein J., Rothstein R. A genetic screen for *top3* suppressors in *Saccharomyces cerevisiae* identifies *SHU1SHU2PSY3* and *CSM2*: four genes involved in error-free DNA repair // *Genetics.* 2005. V. 169. P. 1275–1289.
<https://doi.org/10.1534/genetics.104.036764>
58. Mankouri H.W., Ngo H.P., Hickson I.D. Shu proteins promote the formation of homologous recombination intermediates that are processed by Sgs1–Rmi1–Top3 // *Mol. Biol. Cell.* 2007. V. 18. P. 4062–4073.
<https://doi.org/10.1091/mbc.e07-05-0490>
59. Xu X., Ball L., Chen W. et al. The yeast Shu complex utilizes homologous recombination machinery for error-free lesion bypass via physical interaction with a Rad51 paralogue // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 12.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081371>
60. Godin S., Wier A., Kabbinar F. et al. The Shu complex interacts with Rad51 through the Rad51 paralogues Rad55–Rad57 to mediate error-free recombination // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41. P. 4525–4534.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt138>
61. Scheller J., Schurer A., Rudolph C. et al. MPH1, a yeast gene encoding a DEAH protein, plays a role in protection of the genome from spontaneous and chemically induced damage // *Genetics.* 2000. V. 155. P. 1069–1081.
62. Prakash R., Krejci L., Van Komen S. et al. *Saccharomyces cerevisiae* MPH1 gene, required for homologous recombination-mediated mutation avoidance, encodes a 3' to 5' DNA helicase // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 9. P. 7854–7860.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M413898200>
63. Prakash R., Satory D., Dray E. et al. Yeast Mph1 helicase dissociates Rad-51 made D-loop: implications for crossingover control in mitotic recombination // *Genes*

- Dev. 2009. V. 23. P. 67–79.
<https://doi.org/10.1101/gad.1737809>
64. Ivanov E.L., Kovaltzova S.V., Korolev V.G. *Saccharomyces cerevisiae* mutants with enhanced induced mutation and altered mitotic gene conversion // *Mutat. Res.* 1989. V. 213. P. 105–115.
[https://doi.org/10.1016/0027-5107\(89\)90141-3](https://doi.org/10.1016/0027-5107(89)90141-3)
65. Blackwell Jr., Wilkinson S.T., Mosammaparast N., Pemberton L.F. Mutational analysis of H3 and H4 N termini reveals distinct roles in nuclear import // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. P. 20142–20150.
66. Иванов Е.Л., Федорова И.В., Ковальцова С.В. Выделение и характеристика новых мутантов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с повышенной спонтанной мутабельностью // *Генетика.* 1992. Т. 28. № 1. С. 47–55.
67. Федорова И.В., Ковальцова С.В., Иванов Е.Л. Влияние мутаций *hsm*, повышающих спонтанную мутабельность, на индуцированный мутагенез и митотическую рекомбинацию у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // *Генетика.* 1992. Т. 28. № 1. С. 54–65.
68. Alekseev S.Yu., Kovaltzova S.V., Fedorova I.V. et al. *HSM2 (HMO1)* gene participates in mutagenesis control in yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *DNA Repair.* 2002. V. 1. P. 287–297.
69. Kelberg E.P., Kovaltzova S.V., Alekseev S.Y. et al. *HIM1*, a new yeast *Saccharomyces cerevisiae* gene playing a role in control of spontaneous and induced mutagenesis // *Mutat. Res.* 2005. V. 578. P. 64–78.
<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.03.003>
70. Ковальцова С.В., Грачева Л.М., Евстюхина Т.А. и др. Гены-мутаторы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Взаимодействие *him* и *hsm* с мутациями, блокирующими три основные пути репарации индуцированных повреждений ДНК // *Генетика.* 1996. Т. 32. № 7. С. 927–932.
71. Fedorova I.V., Gracheva L.M., Kovaltzova S.V. et al. The yeast *HSM3* gene acts in one of the mismatch repair pathways // *Genetics.* 1998. V. 148. P. 963–973.
72. Inbar O., Liefshütz B., Bitan G., Kupiec M. The relationship between homology length and crossing over during the repair of a broken chromosome // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 30833–30838.
<https://doi.org/10.1074/jbc.C000133200>
73. Ge Z., Wang H., Parthun M.R. Nuclear Hat1p complex (NuB4) components participate in DNA repair-linked chromatin reassembly // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 16790–16799.
74. Le Tallec B., Barrault M.-B., Guerois R. et al. Hsm3/S5b participates in the assembly pathway of the 19S regulatory particle of the proteasome // *Mol. Cell.* 2009. V. 33. P. 389–399.
75. Funakoshi M., Tomko R.J., Jr., Kobayashi H., Hochstrasser M. Multiple assembly chaperones govern biogenesis of the proteasome regulatory particle base // *Cell.* 2009. V. 137. P. 887–899.
76. Черненко А.Ю., Иванова С.В., Ковальцова С.В. и др. Генетический анализ доменной структуры белка Hsm3 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // *Генетика.* 2010. Т. 46. № 6. С. 742–749.
77. Gadal C., Labarre S., Djschiero C., Thuriaux P. Hmo1, an HMG-box protein, belongs to the yeast ribosomal DNA transcription system // *EMBO J.* 2002. V. 21. P. 5498–5507.
78. Черненко А.Ю., Федоров Д.В., Грачева Л.М. и др. Взаимодействие гена *HSM3* с генами, инициирующими гомологичную рекомбинационную репарацию у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // *Генетика.* 2012. Т. 48. № 3. С. 333–339.
79. Федоров Д.В., Ковальцова С.В., Евстюхина Т.А. и др. Ген *HSM6* идентичен гену *PSY4* дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // *Генетика.* 2013. Т. 49. № 3. С. 328–336.
80. Алексеева Е.А., Евстюхина Т.А., Пешихонов В.Т., Королёв В.Г. Взаимодействие продукта гена *HIM1* с геликазами *SRS2 (RADH)* и *MPH1* дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // *Цитология.* 2018. Т. 60. № 7. С. 555–557.
<https://doi.org/10.31116/tsitol.2018.07.13>
81. Xiao L., Williams A.M., Grove A. The C-terminal domain of yeast high mobility group protein HMO1 mediates lateral protein accretion and in-phase DNA bending // *Biochemistry.* 2010. V. 49. P. 4051–4059.
<https://doi.org/10.1021/bi1003603>
82. Bernstein K.A., Reid R.J.D., Sunjevaric I. et al. The Shu complex, which contains Rad51 paralogues, promotes DNA repair through inhibition of the Srs2 anti-recombinase // *Mol. Biol. Cell.* 2011. V. 22. P. 1599–1607.
83. Ковальцова С.В., Грачева Л.М., Евстюхина Т.А. и др. Гены-мутаторы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Взаимодействие между *him* и *hsm* генами // *Генетика.* 1996. Т. 32. № 7. С. 927–932.
84. Stafa A., Donnianni R.A., Timashev L.A. et al. Template switching during break-induced replication is promoted by the Mph1 helicase in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genetics.* 2014. V. 196. P. 1017–1028.
<https://doi.org/10.1534/genetics.114.162297>
85. Zheng X.-F., Prakash R., Saro D. et al. Processing of DNA structures via DNA unwinding and branch migration by the *S. cerevisiae Mph1* protein // *DNA Repair (Amst.).* 2011. V. 10. № 10. P. 1034–1043.
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2011.08.002>
86. Dohrmann P.R., Sclafani R.A. Novel role for checkpoint Rad53 protein kinase in the initiation of chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Gen. Soc. of America.* 2006. № 174. P. 87–99.
<https://doi.org/10.1534/genetics.106.060236>
87. Chabes A., Georgieva B., Domkin V. et al. Survival of DNA damage in yeast directly depends on increased dNTP levels allowed by relaxed feedback inhibition of ribonucleotide reductase // *Cell.* 2003. V. 112. P. 391–401.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00075-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00075-8)

The DNA Damage Tolerance in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*

E. A. Alekseeva^{a, *} and V. G. Korolev^a

^a*Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre "Kurchatov Institute", Leningrad oblast, Gatchina, 188300 Russia*

**e-mail: alekseeva_ea@npi.nrcki.ru*

In eukaryotes, DNA damage tolerance (DDT) is mediated by two mechanisms. The first is mediated by proteins of homologous recombination repair (HRR). The second is under the control of the *RAD6*-epistatic group of genes, and is divided into two more paths: error-free and error-prone. The error-prone mechanism called translesion synthesis (TLS) is carried out by specialized TLS-DNA polymerases. TLS is a significant source of mutational changes in DNA. On the contrary, in the implementation of the *RAD6*-dependent error-free DDT mechanism, a relatively higher accuracy of DNA synthesis is provided due to the use of an intact sister chromatid or a homologous chromosome as a template for the continuation of replication. In this case, after stopping the replication fork at the damage, the 3'-end of the synthesized strand is transferred to an intact homologous DNA molecule, the synthesis continues for some length on a new template, and then the elongated strand is transferred back to the original chromatid. Inactivation of most of the genes that control the error-free DDT mechanism either does not affect the level of UV-induced mutagenesis or decreases it. Exceptions include genes belonging to the epistatic group *HSM3*. Mutations in the genes of this group lead to a significant increase in the frequency of UV-induced mutagenesis. In this review, the authors consider an unmistakable branch of DDT and attempt to substantiate the role of genes of the *HSM3*-epistatic group in a series of molecular events that lead to an unmistakable bypass of replication blocking lesions in budding yeast.

Keywords: DNA damage tolerance, post-replicative repair, replication, DNA damage, UV-induced mutagenesis.

ОБЗОРНЫЕ
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 575.222.73:633.111.1:633.289

ИНТРОГРЕССИВНАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ:
РЕЗУЛЬТАТЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

© 2021 г. И. Г. Адонина¹, *, Е. М. Тимонова¹, Е. А. Салина¹

¹Курчатовский геномный центр, Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

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

Поступила в редакцию 06.05.2020 г.

После доработки 29.07.2020 г.

Принята к публикации 17.08.2020 г.

Данный обзор посвящен интрогрессивной гибридизации мягкой пшеницы, процессу интеграции в ее геном генов других культурных или дикорастущих видов из вторичного и третичного генных пулов с целью увеличения генетического разнообразия этой важнейшей сельскохозяйственной культуры. Обобщены результаты, достигнутые в интрогрессивной гибридизации мягкой пшеницы за последние 20 лет, проанализировано распределение чужеродных транслокаций по субгеномам и по хромосомам мягкой пшеницы, обсуждаются возможности дальнейшего развития данного направления исследований и селекции, базирующейся на использовании чужеродного генетического материала.

Ключевые слова: мягкая пшеница, интрогрессивная гибридизация, вторичный генный пул, третичный генный пул.

DOI: 10.31857/S0016675821030024

Впервые термины “интрогрессия”, “интрогрессивная гибридизация” были использованы американским генетиком Андерсоном [1, 2]. Под чужеродной интрогрессией обычно понимают перенос в геном какого-либо биологического вида генетической информации от другого вида, а в селекции растений — это интеграция в геном культурных растений генов других культурных или дикорастущих видов. Интрогрессивная гибридизация играет значительную роль в эволюции растений. Поэтому всестороннее изучение данного явления — важное направление исследований в генетике растений. Однако прежде всего интрогрессивная гибридизация — это один из способов увеличения генетического разнообразия культурных растений и, в частности, такой важнейшей сельскохозяйственной культуры как мягкая, или хлебная пшеница (*Triticum aestivum* L., $2n = 6x = 42$).

Дикие и культурные виды, родственные *T. aestivum*, условно можно отнести к нескольким генным пулам [3]. Виды, принадлежащие к первичному генному пулу, имеют геномы, гомологичные субгеномам А, В и D мягкой пшеницы. Эта группа включает, прежде всего, виды пшениц подрода *Triticum* [4]: *T. urartu* Thum. ex Gandil. ($2n = 2x = 14$; геном A^uA^u), относящийся к секции Urartu Dorof et A. Filat., чей геном наиболее близок субгеному А

T. aestivum; 11 тетраплоидных видов секции *Dicoccoides* Flaksb. и гексаплоидные виды секции *Triticum*. Также к первичному генному пулу Фрибе с соавт. [3] отнесли диплоидные виды секции *Monococcon* Dum. подрода *Boeoticum* [4]: *T. monococum* L., *T. boeoticum* Boiss., *T. sinskajae* A. Filat. et Kurk. (геном A^bA^b) и диплоидный вид рода *Aegilops* L. [5], *Aegilops tauschii* Coss. ($2n = 2x = 14$; геном DD), из секции *Vertebrata* Zhuk. Emend. Kihara. Перенос генов от этих видов может быть осуществлен путем прямой гибридизации, гомологичной рекомбинации, беккроссирования и отбора.

Вторичный генный пул включает полиплоидные виды пшениц и эгилопсы, имеющие, по крайней мере, один геном, гомеологичный субгеномам А, В, D *T. aestivum*. В эту группу, например, входят тетраплоидные виды секции *Timopheevi* Filat. et Dorof. [4]: *T. timopheevii* (Zhuk.) Zhuk. и *T. araraticum* Jakubz., диплоидные виды *Aegilops* L. секции *Sitopsis* (Jaub. & Spach.) Zhuk. [5], S-геном которых близок В-субгеному *T. aestivum*. Перенос генов от этих видов в мягкую пшеницу возможен за счет рекомбинации гомеологичных хромосом.

Виды, относящиеся к третичному генному пулу, считаются более отдаленными родственниками пшеницы. Хромосомы их геномов негомологичны хромосомам мягкой пшеницы. Перенос генов

от этих видов затруднен и требует применения других стратегий.

В результате скрещивания мягкой пшеницы с видами вторичного и третичного генных пулов могут быть получены амфиплоиды (полный набор хромосом пшеницы и полный или частичный набор хромосом другого вида) и следующие типы линий: дополненные линии (полный набор хромосом пшеницы и дополнительная пара чужеродных хромосом), замещенные линии (пара хромосом пшеницы замещена на пару чужеродных хромосом), транслоцированные линии (одна или несколько хромосом пшеницы содержат чужеродные транслокации). Перенос генетического материала от отдаленных видов во многих случаях происходит поэтапно от дополненных и замещенных линий к линиям, несущим относительно небольшие транслокации (меньше размера плеча) с целевым геном. Стремление уменьшить размеры чужеродных транслокаций, насколько это возможно, связано с тем, что вместе с целевым геном зачастую переносится большое количество другого генетического материала, который может отрицательно влиять на хозяйственно ценные свойства пшеницы.

Первые попытки получения гибридов между пшеницей и ее дикими или культивируемыми видами-сородичами были предприняты в конце XIX в. [6]. Первоначально целью экспериментов по интрогрессивной гибридизации было изучение вопросов эволюции и происхождения видов, процесса спаривания хромосом в мейозе. Однако основной целью гибридизации являлось создание пшеницы с исключительными свойствами. В перспективе представлялось, что данный подход обеспечит гораздо более широкие возможности для обогащения генома пшеницы, чем традиционная селекция. Своего пика интрогрессивная гибридизация достигла во второй половине XX в. Этому способствовали развитие молекулярной генетики и цитогенетики, работы по секвенированию геномов злаков. Вначале проводилась только цитологическая характеристика интрогрессивных линий, которая ограничивалась описанием митотических хромосом и поведения хромосом в мейозе, а сам факт интрогрессии чужеродного генетического материала устанавливался по появлению новых признаков, например устойчивости к заболеванию.

Бурное развитие методов хромосомного анализа растений [7], таких как дифференциальное окрашивание, в частности С-бэндинг; различные модификации *in situ* гибридизации (GISH – геномная *in situ* гибридизация, FISH – флуоресцентная *in situ* гибридизация с использованием различных повторяющихся последовательностей ДНК в качестве зондов); микродиссекция и сортинг хромосом; геномное секвенирование; разработка разнообразных молекулярных маркеров; построение генетиче-

ских карт, позволило полнее описывать геномную конституцию у межвидовых гибридов, идентифицировать чужеродные хромосомы и характеризовать транслокации. Все это привело к получению широкого разнообразия линий пшеницы с интрогрессиями различных типов от разных доноров.

Наш обзор – это обобщение данных по гибридизации мягкой пшеницы с родственными видами вторичного и третичного генных пулов за последние 20 лет. Мы проанализировали распределение чужеродных транслокаций по субгеномам и по хромосомам мягкой пшеницы. Мы также попытались оценить возможности дальнейшего развития интрогрессивной гибридизации пшеницы. Аналогичного обзора в русскоязычной литературе нами не найдено. Поэтому мы надеемся, что данный обзор будет интересен для специалистов в области генетики пшеницы и особенно для селекционеров.

ВИДЫ, ОТНЕСЕННЫЕ КО ВТОРИЧНОМУ ГЕННОМУ ПУЛУ, КАК ИСТОЧНИКИ НОВЫХ ГЕНОВ

Гибридизация мягкой пшеницы с T. timopheevii и T. araraticum

T. timopheevii и *T. araraticum* относятся к вторичному генному пулу. Субгеном А¹ этих видов родственен субгеному А мягкой пшеницы, а субгеном G – субгеному В. Как следствие этого, для *T. aestivum* получен полный спектр замещенных линий с участием *T. timopheevii*: с замещением хромосом субгенома А на хромосомы субгенома А¹ *T. timopheevii*, хромосом субгенома В на хромосомы субгенома G, а также линии с замещением хромосом субгенома D на хромосомы субгеномов А¹ или G [8]. Интрогрессии генетического материала *T. timopheevii* и *T. araraticum* в геном мягкой пшеницы в виде транслокаций представлены в табл. 1. По меньшей мере девять генов устойчивости к грибным заболеваниям перенесены от этих видов в геном *T. aestivum* (табл. 1): *Lr18*, *Lr50*, *LrSelG12*, *LrTt1* – гены устойчивости к листовой ржавчине (*Puccinia triticina* Erikss.); *Pm6*, *Pm27* – гены устойчивости к мучнистой росе (*Blumeria graminis* DC.); *Sr36*, *Sr37*, *Sr40* – гены устойчивости к стеблевой ржавчине (*Puccinia graminis* Pers.).

Пшенично-эгилопсные интрогрессии. Интрогрессии от эгилопсов секции Sitopsis

Очень интенсивно в гибридизацию с мягкой пшеницей вовлекаются виды рода *Aegilops*. Это объясняется, с одной стороны, тем, что в трибе Triticeae род *Aegilops* является наиболее близким к роду *Triticum*. А с другой стороны, – эгилопсы характеризуются значительным генетическим полиморфизмом. Первенство по количеству полу-

Таблица 1. Транслокации от *T. timopheevii* и *T. araraticum* в геноме мягкой пшеницы

Хромосома	Транслокации	Хозяйственно ценные гены	Ссылки
1A	T1AL-1A ¹ L.1A ¹ S		[9]
2A	2AS-2A ¹ S.2A ¹ L-2AL	<i>LrTt1</i>	[9]
3A	T3AL.3A ¹ L		[8]
	T3AL.3A ¹ S		[8]
7A	T7AL.7A ¹ S		[8]
	T7AS.7A ¹ L		[8]
2B	T2BL.2GS		[8]
	T2B/2G	<i>Sr36/Pm6, Lr50</i>	[3, 10]
	T2BS-2GS.2GL-1BL		[9]
	T2BL/2GS (<i>T. araraticum</i>)	<i>Sr40</i>	[3]
3B	T3BS.3GL		[8]
	T3BS.3BL-3GL	<i>LrSelG12</i>	[11]
4B	T4BS.4GL		[8]
	T4B/4G	<i>Sr37</i>	[3]
5B	T5BS.5BL-5GL	<i>Lr18</i>	[3]
	T5BS.5GL		[12]
	T5BS.5BL-5GL	<i>LrTt1</i>	[9]
6B	T6BS.6GL		[9, 12]
	T6B/6G	<i>Pm27</i>	[13]
7D	T7DS.7A ¹ L		[8]

Примечание (для табл. 1–8). *Lr* – гены устойчивости к листовой ржавчине (*Puccinia triticina* Erikss.); *Sr* – гены устойчивости к стеблевой ржавчине (*Puccinia graminis* Pers.); *Pm* – гены устойчивости к мучнистой росе (*Blumeria graminis* DC.).

ценных с их участием различных замещенных и транслоцированных линий пшеницы принадлежит эгилопсам секции *Sitopsis* (табл. 2), особенно выделяется *Ae. speltooides*, считающийся наиболее вероятным донором В-субгенома *T. aestivum* [32]. Значительное число генов устойчивости к различным болезням и вредителям передано пшенице от эгилопсов этой секции (табл. 2).

ВИДЫ, ОТНЕСЕННЫЕ К ТРЕТИЧНОМУ ГЕННОМУ ПУЛУ, КАК ИСТОЧНИКИ НОВЫХ ГЕНОВ

Интрогрессии в геном мягкой пшеницы от эгилопсов, не относящихся к секции Sitopsis

Интрогрессии от эгилопсов, не относящихся к секции *Sitopsis*, представлены в табл. 3.

Стоит отметить, что интрогрессивные линии, полученные с участием видов *Aegilops*, очень разнообразны и зачастую характеризуются уникальными

признаками, которых нет у пшеницы. И даже если в настоящее время эти линии не так интенсивно используются, их качества могут быть оценены в будущем. Так, например, *Ae. speltooides* стал источником генов устойчивости (*Sr32* и *Sr39*) к расе стеблевой ржавчины Ug99, появившейся в 1999 г. [48–50]. Получение транслокации T2AL.2AS-2N^VS от *Ae. ventricosa* и внедрение ее в селекционные программы позволило остановить распространение пирикулярриоза в странах Азии, в частности в Бангладеш [44, 51]. Интересным фактом является то, что значительный процент линий мягкой пшеницы, вовлеченных в селекционные программы CIMMYT, содержит сегмент 2N^VS, который помимо устойчивости к пирикулярриозу обеспечивает повышенное содержание цинка в зерне [43, 52, 53]. Возможно, транслокация T2AL.2AS-2N^VS окажет значительное влияние на селекцию и производство пшеницы, как это произошло с пшенично-ржаной транслокацией 1BL.1RS.

Таблица 2. Транслокации и замещения хромосом, полученные с участием видов *Aegilops* секции Sitopsis

Хромосома	Транслокации, замещения	Хозяйственно ценные гены (признаки)	Ссылки
1A	T1AS.1AL-1SL	<i>Lr51</i>	[14]
2A	T2AL.2SL-2SS	<i>Sr32</i>	[3]
3A	T3AL.3AS-3SS		[15]
	T3A-3S	<i>Lr66</i>	[16]
	T3AS.3SL		[17]
	T3AL.3SS		[17]
	T3AL.3S ^S S (<i>Ae. searsii</i>)	<i>Sr51</i>	[18]
4A	T4AS-4AL-7SS	<i>Lr28</i>	[3]
6A	T6AL.6SS	<i>Pm12</i>	[17]
	T6AL-6S ^{sh} L.6S ^{sh} S (<i>Ae. sharonensis</i>)	<i>Lr56/Yr38</i>	[19]
7A	T7AS-7SS.7SL	<i>Gb5, Lr47</i>	[3]
	T7AS-7SS-7AS.7AL	<i>Lr47</i>	[20]
	T7AS.7AL-7SL-7AL	<i>Lr47</i>	[20]
1B	1S(1B)		[21]
	T1BL.1BS-1SS		[22, 23]
	T1BS.1BL-1SL	<i>Lr51</i>	[14]
	T1BL.1SS	<i>Pm32</i>	[24]
	T1BS.1SL		[17]
	1BL.1S ^S S (<i>Ae. longissima</i>)		[25]
2B	T2BL/2SS	<i>Sr32</i>	[3]
	T2B/2S	<i>Lr35/Sr39</i>	[3]
	T2BL-2SL.2SS	<i>Sr47</i>	[26]
	T2BL.2SS		[17]
	T2BS.2SL		[17]
	T2BS.2BL-2S	<i>Pm57</i>	[27]
3B	T3BL.3BS-3SS (<i>Ae. longissima</i>)	<i>Pm13</i>	[3]
	T3BL.3S ^S S (<i>Ae. searsii</i>)	<i>Sr51</i>	[18]
4B	T4BL.4SS		[17]
5B	T5BS.5BL-5SL	<i>LrAsp5</i>	[22]
	T5BL.5SS		[17]
	T5BS.5SL		[17]
	T5BS.5BL-5SL		[21]
	T5BS/5SL	<i>Pm53</i>	[28]

Таблица 2. Окончание

Хромосома	Транслокации, замещения	Хозяйственно ценные гены (признаки)	Ссылки
6B	T6BS.6BL-6SL		[22]
	T6BS-6SS.6SL	<i>Pm12</i>	[29]
	T6BS	<i>Lr36</i>	[30]
	T6BS.6SL		[17]
	T6BL.6BS-6SS		[21]
	T6B (<i>Ae. sharonensis</i>)	(устойчивость к листовой и стеблевой ржавчинам)	[31]
7B	T7BL.7SS		[17]
	T7BS.7SL		[17]
1D	T1DS.1DL-1SL		[21]
2D	T2DL-2SL.2SS	<i>Sr32</i>	[3]
	T2DS.2SL	<i>LrSp2</i>	[12]
	T2DS.2DL-2SL		[21]
3D	T3DS.3DL-3SL		[21]
	T3DL.3DS-3S ¹ S (<i>Ae. longissima</i>)	<i>Pm13</i>	[3]
	T3DL.3S ⁸ S (<i>Ae. searsii</i>)	<i>Sr51</i>	[18]
	T3DS-3S ⁸ S.3S ⁸ L (<i>Ae. searsii</i>)	<i>Sr51</i>	[18]
4D	4S(4D)		[21]
5D	T5DS.5SL		[17]
7D	7S(7D)		[15]
	T7SS.7SL-7DL		[23]
	T7DL-7SL.7SS		[21]

Примечание. *Yr* – гены устойчивости к полосатой (желтой) ржавчине (*Puccinia striiformis* Westend.); *Gb* – гены устойчивости к тле (*Schizaphis graminum* Rond.).

Интрогрессии в геном мягкой пшеницы от ржи (*Secale L.*)

Из 14 хромосомных плеч ржи только пять (1RS, 1RL, 2RL, 3RS, и 5RS) коллинеарны пшеничным, остальные перестроены [54, 55]. Поэтому транслокации с участием других хромосом были получены в основном с использованием ионизирующего облучения (табл. 4). До настоящего времени наиболее успешными в плане использования в селекции являются транслокации 1AL.1RS и 1BL.1RS.

Интрогрессии в геном мягкой пшеницы от многолетних видов *Triticaceae*

С участием многолетних видов трибы *Triticaceae* получены дополненные, замещенные линии мягкой пшеницы, линии с различными транслокациями (табл. 5–8). Поскольку систематика мно-

голетних видов трибы *Triticaceae* достаточно сложна и продолжает изменяться с получением новой информации об организации геномов этих видов, мы решили придерживаться наиболее часто используемой в настоящее время номенклатуры [97]. Интерес к этим видам был связан главным образом с надеждой на создание многолетней пшеницы. В основном для реализации этой цели использовались различные виды пырея: пырей удлиненный (*Thinopyrum elongatum*), пырей бессарабский (*Th. bessarabicum*), пырей прутьевидный (*Th. junceum*), пырей средний (*Th. intermedium*), пырей понтийский (*Th. ponticum*). Наиболее широкое применение в качестве доноров полезных признаков получили виды: пырей средний (*Th. intermedium*, синоним *Agropyron glaucum*) и пырей понтийский (*Th. ponticum*). Однако многолетний цикл жизни – сложный признак, носит количественный характер. Оказалось, что гибридные формы становятся многолетними только если доля генома, полученно-

Таблица 3. Транслокации и замещения хромосом, полученные с участием разных видов *Aegilops*

Хромосома	Транслокации, замещения	Вид	Хозяйственно ценные гены (признак)	Ссылки
1A	T1AS-1 ^{Aep} L	<i>Ae. peregrina</i>	<i>Lr59</i>	[33]
2A	T2AS-2ML.2MS	<i>Ae. comosa</i>	<i>Yr8/Sr34</i>	[3]
	T2AS	<i>Ae. ventricosa</i>	<i>Cre5</i>	[34]
	T2AL.2AS-2N ^V S	<i>Ae. ventricosa</i>	<i>Rkn3, Yr17, Lr37, Sr38, Cre5;</i> (устойчивость к пирикуляриозу)	[35, 43, 44]
5A	5N ^V (5A)	<i>Ae. ventricosa</i>	<i>Cre6</i>	[36]
6A	T6AL-6 ^{Aen} L.6 ^{Aen} S	<i>Ae. neglecta</i>	<i>Lr62</i>	[37]
	T6AL-6 ^{Aen} L.6 ^{Aen} S	<i>Ae. neglecta</i>	<i>Yr42, Lr62</i>	[37]
1B	1BS.1BL-2S ^V	<i>Ae. peregrina</i>	<i>CreX</i>	[45]
2B	2U(2B)	<i>Ae. umbellulata</i>	<i>PmY39</i>	[38]
	T2BS.2BL-2U ^L	<i>Ae. triuncialis</i>	<i>Lr58</i>	[39]
3B	T3BS.3BL-3S ^V	<i>Ae. peregrina</i>	<i>CreY, Rkn2</i>	[45]
4B	T4BL.4BS-6UL	<i>Ae. umbellulata</i>	<i>Lr9</i>	[3]
6B	T6BS.6BL-6UL	<i>Ae. umbellulata</i>	<i>Lr9</i>	[3]
	T6BL.6BS-6UL	<i>Ae. umbellulata</i>	<i>Lr9</i>	[3]
7B	T7BL.7BS-6UL	<i>Ae. umbellulata</i>	<i>Lr9</i>	[3]
2D	T2DS.2DL-6UL	<i>Ae. umbellulata</i>	<i>Lr9</i>	[3]
	T2DS.2DL-2UL	<i>Ae. umbellulata</i>		[21]
	T2DS-2ML.2MS	<i>Ae. comosa</i>	<i>Yr8/Sr34</i>	[3]
	T2DL	<i>Ae. kotschyi</i>	<i>Yr37/Lr54</i>	[40]
5D	T5DL.5DS-5M ^S S	<i>Ae. geniculata</i>	<i>Lr57, Yr40</i>	[41]
	T5DL-5M ^S L.5M ^S S	<i>Ae. geniculata</i>	<i>Sr53</i>	[42]
	T5DL.5DS-5US	<i>Ae. umbellulata</i>	<i>Lr76, Yr70</i>	[46]
7D	7N ^V (7D)	<i>Ae. ventricosa</i>	<i>Cre2, Pch1</i>	[36, 43]
	T7DL.7DS-7US	<i>Ae. umbellulata</i>		[21]
	T7DS	<i>Ae. geniculata</i>	<i>Pm29</i>	[47]

Примечание. *Yr* – гены устойчивости к полосатой (желтой) ржавчине (*P. striiformis*); *Cre* – гены устойчивости к корневой нематоды (*Heterodera avenae* Woll.); *Rkn* – гены устойчивости к корневой нематоды (*Meloidogyne* spp.); *Pch* – гены устойчивости к церкоспореллезу (глазковая пятнистость) (*Tapesia yallundae* Wallwork & Spooner).

го от многолетних родителей, значительна [97]. В последние годы появилась тенденция создания многолетних крупнозерных сортов пырея [98–100], однако пока такой подход вызывает много вопросов. Среди диких злаков пырей средний обладает наиболее крупным зерном. В США был создан сорт Kernza, урожайность которого составляет около 30% от урожайности мягкой пшеницы [98, 101]. В Омске создан крупнозёрный сорт пырея Сова, с урожайностью 11–12 центнеров зерна с гектара (Шамагин, неопубликованная информация).

Интрогрессии в геном мягкой пшеницы от ячменя (*Hordeum vulgare* L.)

Ячмень имеет много характеристик, которые могут быть полезны для пшеницы, например раннеспелость, повышенное содержание β-глюканов в зерне, благоприятный аминокислотный состав, устойчивость к засолению и засухе и т.д. Однако одна из основных проблем, возникающих при попытке получения гибридов пшеницы и ячменя, – ядерно-цитоплазматическая несовместимость.

Долгое время изучение пшенично-ячменных гибридов шло по пути создания дополненных и

Таблица 4. Транслокации от ржи в геноме мягкой пшеницы

Хромосома	Транслокации	Хозяйственно ценные гены (признаки)	Ссылки
1A	T1AL-1RS	<i>Gb2/Pm17</i>	[3]
	T1AL.1RS	<i>Gb6</i>	[3]
2A	T2AL-2AS-1RS	<i>Gb6</i>	[3]
	T2AS-1RS-1RL	<i>Gb6</i>	[3]
	T2AS-2RS.2RL	<i>Lr45</i>	[3]
3A	T3AS.3RS	<i>Sr27</i>	[3]
	T3AL-3RS	<i>Sr27</i>	[3]
4A	T4AS.4AL-6RL-4AL	<i>H25</i>	[3]
6A	T6AL.6RS	<i>Pm56</i>	[56]
7A	T7AS.4RS		[57]
1B	T1BL.1RS	<i>Pm8/Sr31, Lr26/Y49; PmCn17; YrCN17, Sr50 (ранее SrR), Sr1RS^{Amigo}</i>	[3, 58–60]
	T1BL.1RS (<i>S. africanum</i>)	<i>Yr9</i>	[61]
2B	T2BS-2RL	<i>H21</i> , (устойчивость к мучнистой росе и листовой ржавчине)	[3, 62]
3B	T3BL.3RS	<i>Sr27</i>	[3]
4B	T4BS.4BL-2RL	<i>Lr25/Pm7</i>	[3]
	T4BS.4BL-6RL	<i>H25</i>	[3]
	T4BL.4RL	(устойчивость к мучнистой росе)	[57]
6B	T6BS-6RL	<i>Pm20, Cre10, Yr83</i>	[3, 63]
	T6BS.6BL-6RL	<i>H25</i>	[3]
2D	T2DS.2RL	<i>Sr59</i>	[64]

Примечание. *Gb* – гены устойчивости к тле (*S. graminum*); *H* – гены устойчивости к гессенской мухе (*Mayetiola destructor* (Say)); *Yr* – гены устойчивости к полосатой (желтой) ржавчине (*P. striiformis*); *Cre* – гены устойчивости к корневой нематоде (*H. avenae*).

Таблица 5. Транслокации от *Thinopyrum elongatum* в геноме мягкой пшеницы

Хромосома	Транслокации	Хозяйственно ценные гены (признаки)	Ссылки
1A	T1AS.1EL		[65]
3A	T3AS.3AL-3EL	(солеустойчивость)	[66]
6A	T6AS.6AL-6EL	<i>Sr26, SrB</i>	[3, 67]
1B	T1BL.1BS-3EL	<i>Sr24/Lr24</i>	[3]
5B	T5BL.6ES	<i>Cmc2</i>	[3]
3D	T3DS-3DL-3EL	<i>Sr24/Lr24</i>	[3]
4D	T4DS.4DL-1EL	(WSMR)	[3]
6D	T6DS		[68]
7D	T7DS.7DL-7EL-7DL		[3]
	T7DL-7EL.7ES	<i>Lr19/Sr25/Sr43</i>	[3]
	T7DS.7DL-7EL	<i>Lr19/Sr25/Sr43</i>	[3]
	T7DS-7EL	<i>Lr19/Sr25/Sr43</i>	[3]

Примечание. *Cmc* – гены устойчивости к клещу (*Eriophyes tulipae* Keifer); WSMR – устойчивость к вирусу полосатой мозаики пшеницы.

Таблица 6. Транслокации и замещения хромосом, полученные с участием *Thinopyrum intermedium*

Хромосома	Транслокации, замещения	Хозяйственно ценные гены (признаки)	Ссылка
2A	T2AS.2AL-7AiL	<i>Lr38</i>	[3]
5A	T5AL.5AS-7AiL	<i>Lr38</i>	[3]
7A	T7AL.7AS-7AiS		[69]
1B	T1BS-7AiS.7AiL	(BYDR)	[3]
	T1BL.1BS-3Ai	<i>YrCH-1BS</i>	[70]
4B	T4BL	<i>Yr50</i>	[71]
6B	T6BS.6AiL	(устойчивость к мучнистой росе и полосатой ржавчине)	[72]
7B	T7BS	<i>Pm40</i>	[73]
1D	T1DS.1DL-7AiL	<i>Lr38</i>	[3]
	1S ^t (1D)	(устойчивость к полосатой ржавчине)	[74]
2D	T2DL	<i>Pm43</i>	[75]
3D	T3DL.3DS-7AiL	<i>Lr38</i>	[3]
4D	T4DL.4AiS	(WSMR)	[3]
6D	T6DS.6DL-7AiL	<i>Lr38</i>	[3]
	6Ai(6D)	<i>Lr6Ai#2</i>	[76]
7D	T7DS-7AiL.7AiS	<i>Sr</i> , (BYDR)	[3]
	T7DS-7AiS.7AiL	(BYDR)	[3]
	7DS.7DL-7EL	<i>Bdv3</i>	[77]
	7E(7D)	<i>Bdv3</i>	[78]
	T7DS-7AiL.7AiS.7AiL	<i>Sr44</i>	[3]
	7DL.7AiS	<i>Sr44</i>	[79]

Примечание. BYDR – устойчивость к вирусу желтой карликовости ячменя; *Yr* – гены устойчивости к полосатой (желтой) ржавчине (*P. striiformis*); WSMR – устойчивость к вирусу полосатой мозаики пшеницы; *Bdv* – гены устойчивости к вирусу желтой карликовости ячменя.

замещенных линий [102]. Затем были получены рекомбинантные интрогрессивные линии пшеницы с транслокациями целых плеч и сегментов хромосом, а также серии линий с фрагментами разного размера от хромосом 1Н, 3Н, 4Н, 5Н, 6Н, 7Н [102–107]. Набор таких линий позволил провести физическое и генетическое картирование хромосом ячменя, однако в селекционных программах большая часть полученных линий не используется.

ОСОБЕННОСТИ ИНТРОГРЕССИВНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

С целью выявления возможных закономерностей в интрогрессивной гибридизации мягкой пшеницы мы проанализировали данные за период с 1996 г. по 2018 г. (табл. 1–8). Результаты проведенного анализа показывают, что больше всего чужеродных транслокаций, полученных с участием

видов, относящихся к вторичному генному пулу, выявляется в хромосомах субгенома В (рис. 1,а), а с участием видов третичного генного пула – в хромосомах субгенома D (рис. 1,б). Это в первую очередь объясняется тем, что геномы соответствующих видов наиболее близки к субгеномам пшеницы В и D. Наименьшая частота чужеродных интрогрессий наблюдается по хромосомам 4А, 5А (рис. 2). Одной из причин этого может быть наличие в геноме мягкой пшеницы транслокации 4AL/5AL/7BS, а также перичентрической и парацентрической инверсий хромосомы 4А [108, 109], перестроек, произошедших в эволюционной истории пшениц на уровне тетраплоидного предшественника гексаплоидной пшеницы. Значительное число транслокаций, полученных с участием видов, относящихся к вторичному генному пулу, в хромосомах 2В и 6В (рис. 2,а) объясняется, скорее всего, тем, что виды *Aegilops* секции *Sitopsis*, принадлежащие к данному генному пулу и являющиеся

Таблица 7. Транслокации от *Dasyphyrum villosum* в геноме мягкой пшеницы

Хромосома	Транслокации	Хозяйственно ценные гены (признак)	Ссылки
5A	T5AL.6VS	<i>Pm55</i>	[80]
6A	T6AL.6VS	<i>Pm21</i>	[81, 82]
	T6AS.6VL	<i>CreV, Sr52, Pm5</i>	[81, 83, 84]
1B	T1BL.1VS		[80]
2B	T2BS.2VS	<i>Pm62</i>	[85]
6B	T6BS.6BL-2VS		[86]
1D	T1DL.1VS		[81]
	T1DL.1VL		[80]
2D	T2DL.2VS		[87]
	T2DS.2VL		[80]
3D	T3DS.2VL		[86]
	T3DL.3VS		[81]
	T3DS.3VL		[81]
4D	T4DL.4VS	(WSSMVR)	[81, 88]
	T4DS.4VL		[81]
5D	T5DL.5VS	<i>Pm55</i>	[80, 81]
6D	T6DL.6VS	<i>Pm21</i>	[89]
7D	T7DL.2VS		[86]
	T7DL.7VS		[81]
	T7DS.7VL		[81]

Примечание. *Cre* – гены устойчивости к корневой нематодe (*H. avenae*); WSSMVR – устойчивость к вирусу веретеновидной полосатой мозаики пшеницы.

донорами большего числа из этих транслокаций, несут в соответствующих гомеологичных хромосомах гаметоцидные гены, имеющие преимущество при передаче потомству [110].

При обсуждении закономерностей интрогрессивной гибридизации мягкой пшеницы важно учитывать тот факт, что чаще всего проводится анализ гибридных линий, полученных селекцио-

нерами. Это значит, что исследуемые линии уже были отобраны по каким-то характеристикам. Наиболее часто такой характеристикой является устойчивость к биотическому стрессу. Многие чужеродные интрогрессии, представленные в табл. 1–8, выявлены именно в таких селекционных линиях. При анализе карты геномного распределения семейств генов пшеницы [111] можно

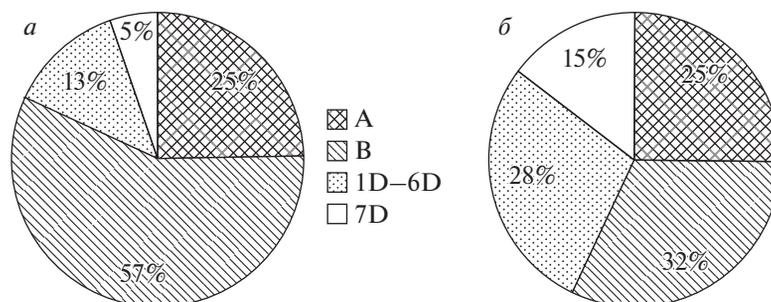


Рис. 1. Процентное распределение чужеродных транслокаций по субгеномам мягкой пшеницы: (а) транслокации от видов вторичного пула; (б) транслокации от видов третичного пула.

Таблица 8. Транслокации и замещение хромосом, полученные с участием разных многолетних видов

Хромосома	Транслокации	Вид	Хозяйственно ценные гены (признаки)	Ссылки
2A	T2AL	<i>Thinopyrum ponticum</i>		[68]
	T2AS	<i>Th. ponticum</i>	<i>Yr69</i>	[90]
7A	T7AL.7LrS	<i>Leymus racemosus</i>	<i>Fhb3</i>	[91]
1B	T1BL	<i>Th. ponticum</i>		[68]
2B	T2BL.2BS-2JS	<i>Th. bessarabicum</i>		[92]
3B	T3BL.3BS-3NsS	<i>Psathyrostachys huashanica</i>	(устойчивость к полосатой ржавчине)	[93]
4B	T4BS.4BL-7LrS	<i>L. racemosus</i>	<i>Fhb3</i>	[91]
	T4BL-7LrS.5LrS	<i>L. racemosus</i>		[91]
5B	T5BS	<i>Th. ponticum</i>		[68]
6B	T6BS.6BL-7LrS	<i>L. racemosus</i>	<i>Fhb3</i>	[91]
	T6BL.5LrS	<i>L. racemosus</i>		[91]
1D	T1DL	<i>Th. ponticum</i>		[68]
2D	T2DL	<i>Th. ponticum</i>	(гены карликовости)	[68, 94]
6D	6P(6D)	<i>A. cristatum</i>		[95]
7D	T7DS.7DL-7AeL	<i>Th. distichum</i>	<i>Lr19/Sr25</i>	[3]
	T7DL	<i>Th. ponticum</i>	<i>Fhb7</i>	[96]

Примечание. *Yr* – гены устойчивости к полосатой (желтой) ржавчине (*P. striiformis*); *Fhb* – гены устойчивости к фузариозу (*Fusarium* spp.).

заметить определенную положительную корреляцию между участками локализации генов (генных семейств), связанных с адаптацией к биотическому стрессу и распределением чужеродных интрогрессий. По-видимому, это связано с коллинеарностью хромосом пшеницы и хромосом родственных видов. Так, например, гены, связанные с адаптацией к биотическому стрессу, в хромосоме 1B сконцентрированы главным образом в ее коротком плече. Транслокации по этой хромосоме также в основном находятся в плече 1BS. Хромосома 4B обеднена генами устойчивости, почти все транслокации по этой хромосоме с генами устойчивости получены с использованием облучения и представляют собой фрагменты негомологичных хромосом других видов.

Среди всех хромосом по числу интрогрессий выделяется хромосома 7D (рис. 2). Наибольшее количество различных интрогрессивных линий получено с участием именно этой хромосомы, особенно это касается видов третичного генного пула. Возможно, одной из причин значительного числа замещений хромосомы 7D и наличия чужеродных транслокаций в хромосоме 7D является то, что хромосомы гомеологичной группы 7, кроме хромосомы 7B, играют незначительную роль в определении жизнеспособности и фертильности мягкой пшеницы по сравнению с хромосомами

других групп [112]. Следует отметить, что структурная организация хромосомы 7B значительно отличается от организации хромосом 7A и 7D из-за транслокации 4AL/5AL/7BS [108, 109]. По-видимому, с этим связано и то, что хромосома 7B характеризуется небольшим числом чужеродных интрогрессий (рис. 2).

Локализация и характеристики чужеродных транслокаций в значительной степени зависят от того, насколько геном донорного вида перестроен относительно генома пшеницы. Так, например, картирование хромосом *T. timopheevii* показало, что хромосомы 6A^t и 1G и дистальный район 3A^tL значительно перестроены [113], и транслокации с участием этих хромосом у мягкой пшеницы не выявлены. Геном *Ae. umbellulata* сильно перестроен относительно генома пшеницы [114], поэтому практически все интрогрессивные линии с участием этого вида получены при использовании радиационного облучения.

ПРОБЛЕМЫ ИНТРОГРЕССИВНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

Интрогрессивная гибридизация пшеницы сталкивается со многими проблемами.

- Получение интрогрессивных линий и в особенности создание сортов на их основе является

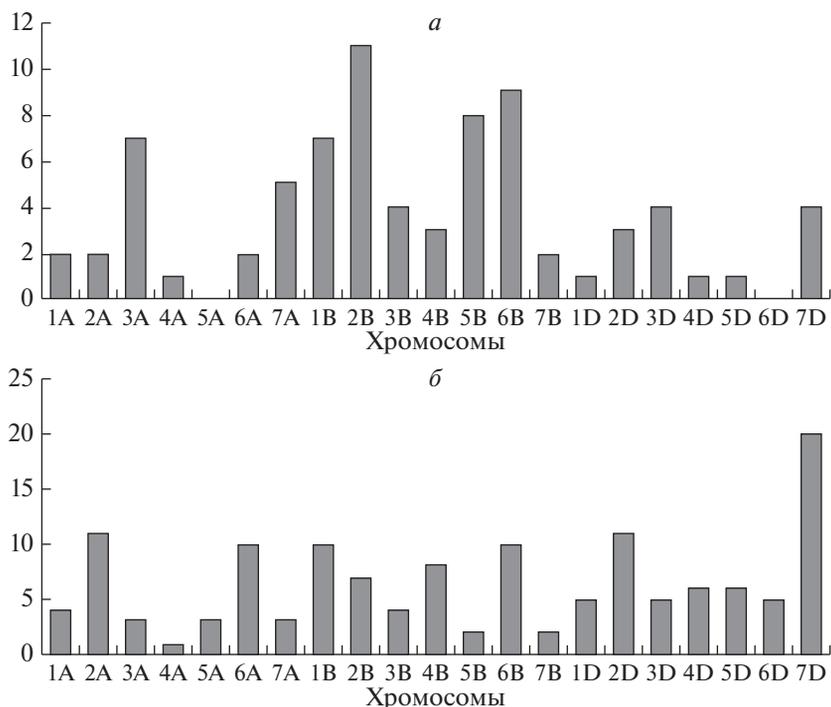


Рис. 2. Количественное распределение чужеродных транслокаций по хромосомам мягкой пшеницы: (а) транслокации от видов вторичного пула; (б) транслокации от видов третичного пула.

долгим и сложным процессом, даже несмотря на развитие технологий с использованием молекулярных маркеров для ускорения селекции.

- Вместе с целевым геном зачастую переносится большое количество избыточного генетического материала, который может отрицательно влиять на хозяйственно ценные свойства пшеницы.

- Чем больше эволюционное расстояние между видами, тем сложнее получить гибриды.

- Для переноса в пшеницу генов от видов, относящихся к третичному генному пулу, часто используют ионизирующее излучение, которое вызывает случайные хромосомные разрывы, из-за чего могут возникать генетически несбалансированные транслокации между негомеологичными хромосомами (участками хромосом), в результате чего потеря собственных генов не компенсируется генами донора.

- Еще одной проблемой, особенно когда в роли доноров генетического материала выступают виды рода *Aegilops*, являются гаметоцидные гены. Они считаются агрономически негативными, поскольку нарушают жизнеспособность гамет. Однако, с другой стороны, способность гаметоцидных генов элиминировать гаметы, несущие нежелательный аллель, может использоваться для отбора, если они связаны с генами, контролирующими полезные признаки [115]. Кроме того, гаметоцидные гены, как и ионизирующее излучение, используются для индукции разрыва донорских хромосом,

для стимуляции встройки чужеродных фрагментов в хромосомы пшеницы.

Существуют и другие проблемы, с которыми можно столкнуться при попытке улучшения свойств пшеницы с помощью интрогрессивной гибридизации. Это ядерно-цитоплазматическая несовместимость, изменение экспрессии чужеродного гена в новом генетическом окружении, возможная активация мобильных элементов [116]. В некоторых случаях чужеродные гены могут инактивироваться или не функционировать должным образом. Внесение чужеродного хроматина может изменять пространственную организацию генома и, как следствие, влиять на его функционирование. Следует отметить, что эти аспекты еще изучены совершенно недостаточно.

СОВРЕМЕННЫЙ СТАТУС ИНТРОГРЕССИВНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ ПШЕНИЦЫ

На настоящий момент получено значительное число разнообразных интрогрессивных линий. Большинство из них несут гены устойчивости к разным факторам биотического стресса. Однако в результате интрогрессивной гибридизации было создано лишь небольшое количество коммерческих сортов. Вероятно, лучшим примером успешности чужеродной интрогрессии является транслокация 1BL.1RS. Было подсчитано, что в период

с 1991 по 1995 г. 45% из 505 коммерческих сортов мягкой пшеницы в 17 странах мира имели транслокацию 1BL.1RS, которая обеспечила увеличение урожайности зерна за счет устойчивости к ржавчинным заболеваниям, повышение устойчивости к стрессу, больший вес зерна [6].

В Мексике был создан сорт Oasis 89, несущий ген *Lr19* от *Th. ponticum*, который оказался более урожайным, чем родительский сорт Yesoga 70 даже при отсутствии поражения ржавчиной [6]. В Индии сорта с сочетанием генов *Lr19* и *Sr25* приобрели популярность не только из-за устойчивости к ржавчине, но и благодаря повышенной продуктивности [97]. Сорта Plainsman V, Plainsman IV, Encore и Frontiersman (США), созданные с участием *Ae. ovata*, характеризовались увеличением содержания белка [6]. И, наконец, еще один яркий пример – китайский сорт Хяоуан 6, у которого хромосомы 2A и 7D содержат интрогрессии от *Th. ponticum* [97]. Благодаря устойчивости к болезням, экологической пластичности (высокая стабильность урожая в разных условиях) и хорошим хлебопекарным качествам Хяоуан 6 выращивался в качестве основного сорта в провинции Шэньси в течение 16 лет (1980–1995 гг.). Кроме того, на основе Хяоуан 6 в Китае было выведено более 50 новых сортов пшеницы. Эти сорта в свою очередь занимали более 20 млн га посевных площадей и увеличили производство зерна в общей сложности на 7.5 млн т.

В нашей стране тоже получен ряд успешных сортов мягкой пшеницы с чужеродными интрогрессиями, например:

- сорта селекции Самарского НИИСХ, Тулайковская 5, Тулайковская 10 и Тулайковская 100 с замещением хромосомы 6D на соответствующую хромосому пырея, 6Aⁱ(6D), характеризующиеся устойчивостью к листовой ржавчине и мучнистой росе [76, 117];

- сорт Фишт (Краснодарский НИИСХ им. П.П. Лукьяненко), с транслокациями 5BS.5GL, 6BS.6GL от *T. timopheevii* и замещением хромосом 1D, 6D на соответствующие хромосомы *Ae. tauschii* [12];

- сорт Челябин 75 (Челябинский НИИСХ) с транслокацией 2DS.2SL от *Ae. speltoides*, устойчивый к стеблевой ржавчине [115].

ПЕРСПЕКТИВЫ ИНТРОГРЕССИВНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ

Каковы перспективы интрогрессивной гибридизации в XXI в.?

В первую очередь необходимо развивать теоретические знания. Почти ничего не известно о том, как геном пшеницы взаимодействует с интрогрессивными генами и как он влияет на их функцию. Последние достижения в областях

геномики, транскриптомики, протеомики, эпигенетики, цитогенетики обещают дать необходимую информацию.

Важно сохранение уже созданных отдельными исследователями или селекционерами коллекций интрогрессивных линий и получение новых, поскольку потенциал многих родственных видов, например видов *Aegilops*, еще далеко не исчерпан.

До недавнего времени использование в селекции пшеницы потенциала отдаленных видов было недостаточно эффективным. Однако современные технологии генотипирования в сочетании со специфическими стратегиями скрещиваний значительно повысили результативность интрогрессивной гибридизации с участием видов вторичного и третичного генных пулов. Применение молекулярных маркеров и современных цитогенетических методов (FISH/GISH) позволяет обнаруживать, точно характеризовать перенесенные в пшеницу чужеродные фрагменты, а также отслеживать их судьбу в последующих скрещиваниях [43]. Особенно важно то, что в настоящее время с помощью молекулярных маркеров могут быть выявлены интестигиальные интрогрессии, не имеющие значимого фенотипического проявления [26]. Многие из последних работ направлены на уменьшение размеров фрагментов генетического материала отдаленных видов, которые были ранее перенесены в геном пшеницы или получены от новых скрещиваний. Это делается для снижения отрицательного влияния сопутствующего генетического материала, перенесенного вместе с полезными целевыми генами. Так, например, успешно проведены работы по уменьшению размеров транслокаций с целевыми генами устойчивости к вирусу полосатой мозаики *Wsm1* и *Wsm3* у ранее отобранных интрогрессивных линий пшеницы, у которых короткое плечо хромосомы 4D и длинное плечо хромосомы 7B были полностью замещены на плечи соответствующих гомеологичных хромосом *Th. intermedium* [118, 119]. Ни у с соавт. [50], используя мутантный (делеционный) локус *ph1b*, индуцировали рекомбинацию между хромосомами 2B мягкой пшеницы и 2S *Ae. speltoides*. В результате после скрининга популяции из 1048 растений было отобрано 40 рекомбинантных линий. Четыре из них содержали ген *Sr39* с размером прилегающего фрагмента 2.87–9.15% хромосомы эгилопса. Занг с соавт. [120, 121] также, используя локус *ph1b* и генотипирование с помощью SNP-маркеров, продемонстрировали алгоритм, позволяющий стимулировать и идентифицировать гомеологичную рекомбинацию между хромосомой 2B мягкой пшеницы и хромосомами 2S *Ae. speltoides* (генотипировано 83 рекомбинантных линии) и 2E *Th. elongatum* (генотипировано 67 рекомбинантных линий). И, наконец, группой ученых под руководством Джулии Кинг

была выполнена масштабная работа по получению интрогрессивных популяций для ряда видов злаков. На сегодняшний день ими получено и охарактеризовано с помощью SNP-маркеров 218 интрогрессий от *Amblyopyrum mutica* [122], 294 интрогрессированных фрагмента от *Ae. speltooides* [123], 276 интрогрессированных фрагментов от *T. timopheevii* [124] и 12 интрогрессированных фрагментов от *Th. bessarabicum* [125]. Хотя влияние большей части полученных фрагментов на фенотип еще не изучено, полученный материал, скорее всего, может оказаться полезным не только для решения задач селекции, но и в фундаментальных исследованиях. Например, созданные серии интрогрессивных линий позволяют строить физические и генетические карты высокого разрешения [43, 106, 123].

Помимо совершенствования технологий традиционной интрогрессивной гибридизации мягкой пшеницы все более актуальным становится использование новых оригинальных подходов в селекции растений. Так, например, применение в селекции синтетических гексаплоидных пшениц, полученных путем скрещивания различных тетраплоидных видов пшеницы с *Ae. tauschii*, позволяет использовать потенциал генетического разнообразия сразу двух видов [126]. Стабильные гексаплоидные синтетики затем успешно скрещиваются с сортами мягкой пшеницы. Перспективным методом внесения изменений в геном пшеницы является цисгенез — альтернатива трансгенезу, такая технология генетической модификации, при которой манипуляции происходят с использованием ДНК близкородственного вида, с которым возможен половой процесс [127]. В отличие от трансгенных такие растения не должны содержать репортерные и селективные гены, т.е. гены неродственных организмов и гены устойчивости к антибиотикам. Следует отметить, что все большие обороты в современном мире набирают технологии редактирования генома, особенно основанные на применении системы CRISPR/Cas9 [127].

В связи с расширением круга задач, усложнением методов интрогрессивной гибридизации мягкой пшеницы и других хозяйственно важных растений было даже предложено дать новое название этому направлению исследований — **интрогрессиомика (introgressiomics)** [128].

Таким образом, можно сделать вывод, что интрогрессивная гибридизация мягкой пшеницы имеет значительный потенциал дальнейшего развития и в XXI в.

Работа выполнена в рамках бюджетного проекта 0324-2019-0039-С-01, при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-016-00122.

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. Anderson E., Hubricht L. Hybridization in tradescantia. III. The evidence for introgressive hybridization // Amer. J. Bot. 1938. V. 25. P. 396–402.
2. Anderson E. Introgressive Hybridization. N.Y., 1949. 109 p.
3. Friebe B., Yiang J., Raupp W.J. et al. Characterization of wheat alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status // Euphytica. 1996. V. 91. P. 59–87.
4. Дорофеев В.Ф., Филатенко А.А., Мигушова Э.Ф. и др. Пшеница // Культурная флора СССР. Л.: Колос, 1979. Т. 1. С. 7–31.
5. van Slageren M.W. Wild Wheats: A Monograph of *Aegilops* L. and *Amblyopyrum* (Jaub., Spach.) Eig. (Poaceae). Wageningen Agricultural Univ., Intern. Center for Agricultural Research in the Dry Areas: Veenman Drukkers, Wageningen, 1994. 512 p.
6. Bedő Z., Láng L. Wheat breeding: Current status and bottlenecks // Alien Introgression in Wheat Cytogenetics, Molecular Biology, and Genomics / Eds Molnár-Láng M., Ceoloni C., Doležel J. Switzerland: Springer International Publ., 2015. P. 77–101. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-23494-6>
7. Бадаева Е.Д., Салина Е.А. Структура генома и хромосомный анализ растений // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2013. Т. 17. № 4/2. С. 1017–1043.
8. Бадаева Е.Д., Будашкина Е.Б., Билинская Е.Н., Пухальский В.А. Закономерности межгеномных замещений хромосом у межвидовых гибридов пшеницы и их использование для создания генетической номенклатуры хромосом *Triticum timopheevii* // Генетика. 2010. Т. 46. № 7. С. 869–886.
9. Leonova I., Budashkina E., Flath K. et al. Microsatellite mapping of a leaf rust resistance gene transferred to common wheat from *Triticum timopheevii* // Cereal Res. Commun. 2010. V. 38. P. 211–219. <https://doi.org/10.1556/CRC.38.2010.2.7>
10. Brown-Guedira G., Singh S., Fritz A. Performance and mapping of leaf rust resistance transferred to wheat from *Triticum timopheevii* subsp. *armeniicum* // Phytopathology. 2003. V. 93. P. 784–789. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.7.784>
11. Singh A.K., Sharma J.B., Singh P.K. et al. Genetics and mapping of a new leaf rust resistance gene in *Triticum aestivum* L. × *Triticum timopheevii* Zhuk. derivative ‘Selection G12’ // J. Genet. 2017. V. 96. P. 291–297.

12. Адонина И.Г., Леонова И.Н., Бадаева Е.Д., Салина Е.А. Генотипирование сортов мягкой пшеницы разных регионов России // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2016. Т. 20. № 1. С. 44–50. <https://doi.org/10.18699/VJ16.107>
13. Jarve K., Peusha H.O., Tsymbalova J. et al. Chromosomal location of a *T. timopheevii*-derived powdery mildew resistance gene transferred to common wheat // Genome. 2000. V. 43. P. 377–381. <https://doi.org/10.1139/g99-141>
14. Helguera M., Vanzetti L., Soria M. et al. PCR markers for *Triticum speltoides* leaf rust resistance gene *Lr51* and their use to develop isogenic hard red spring wheat lines // Crop Sci. 2005. V. 45. P. 728–734. <https://doi.org/10.2135/cropsci2005.0728>
15. Adonina I.G., Salina E.A., Efremova T.T., Pshenichnikova T.A. The study of introgressive lines of *Triticum aestivum* × *Aegilops speltoides* by *in situ* and SSR analyses // Plant Breed. 2004. V. 123. P. 220–224. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2004.00932.x>
16. Marais G.F., Bekker T.A., Eksteen A. et al. Attempts to remove gametocidal genes co-transferred to wheat with rust resistance from *Aegilops speltoides* // Euphytica. 2009. V. 171. P. 71–85. <https://doi.org/10.1007/s10681-009-9996-2>
17. Liu W., Koo D.-H., Friebe B., Gill B. A set of *Triticum aestivum*–*Aegilops speltoides* Robertsonian translocation lines // Theor. Appl. Genet. 2016. V. 129. P. 2359–2368. <https://doi.org/10.1007/s00122-016-2774-3>
18. Liu W.X., Jin Y., Rouse M. et al. Development and characterization of wheat–*Ae. searsii* Robertsonian translocations and a recombinant chromosome conferring resistance to stem rust // Theor. Appl. Genet. 2011. V. 122. P. 1537–1545. <https://doi.org/10.1007/s00122-011-1553-4>
19. Marais G.F., McCallum B., Marais A.S. Leaf rust and stripe rust resistance genes derived from *Triticum sharonense* // Euphytica. 2006. V. 149. P. 373–380.
20. Dubcovsky J., Lukaszewski A.J., Echaide M. et al. Molecular characterization of two *Triticum speltoides* interstitial translocations carrying leaf rust and green bug resistance genes // Crop Sci. 1998. V. 38. P. 1655–1660. <https://doi.org/10.2135/cropsci1998.0011183X003800-060040x>
21. Adonina I.G., Davoyan R.O., Bebyakina I.V. et al. Chromosomal rearrangements in wheat introgression lines obtained using synthetic genome substitution and genome addition forms: IV Межд. конф. “Генофонд и селекция растений” (ГРВ 2018). Новосибирск, 2018. С. 13–17.
22. Адонина И.Г., Петраш Н.В., Тимонова Е.М. и др. Создание и изучение устойчивых к листовой ржавчине линий мягкой пшеницы с транслокациями от *Aegilops speltoides* Tausch // Генетика. 2012. Т. 48. № 4. С. 488–494.
23. Салина Е.А., Егорова Е.М., Адонина И.Г. и др. ДНК-маркеры для генотипирования линий мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с генетическим материалом *Aegilops speltoides* Tausch и *Triticum timopheevii* Zhuk. // Вестник ВОГиС. 2008. Т. 12. № 4. С. 620–628.
24. Hsam S.L.K., Lapochkina I.F., Zeller F.J. Chromosomal location of genes for powdery mildew resistance in common wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell.). 8. Gene *Pm32* in a wheat–*Aegilops speltoides* translocation line // Euphytica. 2003. V. 133. P. 367–370.
25. Wang K., Lin Z., Wang L. et al. Development of a set of PCR markers specific to *Aegilops longissima* chromosome arms and application in breeding a translocation line // Theor. Appl. Genet. 2018. V. 131. P. 13–25. <https://doi.org/10.1007/s00122-017-2982-5>
26. Klindworth D.L., Niu Z.X., Chao S.M. et al. Introgression and characterization of a goat grass gene for a high level of resistance to Ug99 stem rust in tetraploid wheat // Genes, Genomes Genet. 2012. V. 2. P. 665–673. <https://doi.org/10.1534/g3.112.002386>
27. Liu W., Koo D.-H., Xia Q. et al. Homoeologous recombination-based transfer and molecular cytogenetic mapping of powdery mildew-resistant gene *Pm57* from *Aegilops searsii* into wheat // Theor. Appl. Genet. 2017. V. 130. P. 841–848. <https://doi.org/10.1007/s00122-017-2855-y>
28. Petersen S., Lyerly J.H., Worthington M.L. et al. Mapping of powdery mildew resistance gene *Pm53* introgressed from *Aegilops speltoides* into soft red winter wheat // Theor. Appl. Genet. 2015. V. 128. P. 303–312. <https://doi.org/10.1007/s00122-014-2430-8>
29. Jia J., Devos K.M., Chao S. et al. RFLP-based maps of homoeologous group-6 chromosomes of wheat and their application in the tagging of *Pm12*, a powdery mildew resistance gene transferred from *Aegilops speltoides* to wheat // Theor. Appl. Genet. 1996. V. 92. P. 559–565.
30. Dvorak J., Knott D.R. Location of a *Triticum speltoides* chromosome segment conferring resistance to leaf rust in *Triticum aestivum* // Genome. 1990. V. 33. P. 892–897. <https://doi.org/10.1139/g90-134>
31. Millet E., Manisterski J., Ben-Yehuda P. et al. Introgression of leaf rust and stripe rust resistance from Sharon goat grass (*Aegilops sharonensis* Eig) into bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // Genome. 2014. V. 57. P. 1–8. <https://doi.org/10.1139/gen-2014-0004>
32. El Baidouri M., Murat F., Veyssiere M. et al. Reconciling the evolutionary origin of bread wheat (*Triticum aestivum*) // New Phytologist. 2017. V. 213. P. 1477–1486.
33. Marais G.F., McCallum B., Marais A.S. Wheat leaf rust resistance gene *Lr59* derived from *Aegilops peregrine* // Plant Breed. 2008. V. 127. P. 340–345. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2008.01513.x>
34. Jahier J., Abelard P., Tonguy A.M. et al. The *Aegilops ventricosa* segment on chromosome 2AS of the wheat cultivar ‘VPM1’ carries the cereal cyst nematode gene

- Cre5* // Plant Breed. 2001. V. 120. P. 125–128.
<https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2001.00585.x>
35. Williamson V.M., Thomas V., Ferris H., Dubcovsky J. An *Aegilops ventricosa* translocation confers resistance against root-knot nematodes to common wheat // Crop Sci. 2013. V. 53. № 4. P. 1412–1418.
<https://doi.org/10.2135/cropsci2012.12.0681>
 36. Ogbonnaya F.C., Seah S., Delibes A. et al. Molecular-genetic characterization of a new nematode resistance gene in wheat // Theor. Appl. Genet. 2001. V. 102. P. 623–629.
 37. Marais F., Marais A., McCallum B., Pretorius Z. Transfer of leaf rust and stripe rust resistance genes *Lr62* and *Yr42* from *Aegilops neglecta* Req. ex Bertol. to common wheat // Crop Sci. 2009. V. 49. P. 871–879.
<https://doi.org/10.2135/cropsci2008.06.0317>
 38. Zhu Z., Zhou R., Kong X. et al. Microsatellite marker identification of a *Triticum aestivum*–*Aegilops umbellulata* substitution line with powdery mildew resistance // Euphytica. 2006. V. 150. P. 149–153.
<https://doi.org/10.1007/s10681-006-9103-x>
 39. Kuraparthy V., Sood S., Chhuneja P. et al. A cryptic wheat–*Aegilops triuncialis* translocation with leaf rust resistance gene *Lr58* // Crop Sci. 2007. V. 47. P. 1995–2003.
<https://doi.org/10.2135/cropsci2007.01.0038>
 40. Marais G.F., McCallum B., Snyman J.E. et al. Leaf rust and stripe rust resistance genes *Lr54* and *Yr37* transferred to wheat from *Aegilops kotschyi* // Plant Breed. 2005. V. 124. P. 538–541.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2005.01116.x>
 41. Kuraparthy V., Chunneja P., Dhaliwal H.S. et al. Characterization and mapping of cryptic alien introgression from *Aegilops geniculata* with new leaf rust and stripe rust resistance genes *Lr57* and *Yr40* in wheat // Theor. Appl. Genet. 2007. V. 114. P. 1379–1389.
<https://doi.org/10.1007/s00122-007-0524-2>
 42. McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J. et al. Catalogue of Gene Symbols for Wheat. 2013. Available at: <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/>.
 43. Kishii M. An update of recent use of *Aegilops* species in wheat breeding // Front. Plant Sci. 2019. V. 10. Article. 585.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00585>
 44. Cruz C.D., Peterson G.L., Bockus W.W. et al. The 2NS translocation from *Aegilops ventricosa* confers resistance to the *Triticum* pathotype of *Magna portheoryzae* // Crop Sci. 2016. V. 56. P. 990–1000.
<https://doi.org/10.2135/cropsci2015.07.0410>
 45. Coriton O., Barloy D., Huteau V. et al. Assignment of *Aegilops variabilis* Eig chromosomes and translocations carrying resistance to nematodes in wheat // Genome. 2009. V. 52. № 4. P. 338–346.
<https://doi.org/10.1139/G09-011>
 46. Bansal M., Kaur S., Dhaliwal H.S. et al. Mapping of *Aegilops umbellulata*-derived leaf rust and stripe rust resistance loci in wheat // Plant Pathol. 2017. V. 66. P. 38–44.
<https://doi.org/10.1111/ppa.12549>
 47. Zeller F.J., Kong L., Hartl L. et al. Chromosomal location of genes for resistance to powdery mildew in common wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell.). 7. Gene *Pm29* in line Pova // Euphytica. 2002. V. 123. № 2. P. 187–194.
 48. Mago R., Zhang P., Bariana H.S. et al. Development of wheat lines carrying stem rust resistance gene *Sr39* with reduced *Aegilops speltoides* chromatin and simple PCR markers for marker assisted selection // Theor. Appl. Genet. 2009. V. 119. P. 1441–1450.
<https://doi.org/10.1007/s00122-009-1146-7>
 49. Mago R., Verli D., Zhan P. et al. Development of wheat–*Aegilops speltoides* recombinants and simple PCR-based markers for *Sr32* and a new stem rust resistance gene on the 2S#1 chromosome // Theor. Appl. Genet. 2013. V. 126. P. 2943–2955.
<https://doi.org/10.1007/s00122-013-2184-8>
 50. Niu Z., Klindworth D.L., Friesen T.L. et al. Targeted introgression of a wheat stem rust resistance gene by DNA marker assisted chromosome engineering // Genetics. 2011. V. 187. P. 1011–1021.
<https://doi.org/10.1534/genetics.110.123588>
 51. Mahmud H. Wheat blast in Bangladesh threatening South Asia wheat production // Acta Sci. Microbiol. 2019. V. 2. P. 8–9.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197555>
 52. Juliana P., Singh R.P., Singh P.K. et al. Genomic and pedigree-based prediction for leaf, stem, and stripe rust resistance in wheat // Theor. Appl. Genet. 2017. V. 130. P. 1415–1430.
<https://doi.org/10.1007/s00122-017-2897-1>
 53. Velu G., Crespo-Herrera L., Guzman C. et al. Assessing genetic diversity to breed competitive biofortified wheat with enhanced grain Zn and Fe concentrations // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. Article 1971.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01971>
 54. Naranjo T., Fernandez-Rueda P. Homoeology of rye chromosome arms to wheat // Theor. Appl. Genet. 1991. V. 82. P. 577–586.
 55. Devos K.M., Atkinson M.D., Chinoy C.N. et al. Chromosomal rearrangements in the rye genome relative to wheat // Theor. Appl. Genet. 1993. V. 85. P. 673–680.
 56. Hao M., Liu M., Luo J. et al. Introgression of powdery mildew resistance gene *Pm56* on rye chromosome arm 6RS into wheat // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. Article 1040.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01040>
 57. Ma P., Han G., Zheng Q. et al. Development of novel wheat-rye chromosome 4R translocations and assignment of their powdery mildew resistance // Plant Dis. 2020. V. 104. № 1. P. 260–268.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-01-19-0160-RE>
 58. Ren T.H., Yang Z.J., Yan B.J. et al. Development and characterization of a new 1BL.1RS translocation line with resistance to stripe rust and powdery mildew of wheat // Euphytica. 2009. V. 169. P. 207–313.
<https://doi.org/10.1007/s10681-009-9924-5>
 59. Luo P.G., Zhang H.Y., Shu K. et al. Stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) resistance in wheat with the wheat-rye 1BL/1RS chromosomal translocation //

- Canad. J. Plant Pathol. 2007. V. 30. P. 1–6.
<https://doi.org/10.1080/07060661.2008.10540540>
60. Mago R., Zhang P., Vautrin S. et al. The wheat *Sr50* gene reveals rich diversity at a cereal disease resistance locus // Nat. Plants. 2015. V. 1. Article 15186.
<https://doi.org/10.1038/nplants.2015.186>
61. Yang Z.J., Li G.R., Jia J.Q. et al. Molecular cytogenetic characterization of wheat–*Secale africanum* amphiploids and derived introgression lines with stripe rust resistance // Euphytica. 2009. V. 167. P. 197–202.
<https://doi.org/10.1007/s10681-008-9861-8>
62. Hysing S.C., Hsam S.L.K., Singh R.P. et al. Agronomic performance and multiple disease resistance in T2BS.2RL wheat-rye translocation lines // Crop Sci. 2007. V. 47. P. 254–260.
<https://doi.org/10.2135/cropsci2006.04.0269>
63. Li J., Dundas I., Dong C. et al. Identification and characterization of a new stripe rust resistance gene *Yr83* on rye chromosome 6R in wheat // Theor. Appl. Genet. 2020. V. 133. P. 1095–1107.
<https://doi.org/10.1007/s00122-020-03534-y>
64. Rahmatov M., Rouse M.N., Nirmala J. et al. A new 2DS.2RL Robertsonian translocation transfers stem rust resistance gene *Sr59* into wheat // Theor. Appl. Genet. 2016. V. 129. P. 1383–1392.
<https://doi.org/10.1007/s00122-016-2710-6>
65. Kumar A., Garg M., Kaur N. et al. Rapid development and characterization of chromosome specific translocation line of *Thinopyrum elongatum* with improved dough strength // Front. Plant Sci. 2017. Article 1593.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01593>
66. Mullan D.J., Mirzaghaderi G., Walker E. et al. Development of wheat–*Lophopyrum elongatum* recombinant lines for enhanced sodium ‘exclusion’ during salinity stress // Theor. Appl. Genet. 2009. V. 119. P. 1313–1323.
<https://doi.org/10.1007/s00122-009-1136-9>
67. Mago R., Zhang P., Xia X. et al. Transfer of stem rust resistance gene *SrB* from *Thinopyrum ponticum* into wheat and development of a closely linked PCR-based marker // Theor. Appl. Genet. 2019. V. 132. P. 371–382.
<https://doi.org/10.1007/s00122-018-3224-1>
68. Wang J., Xiang F., Xia G. *Agropyron elongatum* chromatin localization on the wheat chromosomes in an introgression line // Planta. 2005. V. 221. P. 277–286.
<https://doi.org/10.1007/s00425-004-1443-y>
69. Khan I.A. Molecular and agronomic characterization of wheat–*Agropyron intermedium* recombinant chromosomes // Plant Breed. 2000. V. 119. P. 25–29.
<https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2000.00440.x>
70. Zheng X., Tang C., Han R. et al. Identification, characterization, and evaluation of novel stripe rust-resistant wheat–*Thinopyrum intermedium* chromosome translocation lines // Plant Disease Publ. Online. 2020.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-01-19-0001-RE>
71. Liu J., Chang Z.J., Zhang X.J. et al. Putative *Thinopyrum intermedium*-derived stripe rust resistance gene *Yr50* maps on wheat chromosome arm 4BL // Theor. Appl. Genet. 2013. V. 126. P. 265–274.
<https://doi.org/10.1007/s00122-012-1979-3>
72. Zhan H., Zhang X., Li G. et al. Molecular characterization of a new wheat–*Thinopyrum intermedium* translocation line with resistance to powdery mildew and stripe rust // Int. J. Mol. Sci. 2015. V. 16. P. 2162–2173.
<https://doi.org/10.3390/ijms16012162>
73. Luo P.G., Luo H.Y., Chang Z.J. et al. Characterization and chromosomal location of *Pm40* in common wheat: a new gene for resistance to powdery mildew derived from *Elytrigia intermedium* // Theor. Appl. Genet. 2009. V. 118. P. 1059–1064.
<https://doi.org/10.1007/s00122-009-0962-0>
74. Hu L.-J., Li G.-R., Zeng Z.-X. et al. Molecular cytogenetic identification of a new wheat–*Thinopyrum* substitution line with stripe rust resistance // Euphytica. 2011. V. 177. P. 169–177.
<https://doi.org/10.1007/s10681-010-0216-x>
75. He R.L., Chang Z.J., Yang Z.J. et al. Inheritance and mapping of powdery mildew resistance gene *Pm43* introgressed from *Thinopyrum intermedium* into wheat // Theor. Appl. Genet. 2009. V. 118. P. 1173–1180.
<https://doi.org/10.1007/s00122-009-0971-z>
76. Salina E.A., Adonina I.G., Badaeva E.D. et al. A *Thinopyrum intermedium* chromosome in bread wheat cultivars as a source of genes conferring resistance to fungal diseases // Euphytica. 2015. V. 204. P. 91–101.
<https://doi.org/10.1007/s10681-014-1344-5>
77. Ohm H.W., Anderson J.M., Sharma H.C. et al. Registration of yellow dwarf virus resistant wheat germplasm line P961341 // Crop Sci. 2005. V. 45. P. 805–806.
<https://doi.org/10.2135/cropsci2005.0805>
78. Sharma H.C., Ohm H.W., Perry K.L. Registration of barley yellow dwarf virus resistant wheat germplasm line P29 // Crop Sci. 1997. V. 37. P. 1032–1033.
<https://doi.org/10.2135/cropsci1997.0011183X003700-030096x>
79. Liu W., Danilova T., Rouse M. et al. Development and characterization of a compensating wheat–*Thinopyrum intermedium* Robertsonian translocation with *Sr44* resistance to stem rust (Ug99) // Theor. Appl. Genet. 2013. V. 126. P. 1167–1177.
<https://doi.org/10.1007/s00122-013-2044-6>
80. Zhang R., Sun B., Chen J. et al. *Pm55*, a developmental-stage and tissue-specific powdery mildew resistance gene introgressed from *Dasypyrum villosum* into common wheat // Theor. Appl. Genet. 2016. V. 129. P. 1975–1984.
<https://doi.org/10.1007/s00122-016-2753-8>
81. Liu C., Qi L.L., Liu W.X. et al. Development of a set of compensating *Triticum aestivum*–*Dasypyrum villosum* Robertsonian translocation lines // Genome. 2011. V. 54. P. 836–844.
<https://doi.org/10.1139/g11-051>
82. Qi L.L., Chen P.D., Liu D.J. et al. The gene *Pm21* – a new source of resistance to wheat powdery mildew // Acta Agriculture Sinica. 1995. V. 21. P. 257–261.

83. Zhang R., Feng Y., Li H. et al. Cereal cyst nematode resistance gene *CreV* effective against *Heterodera filipjevi* transferred from chromosome 6VL of *Dasypyrum villosum* to bread wheat // Mol. Breed. 2016. V. 36. Article 122. <https://doi.org/10.1007/s11032-016-0549-9>
84. Li H., Dong Z., Ma C. et al. Physical mapping of stem rust resistance gene *Sr52* from *Dasypyrum villosum* based on *ph1b*-induced homoeologous recombination // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. № 19. Article 4887. <https://doi.org/10.3390/ijms20194887>
85. Zhang R., Fan Y., Kong L. et al. *Pm62*, an adult-plant powdery mildew resistance gene introgressed from *Dasypyrum villosum* chromosome arm 2VL into wheat // Theor. Appl. Genet. 2018. V. 131. P. 2613–2620. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3176-5>
86. Chen Q.Z., Cao A.Z., Qi Z.J. et al. Structural change of 2V chromosome of *Haynaldia villosa* induced by gametocidal chromosome 3C of *Aegilops triuncialis* // Agric. Sci. China. 2008. V. 7. P. 804–811. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(08\)60117-0](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(08)60117-0)
87. Zhang R., Hou F., Feng Y. et al. Characterization of a *Triticum aestivum*–*Dasypyrum villosum* T2VS·2DL translocation line expressing a longer spike and more kernels traits // Theor. Appl. Genet. 2015. V. 128. P. 2415–2425. <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2596-8>
88. Zheng Q.P., Li Q.A., Wang X.U. et al. Development and characterization of a *Triticum aestivum*–*Haynaldia villosa* translocation line T4VS.4DL conferring resistance to wheat spindle streak mosaic virus // Euphytica. 2005. V. 145. P. 317–320.
89. Li H., Chen X., Xin Z.Y. et al. Development and identification of wheat–*Haynaldia villosa* 6DL.6VS chromosome translocation lines conferring resistance to powdery mildew // Plant Breed. 2005. V. 124. P. 203–205. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2004.01062.x>
90. Hou L.Y., Jia J.Q., Zhang X.J. et al. Molecular mapping of the stripe rust resistance gene *Yr69* on wheat chromosome 2AS // Plant Dis. 2016. V. 100. P. 1717–1724. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-15-0555-RE>
91. Qi L.L., Pumphrey M.O., Friebe B. et al. Molecular cytogenetic characterization of alien introgressions with gene *Fhb3* for resistance to *Fusarium* head blight disease // Theor. Appl. Genet. 2008. V. 117. P. 1155–1166. <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0853-9>
92. Qi Z.J., Du P., Qian B.L. et al. Characterization of a wheat–*Thinopyrum bessarabicum* (T2JS·2BS·2BL) translocation line // Theor. Appl. Genet. 2010. V. 121. P. 589–597. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1332-7>
93. Kang H., Wang Y., Fedak G. et al. Introgression of chromosome 3Ns from *Psathyrostachys huashanica* into wheat specifying resistance to stripe rust // PLoS One. 2011. V. 6. e21802. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021802>
94. Chen G., Zheng Q., Bao Y. et al. Molecular cytogenetic identification of a novel dwarf wheat line with introgressed *Thinopyrum ponticum* chromatin // J. Biosci. 2012. V. 37. P. 149–155. <https://doi.org/10.1007/s12038-011-9175-1>
95. Wu J., Yang X., Li H. et al. The introgression of chromosome 6P specifying for increased numbers of florets and kernels from *Agropyron cristatum* into wheat // Theor. Appl. Genet. 2006. V. 114. P. 13–20. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0405-0>
96. Guo J., Zhang X., Hou Y. et al. High-density mapping of the major FHB resistance gene *Fhb7* derived from *Thinopyrum ponticum* and its pyramiding with *Fhb1* by marker-assisted selection // Theor. Appl. Genet. 2015. V. 128. P. 2301–2316. <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2586-x>
97. Ceoloni C., Kuzmanovic L., Forte P. et al. Wheat-perennial Triticeae introgressions: major achievements and prospects // Alien Introgression in Wheat Cytogenetics, Molecular Biology, and Genomics / Eds Molnár-Láng M., Ceoloni C., Doležel J. Switzerland: Springer Intern. Publ., 2015. P. 273–313. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-23494-6>
98. Cox T.S., Van Tassel D.L., Cox C.M., DeHaan L.R. Progress in breeding perennial grains // Crop and Pasture Sci. 2010. V. 61. P. 513–521. <https://doi.org/10.1071/CP09201>
99. Culman S.W., Snapp S.S., Ollenburger M. et al. Soil and water quality rapidly responds to the perennial grain Kernza wheatgrass // Agron. J. 2013. V. 105. P. 735–744. <https://doi.org/10.2134/agronj2012.0273>
100. Zhang X., Sallam A., Gao L. et al. Establishment and optimization of genomic selection to accelerate the domestication and improvement of intermediate wheatgrass // Plant Genome. 2016. V. 9. № 1. P. 1–18.
101. Айдаров А.Н., Чурсин А.С., Шаманин В.П. Оценка многолетнего зернокармального злака в условиях Западной Сибири // Научные инновации – аграрному производству: Материалы Междун. научно-практ. конф., посвященной 100-летию юбилею Омского ГАУ. Омск, 2018. С. 582–585.
102. Molnár-Láng M., Linc G. Wheat–barley hybrids and introgression lines // Alien Introgression in Wheat Cytogenetics, Molecular Biology, and Genomics / Eds Molnár-Láng M., Ceoloni C., Doležel J. Switzerland: Springer Intern. Publ., 2015. P. 315–345. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-23494-6>
103. Molnár-Láng M., Linc G., Friebe B.R., Sutka J. Detection of wheat–barley translocations by genomic *in situ* hybridization in derivatives of hybrids multiplied *in vitro* // Euphytica. 2000. V. 112. P. 117–123. <https://doi.org/10.1023/A:1003840200744>
104. Nagy E.D., Molnár-Láng M., Linc G., Láng L. Identification of wheat–barley translocations by sequential GISH and two-colour FISH in combination with the use of genetically mapped barley SSR markers // Genome. 2002. V. 45. P. 1238–1247. <https://doi.org/10.1139/g02-068>
105. Cseh A., Kruppa K., Molnár I. et al. Characterization of a new 4BS.7HL wheat–barley translocation line using

- GISH, FISH, and SSR markers and its effect on the β -glucan content of wheat // *Genome*. 2011. V. 54. P. 795–804.
<https://doi.org/10.1139/g11-044>
106. Kruppa K., Sepsi A., Szakács É. et al. Characterization of a 5HS-7DS.7DL wheat-barley translocation line and physical mapping of the 7D chromosome using SSR markers // *J. Appl. Genet.* 2013. V. 54. P. 251–258.
<https://doi.org/10.1007/s13353-013-0152-2>
107. Darkó É., Barnabás B., Molnár-Láng M. Characterization of newly developed wheat/barley introgression lines in respect of aluminium tolerance // *Am. J. Plant. Sci.* 2012. V. 3. P. 1462–1469.
<https://doi.org/10.4236/ajps.2012.310176>
108. Liu C.J., Atkinson M.D., Chinoy C.N. et al. Nonhomoeologous translocations between group 4, 5 and 7 chromosomes within wheat and rye // *Theor. Appl. Genet.* 1992. V. 83. P. 305–312.
<https://doi.org/10.1007/BF00224276>
109. Devos K.M., Dubcovsky J., Dvořák J. et al. Structural evolution of wheat chromosomes 4A, 5A, and 7B and its impact on recombination // *Theor. Appl. Genet.* 1995. V. 91. P. 282–288.
<https://doi.org/10.1007/bf00220890>
110. Endo T.R. Gametocidal genes // *Alien Introgression in Wheat Cytogenetics, Molecular Biology, and Genomics* / Eds Molnár-Láng M., Ceoloni C., Doležel J. Switzerland: Springer Intern. Publ., 2015. P. 121–132.
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-23494-6>
111. The International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC) Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome // *Science*. 2018. V. 361. № 6403. eaar7191.
<https://doi.org/10.1126/science.aar7191>
112. Sears E.R. The aneuploids of common wheat // *Mo. Agr. Exp. Sta. Res. Bull.* 1954. V. 572. P. 1–58.
113. Salina E.A., Leonova I.N., Efremova T.T., Roder M.S. Wheat genome structure: translocations during the course of polyploidization // *Functional and Integrative Genomics*. 2006. V. 1. P. 71–80.
<https://doi.org/10.1007/s10142-005-0001-4>
114. Zhang H., Jia J., Gale M.D., Devos K.M. Relationships between the chromosomes of *Aegilops umbellulata* and wheat // *Theor. Appl. Genet.* 1998. V. 96. P. 69–75.
<https://doi.org/10.1007/s001220050710>
115. Адонина И.Г., Букатич Е.Ю., Пискарев В.В. и др. Особенности наследования транслокации, несущей ген устойчивости к бурой ржавчине, от *Aegilops speltoides* Tausch на хромосому 2D мягкой пшеницы // *Генетика*. 2018. Т. 54. № 8. С. 969–974.
116. Rey E., Molnár I., Doležel J. Genomics of wild relatives and alien introgressions // *Alien Introgression in Wheat Cytogenetics, Molecular Biology, and Genomics* / Eds Molnár-Láng M., Ceoloni C., Doležel J. Switzerland: Springer Intern. Publ., 2015. P. 347–381.
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-23494-6>
117. Сибикеев С.Н., Крупнов В.А., Воронина С.А., Бадаева Е.Д. Идентификация чужеродной хромосомы у линии мягкой пшеницы Мульти 6R // *Генетика*. 2005. Т. 41. № 8. С. 1084–1088.
118. Qi L.L., Friebe B., Zhang P., Gill B.S. Homoeologous recombination, chromosome engineering and crop improvement // *Chromosome. Res.* 2007. V. 15. P. 3–19.
<https://doi.org/10.1007/s10577-006-1108-8>
119. Danilova T.V., Zhang G., Liu W. et al. Homoeologous recombination-based transfer and molecular cytogenetic mapping of a wheat streak mosaic virus and *Triticum* mosaic virus resistance gene *Wsm3* from *Thinopyrum intermedium* to wheat // *Theor. Appl. Genet.* 2017. V. 130. P. 549–556.
<https://doi.org/10.1007/s00122-016-2834-8>
120. Zhang P., Dundas I.S., Xu S.S. et al. Chromosome engineering techniques for targeted introgression of rust resistance from wild wheat relatives // *Methods in Mol. Biol.* 2017. V. 1659. P. 163–172.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7249-4_14
121. Zhang W., Zhu X., Zhang M. et al. Meiotic homoeologous recombination-based mapping of wheat chromosome 2B and its homoeologues in *Aegilops speltoides* and *Thinopyrum elongatum* // *Theor. Appl. Genet.* 2018. V. 131. P. 2381–2395.
<https://doi.org/10.1007/s00122-018-3160-0>
122. King J., Grewal S., Yang C. et al. A step change in the transfer of interspecific variation into wheat from *Amblyopyrum muticum* // *Plant Biotech. J.* 2017. V. 15. P. 217–226.
<https://doi.org/10.1111/pbi.12606>
123. King J., Grewal S., Yang C. et al. Introgression of *Aegilops speltoides* segments in *Triticum aestivum* and the effect of the gametocidal genes // *Ann. Bot.* 2018. V. 121. P. 229–240.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcx149>
124. Devi U., Grewal S., Yang C. et al. Development and characterization of interspecific hybrid lines with genome-wide introgressions from *Triticum timopheevii* in a hexaploid wheat background // *BMC Plant Biol.* 2019. V. 19. Article 183.
<https://doi.org/10.1186/s12870-019-1785-z>
125. Grewal S., Yang C., Hubbard-Edwards S. et al. Characterization of *Thinopyrum bessarabicum* chromosomes through genome wide introgressions into wheat // *Theor. Appl. Genet.* 2018. V. 131. P. 389–406.
<https://doi.org/10.1007/s00122-017-3009-y>
126. Ogbonnaya F.C., Abdalla O., Mujeeb-Kazi A. et al. Synthetic hexaploids: harnessing species of the primary gene pool for wheat improvement // *Plant Breed. Rev.* 2013. V. 37. P. 35–122.
<https://doi.org/10.1002/9781118497869.ch2>
127. Hartung F., Schiemann J. Precise plant breeding using new genome editing techniques: opportunities, safety and regulation in the EU // *The Plant J.* 2014. V. 78. P. 742–752.
<https://doi.org/10.1111/tpj.12413>
128. Prohens J., Gramazio P., Plasas M. et al. Introgressions: A new approach for using crop wild relatives in breeding for adaptation to climate change // *Euphytica*. 2017. V. 213. Article 158.
<https://doi.org/10.1007/s10681-017-1938-9>

Wheat–Alien Introgression Breeding: Current Status and Prospects

I. G. Adonina^{a, *}, E. M. Timonova^a, and E. A. Salina^a

^a*Kurchatov Genomics Center, Institute of Cytology and Genetics Siberian Branch
of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

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

This review is devoted to common wheat–alien introgression breeding, i.e. the process of integrating genes of cultural or wild species from the secondary and tertiary gene pools into the wheat genome in order to increase the genetic diversity of this most important crop. The review generalizes the results achieved in the common wheat introgression breeding over the past 20 years, provides an analysis of the distribution of alien translocations by subgenomes and chromosomes of common wheat, and discusses the possibilities for further development of this research direction and selection.

Keywords: common wheat, introgression breeding, secondary gene pool, tertiary gene pool.

ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА *ipiO* ООМИЦЕТА *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary В ПОПУЛЯЦИИ МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ ПРИ ПОМОЩИ SSCP-АНАЛИЗА

© 2021 г. В. В. Мартынов^{1,2, *}, В. К. Чижик²

¹Московский государственный областной университет, Московская область, Мытищи, 141014 Россия

²Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, 127550 Россия

*e-mail: martynov.vik@gmail.com

Поступила в редакцию 18.05.2020 г.

После доработки 01.07.2020 г.

Принята к публикации 08.07.2020 г.

Изучен полиморфизм первичной структуры генов семейства *ipiO* в популяции *Phytophthora infestans* в Московской области. В качестве метода оценки полиморфизма использовали SSCP-анализ. В результате при помощи этого метода удалось различить классы генов семейства *ipiO* и установить, что изучаемые образцы имели один из трех вариантов генотипа *ipiO* в зависимости от комбинации у них генов этих классов. Выявленные генотипы оказались распределены в проанализированной популяции *P. infestans* Московской области с неодинаковой частотой. Кроме того, было показано, что картофельная и томатная субпопуляции *P. infestans* также различаются по частотам встречаемости выявленных генотипов.

Ключевые слова: популяция, полиморфизм, гены вирулентности, *Phytophthora infestans*, SSCP-анализ.

DOI: 10.31857/S0016675821040081

Фитофтороз относится к числу наиболее вредоносных заболеваний картофеля и томатов. Его возбудителем является оомицет *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Чтобы инфицировать растительные клетки, *P. infestans* секретирует так называемые эффекторные белки. Основная роль этих эффекторных белков заключается в подавлении базальной защитной реакции хозяина, что позволяет патогену развиваться в тканях растения. Однако эффекторные белки могут распознаваться R-белками растения-хозяина, которые взаимодействуют с эффекторами согласно модели ген–на–ген, в результате этого взаимодействия развивается гиперчувствительный ответ и растение сохраняет устойчивость к патогену. Таким образом, эффекторы действуют как факторы вирулентности/авирулентности. Эффекторные белки в геноме *P. infestans* кодируются генами вирулентности (*Avr*-генами), а R-белки растения – генами устойчивости (*R*-генами). “Гонка вооружений” между патогеном и хозяином и их коэволюция привели к возникновению значительного полиморфизма генов *Avr*. За последнее время в геноме *P. infestans* было обнаружено множество генов вирулентности, кодирующих белки, принадлежащие к семейству RXLR-dEER эффекторов [1]. К числу таких генов относятся гены семейства *ipiO*. Это семейство является очень полиморфным. Так у *P. infestans* было выявлено 13

вариантов последовательностей гена *ipiO*, которые на основании различий в их первичной структуре были разделены на три класса (I, II и III) [2]. Наиболее полиморфным является класс I, который включает в себя 10 вариантов, класс II содержит два варианта, а класс III представлен всего одним вариантом *ipiO4* [2]. Варианты гена *ipiO*, относящиеся к классу I, распознаются соответствующим геном устойчивости растения (ген *Rpi-blb1*), т.е. в функциональном отношении являются авирулентными [2, 3], в то время как продукт гена *ipiO4* (класс III) избегает распознавания, и таким образом этот вариант является вирулентным [4, 5]. Кроме того, было показано, что изоляты, у которых отсутствуют варианты класса I, являются вирулентными на растениях, имеющих ген *Rpi-blb1*, а вариант *ipiO4* не только сам избегает распознавания, но и подавляет гиперчувствительный ответ, возникающий в результате распознавания генов *ipiO* класса I продуктом гена *Rpi-blb1* [3, 6]. Варианты, относящиеся к классу II, в функциональном отношении проявляют себя неоднозначно. Было показано, что такие варианты вызывают гиперчувствительный ответ при агробактериальной коинфекции с геном *Rpi-blb1*, но в естественных условиях штаммы *P. infestans*, содержащие только варианты генов *ipiO* класса II, не вызывают гиперчувствительного ответа у растений, име-

ющих в своем геноме ген *Rpi-blb1*. Из приведенных выше данных видно, что полиморфизм генов семейства *ipiO* тесно связан с их функцией, и набор этих генов у штаммов *P. infestans* может оказывать влияние на вирулентность и агрессивность этих штаммов. Поэтому изучение полиморфизма генов семейства *ipiO* является важным не только с научной, но и с практической точки зрения, так как сведения об этом полиморфизме будут способствовать более эффективной борьбе с фитофторозом. Однако полиморфизм генов этого семейства был изучен лишь на небольшой коллекции европейских изолятов [2, 7], а также у изолятов, собранных на территории Центральной и Северной Америки и Юго-Восточной Азии [4], а для российских популяций *P. infestans* такие исследования не проводились. Поэтому цель настоящей работы – изучение полиморфизма первичной структуры генов семейства *ipiO* в популяции *P. infestans* в Московской области.

Изучение генетического полиморфизма можно проводить различными способами. Одним из таких способов является SSCP-метод, основанный на анализе одноцепочечного конформационного полиморфизма (single-strand conformation polymorphism). Этот простой метод анализа позволяет определить являются ли фрагменты ДНК идентичными по своей нуклеотидной последовательности, не прибегая к их секвенированию [8, 9]. Метод SSCP-анализа был применен нами для изучения структурного полиморфизма генов семейства *ipiO* в популяции *P. infestans* в Московской области.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материала *P. infestans* использовали пораженные фитофторозом листья растений картофеля, собранные летом 2015 г. на территории четырех районов Московской области (Люберецкий, Чеховский, Коломенский и Озерский), и пораженные фитофторозом листья растений томатов, собранные в то же время и в тех же точках на территории Коломенского, Озерского и Чеховского районов (рис. 1). В общей сложности было пять точек сбора, в трех из которых образцы были собраны как с растений картофеля, так и с растений томатов. Каждый образец собран с индивидуального растения. Они находились друг от друга на расстоянии примерно 10 м. Всего было собрано и затем проанализировано 37 образцов пораженных растений картофеля (семь из точки 1, десять из точки 2, десять из точки 3, четыре из точки 4 и шесть из точки 5) и 10 образцов пораженных растений томатов (четыре из точки 3, два из точки 4 и четыре из точки 5). Таким образом, в общей сложности было собрано и проанализировано 47 образцов. Чтобы подтвердить, что растение поражено именно фитофторозом, для экспресс-опре-

деления *P. infestans* в полевых условиях использовали тест-набор производства фирмы ООО “Ген-контроль”. Собранные листья высушивали и хранили в виде гербария для последующего выделения из них препарата тотальной ДНК. Пригодность гербарных образцов для выделения из них ДНК *P. infestans* известна из литературы [10].

Выделение ДНК

Тотальную ДНК выделяли из гербарных образцов при помощи набора реагентов “SILICA plant” производства ООО компании “Биоком” по протоколу фирмы-производителя. Для выделения тотальной ДНК брали фрагмент высушенного листа растения площадью примерно 1 см².

Условия ПЦР

Поскольку семейство генов *ipiO* является высокополиморфным, а функциональные различия наблюдаются только между отдельными классами, для амплификации генов этого семейства в препаратах тотальной ДНК нами были подобраны праймеры на участки последовательностей генов *ipiO*, консервативные для всех трех классов. Кроме того, поскольку класс III этого семейства генов представлен только одним геном *ipiO4*, нуклеотидная последовательность которого достаточно сильно отличается от последовательностей других генов этого семейства, нами был сконструирован обратный праймер для специфичной амплификации именно этого варианта гена. Таким образом, ПЦР-амплификацию проводили с консервативными праймерами IPIOF 5-CATCCAAGATTCGCTTTCTGTCT-3 и IPIOR 5-GCTTATCGGCGTCTCTCCGG-3, а для специфичной амплификации гена *ipiO4* вместо праймера IPIOR использовали праймер IPIOR 5-GGATGCTTGTCTTGTAGCTAGC-3. Программа амплификации для обеих реакций была следующей: 94°C, 3 мин; 35 циклов (94°C, 30 с; 63°C, 30 с; 72°C, 1 мин), финальный синтез 72°C, 5 мин. Объем реакционной смеси составлял 25 мкл. На одну реакцию брали 50 нг тотальной ДНК. Для амплификации использовали прибор GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Inc., США). Электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводили в 1%-ном агарозном геле в 0.5× TBE-буфере.

SSCP-анализ

Для изучения полиморфизма генов *ipiO* применяли SSCP-анализ. SSCP (single-strand conformational polymorphism) анализ представляет собой метод, основанный на способности одноцепочечных молекул ДНК образовывать уникальные вторичные структуры, конформации которых зависят от их



Рис. 1. Карта-схема мест сбора образцов в Московской области. Точка 1 – п. Коренево, поле ВНИИКХ; точка 2 – п. Коренево, частный сектор; точка 3 – д. Масловка; точка 4 – п. Поляны; точка 5 – п. Лесное.

нуклеотидной последовательности. Замены в нуклеотидной последовательности изменяют вторичную структуру молекулы, что приводит к изменению ее подвижности в неденатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ). Такие изменения в электрофоретической подвижности указывают на полиморфизм последовательности ДНК. При помощи SSCP-анализа можно обнаружить одиночные нуклеотидные замены в относительно коротких последовательностях (ампликонах), и этот способ широко используется для решения различных задач, связанных с выявлением полиморфизма первичной структуры ДНК, в том числе в фитопатологических исследованиях [11–14]. Для перевода ДНК в одноцепочечное состояние используют термическую и химическую денатурацию, после чего проводят разделение в ПААГ. В настоящем исследовании протокол анализа был следующим: к 1.5–4 мкл ПЦР-продукта добавляли семь объемов денатурирующего буфера (95% формамида, 0.05% бромфенолового синего, 0.05% ксилена цианола, 20 мМ ЭДТА) и инкубировали в течение 10 мин при температуре 95°C. Затем образцы немедленно помещали в лед и наносили на 8%-ный

ПААГ (40 : 1 акриламид : бис-акриламид). Электрофоретическое разделение проводили в 0.5× TBE-буфере при температуре 4°C и напряжении 200 В в течение 4.5 ч. Детекцию результатов электрофореза проводили путем окрашивания геля красителем SYBR Green I с последующей визуализацией в ультрафиолете.

Клонирование и секвенирование

Для определения нуклеотидных последовательностей зон электрофоретической подвижности, обнаруженных по результатам SSCP-анализа, эти зоны вырезали из геля, элюировали TE-буфером, клонировали в вектор pAL-TA (Евроген) по протоколу фирмы-производителя, которым трансформировали компетентные клетки *E. coli* штамма DH5 α , и секвенировали по пять клонов для каждого образца (по методу Сэнгера с помощью набора реактивов Big Dye Terminator v. 3.1 (Applied Biosystems, Inc.) на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems, Inc.)) согласно инструкциям производителя. Надежность прочтения при секвенировании подтверждали тем, что каждый клон секвенировали в двух по-

Таблица 1. Частоты выявленных генотипов *ipiO* в разных точках сбора у образцов *P. infestans*, собранных с растений картофеля

Классы гена <i>ipiO</i>	Доля образцов (%) с выявленными генотипами				
	точка 1	точка 2	точка 3	точка 4	точка 5
Класс I	100	50	100	100	33
Классы I и II	0	20	0	0	67
Класс II	0	30	0	0	0

Примечание. Точка 1 – п. Коренево, поле ВНИИКХ; точка 2 – п. Коренево, частный сектор; точка 3 – д. Масловка; точка 4 – п. Поляны; точка 5 – п. Лесное.

вторностях с прямого и обратного праймеров, и полученные таким образом сиквенсы для каждого клона были идентичны по нуклеотидной последовательности. В общей сложности было получено десять нуклеотидных последовательностей десяти клонов (по пять клонов для каждой из двух зон электрофоретической подвижности).

Математическая обработка данных

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли при помощи программы Clustal Omega, доступной на сервере <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>, с последующим анализом результатов этого выравнивания при помощи программы GeneDoc. Производные аминокислотные последовательности были получены с помощью программы EditSeq. Для построения дендрограммы использовали метод минимальной эволюции в программе MEGA 6.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате ПЦР-амплификации препаратов тотальной ДНК 47 образцов с праймерами, специфичными по отношению к консервативным участкам генов семейства *ipiO P. infestans*, во всех образцах был получен продукт ожидаемой длины – 266 пн. SSCP-анализ полученных ампликонов показал, что в исследуемой популяции полиморфизм генов семейства *ipiO* представлен двумя зонами электрофоретической подвижности – “нижней” и “верхней”, и эти две зоны дают три варианта генотипа-паттерна (рис. 2). Клонирование и секвенирование этих зон показало, что они действительно являются структурными гомологами гена *ipiO*. Эти нуклеотидные последовательности были зарегистрированы нами в базе данных GeneBank NCBI под номерами MN450292 и MN450293 соответственно. Мы сравнили полученные последовательности с известными вариантами гена *ipiO*, относящимися к трем классам семейства этого гена. Результаты сравнения представлены в виде дендрограммы (рис. 3). На этой дендрограмме видно, что полученная нами последовательность нижней зоны относится к клас-

су I гена *ipiO* и наиболее гомологична варианту *ipiO6*, с которым она образует общий кластер, в то время как последовательность верхней зоны образует общий кластер с вариантами *ipiO3* и *ipiO13*, которые принадлежат к классу II. Таким образом, выявляемые с помощью SSCP-анализа три варианта генотипов можно охарактеризовать так: содержащий только гены *ipiO* класса I (паттерн 1); содержащий гены *ipiO* класса I и класса II (паттерн 2); содержащий только гены *ipiO* класса II (паттерн 3). Вариант гена *ipiO4*, который является единственным представителем класса III, в нашем исследовании обнаружен не был.

Вышеуказанные генотипы распределены в проанализированной популяции *P. infestans* Московской области с неодинаковой частотой. Так, наиболее часто встречающимся оказался генотип, содержащий только гены *ipiO* класса I. Он был обнаружен у 60% образцов (28 образцов). Вторым по распространенности оказался генотип, содержащий гены *ipiO* класса I и класса II. Этот генотип имели 23% образцов (11 образцов). Наиболее редким был генотип, содержащий только гены *ipiO* класса II, он был выявлен у 17% образцов (восемь образцов).

При этом встречаемость данных генотипов в разных точках сбора отличалась от общей для популяции и существенно различалась у образцов, собранных с растений картофеля, и образцов, собранных с томатов. Так, в случае образцов, полученных с растений картофеля (табл. 1), все образцы из точек 1, 3 и 4 (п. Коренево, поле ВНИИКХ; д. Масловка; п. Поляны) имели одинаковый генотип, содержащий только гены *ipiO* класса I. Образцы из точки 2 (п. Коренево, частный сектор) были представлены всеми тремя генотипами, при этом частота генотипа, содержащего только гены *ipiO* класса I, была немного ниже средней по популяции, а частота генотипа, содержащего только гены *ipiO* класса II, почти в 2 раза превышала частоту этого варианта для всей популяции. Образцы из точки 5 (п. Лесное) были представлены двумя генотипами – содержащим только гены *ipiO* класса I и содержащим гены *ipiO* класса I и класса II. В этой точке частота встречаемости генотипа, содержащего гены *ipiO* класса I и класса II, почти в

3 раза превышала среднюю по популяции, а частота генотипа, содержащего только гены *ipiO* класса I, напротив была в 2 раза ниже средней по популяции. Также было проанализировано распределение этих генотипов в каждой из трех точек сбора образцов с растений томатов. Результаты этого анализа приведены в табл. 2. Все образцы из точки 4 (п. Поляны) были представлены генотипом, содержащим только гены *ipiO* класса II. У образцов, собранных в точке 3 (д. Масловка), генотип, содержащий гены *ipiO* класса I и класса II, и генотип, содержащий только гены *ipiO* класса II, были представлены поровну, а генотип, содержащий только гены *ipiO* класса I, обнаружен не был. Среди образцов, собранных в точке 5 (п. Лесное), преобладали образцы с генотипом, содержащим гены *ipiO* класса I и класса II. Генотип, содержащий только гены *ipiO* класса II, встречался значительно реже, а генотип, содержащий только гены *ipiO* класса I, также не был обнаружен в этой точке сбора.

Таким образом, было установлено, что картофельная и томатная популяции *P. infestans* существенно различаются по частотам выявленных генотипов *ipiO* (табл. 3). Главным, обращающим на себя внимание, различием является то, что ни у одного из образцов *P. infestans*, собранных на томатах, не был обнаружен генотип, содержащий только гены *ipiO* класса I, который наиболее распространен среди образцов, полученных с картофеля. И наоборот, самый редкий у картофельных образцов генотип, содержащий только гены *ipiO* класса II, у образцов, полученных с растений томатов, встречался в 50% случаев, а другие 50% образцов были представлены генотипом, содержащим гены *ipiO* класса I и класса II, который у картофельных образцов также встречается достаточно редко.

ОБСУЖДЕНИЕ

При помощи метода SSCP-анализа нам удалось изучить полиморфизм генов семейства *ipiO* оомицета *P. infestans* в популяции этого патогена в Московской области. Для этого с использованием специфичных праймеров для ПЦР-амплификации генов данного семейства мы проанализировали 47 образцов тотальной ДНК полевых образцов *P. infestans*, собранных на территории Московской области. В результате SSCP-анализа полученных ампликонов были выявлены две зоны электрофоретической подвижности, которые в разных комбинациях образуют три паттерна, характеризующих полиморфизм генов семейства *ipiO* у изученных образцов. Метод SSCP-анализа достаточно широко применяется для изучения генетического полиморфизма [15], в том числе и у патогенов [11–14], однако ни в одном из известных исследований их авторы не пытались установить молекулярную природу наблюдаемого полиморфизма. В своем

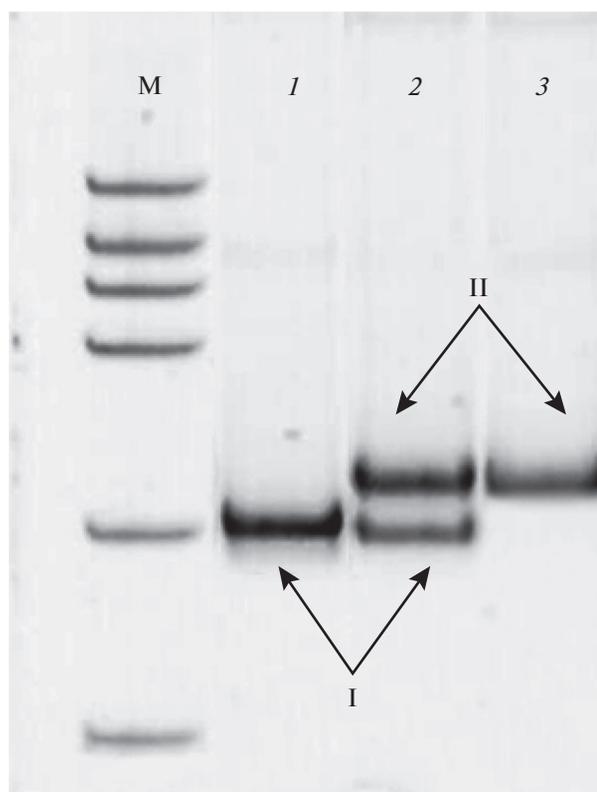


Рис. 2. Полиморфизм генов семейства *ipiO*, выявляемый при помощи SSCP-анализа. М – маркер молекулярной массы; 1, 2, 3 – выявляемые электрофоретические паттерны генов *ipiO*; I и II – зоны, соответствующие классу I и классу II генов *ipiO* соответственно.

исследовании мы отсековировали каждую из двух наблюдаемых зон электрофоретической подвижности и установили, что нуклеотидные последовательности этих зон различаются между собой и соответствуют последовательностям генов *ipiO*, принадлежащих двум разным классам этого семейства. Таким образом, мы установили, что наблюдаемый электрофоретический полиморфизм не является артефактным, а действи-

Таблица 2. Частоты выявленных генотипов *ipiO* в разных точках сбора у образцов *P. infestans*, собранных с растений томатов

Классы гена <i>ipiO</i>	Доля образцов (%) с выявленными генотипами		
	точка 3	точка 4	точка 5
Класс I	0	0	0
Классы I и II	50	0	75
Класс II	50	100	25

Примечание. Точка 3 – д. Масловка; точка 4 – п. Поляны; точка 5 – п. Лесное.

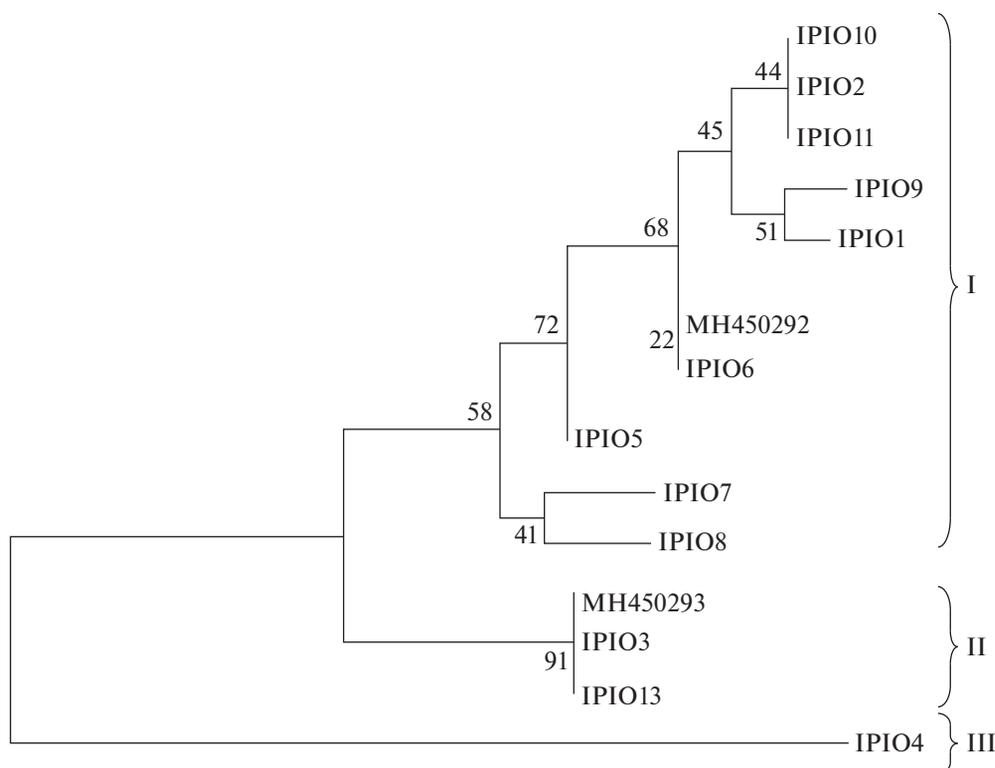


Рис. 3. Дендрограмма нуклеотидных последовательностей генов семейства *ipiO*. I, II, III – классы семейства *ipiO*; MN450292 и MN450293 – регистрационные номера последовательностей “нижней” и “верхней” зон соответственно, в базе данных NCBI; IPIO1–IPIO11, IPIO13 – известные варианты генов *ipiO*, зарегистрированные в базе данных NCBI под номерами PHTPI01D, PHTPI02C, GQ371190, GQ371191, GQ371192, GQ371193, GQ371194, GQ371195, GQ371196, GQ371197, GQ371198, GQ371200 соответственно.

тельно обусловлен различиями в нуклеотидных последовательностях образующих его зон, причем эти различия соответствуют структурным особенностям генов *ipiO* класса I и класса II. Поэтому в дальнейшем при оценке полиморфизма генов семейства *ipiO* выявленные паттерны мы рассматривали как генотипы, содержащие варианты генов *ipiO* класса I и класса II, и оценивали частоты их встречаемости среди образцов изучаемой популяции.

Преобладание в популяции *P. infestans* Московской области генотипов, содержащих гены *ipiO* класса I, согласуется с литературными данными, полученными для других популяций. Так, в рабо-

Таблица 3. Различия в частотах выявленных генотипов *ipiO* у образцов *P. infestans*, собранных с растений картофеля и растений томатов

Классы гена <i>ipiO</i>	Доля образцов (%) с выявленными генотипами	
	Класс I	76
Классы I и II	16	50
Класс II	8	50

те Vleeshouwers et al. [16] есть указание на то, что гены *ipiO* класса I широко распространены в большинстве европейских и североамериканских популяций *P. infestans*, хотя точные данные о процентном соотношении генов *ipiO* разных классов в этой работе не приводятся. Кроме того, другими авторами была отмечена редкая встречаемость гена *ipiO4* класса III [4], который в нашем исследовании вообще обнаружен не был.

Такое преобладание генов *ipiO* класса I можно объяснить тем, что в то время как большинство генов устойчивости картофеля к фитофторозу были интрогрессированы в культурные сорта из дикорастущего вида *Solanum demissum* [17], ген *Rpi-blb1*, распознающий именно варианты гена *ipiO* класса I, был интрогрессирован из другого дикого вида *S. bulbocastanum* [18, 19], который был включен в селекционные программы сравнительно недавно, и поэтому этот ген устойчивости еще редко встречается в возделываемых в России сортах картофеля. Как следствие, в отличие от большинства других известных генов вирулентности *P. infestans*, представленных в популяциях этого патогена вирулентными формами, ген *ipiO* представлен в основном своими авирулентными вариантами, образующими самый многочисленный

класс I этого семейства генов. Поэтому на основе полученных данных можно сделать вывод о том, что широкое внедрение в практику сельского хозяйства сортов картофеля, содержащих в своем геноме ген устойчивости *Rpi-blb1*, является перспективным подходом в борьбе с фитофторозом, так как большинство изолятов *P. infestans* имеют в своем геноме варианты гена *ipiO*, распознаваемые этим геном устойчивости.

В то же время все три выявленные варианты генотипа *ipiO* имели неодинаковую распространенность в исследованной популяции *P. infestans*. Эти генотипы были представлены в точках сбора в разных процентных соотношениях (табл. 1). Такое распределение можно объяснить тем, что источником распространения инфекции *P. infestans* являются клубни, а также растительные остатки в почве, кучи выбракованных клубней, перезимовавшие в почве ооспоры и близость посадок картофеля к томатам. Кроме того, в Московской области возделывается картофель, привезенный из разных нецентрализованных источников. Таким образом, подмосковные популяции возбудителя фитофтороза представлены множеством клонов и отличаются высоким разнообразием [20]. Кроме того, генотип растения-хозяина также является фактором отбора для патогена. И даже в том случае если растение-хозяин имеет другие гены устойчивости, не отвечающие за распознавание эффектора *ipiO*, то они могут косвенно влиять на отбор тех или иных вариантов гена *ipiO*, которые в геноме *P. infestans* могут быть сцеплены с вирулентными формами других *Avr*-генов. Поэтому, например, в точке 2, расположенной в частном секторе п. Коренево, могло выращиваться много различных сортов, на которых паразитировала *P. infestans*, содержащая все три варианта генотипа *ipiO*, в то время как в точке 1, находящейся в поле ВНИИКХ, скорее всего, возделывался один сорт, и все образцы из этой точки имели один вариант генотипа, содержащий только гены *ipiO* класса I.

Также мы выявили различия в частотах встречаемости вариантов генотипа *ipiO* между картофельной и томатной субпопуляциями *P. infestans* в Московской области (табл. 3). У “томатных” образцов полностью отсутствует вариант генотипа, содержащий только гены *ipiO* класса I, а у “картофельных” образцов в четырех из пяти точек сбора отсутствует вариант генотипа, содержащий только гены *ipiO* класса II (табл. 1 и 2). Различия в частотах проявляются даже в одной точке сбора. Наиболее ярко выраженное различие наблюдается в точке 4, где все “картофельные” образцы имеют вариант генотипа, содержащий только гены *ipiO* класса I, а все “томатные” образцы – вариант генотипа, содержащий только гены *ipiO* класса II (табл. 1 и 2). В отличие от картофеля молекулярная генетика устойчивости к фитофторозу у томата изучена довольно слабо. Так, у томата картиро-

вано шесть генов устойчивости к фитофторозу, интрогрессированных в культурные формы из дикорастущего вида *S. pimpinellifolium*, и из этих шести генов нуклеотидная последовательность известна только для одного гена *Ph-3* [21]. При этом известно, что близкие структурные гомологи некоторых генов устойчивости к фитофторозу картофеля у томата выполняют другие функции. В частности, гомолог гена *R3a* картофеля ген *I2* у томата отвечает за устойчивость к *Fusarium oxysporum* [22, 23], а гомолог гена *Rpi-blb2* картофеля ген *Mi-1* у томата придает устойчивость к нематодам, тле и белокрылке [24]. В связи с таким положением дел ничего не известно и о собственно “томатных” эффекторах *P. infestans*, кодирующих их генах вирулентности и полиморфизме этих генов. В то же время было показано, что томатная и картофельная популяции *P. infestans* различаются между собой по ряду признаков, таких как соотношение типов спаривания, расовый состав, устойчивость к металлосу, спектры изоферментов пептидазы, гаплотипы митохондриальной ДНК, профиль SSR-маркеров [25–28]. Мы в своем исследовании впервые установили, что картофельная и томатная субпопуляции *P. infestans* различаются на молекулярном уровне также и по составу *Avr*-генов. Возможно, на томате у *P. infestans* отбор идет по каким-то генам, которые сцеплены с определенными вариантами генов *ipiO*. Молекулярно-генетический аспект взаимодействия *P. infestans* с растением-хозяином в случае томата требует дальнейших исследований.

Таким образом, в настоящей работе впервые выполнено популяционно-генетическое изучение полиморфизма генов семейства *ipiO* *P. infestans* на молекулярном уровне при помощи метода SSCP-анализа. Была показана применимость этого метода для указанной цели и выявлены территориальные особенности распределения полиморфизма генов семейства *ipiO* в популяции *P. infestans* в Московской области, а также связь наблюдаемого полиморфизма с видом растения-хозяина.

Работа выполнена при финансовой поддержке Комплексного плана научных исследований “Развитие селекции и семеноводства картофеля”.

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

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

Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Haas B.J., Kamoun S., Zody M.C. et al. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* // Nature. 2009. V. 461.

- № 7262. P. 393–398.
<https://doi.org/10.1038/nature08358>
2. Champouret N., Bouwmeester K., Rietman H. et al. *Phytophthora infestans* isolates lacking class I *ipiO* variants are virulent on *Rpi-blb1* potato // Mol. Plant-Microbe Interactions. 2009. V. 22. № 12. P. 1535–1545.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-22-12-1535>
 3. Chen Y., Liu Z., Halterman D.A. Molecular determinants of resistance activation and suppression by *Phytophthora infestans* effector IPI-O // PLoS Pathogens. 2012. V. 8. № 3. P. e1002595.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002595>
 4. Halterman D.A., Chen Y., Sopee J. Competition between *Phytophthora infestans* effectors leads to increased aggressiveness on plants containing broad-spectrum late blight resistance // PLoS One. 2010. V. 5. № 5. P. e10536.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010536>
 5. Chen Y., Halterman D.A. Determination of virulence contribution from *Phytophthora infestans* effector IPI-O4 in a resistant potato host containing the *RB* gene // Physiol. and Mol. Plant Pathol. 2017. № 100. P. 30–34.
<https://doi.org/10.1016/j.pmp.2017.05.006>
 6. Chen Y., Halterman D.A. *Phytophthora infestans* effectors IPI-O1 and IPI-O4 each contribute to pathogen virulence // Phytopathology. 2017. V. 107. № 5. P. 600–606.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-16-0240-R>
 7. Thilliez G.J., Armstrong M.R., Lim T.Y. et al. Pathogen enrichment sequencing (PenSeq) enables population genomic studies in oomycetes // New Phytologist. 2019. V. 221. № 3. P. 1634–1648.
<https://doi.org/10.1111/nph.15441>
 8. Kakavas V.K., Plageras P., Vlachos T.A. PCR–SSCP: A method for the molecular analysis of genetic diseases // Mol. Biotechnol. 2008. V. 38. № 2. P. 155–163.
<https://doi.org/10.1007/s12033-007-9006-7>
 9. Sunnucks P., Wilson A.C.C., Beheregaray L.B. et al. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology // Mol. Ecol. 2000. V. 9. № 11. P. 1699–1710.
 10. Ristaino J.B., Groves C.T., Parra G.R. PCR amplification of the Irish potato famine pathogen from historic specimens // Nature. 2001. V. 411. № 6838. P. 695–697.
<https://doi.org/10.1038/35079606>
 11. Nahiyan A.S.M., Boyer L.R., Jeffries P., Matsubara Y. PCR–SSCP analysis of *Fusarium* diversity in asparagus decline in Japan // Eur. J. Plant Pathol. 2011. V. 130. P. 197–203.
<https://doi.org/10.1007/s10658-011-9745-y>
 12. Hansen E., Hesse C., Reeser P. et al. Using single strand conformational polymorphisms (SSCP) to identify *Phytophthora* species in Oregon forests affected by sudden oak death // Proc. Sudden Oak Death Second Sci. Symp.: The State of Our Knowledge. Gen. Tech. Rep. PSW-GTR-196. Albany, CA: Pacific Southwest Research Station, Forest Service, US Department of Agriculture. 2006. № 196. P. 141–142.
 13. Hong C., Gallegly M.E., Richardson P.A., Kong P. *Phytophthora pini* Leonian resurrected to distinct species status // Mycologia. 2011. V. 103. № 2. P. 351–360.
<https://doi.org/10.3852/10-058>
 14. Martin F.N., Coffey M.D., Zeller K. et al. Evaluation of molecular markers for *Phytophthora ramorum* detection and identification: Testing for specificity using a standardized library of isolates // Phytopathology. 2009. V. 99. № 4. P. 390–403.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-4-0390>
 15. Rodríguez F., Cai D., Teng Y., Spooner D. Asymmetric single-strand conformation polymorphism: An accurate and cost effective method to amplify and sequence allelic variants // Am. J. Bot. 2011. V. 98. № 7. P. 1061–1067.
<https://doi.org/10.3732/ajb.1000251>
 16. Vleeshouwers V.G.G.A., Rietman H., Krennek P. et al. Effector genomics accelerates discovery and functional profiling of potato disease resistance and *Phytophthora infestans* avirulence genes // PLoS One. 2008. V. 3. № 8. P. e2875.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002875>
 17. Gu B., Cao X., Zhou X. et al. The histological, effectoromic, and transcriptomic analyses of *Solanum pinnatisectum* reveal an upregulation of multiple NBS-LRR genes suppressing *Phytophthora infestans* infection // Intern. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 9. P. 3211.
<https://doi.org/10.3390/ijms21093211>
 18. Song J., Bradeen J.M., Naess S.K. et al. Gene *RB* cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight // PNAS. USA. 2003. V. 100. № 16. P. 9128–9133.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1533501100>
 19. Van Der Vossen E.A.G., Sikkema A., Hekkert B. te L. et al. An ancient *R* gene from the wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato // The Plant J. 2003. V. 36. № 6. P. 867–882.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01934.x>
 20. Elansky S., Smirnov A., Dyakov Y. et al. Genotypic analysis of Russian isolates of *Phytophthora infestans* from the Moscow region, Siberia and Far East // Phytopathology. 2001. V. 149. P. 605–611.
<https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2001.00642.x>
 21. Zhang C., Liu L., Wang X. et al. The *Ph-3* gene from *Solanum pimpinellifolium* encodes CC-NBS-LRR protein conferring resistance to *Phytophthora infestans* // Theor. Applied Genet. 2014. V. 127. № 6. P. 1353–1364.
<https://doi.org/10.1007/s00122-014-2303-1>
 22. Huang S., Van Der Vossen E.A.G., Kuang H. et al. Comparative genomics enabled the isolation of the *R3a* late blight resistance gene in potato // The Plant J. 2005. V. 42. № 2. P. 251–261.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02365.x>
 23. Dey S., Ghose K., Gangopadhyay G., Basu D. Assessment of genomic diversity of wild and cultivated tomato through resistance gene analogue polymorphism and *I2* homologues // Euphytica. 2007. V. 154. № 1–2. P. 219–230.
<https://doi.org/10.1007/s10681-006-9290-5>
 24. Van Der Vossen E.A.G., Gros J., Sikkema A. et al. The *Rpi-blb2* gene from *Solanum bulbocastanum* is an *Mi-1* gene homolog conferring broad-spectrum late blight resistance in potato // The Plant J. 2005. V. 44. № 2. P. 208–222.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02527.x>
 25. Кузнецова М.А., Стацюк Н.В., Рогожин А.Н. и др. Мониторинг изолятов *Phytophthora infestans*, выделенных с картофеля и томатов в Московской обла-

- сти (2009–2017 гг.) // Достижения науки и техники АПК. 2018. Т. 32. № 3. С. 28–33.
<https://doi.org/10.24411/0235-2451-2018-10306>
26. Elansky S.N., Pobedinskaya M.A., Kokaeva L.Y. et al. *Phytophthora infestans* populations from the European part of Russia: Genotypic structure and metalaxyl resistance // J. Plant Pathol. 2015. V. 97. № 3. P. 449–456.
<https://doi.org/10.4454/JPP.V97I3.020>
27. Kröner A., Mabon R., Corbière R. et al. The level of specialization of *Phytophthora infestans* to potato and tomato is a biotrophy-related, stable trait // BioRxiv. 2019. 571596.
<https://doi.org/10.1101/571596>
28. Cohen Y., Rubin A.E., Galperin M. et al. Migration and selection enforced multiple phenotypic and genotypic changes in the population of *Phytophthora infestans* in Israel during the last 36-year period // Preprints. 2020. 2020010321.
<https://doi.org/10.20944/preprints202001.0321.v1>

The Study of Polymorphism of the *ipiO* Gene Family in Oomycete *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary in the Moscow Region Population Using SSCP Analysis

V. V. Martynov^{a, b, *} and V. K. Chizhik^b

^aMoscow Region State University, Moscow region, Mytishchi, 141014 Russia

^bAll-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, 127550 Russia

*e-mail: martynov.vik@gmail.com

The goal of this study was to investigate the polymorphism of the primary structure of *ipiO* genes in the population of *P. infestans* from the Moscow region. To this end we used SSCP analysis as an efficient method for assessing polymorphism. As a result, using this technique, we could distinguish between the classes of the *ipiO* gene family and establish that the studied samples had one of three variants of the *ipiO* genotype depending on the combination of genes of these classes. Identified genotypes were found to be distributed in the analyzed population of *P. infestans* in the Moscow region with an unequal frequency. In addition, it was shown that potato and tomato subpopulations of *P. infestans* also differ in the frequency of occurrence of the identified genotypes.

Keywords: population, polymorphism, virulence genes, *Phytophthora infestans*, SSCP analysis.

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ СЕВЕРНЫХ И ЮЖНОЙ ПОПУЛЯЦИЙ КАРЕЛЬСКОЙ БЕРЕЗЫ

© 2021 г. Л. В. Ветчинникова^{1, *}, А. Ф. Титов^{2, 3}, Л. В. Топчиева²

¹Институт леса Федерального исследовательского центра
“Карельский научный центр Российской академии наук”, Петрозаводск, 185910 Россия

²Институт биологии Федерального исследовательского центра
“Карельский научный центр Российской академии наук”, Петрозаводск, 185910 Россия

³Отдел комплексных научных исследований Федерального исследовательского центра
“Карельский научный центр Российской академии наук”, Петрозаводск, 185910 Россия

*e-mail: vetchin@krc.karelia.ru

Поступила в редакцию 20.05.2020 г.

После доработки 31.07.2020 г.

Принята к публикации 25.08.2020 г.

На основе микросателлитного анализа проведена сравнительная оценка генетического разнообразия северных (находящихся в Республике Карелия и в Финляндии) и южной (в Республике Беларусь) популяций карельской березы *Betula pendula* Roth var. *carelica* (Mercklin) Hämet-Ahti. Полученные результаты позволили выявить их общие черты, а также определенное генетическое своеобразие. Установлено, что для популяций карельской березы характерно довольно высокое аллельное разнообразие и одновременно с этим превышение значений ожидаемой гетерозиготности над наблюдаемой, что свидетельствует о преимущественном накоплении в популяциях гомозигот и соответственно повышении риска дальнейшей деградации популяций, особенно северных, численность которых резко сократилась в последние десятилетия. В южной популяции аллельное разнообразие оказалось несколько выше, чем в северных, что может быть обусловлено ее значительно более высокой численностью и слабовыраженной фрагментацией. Кластерный анализ подтвердил обособленность южной популяции от северных, что в определенной степени соответствует известному феномену “изоляция расстоянием”.

Ключевые слова: карельская береза *Betula pendula* Roth var. *carelica* (Mercklin) Hämet-Ahti, микросателлитные локусы, популяции, генетическое разнообразие и дифференциация.

DOI: 10.31857/S0016675821040147

Представители рода *Betula* L., относящегося к семейству Betulaceae, порядку Betulales, произрастают во всех природных зонах Северного полушария от тундры до субтропиков. На территории Европы широкое распространение получили белокорые березы – *Betula pendula* Roth и *Betula pubescens* Ehrh., при этом наиболее многочисленные их популяции сосредоточены в умеренных и бореальных лесах [1–3]. Уникальный представитель аборигенной дендрофлоры здесь – карельская береза *Betula pendula* Roth var. *carelica* (Mercklin) Hämet-Ahti, которая широко известна благодаря высокоценной узорчатой текстуре древесины [4]. Являясь древесной породой, карельская береза лесов не образует, а ее ареал в значительной степени перекрывается с ареалами березы повислой и березы пушистой, однако ее синэкологический оптимум отличается от последних, прежде всего отношением к световому фактору. Карельская береза также характеризуется высоким уровнем

полиморфизма по целому ряду признаков, включая жизненную форму (от одноствольного дерева до многоствольного “дерева-куста” и кустарника), тип поверхности ствола, насыщенность рисунка в древесине и ряд других. Это является одним из отражений биологических особенностей данного вида, характеризует его определенную пластичность, расширяет возможности существования в различных экологических условиях, в том числе малоприспособленных для других древесных растений [4].

Подобно многим древесным породам карельская береза уже не одно столетие активно используется человеком, однако ее целенаправленное изучение было начато лишь в 20–30-е гг. прошлого века [5–8]. Анализ численности карельской березы в природных популяциях, расположенных исключительно на территории Балтийского региона, показал, что этот вид оказался среди наиболее уязвимых: за последние 100 лет его численность сократилась почти на две трети, а ареал

Таблица 1. Характеристика используемых праймеров и их последовательность

Локус	Номер доступа в базе NCBI	Последовательность праймеров 5'–3'	
		прямой	обратный
L2.3	AF310847	Cy5cagtgtttggacggtgagaa	cgggtgaagtagacggaact
L5.4	AF310862	Cy5aagggcacctgcagattaaga	aaaattgcaacaaaacgttgc
L7.3	AF310864	Cy5ggggatccagtaagcggat	cacacgagagatagagtaacgaa
L7.4	AF310855	Cy5tgaacgaacggaagagttg	atagccagacttttcatccg
L022	AF310874	Cy5aacggacaattcacgggta	ggagttcatggattggagga

приобрел дизъюнктивный (фрагментированный) характер [9, 10]. Столь значительное его сокращение с большой вероятностью могло привести к обеднению генофонда карельской березы, кардинально изменить генетическую структуру ее популяций и уровень генетического разнообразия. Менее фрагментированная и более многочисленная популяция карельской березы в настоящее время сохранилась только на территории Республики Беларусь.

Учитывая это, цель данной работы – изучение генетического разнообразия и уровня дифференциации популяций карельской березы, расположенных в северной (Россия (Республика Карелия), Финляндия) и южной (Республика Беларусь) частях ее ареала, с помощью ядерных микросателлитных маркеров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования использовали двухлетние растения карельской березы, полученные из семян от контролируемого опыления. Родительские особи сибсового потомства отбирали в наиболее крупных природных популяциях карельской березы, расположенных в северной (~62° с.ш., Финляндия и Россия) и южной (~52° с.ш., Республика Беларусь) частях ее ареала, удаленных друг от друга примерно на 1300 км с севера на юг в пределах одной географической долготы (~30° в.д.). Учитывая значительное сокращение площади и численности деревьев северных популяций карельской березы, в исследования были включены три наиболее многочисленные, одна из которых – Финская – расположена в районе Пункахарью (Восточная Финляндия, Южное Саво), а две другие – Карельская 1 и Карельская 2 – на территории Республики Карелия (Россия), примерно в 400–500 км восточнее финской. Кроме того, каждая из карельских популяций представлена двумя субпопуляциями, разделенными между собой акваторией Онежского озера: это Прионежская А и Прионежская Б (в случае Карельская 1) и Заонежская А и Заонежская Б (в случае Карельская 2), произрастающие, соответственно, на юго-западном и северо-восточном его побережьях. Все се-

верные популяции находятся в сходных природно-климатических условиях. Южная популяция (Белорусская) отражает генофонд основных белорусских популяций, представленный в составе искусственно созданного насаждения на территории Корневской экспериментальной лесной базы Института леса Национальной академии наук Беларуси (в 13 км южнее г. Гомеля).

Общее число исследованных образцов составило не менее 180 (по 30 случайно отобранных растений от каждой из изученных популяций и субпопуляций). Листовые пластинки отбирали весной в период их распускания.

ДНК из растительной ткани выделяли с использованием набора AxyPrep Multisource Genomic DNA Kit (Axygen, США). Микросателлитный анализ проводили по пяти ядерным микросателлитным локусам: L2.3, L5.4, L7.3, L7.4, L022 (табл. 1), использованным нами ранее для оценки генетической структуры популяций в Карелии [11].

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) осуществляли в амплификаторе iCycler iQ 5 (Bio-Rad, США) по следующей программе: денатурация – 3 мин при 95°C, далее 35 циклов: денатурация 30 с при 95°C, отжиг – 30 с при 59°C, полимеризация 30 с при 72°C. Финальная элонгация – 10 мин при 72°C. Протокол был оптимизирован с использованием градиентного температурного режима. Реакционная смесь для ПЦР объемом 50 мкл включала 50 нг ДНК изучаемых образцов (2 мкл), 10 пМ каждого праймера (0.2 мкл), 12.5 мкл смеси для ПЦР DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Германия) и 35 мкл деионизованной стерильной воды.

Разделение и определение ядерных микросателлитных фрагментов выполняли на приборе CEQ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, Швейцария) с использованием набора GenomeLab Fragment Analysis (Beckman Coulter). Количество анализируемого ПЦР-продукта – 0.5 мкл. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы Aglequin 3.1. Уровень генетического разнообразия и дифференциацию популяций оценивали по следующим показателям: число аллелей, приходящееся на один локус; наблюдаемая гетерози-

Таблица 2. Число аллелей и величины наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности для пяти локусов в популяциях и субпопуляциях карельской березы, находящихся в северной и южной частях ее ареала

Популяция, субпопуляция	Число аллелей		F_{IS}	Гетерозиготность	
	всего	на один локус		наблюдаемая (H_O)	ожидаемая (H_E)
Северная часть ареала					
Карельская 1					
Прионежская А	28	7.00 ± 2.55	0.6056	0.51 ± 0.18	0.71 ± 0.06
Прионежская Б	26	6.50 ± 0.87	0.7785	0.44 ± 0.17	0.71 ± 0.07
Карельская 2					
Заонежская А	26	6.50 ± 1.12	-0.2475	0.56 ± 0.20	0.57 ± 0.17
Заонежская Б	26	6.50 ± 1.70	0.2505	0.31 ± 0.16	0.73 ± 0.10
Среднее	26.5	6.63		0.46	0.68
Финская	27	6.75 ± 1.10	0.3305	0.45 ± 0.10	0.75 ± 0.09
Южная часть ареала					
Белорусская	29	7.25 ± 2.50	-0.2022	0.38 ± 0.22	0.75 ± 0.06

гетерозиготность (H_O); ожидаемая гетерозиготность (H_E); индекс фиксации Райта (коэффициент инбридинга, F): коэффициент инбридинга особи относительно популяции (F_{IS}), коэффициент инбридинга особи относительно вида (F_{IT}), коэффициент инбридинга популяции относительно вида (показатель межпопуляционного разнообразия (F_{ST}). Соответствие распределения частот аллелей равновесию Харди–Вайнберга для каждой популяции (критерий χ^2) проверяли с использованием программного обеспечения Arlequin 3.1 [12]. Наличие “нуль-аллелей” выявляли с помощью программного обеспечения MICRO-CHECKER 2.2.3. Генетическое расстояние между популяциями оценивали с помощью программы GenAlEx 6.51b2. Объединение особей в кластеры (метод UPGMA) и построение дендрограммы с бутстреп-оценкой (1000 генераций) осуществляли в программе PopTree. Для анализа пространственного распределения генетической изменчивости популяций использовали тест Мантеля (программа GenAlEx 6.51b2).

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Все изученные популяции карельской березы характеризуются высоким уровнем аллельного разнообразия (табл. 2). При этом наибольшее число

аллелей на локус зафиксировано для южной (белорусской) популяции (7–8), а наименьшее – для северных (карельских и финской, в среднем до 7). При этом во всех изученных популяциях выявлено несоответствие распределения частот аллелей закону Харди–Вайнберга ($p < 0.05$).

Минимальные значения наблюдаемой гетерозиготности (H_O) установлены для карельской субпопуляции Заонежская Б и популяции Белорусская (соответственно 0.31 и 0.38) (табл. 2). Для других величина H_O колебалась от 0.44 до 0.56. Наименьшие значения ожидаемой гетерозиготности (H_E) отмечены для карельской субпопуляции Заонежская А (0.57), в остальных популяциях она варьировала от 0.71 до 0.75.

Таблица 3. Значения статистик Райта по пяти ядерным микросателлитным локусам

Локус	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
L2.3	0.286	0.432	0.205
L5.4	0.496	0.597	0.199
L7.3	0.291	0.445	0.217
L7.4	0.197	0.328	0.163
L022	0.287	0.356	0.201

Таблица 4. Значения F_{ST} для популяций карельской березы, находящихся в северной и южной частях ее ареала

Популяции, субпопуляции	Карельские				Финская	Белорусская
	Прионежская А	Прионежская Б	Заонежская А	Заонежская Б		
Карельские						
Прионежская А	0.0000					
Прионежская Б	0.0811	0.0000				
Заонежская А	0.1574	0.1645	0.0000			
Заонежская Б	0.1660	0.2260	0.1738	0.0000		
Финская	0.1451	0.2079	0.1429	0.1536	0.0000	
Белорусская	0.2823	0.2945	0.2574	0.2433	0.2293	0.0000

Таблица 5. Результаты анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) между популяциями карельской березы

Источник изменчивости	Число степеней свободы	Сумма квадратов	Компонент дисперсии	Изменчивость, %
Межпопуляционная	5	232.17	1.43	28
Внутрипопуляционная	174	627.13	3.60	72
Общая	179	859.30	5.03	100

Оценка генетической подразделенности популяций и инбридинга показала, что из пяти исследованных ядерных микросателлитных локусов только L5.4 отличается повышенными значениями показателей F_{IS} и F_{IT} (табл. 3). Значения F_{ST} оказались весьма близкими для всех изученных локусов.

На основании расчета индекса фиксации Райта F_{IS} , характеризующего инбридинг особи относительно популяции, установлено, что в одной из карельских субпопуляций (Заонежская А) и в популяции Белорусская наблюдается избыток гетерозигот ($F_{IS} = -0.2475$ и -0.2022 соответственно), а в других северных популяциях – их дефицит (табл. 2). Величина генного разнообразия также оказалась выше в южной популяции по сравнению с северными (почти на 5%), однако статистически значимых различий между ними не обнаружено (например, значение критерия Стьюдента при сравнении субпопуляций Заонежская А и популяции Белорусская составило 0.94, $p = 0.35$).

Количественная оценка дифференциации популяций карельской березы, расположенных в северной и южной частях ее ареала, проведена на основании коэффициента F_{ST} , который при парном сравнении служит мерой генетических дистанций (табл. 4). Согласно четырем внутривидовым уровням дифференциации, предложенным

Райтом ($F_{ST} < 0.05$ – слабая; $0.05 < F_{ST} < 0.15$ – промежуточная; $0.15 < F_{ST} < 0.25$ – большая и $F_{ST} > 0.25$ – очень большая) [13], только в южной популяции (Белорусская) карельской березы обнаружен высокий уровень дифференциации, который варьировал от 0.23 до 0.29. Минимальные значения F_{ST} и слабый уровень генетической дистанции зафиксированы при сравнении субпопуляций внутри популяции Карельская 1. Между другими северными популяциями уровень дифференциации оказался промежуточным или большим.

По результатам анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) 28% общей генетической изменчивости приходится на межпопуляционную составляющую, 72% – на внутрипопуляционную компоненту (табл. 5).

Дендрограмма генетического сходства изученных популяций карельской березы отображена на рис. 1. Кластерный анализ объединил субпопуляции Прионежская А и Прионежская Б, представляющие популяцию Карельская 1, в один кластер, что подтвердило их близкое родство (0.92). Популяция Карельская 2, в состав которой входят субпопуляции Заонежская А и Заонежская Б, составила общий кластер с популяциями Финская и Карельская 1 (генетическое сходство равно 0.86). Однако заонежские субпопуляции оказались более удаленными друг от друга по сравнению с прионеж-

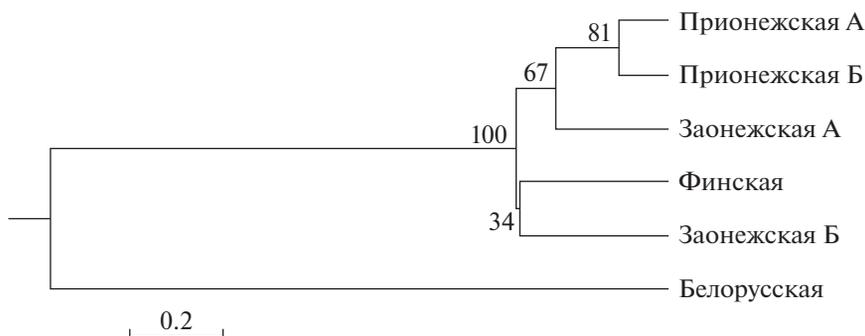


Рис. 1. Дендрограмма, отражающая степень генетического сходства популяций карельской березы, находящихся в северной (Финская, Карельская 1 (субпопуляции Прионежская А и Прионежская Б) и Карельская 2 (субпопуляции Заонежская А и Заонежская Б)) и южной (Белорусская) частях ее ареала, с помощью микросателлитных маркеров.

скими. Южная популяция (Белорусская) сформировала на дендрограмме отдельное плечо и оказалась генетически обособленной от северных. Об изоляции расстоянием изученных популяций свидетельствует также уровень значимости для коэффициента Мантеля ($p < 0.01$), за исключением популяций Заонежская А и Б.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты микросателлитного анализа ДНК показали, что популяции карельской березы, расположенные в северной (Республика Карелия, Финляндия) и южной (Республика Беларусь) частях ее ареала характеризуются высоким уровнем аллельного разнообразия (от 4 до 14), что согласуется с данными финских ученых (от 4 до 15), изучавших карельскую березу по семи микросателлитным локусам [14]. У *B. pendula* и *B. pubescens* аллельное разнообразие по тем же локусам оказалось существенно ниже. В частности, в условиях Беларуси число аллелей на локус для березы повислой составило всего 1–2, а для березы пушистой – от 2 до 4 [15].

Наши исследования, проведенные по пяти микросателлитным локусам, свидетельствуют о том, что аллельное разнообразие карельской березы несколько выше в южной части ее ареала (29 аллелей) по сравнению с северной (26.5–27 аллелей) (табл. 2). По всей вероятности, это обусловлено значительно более высокой численностью ее популяций без выраженной фрагментации ареала на территории Республики Беларусь, а не экологической нагрузкой, которую могут испытывать виды на границах ареала или в неблагоприятных условиях произрастания [16–19]. Наиболее вероятной причиной значительного снижения численности в северных популяциях мог выступать антропогенный фактор, в частности селективная вырубка деревьев с наиболее ярко выраженной узорчатой текстурой в древесине, которая особенно активно осуществлялась на

территории стран Северной Европы и российской Карелии [10, 20–23]. В результате сокращения площади популяций и их численности количество аллелей сократилось, но не так резко, как это отмечено, например, для островных популяций сосны обыкновенной [24]. Учитывая предельный возраст карельской березы, который составляет 100 лет и более, можно предположить, что сравнительно высокий полиморфизм северных популяций сохранился благодаря тому, что необратимое снижение эффективной численности популяций и сокращение их площадей произошли относительно недавно.

Различия, обнаруженные в соотношении наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности в сторону увеличения последней, являются отражением инбридинга, отбора против гетерозигот и дрейфа генов в популяциях с низкой численностью [18, 25–31]. О значительном недостатке гетерозигот (от 25 до 77%) свидетельствуют также различия, выявленные по уровню инбридинга особи относительно отдельной популяции (F_{IS}) (см. табл. 2). Так, наибольшие значения F_{IS} отмечены в популяции Карельская 1, которые по сравнению с Финской оказались выше более чем в 2 раза. Ранее нами показано, что для карельских популяций по четырем локусам среднее значение F_{IS} равнялось 0.2223, а инбридинг особи относительно популяции соответствовал 22.23% [11, 32]. F_{IT} по значениям оказался выше и обнаружил 33.51%-ный недостаток гетерозигот у особей относительно вида, тогда как F_{ST} составил лишь 0.1450. Следовательно, только 14.5% всей генетической изменчивости карельской березы приходится на межпопуляционную составляющую, а 85.5% – на внутривидовую [9]. Причиной этого могла стать высокая частота близкородственных скрещиваний, происходящих, вероятно, вследствие пространственной изоляции северных популяций и входящих в них субпопуляций и соответственно ослабления потока генов между ними [33, 34].

Следует также отметить, что субпопуляция карельской березы Заонежская 2 и популяция Белорусская характеризуются статистически достоверным накоплением избытка доли гетерозигот. Последнее коррелируется с тем, что первая является наибольшей по численности в России, а вторая — наибольшей в мире. По данным П.С. Кирьянова с соавт. [15] в составе белорусских популяций среди “зорчатых” особей карельской березы более 70% являются гетерозиготными. Довольно высокие значения ожидаемой гетерозиготности в популяциях карельской березы отмечены также на территории Финляндии (0.72) [14].

Показатели генетического сходства (в пределах от 0.92 до 0.77) подтвердили выявленные генетические различия между северными и южной популяциями карельской березы. Согласно дендрограмме генетического сходства анализируемые популяции можно условно разделить на два больших кластера (см. рис. 1). В один из них вошли деревья из популяций, расположенных на территории России (Республика Карелия) и Финляндии, что было ожидаемым, поскольку эти территории, хотя и удалены друг от друга на 400 км, расположены в сходных природно-климатических условиях. Генетически дальше от них отстоит Белорусская популяция, что прежде всего может быть следствием ее географической отдаленности и действия фактора “изоляция расстоянием” [35–38].

Таким образом, полученные нами результаты демонстрируют довольно высокое генетическое разнообразие популяций карельской березы, знание которого необходимо учитывать при выборе путей предотвращения негативных последствий, связанных с сокращением численности ее популяций. Некоторые различия в величинах параметров генетического разнообразия, выявленные у карельской березы в северной и южной частях ее ареала, скорее обусловлены биологическими особенностями вида и его эволюционной историей (включая дрейф генов), чем экологическими условиями местообитания ее северных и южных популяций. Поэтому, решая проблему сохранения генетического разнообразия карельской березы, важно учитывать генетическую структуру ее популяций и уровень их внутри- и межпопуляционной дифференциации. В частности, для искусственного воспроизводства и реинтродукции данной древесной породы следует отбирать лучшие генотипы (плюсовые деревья) из разных частей ареала с учетом происхождения и особенностей конкретных популяций. Целесообразно также создавать и использовать для этих целей уже имеющиеся коллекции клонов карельской березы в культуре *in vitro* [39, 40].

Работа осуществлялась из средств федерального бюджета в рамках выполнения государственного

задания ФИЦ “Карельский научный центр Российской академии наук” (Институт леса КарНЦ РАН, Институт биологии КарНЦ РАН и Отдел комплексных научных исследований КарНЦ 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. Consensus document on the biology of European white birch (*Betula pendula* Roth) // Series on harmonisation of regulatory oversight in biotechnology. № 28. Environment Directorate Organization for Economic Cooperation and Development. Paris, 2003. 46 p.
2. Hynynen J., Niemistö P., Viherä-Aarnio A. et al. Silviculture of birch (*Betula pendula* Roth and *Betula pubescens* Ehrh.) in Northern Europe // Forestry. 2010. V. 83. № 1. P. 103–119. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpp035>
3. Понов С.Ю. Ценогическое распределение и экологические предпочтения *Betula pendula* и *Betula pubescens* в Центральной России // Журн. общ. биологии. 2017. Т. 78. № 2. С. 61–73.
4. Ветчинникова Л.В., Тумов А.Ф. Карельская береза — уникальный биологический объект // Успехи соврем. биологии. 2019. Т. 139. № 5. С. 412–433. <https://doi.org/10.1134/S0042132419050107>
5. Hintikka T.J. Visakoivusta ja sen esiintymisestä // Metsät. Aikak. 1916. V. 33. № 11. P. 417–420.
6. Heikinheimo O. Visakoivumetsien perustaminen ja kasvattaminen // Suomen metsänhoitoyhdistyksen vuosikirja. 1933. P. 27–46.
7. Соколов Н.О. Краеводам о карельской березе. Петрозаводск: Изд. Карельского гос. музея, 1938. 16 с.
8. Lindquist B. Forstgenetik in der Schwedischen Waldbaupraxis. Radebeul und Berlin: Neumann, 1954. 156 s.
9. Ветчинникова Л.В., Тумов А.Ф. Ботанические заказники карельской березы в Республике Карелия: история, современное состояние и проблемы // Ботан. журн. 2018. Т. 103. № 2. С. 256–265. <https://doi.org/10.1134/S0006813618020096>
10. Ветчинникова Л.В., Тумов А.Ф. Современное состояние ресурсов *Betula pendula* var. *carelica* (Betulaceae) // Растит. ресурсы. 2020. Т. 56. № 1. С. 16–33. <https://doi.org/10.31857/S0033994620010082>
11. Ветчинникова Л.В., Тумов А.Ф., Топчиева Л.В., Рендаков Н.Л. Оценка генетического разнообразия популяций карельской березы в Карелии с помощью микросателлитных маркеров // Экол. генетика. 2012. Т. 10. Вып. 1. С. 34–37.
12. Excoffier L., Lischer H.E.L. Arlequin suite version 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>
13. Фрисман Л.В., Богданов А.С., Картавец И.В. и др. Дифференциация континентальных изолятов полевой мыши (*Apodemus agrarius* Pallas, 1771) по микросателлитным локусам // *Журн. общ. биологии.* 2019. Т. 80. № 4. С. 274–285.
 14. Koivuranta L., Leinonen K., Pulkkinen P. Marketing of forest reproductive material: the use of microsatellites for identification of registered tree clones in Finland // *Metlan työraportteja / Working Papers of the Finnish Forest Research Institute* 77. 2008. 19 s.
<http://www.metla.fi/julkaisut/workingpapers/2008/mwp077.htm>.
 15. Кирьянов П.С., Баранов О.Ю., Маслов А.А., Падутов А.В. Молекулярно-генетические подходы к идентификации межвидовых и внутривидовых гибридов берез Восточно-Европейского региона // *Мол. и прикл. генетика.* 2019. Т. 26. С. 45–55.
 16. Лебедева О.Н., Николаевская Т.С., Титов А.Ф., Федоренко О.М. Биологические особенности северных популяций многолетних злаков. Генетический груз и выживаемость. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2012. 261 с.
 17. Федоренко О.М., Зарецкая М.В., Лебедева О.Н., Титов А.Ф. Генетическое разнообразие природных популяций *Arabidopsis thaliana* (L.), расположенных на северной периферии ареала вида // *Тр. Карельского научн. центра РАН.* 2014. № 2. С. 36–42.
 18. Шигапов З.Х., Мустафина А.Н., Шигапова А.И., Уразбахтина К.А. Генетическое разнообразие популяций редкого вида *Dictamnus gymnostylis* Stev. в Башкирском Предуралье // *Генетика.* 2014. Т. 50. № 9. С. 1067–1074.
<https://doi.org/10.7868/S0016675814090136>
 19. Нечаева Ю.С., Жуланов А.А., Боронникова С.В., Пришневская Я.В. Нуклеотидный полиморфизм адаптивно значимых генов-кандидатов в популяциях *Larix sibirica* Ledeb. Урала // *Генетика.* 2017. Т. 53. № 5. С. 591–600.
<https://doi.org/10.7868/S0016675817050071>
 20. Scholz E. Das Verbreitungsgebiet der Braunmasebirke // *Arch. Forstwesen.* 1963. Bd. 12. № 12. S. 1243–1253.
 21. Соколов Н.О. Карельская береза. Петрозаводск: гос. изд-во Карело-Финской ССР, 1950. 116 с.
 22. Побирушко В.Ф. Распространение и изменчивость березы карельской в Беларуси // *Ботаника.* Минск: Навука і тэхніка, 1992. Вып. 31. С. 31–39.
 23. Hagqvist R., Mikkola A. Visakoivun kasvatus ja käyttö. Nameenlinna, 2008. 168 s.
 24. Санников С.Н., Петрова И.В., Санникова Н.С. и др. Инсуляризация и полиморфизм островных маргинальных популяций *Pinus sylvestris* L. // *Экология.* 2011. № 3. С. 170–175.
 25. Сулей М. Пороги для выживания: поддержание приспособленности и эволюционного потенциала // *Биология охраны природы.* М.: Мир, 1983. С. 177–196.
 26. Hamrick J.L., Godt M.J.W. Allozyme diversity in plant species // *Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources.* Massachusetts: Sinauer Associates, Sunderland, 1989. P. 43–63.
 27. Ellstrand N.C., Elam D.R. Population genetic consequences of small population size: implication for plant conservation // *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 1993. V. 24. P. 217–242.
 28. Алтухов Ю.П. Генетика популяций и сохранение биоразнообразия // *Соросовский журн.* 1995. № 1. С. 32–43.
 29. Хедрик Ф. Генетика популяций. М.: Техносфера, 2003. 588 с.
 30. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / Под ред. Алтухова Ю.П. М.: Наука, 2004. 619 с.
 31. Падутов В.Е., Хотылева Л.В., Баранов О.Ю., Ивановская С.И. Генетические эффекты трансформации лесных экосистем // *Экол. генетика.* 2008. Т. 6. № 1. С. 3–11.
 32. Ветчинникова Л.В., Титов А.Ф., Кузнецова Т.Ю. Карельская береза: биологические особенности, динамика ресурсов и воспроизводство. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2013. 312 с.
 33. Холина А.Б., Корень О.Г., Журавлев Ю.Н. Генетическая структура и дифференциация популяций тетраплоида *Oxytropis chankaensis* (Fabaceae) // *Генетика.* 2009. Т. 45. № 1. С. 81–91.
 34. Баранов О.Ю., Каган Д.И., Падутов В.Е. Оценка влияния различных факторов на формирование генетической структуры и уровень генетической изменчивости популяций лесных древесных видов // *Мол. и прикл. генетика.* 2016. Т. 20. С. 5–14.
 35. Wright S. Isolation by distance // *Genetics.* 1943. V. 28. № 2. P. 114–138.
 36. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. М.: Академкнига, 2003. 431 с.
 37. Видякин А.И., Боронникова С.В., Нечаева Ю.С. и др. Генетическая изменчивость, структура и дифференциация популяций сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) на северо-востоке Русской равнины по данным молекулярно-генетического анализа // *Генетика.* 2015. Т. 51. № 12. С. 1401–1409.
<https://doi.org/10.7868/S0016675815120139>
 38. Федоренко О.М., Зарецкая М.В. Особенности микросателлитного полиморфизма двух видов *Arabidopsis* // *Генетика.* 2015. Т. 51. № 12. С. 1391–1400.
 39. Коллекция *in vitro* клонов редких растений семейства Betulaceae. <http://www.ckr-rf.ru/usu/465691/>.
 40. Коллекция *in vitro* клонов ценных генотипов листовых древесных растений. <http://ckr-rf.ru/usu/569228/>.

A Study of the Genetic Diversity and Differentiation of Northern and Southern Curly Birch Populations

L. V. Vetchinnikova^{a, *}, A. F. Titov^{b, c}, and L. V. Topchieva^b

^aForest Research Institute, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, 185910 Russia

^bInstitute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, 185910 Russia

^cDepartment for Multidisciplinary Scientific Research, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, 185910 Russia

*e-mail: vetchin@krc.karelia.ru

The genetic diversity of northern (in the Republic of Karelia and Finland) and southern (in Belarus) populations of curly birch *Betula pendula* Roth var. *carelica* (Mercklin) Hämet-Ahti was compared using microsatellite analysis. As a result, their common features as well as some genetic peculiarities were revealed. We found that the curly birch populations had a fairly high allelic diversity simultaneously with observed heterozygosity not as high as expected, indicating that the accumulation of homozygotes prevailed in the populations, thus increasing the risk of their degradation, especially for northern populations, which have already declined sharply in the past few decades. In the southern population, the allelic diversity turned out to be somewhat higher than in northern ones, possibly due to a larger size and slight fragmentation. Cluster analysis confirmed the separation of the southern population from its northern counterparts, which to some degree corresponds to the well-known “isolation by distance” phenomenon.

Keywords: curly birch *Betula pendula* Roth var. *carelica* (Mercklin) Hämet-Ahti, microsatellite loci, populations, genetic diversity and differentiation.

**ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ
КЫРГЫЗСКОЙ ПОРОДЫ ЛОШАДЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ – РАСШИРЕННОЕ
ГЕНОГЕОГРАФИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

© 2021 г. Ж. Т. Исакова¹ *, М. А. Исаев², В. Н. Кипень³, Л. В. Калинин⁴, К. А. Айтбаев¹,
М. А. Арзыбаев², С. Б. Мукеева¹, Осмонкул кызы Мээрим¹, Н. М. Алдашева¹

¹Институт молекулярной биологии и медицины, Бишкек, 720040 Кыргызстан

²Кыргызский национальный аграрный университет им. К.И. Скрябина, Бишкек, 720005 Кыргызстан

³Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, 220072 Республика Беларусь

⁴Всероссийский научно-исследовательский институт коневодства, Рязанская обл., п. Дивово, 391105 Россия

*e-mail: jainagul@mail.ru

Поступила в редакцию 29.04.2020 г.

После доработки 07.08.2020 г.

Принята к публикации 01.10.2020 г.

Современная порода кыргызских лошадей обнаруживает высокий уровень внутривидовой генетической вариабельности. В 17 STR-локусах идентифицировано 154 аллеля, в том числе 59 редких аллелей. Выявлены новые редкие аллели для 15 локусов – *AHT4*, *AHT5*, *ASB2*, *ASB17*, *ASB23*, *CA425*, *HMS1*, *HMS2*, *HMS3*, *HMS6*, *HMS7*, *HTG4*, *HTG6*, *HTG7*, *HTG10*. Наибольшее генетическое разнообразие среди четырех исследованных географически изолированных зон в Таласской, Ошской и Нарынской областях отмечено среди лошадей кыргызской породы из села Таш-Башат (Нарынская обл.): среднее количество выявленных аллелей было максимальным среди исследованных групп 8.294 ± 0.561 , количество эффективных аллелей – 5.009 ± 0.416 , индекс разнообразия Шеннона (H) – 1.745 ± 0.076 и ожидаемая гетерозиготность (H_e) – 0.773 ± 0.020 .

Ключевые слова: кыргызская лошадь, ДНК, микросателлиты, генотипирование.

DOI: 10.31857/S0016675821040032

Кыргызская порода лошадей имеет многосторонний характер хозяйственного использования. Они широко используются в государственных, коллективных, фермерских, крестьянских, а также личных подсобных хозяйствах населения в качестве живой тягловой силы при выполнении разнообразных видов транспортных и сельскохозяйственных работ [1, 2].

Кыргызская лошадь отличается комбинированными продуктивными качествами и хорошей приспособленностью к условиям табунного содержания, что следует рассматривать как положительный фактор при организации мясного и молочного коневодства. Кочевой образ жизни, экстенсивное ведение табунного коневодства препятствовали созданию статной быстроаллюрной лошади. Особи данной породы не характеризуются большой резвостью, но отличается легкостью и хорошей координацией движений, исключительно выносливы и неприхотливы к кормам; они мало восприимчивы к резким переменам погоды, обладают хорошей дистанционностью при работе под седлом.

Перспективным направлением является продуктивное коневодство, которое подразделяется на мясное табунное и молочное. Молочное коневодство предусматривает получение кобыльего молока и производство из него высокоценного пищевого диетического и лечебного продукта – кумыса. Натуральный кумыс, приготовленный из кобыльего молока, является традиционным продуктом питания населения Кыргызстана. В современной медицине кумыс применяется не только для лечения туберкулеза легких, но и желудочно-кишечных, костных и ряда других заболеваний [2].

Племенные коневодческие хозяйства Кыргызстана занимаются разведением племенных лошадей для улучшения массового коневодства (рабоче-пользовательного и продуктивного) и спортивных лошадей для конно-спортивных организаций различного назначения (конноспортивные школы, секции и клубы, пункты верхового и экипажного проката и др.).



Рис. 1. Места отбора образцов: 1 – с. Копуро-Базар, Таласский р-н, Таласская обл.; 2 – с. Талды-Булак, Таласский р-н, Таласская обл.; 3 – с. Чон-Алай, Чон-Алайский р-н, Ошская обл.; 4 – с. Таш-Башат, Нарынский р-н, Нарынская обл.

В Кыргызстане планируется внедрить новые виды спорта для выхода на международную арену – конные пробеги. Вместе с тем, в силу ряда причин, многогранные резервы коневодства в увеличении производства сельскохозяйственной продукции используются не полностью, а коневодство отстает от мирового уровня. Национальная порода – кыргызская лошадь, пройдя через века, в XX и XXI столетиях оказалась на грани почти полного вырождения, про нее встречаются только отрывочные сведения в научной литературе, а сама же она рассеялась, смешавшись с разными породами. Для сохранения ценных особенностей генофонда кыргызской лошади необходимо проводить генетические исследования, а сохранение и дальнейшее совершенствование породы должно осуществляться под контролем изучения генетической ситуации как в породе в целом, так и в основных племенных хозяйствах, занимающихся разведением чистопородных лошадей.

В настоящее время наиболее эффективными генетическими маркерами для описания генетической структуры популяций разных видов животных, в частности лошадей, являются полиморфные микросателлитные локусы ДНК (STR, Short Tandem Repeat), которые имеют кодоминантный характер наследования и служат незаменимым инструментом при исследовании генетических различий не только между животными, но и популяциями одной породы, а также между породами.

Цель исследования – провести расширенное геногеографическое исследование, а также дать оценку генетической структуры и генетического

разнообразия кыргызской породы лошадей с использованием 17-ти микросателлитных маркеров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биологическим материалом для молекулярно-генетического исследования послужили образцы волос с луковицами, взятые у взрослого поголовья кыргызских лошадей (104 животных), разводимых в высокогорных экспериментальных зонах: в селах Копуро-Базар (№ 1) и Талды-Булак (№ 2) (Таласский р-н, Таласская обл.) – по 20 животных, в с. Чон-Алай (Чон-Алайский р-н, Ошская обл.) – 23 животных (№ 3) и в с. Таш-Башат (Нарынский р-н, Нарынская обл.) – 41 животное (№ 4). Места отбора образцов представлены на рис. 1.

Лошадей для молекулярно-генетического исследования отбирали по признакам экстерьера: рост, масть и фенотип. Для кыргызских лошадей характерны сравнительно большая голова, недлинная шея, низкая холка, прямая спина, спущенный, часто короткий круп, широкая и глубокая грудь и сухие ноги. Особо следует отметить высокую прочность копытного рога, позволяющую передвигаться по каменистому грунту даже с тяжелым грузом на спине. Масть кыргызских лошадей в большинстве случаев гнедая или серая, бывают пегие.

Образцы были генотипированы по 17 микросателлитным локусам, рекомендованным Международным обществом генетики животных (ISAG, International Society for Animal Genetics): *AHT4*,

AHT5, ASB2, ASB17, ASB23, CA425, HMS1, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, HTG7, HTG10, LEX3, VHL20. Для обозначения аллелей применялся международный алфавитный код [3]. Статистическую обработку данных проводили с использованием программ GenALEX v. 6.5 [4], STRUCTURE v. 2.3.4 [5] и POPHELPER v. 1.0.10 [6]. С использованием GenALEX v. 6.5 были рассчитаны следующие показатели: среднее число аллелей на locus (N_a), эффективное число аллелей (N_e), уровни ожидаемой (H_e) и наблюдаемой (H_o) гетерозиготностей, значение информационного индекса Шеннона (I), коэффициент F_{IS} [7]. В программе STRUCTURE v. 2.3.4 по методу J.K. Pritchard с соавт. был рассчитан критерий Q , который характеризует принадлежность каждого отдельного животного к соответствующему кластеру. С использованием веб-приложения POPHELPER v. 1.0.10 произведена графическая интерпретация результатов, полученных в STRUCTURE v. 2.3.4.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Современная порода кыргызских лошадей обнаруживает высокий уровень внутривидовой генетической вариативности – в 17-ти исследованных нами микросателлитных локусах было идентифицировано 154 аллеля, в том числе 59 редких аллелей (с частотой встречаемости менее 5.0%), что составляет 38.3% от общего количества выявленных аллелей: *L/M/N/P* для локуса *AHT4*, *I* – для *AHT5*, *B/C/I/P* – для *ASB2*, *D/H/J/K/L/P/Q/T/W* – для *ASB17*, *G/M* (21 динуклеотидный повтор)/*Q/R* – для *ASB23*, *F/G/H/I/K* – для *CA425*, *N/Q* – для *HMS1*, *J/M/O/P/R* – для *HMS2*, *G* (19 динуклеотидных повторов)/*L/S* – для *HMS3*, *N/Q* – для *HMS6*, *P/Q* – для *HMS7*, *J* (29 динуклеотидных повторов)/*N/P* – для *HTG4*, *M/N/P/R* (24 динуклеотидных повтора) – для *HTG6*, *L* (16 динуклеотидных повторов) – для *HTG7*, *N/P/Q/S/T* – для *HTG10*, *G/I/K/O* – для *LEX3*, *J* – для *VHL20* (табл. 1). Также выявлены 22 новых аллеля (14.3% от общего количества всех аллелей), не обнаруженных в нашем предыдущем исследовании [8]. Из них для 15 локусов – *AHT4, AHT5, ASB2, ASB17, ASB23, CA425, HMS1, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, HTG7, HTG10* – имеются новые редкие аллели с частотой встречаемости менее 5.0% (табл. 1).

Значение индекса Шеннона для данной породы составляет 1.749 ± 0.066 , что указывает на среднюю сложность структуры сообщества исследованных кыргызских лошадей [2].

Для оценки генетической подразделенности исследуемых групп лошадей кыргызской породы в программе STRUCTURE v. 2.3.4 по методу J.K. Pritchard был проведен расчет критерия Q , который характеризует принадлежность каждого

отдельного животного к соответствующей группе. Значение Q , равное 75% или выше, подтверждает членство особи в своем кластере. На рис. 2 графически представлены (с использованием веб-приложения POPHELPER v. 1.0.10 [http://pophelper.com/]) результаты анализа, проведенного в STRUCTURE v. 2.3.4 (проведена автоматическая сортировка на основании принадлежности конкретного образца к мажорному кластеру).

В исследовании был использован генетически изолированных высокогорных зон (рис. 1). Уже для $K = 5$ выделяется три четких кластера, и данная зависимость сохраняется вплоть до значения $K = 10$. Для всех образцов за пределами данных кластеров наблюдается общая однородность структуры, вклад каждого субкластера становится равноценным. На рис. 3 представлены результаты кластеризации для всех 104 образцов (расположены по порядку, без сортировки по значению Q) в пределах географических зон ($K = 4$).

Видно, что для каждой группы (№ 1–4 на рис. 3) имеются особенности: в пределах групп лошадей из с. Талды-Булак (Таласский р-н, Таласская обл.) – № 2 – имеются особи, относящиеся к одному субкластеру (цвет кластера соответствует Cluster 2 на рис. 3); некоторые особи кыргызской породы лошадей из с. Чон-Алай (Чон-Алайский р-н, Ошская обл.) – № 3, и с. Таш-Башат (Нарынский р-н, Нарынская обл.) – № 4 – также могут быть сгруппированы в один субкластер (цвет кластера соответствует Cluster 3 на рис. 3). Данный факт может быть следствием того, что изучаемые в рамках данного исследования субпопуляции лошадей имеют общих предков (например производителей из других табунов), возможно влияние иных факторов.

На основании анализа генетических дистанций F_{ST} , рассчитанных по алгоритму AMOVA для 16 STR-локусов (кроме LEX3), был построен график главных компонент (PCA, principal component analysis), отражающий взаимное сходство или различие исследованных групп лошадей (рис. 4).

Видно, что группа особей из с. Талды-Булак, № 2 (Таласский р-н, Таласская обл.) расположена наиболее удаленно от других исследуемых групп лошадей. Также, несмотря на географическую близость расположения сел Копуро-Базар, № 1 (Таласский р-н, Таласская обл.) и Талды-Булак, № 2 (Таласский р-н, Таласская обл.), наблюдается существенное различие по взаимному расположению их координат на графике главных компонент, на долю которых (первая и вторая компоненты) приходится 97.07% вариации признака. Причина подобных несовпадений в большей степени обусловлена различиями в частоте распространенности аллелей в исследованных STR-локусах, а также наличием в исследованных группах лошадей как

Таблица 1. Частоты распространенности аллелей в 17 микросателлитных локусах ДНК для лошадей кыргызской породы

Локус	Аллели									
	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>F</i>	<i>G</i>	<i>H</i>	<i>I</i>	<i>J</i>	<i>K</i>	<i>L</i>
<i>AHT4</i>						0.202	0.058	0.149	0.144	0.043*
<i>AHT5</i>							0.005	0.188	0.260	0.091
<i>ASB2</i>	0.019	0.010					0.010		0.159	
<i>ASB17</i>			0.005	0.038	0.096	0.038	0.091	0.019	0.043	0.034
<i>ASB23</i>					0.010		0.072	0.245	0.173	0.173
<i>CA425</i>				0.005	0.024	0.005	0.024	0.087	0.014	0.077
<i>HMS1</i>							0.063	0.346	0.067	0.053
<i>HMS2</i>						0.293	0.130	0.014	0.173	0.269
<i>HMS3</i>					0.005*		0.096			0.005
<i>HMS6</i>									0.053	0.101
<i>HMS7</i>								0.111	0.053	0.341
<i>HTG4</i>								0.005	0.163	0.115
<i>HTG6</i>					0.188		0.058	0.154		
<i>HTG7</i>									0.284	0.005
<i>HTG10</i>							0.063		0.077	0.072
<i>LEX3</i>				0.159	0.005	0.144	0.038		0.029	0.207
<i>VHL20</i>							0.135	0.024		0.067

Локус	Аллели									
	<i>M</i>	<i>N</i>	<i>O</i>	<i>P</i>	<i>Q</i>	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>T</i>	<i>U</i>	<i>W</i>
<i>AHT4</i>	0.019	0.024	0.322	0.038						
<i>AHT5</i>	0.091	0.197	0.168							
<i>ASB2</i>	0.178	0.308	0.135	0.024	0.096	0.063				
<i>ASB17</i>	0.063	0.163	0.077	0.010	0.034	0.207	0.053	0.024		0.005
<i>ASB23</i>	0.005				0.005	0.043	0.149	0.014	0.125	
<i>CA425</i>	0.250	0.394	0.120							
<i>HMS1</i>	0.442	0.014			0.014					
<i>HMS2</i>	0.048		0.014	0.010		0.048				
<i>HMS3</i>	0.207	0.091	0.120	0.317	0.058	0.087	0.014			
<i>HMS6</i>	0.264	0.024	0.188	0.361	0.010					
<i>HMS7</i>	0.115	0.149	0.197	0.005	0.029					
<i>HTG4</i>	0.591	0.034	0.053	0.038						
<i>HTG6</i>	0.034	0.005	0.529	0.029		0.005				
<i>HTG7</i>	0.144	0.216	0.351							
<i>HTG10</i>	0.130	0.019	0.260	0.034	0.048	0.245	0.048	0.005		
<i>LEX3</i>	0.207	0.077	0.048	0.087						
<i>VHL20</i>	0.221	0.111	0.120	0.101	0.091	0.130				

Примечание. * – аллели с частотой распространенности <5.0% (редкий аллель); # – новые аллели, не представленные в <https://strbase.nist.gov/horseSTRs.htm>.

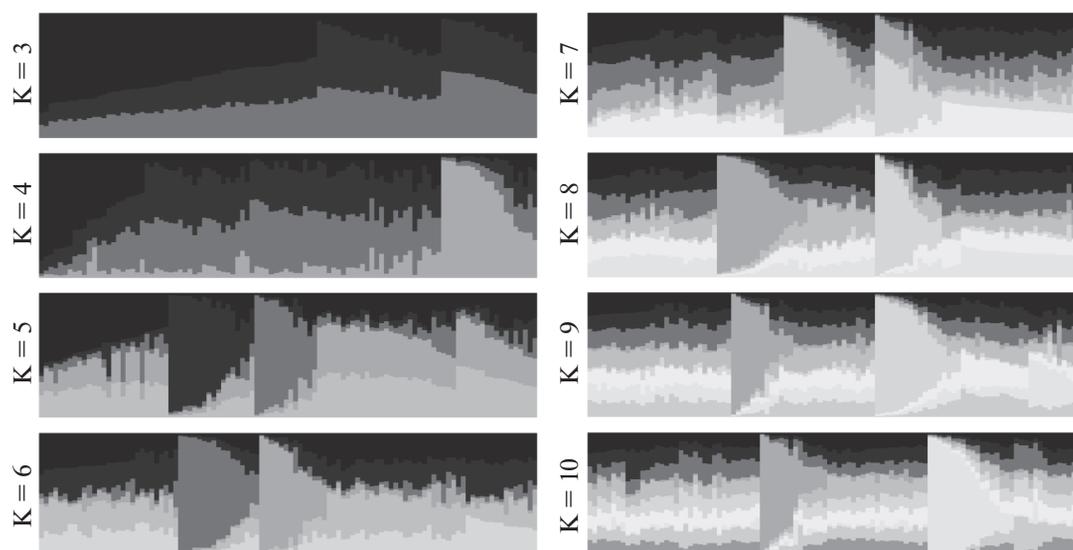


Рис. 2. Результаты анализа генетической структуры изучаемых четырех выборок кыргызской породы лошадей для наиболее вероятного числа кластеров (K) от 3 до 10 (ось X – ID животного, ось Y – доля членства в соответствующем кластере).

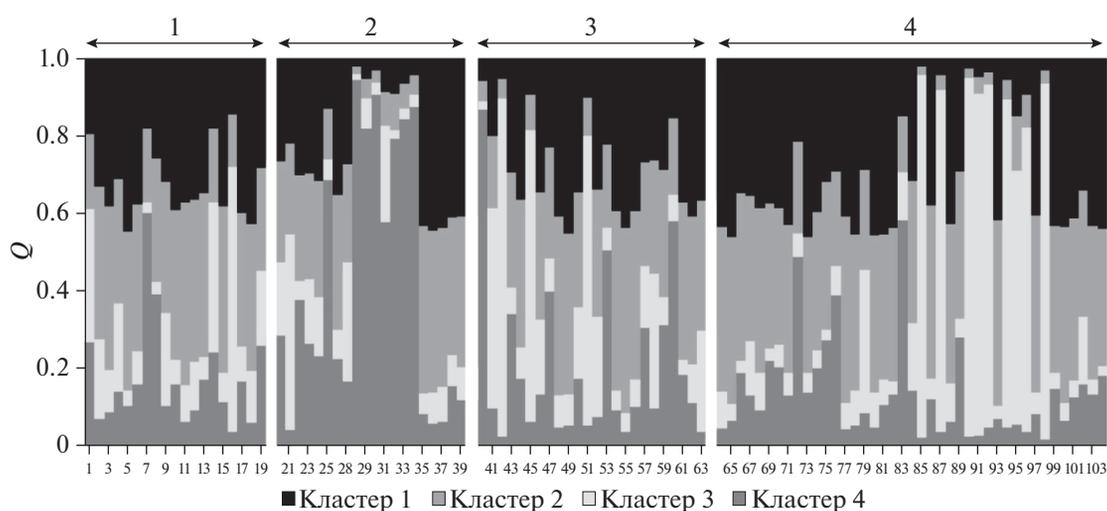


Рис. 3. Результаты анализа генетической структуры изучаемых четырех выборок кыргызской породы лошадей для $K = 4$ (четыре выборки): № 1 – с. Копуро-Базар, Таласский р-н, Таласская обл.; № 2 – с. Талды-Булак, Таласский р-н, Таласская обл.; № 3 – с. Чон-Алай, Чон-Алайский р-н, Ошская обл.; № 4 – с. Таш-Башат, Нарынский р-н, Нарынская обл. (ось X – ID животного, ось Y – доля членства в соответствующем кластере).

редких (частота распространенности менее 5%), так и частных (встречаются только в одной из исследованных групп) аллелей – табл. 2 и 3 соответственно.

Наибольший накопленный суммарный процент редких аллелей определен для лошадей из с. Чон-Алай (Чон-Алайский р-н, Ошская обл.) – № 4. Минимальное значение данного параметра выявлено для особей из с. Талды-Булак (Таласский р-н, Таласская обл.) – № 2. STR-локус *ASB17* отличался наибольшим аллельным разно-

образием среди всех исследованных групп. Также имелись и межгрупповые особенности: для локуса *HMS2* среди особей из группы № 3 (с. Чон-Алай, Чон-Алайский р-н, Ошская обл.) на долю редких аллелей пришлось 17.39%; для локусов *ABS17*, *HMS1*, *HTG4* и *HTG10* среди особей из группы № 4 (с. Таш-Башат, Нарынский р-н, Нарынская обл.) на долю редких аллелей пришлось 20.73, 15.85, 13.42 и 12.20% соответственно. Для данных групп – № 3 и 4 – имелись также особенности и в количестве выявленных частных аллелей. Среди лошадей из с. Чон-Алай они опреде-

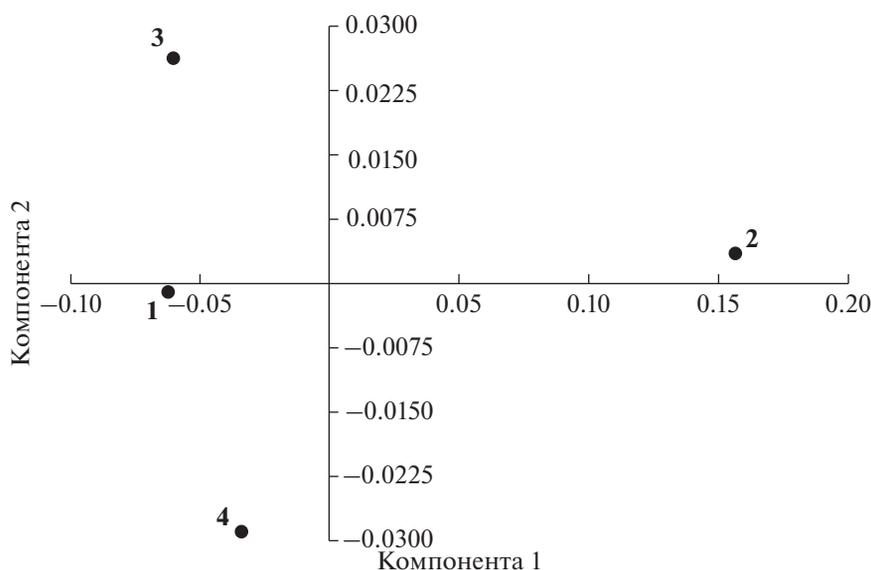


Рис. 4. Результаты анализа главных компонент (по совокупности 16 STR-локусов, кроме *LEX3*).

лены для четырех локусов – *ASB17*, *CA425*, *HMS6* и *HTG6* – причем для локуса *HMS6* аллель *Q* выявлен в 4.30%. Среди лошадей из с. Таш-Башат приватные аллели выявлены уже для восьми локусов – *AHT5*, *ASB23*, *CA425*, *HMS1*, *HMS3*, *HMS7*, *HTG4* и *HTG10*, – аллель *Q* для локуса *HMS7* был выявлен в 7.30% случаев.

Таблица 2. Суммарные частоты распространенности редких аллелей в исследованных группах лошадей кыргызской породы (в %)

Локус	Группа			
	1	2	3	4
<i>AHT4</i>	7.50	5.00	10.87	7.32
<i>AHT5</i>	–	–	–	6.10
<i>ASB2</i>	2.50	2.50	4.35	7.32
<i>ASB17</i>	10.00	5.00	30.44	20.73
<i>ASB23</i>	5.00	–	2.17	1.22
<i>HMS1</i>	–	2.50	21.74	10.98
<i>HMS2</i>	2.50	–	6.52	15.85
<i>HMS3</i>	2.50	–	17.39	2.44
<i>HMS6</i>	5.00	–	4.35	9.76
<i>HTG4</i>	2.50	–	6.52	3.66
<i>HTG6</i>	–	2.50	2.17	1.22
<i>HTG7</i>	2.50	2.50	2.17	13.42
<i>HTG10</i>	5.00	2.50	4.35	3.66
<i>VHL20</i>	2.50	–	–	–
Сумма*	55.00	30.00	126.09	124.40

* – накопленный суммарный процент редких аллелей.

Из 16 STR-локусов – *AHT4*, *AHT5*, *ASB2*, *ASB17*, *ASB23*, *HMS1*, *HMS2*, *HMS3*, *HMS6*, *HTG4*, *HTG6*, *HTG7*, *HTG10* и *VHL20* – расположенных на аутосомах, наибольшим потенциалом по дифференциации исследуемых групп лошадей кыргызской породы обладают те, для которых рассчитанные значения F_{ST} являются максимальными – табл. 4.

Набольшие рассчитанные значения F_{ST} показаны для STR-локусов *AHT4*, *ASB23* и *HMS7*, в целом значения F_{ST} для всех локусов невысокие и не превышают 0.1. Информация об аллельном разнообразии и частотах распространенности конкретных аллелей для перечисленных выше STR-локусов представлена в табл. 5.

Таким образом, в различных группах преобладают конкретные аллели: в группе № 2 для локуса *AHT4* в мажорном состоянии находятся аллели *H* и *O*, в то время как для остальных групп наибольшую распространенность получил только аллель *O*; для локуса *ASB23* в группе № 2 суммарная частота распространенности аллелей *L* (30.0%) и *S* (42.5%) составила 72.5%, в то время как для других групп аллель *S* встречался с частотой менее 20.0%, для групп № 1, 3, 4 превалировал аллель *J*; для локуса *HMS7* в группе № 2 мажорным (частота – более 30%) является аллель *O*, для групп же № 1, 3, 4 – аллель *L*. В целом для каждой группы имеются индивидуальные различия в профиле распределения частот распространенности аллелей по всем исследуемым STR-локусам.

Для анализа внутривидовой генетической подразделенности кыргызских лошадей, разводимых в четырех географически изолированных высокогорных зонах, необходимо также оценить

Таблица 3. Частоты распространенности частных аллелей в исследованных группах лошадей кыргызской породы

Группа	STR-локус	Аллель	Частота, %
1	<i>ASB23</i>	<i>G</i>	5.00
	<i>ASB23</i>	<i>Q</i>	2.50
	<i>HTG6</i>	<i>N</i>	2.50
	<i>HTG7</i>	<i>L</i>	2.50
2	<i>ASB17</i>	<i>W</i>	2.50
	<i>HMS2</i>	<i>P</i>	5.00
3	<i>ASB17</i>	<i>D</i>	2.20
	<i>CA425</i>	<i>H</i>	2.20
	<i>HMS6</i>	<i>Q</i>	4.30
	<i>HTG6</i>	<i>R</i>	2.20
4	<i>AHT5</i>	<i>I</i>	1.20
	<i>ASB23</i>	<i>M</i>	1.20
	<i>CA425</i>	<i>F</i>	1.20
	<i>HMS1</i>	<i>Q</i>	3.70
	<i>HMS3</i>	<i>G</i>	1.20
	<i>HMS3</i>	<i>L</i>	1.20
	<i>HMS7</i>	<i>P</i>	1.20
	<i>HMS7</i>	<i>Q</i>	7.30
	<i>HTG4</i>	<i>J</i>	1.20
	<i>HTG10</i>	<i>T</i>	1.20

Таблица 4. Дифференцирующий потенциал 16 STR-локусов (результаты анализа locus-by-locus AMOVA)

Локус	F_{ST}^*	p -уровень	Локус	F_{ST}	p -уровень
<i>AHT4</i>	0.044	<0.001	<i>HMS3</i>	0.020	<0.001
<i>AHT5</i>	0.020	<0.001	<i>HMS6</i>	0.014	<0.001
<i>ASB2</i>	0.031	<0.001	<i>HMS7</i>	0.032	<0.001
<i>ASB17</i>	0.029	<0.001	<i>HTG4</i>	0.022	<0.001
<i>ASB23</i>	0.063	<0.001	<i>HTG6</i>	0.028	<0.001
<i>CA425</i>	0.032	<0.001	<i>HTG7</i>	0.010	<0.001
<i>HMS1</i>	0.031	<0.001	<i>HTG10</i>	0.026	<0.001
<i>HMS2</i>	0.035	<0.001	<i>VHL20</i>	0.021	<0.001

F_{ST} , коэффициент инбридинга субпопуляций относительно всей популяции, указывает на редукцию гетерозиготности из-за ограничения потока генов (миграции) и генетического дрейфа между субпопуляциями; жирным выделены три STR-локуса с максимальными значениями F_{ST} .

значения показателей N_a , N_e , H_o , H_e , I и коэффициента F_{IS} – табл. 6.

При анализе показателей N_a , N_e , H_o , H_e , I и коэффициента F_{IS} выявлено, что наименьшим генетическим разнообразием среди четырех географически изолированных зон отличаются лошади

Таблица 5. Частоты распространенности аллелей для трех STR-локусов с наибольшим дифференцирующим потенциалом (по результатам F_{ST})

Локус/Аллели	Группа			
	1	2	3	4
<i>AHT4</i>				
<i>H</i>	12.50	37.50	10.87	20.73
<i>I</i>	2.50	5.00	10.87	4.88
<i>J</i>	22.50	2.50	19.57	14.63
<i>K</i>	17.50	2.50	21.74	14.63
<i>L</i>	2.50	5.00	2.17	6.10
<i>M</i>	5.00	–	4.35	–
<i>N</i>	2.50	–	4.35	2.44
<i>O</i>	35.00	47.50	19.57	30.49
<i>P</i>	–	–	6.52	6.10
<i>ASB23</i>				
<i>G</i>	5.00	–	0.00	0.00
<i>I</i>	5.00	–	8.70	10.98
<i>J</i>	35.00	5.00	32.61	24.39
<i>K</i>	27.50	7.50	19.57	15.85
<i>L</i>	7.50	30.00	19.57	14.63
<i>M</i>	–	–	–	1.22
<i>Q</i>	2.50	–	–	–
<i>R</i>	2.50	5.00	2.17	6.10
<i>S</i>	5.00	42.50	6.52	10.98
<i>T</i>	–	–	–	–
<i>U</i>	10.00	10.00	10.87	15.85
<i>HMS7</i>				
<i>J</i>	17.50	2.50	17.39	8.54
<i>K</i>	7.50	5.00	–	7.32
<i>L</i>	37.50	22.50	32.61	39.02
<i>M</i>	15.00	25.00	2.17	8.54
<i>N</i>	5.00	15.00	21.74	15.85
<i>O</i>	17.50	30.00	26.09	12.20
<i>P</i>	–	–	–	1.22
<i>Q</i>	–	–	–	7.32

кыргызской породы из с. Талды-Булак (Таласский р-н, Таласская обл.) – № 2: среднее количество выявленных аллелей N_a было минимальным среди исследованных групп – 6.059 ± 0.441 , количество эффективных аллелей N_e – 3.898 ± 0.318 , индекс разнообразия Шеннона I также оказался наименьшим среди рассчитанных – 1.475 ± 0.083 , и ожидаемая гетерозиготность H_e также оказалась минимальной – 0.705 ± 0.029 .

Наибольшее генетическое разнообразие было обнаружено среди лошадей кыргызской породы

Таблица 6. Генетическая характеристика четырех субпопуляций лошадей кыргызской породы по результатам генотипирования 17 STR-локусов

	Группа			
	1	2	3	4
N_a	7.059 ± 0.481	6.059 ± 0.441	7.471 ± 0.543	8.294 ± 0.561
N_e	4.556 ± 0.321	3.898 ± 0.318	4.837 ± 0.362	5.009 ± 0.416
I	1.643 ± 0.073	1.475 ± 0.083	1.695 ± 0.067	1.745 ± 0.076
$H_o^\#$	0.791 ± 0.023	0.759 ± 0.038	0.804 ± 0.020	0.765 ± 0.023
$H_e^\#$	0.756 ± 0.020	0.705 ± 0.029	0.773 ± 0.016	0.773 ± 0.020
$F_{IS}^\#$	-0.052 ± 0.031	-0.075 ± 0.030	-0.041 ± 0.016	0.009 ± 0.021

Примечание. N_a – среднее количество выявленных аллелей на локус, N_e – количество эффективных аллелей, I – индекс разнообразия Шеннона, H_o – наблюдаемая гетерозиготность, H_e – ожидаемая гетерозиготность, F_{IS} – индивидуальный индекс фиксации, $^\#$ – среднее для 16 STR-локусов (кроме LEX3).

из с. Таш-Башат (Нарынский р-н, Нарынская обл.), № 4: N_a – 8.294 ± 0.561 , I – 1.745 ± 0.076 .

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современная порода кыргызских лошадей обнаруживает высокий уровень внутривидовой генетической вариабельности. В 17 STR-локусах идентифицировано 154 аллеля, в том числе 59 редких аллелей. Выявлены новые аллели, не обнаруженные в нашем предыдущем исследовании [8], из них для 15 локусов – *AHT4*, *AHT5*, *ASB2*, *ASB17*, *ASB23*, *CA425*, *HMS1*, *HMS2*, *HMS3*, *HMS6*, *HMS7*, *HTG4*, *HTG6*, *HTG7*, *HTG10*, – имеются новые редкие.

При анализе показателей N_a , N_e , H_o , H_e , I и коэффициента F_{IS} выявлено, что наибольшее генетическое разнообразие среди четырех географически изолированных зон – с. Копуро-Базар (Таласский р-н, Таласская обл.), с. Талды-Булак (Таласский р-н, Таласская обл.), с. Чон-Алай (Чон-Алайский р-н, Ошская обл.) и с. Таш-Башат (Нарынский р-н, Нарынская обл.) – отмечено среди лошадей кыргызской породы из с. Таш-Башат: среднее количество выявленных аллелей N_a было максимальным среди исследованных групп 8.294 ± 0.561 , количество эффективных аллелей N_e – 5.009 ± 0.416 , индекс разнообразия Шеннона I – 1.745 ± 0.076 и ожидаемая гетерозиготность H_e – 0.773 ± 0.020 .

Исследование было поддержано Федерацией органического движения “БИО-KG” Кыргызстана (договор № 9 от 6 ноября 2019 г).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Абрамзон С.М.* Киргизы и их этногенетические и историко-культурные связи. Л.: Наука, 1971. 478 с.
2. *Рунар Ж.* Кыргызская лошадь: сохранение и использование, скачки на выносливость и экотуризм. Практическое указание / Под ред. Рипар Ж., Уатто С., Перез С., перевод Илиязова А. Бишкек: 2007. 32 с.
3. *Van De Goor L.H.P.* A proposal for standardization in forensic equine DNA typing: Allele nomenclature for 17 equine-specific STR loci // *Anim. Genet.* 2010. V. 41(2). P. 122–127. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.01975.x>
4. *Peakall R., Peter E. Smouse.* GenAIEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update // *Bioinformatics.* 2012. V. 28. P. 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
5. *Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P.* Inference of population structure using multilocus genotype data // *Genetics.* 2000. V. 155(2). P. 945–959.
6. *Hammer Q., Harper A.T., Ryan P.D.* Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis // *Palaeontologia Electronica.* 2001. V. 4. P. 1–9.
7. *Excoffier L.* Analysis of molecular variance inferred from metric distances among dna haplotypes: Application to human mitochondrial dna restriction data // *Genetics.* 1992. V. 131. P. 479–491.
8. *Исакова Ж.Т., Токтосунов Б.И., Кипень В.Н. и др.* Генетический портрет кыргызской лошади // *Кониводство и конный спорт.* 2018. № 1. С. 21–23.

Genetic Diversity of the Kyrgyz Horse Breed Using Microsatellite Markers – Extended Genogeographic Study

Zh. T. Isakova^{a,*}, M. A. Isaev^b, V. N. Kipen^c, L. V. Kalinkova^d, K. A. Aitbaev^a,
M. A. Arzybaev^b, S. B. Mukeeva^a, Osmoykul k. Meerim^a, and N. M. Aldasheva^a

^a*Institute of Molecular Biology and Medicine, Bishkek, 720040 Kyrgyzstan*

^b*Kyrgyz National Agrarian University named after K.I. Skryabin, Bishkek, 720005 Kyrgyzstan*

^c*Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220072 Republic of Belarus*

^d*All-Russian Scientific Research Institute of Horse Breeding, Ryazan oblast, Divovo, 391105 Russia*

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

There is a high inter-breed genetic variability found in the contemporary Kyrgyz horses breed. One-hundred and fifty-four alleles, including rare 59 ones, in 17 STR loci were identified. We found new rare alleles for 15 loci, including *AHT4*, *AHT5*, *ASB2*, *ASB17*, *ASB23*, *CA425*, *HMS1*, *HMS2*, *HMS3*, *HMS6*, *HMS7*, *HTG4*, *HTG6*, *HTG7* and *HTG10*. The greatest genetic variability among four geographically separated zones in Talas, Osh and Naryn Provinces under study was found in horses of Kyrgyz breed from Tash-Bashat (Naryn Province) village with the largest mean count of alleles (8.294 ± 0.561), effective alleles (5.009 ± 0.416), Shannon biodiversity index (1.745 ± 0.076) and expected heterozygosity (0.773 ± 0.020).

Keywords: the Kyrgyz breed of horses, DNA, microsatellite markers, genotyping.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ СЕРЕБРЯНОГО КАРАСЯ *Carassius gibelio* (Cyprinidae) В БАССЕЙНЕ СРЕДНЕЙ ОБИ

© 2021 г. М. А. Побединцева^{1, *}, С. Н. Решетникова^{2, 3}, Н. А. Сердюкова¹,
А. Бишани⁴, В. А. Трифионов^{1, 4}, Е. А. Интересова^{2, 3}

¹Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

²Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии,
Новосибирск, 630091 Россия

³Томский государственный университет, Томск, 634050 Россия

⁴Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: mapob@mcb.nsc.ru

Поступила в редакцию 08.05.2020 г.

После доработки 21.07.2020 г.

Принята к публикации 25.08.2020 г.

В настоящее время в озерах бассейна замкнутого стока на юге Западной Сибири происходит замещение аборигенной формы серебряного карася *Carassius gibelio* (Bloch, 1782) формой серебряного карася из р. Амур, вселенной в конце 70-х годов XX века в водоемы региона. На основании анализа полиморфизма фрагмента контрольного района митохондриальной ДНК (460 пн) мы оценили генетическое разнообразие этого вида в Южной Сибири и выявили присутствие двух гаплогрупп, одна из которых (В) крайне редко встречается в Юго-Восточной Азии и, вероятно, может быть индикатором автохтонных форм серебряного карася, а другая (А) совпадает с гаплотипами, характерными для дальневосточных популяций.

Ключевые слова: серебряный карась, *Carassius gibelio*, Западная Сибирь, ихтиофауна, интродуценты, гаплотипы, гетерогенность.

DOI: 10.31857/S0016675821040111

Серебряный карась *Carassius gibelio* (Cyprinidae) один из наиболее многочисленных и повсеместно распространенных видов рыб Евразии, однако его систематический статус и распространение широко обсуждаются в литературе [1–6]. В России популяционно-генетические исследования серебряного карася показали довольно высокое генетическое разнообразие и присутствие двух хорошо разрешенных гаплогрупп в водоемах Приморья [7, 8]. Кроме того, Н. Sakai с соавт. [2] предложили выделить серебряного карася с гаплотипами второй гаплогруппы, выявленного в Верхнем Иртыше, в отдельный подвид (*Carassius gibelio* sub-species M).

Известно, что караси легко натурализуются в местах интродукции и нередко замещают аборигенные формы [9–13]. В Европе *Carassius gibelio* является инвазивным видом [14–22]. В водоемах Западной Сибири караси известны с XVIII в. [23] и широко распространены [24–32]. В конце 70-х годов XX в., в ходе работ по повышению биопродукционного потенциала водоемов, широко проводившихся на территории Сибири в течение всего

столетия [33], в оз. Убинское (Обь-Иртышское междуречье, бассейн замкнутого стока) были вселены серебряные караси из р. Амур, с предположительно большим темпом роста.

В первой половине 90-х годов вселенец проник в оз. Чаны, где, как предполагается, полностью вытеснил аборигенную форму [34, 35]. Подобное замещение наблюдается и в иных озерах региона [36]. Однако вопрос о возможном проникновении амурской формы серебряного карася в р. Обь до настоящего времени оставался открытым.

Митохондриальные ДНК-маркеры удобны в популяционных исследованиях благодаря их высокому полиморфизму (особенно в Д-петле) и наследованию по материнской линии [37, 38].

В настоящей работе мы исследовали генетическое разнообразие современных популяций серебряного карася в бассейне Средней Оби на основании анализа фрагмента Д-петли митохондриальной ДНК (мтДНК). Наши данные демонстрируют низкое генетическое разнообразие серебряного карася в некоторых внутренних водоемах и указывают на присутствие редкой гаплогруппы, описанной в

Приморье и верховьях Иртыша, в некоторых популяциях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для работы послужили образцы тканей серебряного караса из четырех участков Средней Оби: два места отлова непосредственно в р. Обь: в Парабельском и Александровском р-нах Томской обл., на расстоянии 350 км друг от друга (7 и 14 экз. соответственно); а также из пойменных озер: оз. Монатка, расположенного в пойме р. Обь (9 экз.) и оз. Штаны в пойме р. Чулым (9 экз.). Кроме того, для анализа были использованы образцы тканей серебряного караса из Обь-Иртышского междуречья: оз. Сарглан, куда амурскую форму серебряного караса достоверно вселяли в 90-х годах XX в. (12 экз.), оз. Яркуль (12 экз.), оз. Чаны (6 экз.). Мы также взяли внешнюю западную точку — оз. Костомар, в 15 км от р. Ишим (приток Иртыша), Северный Казахстан (5 экз.) (рис. 1).

Выделение тотальной ДНК осуществляли из плавников, фиксированных в 96%-ном этаноле. Выделение ДНК производили с помощью набора “БиоСилика” (Новосибирск) по стандартной методике.

Аmplификацию фрагмента контрольного района мтДНК длиной 460 пн проводили с праймерами L15923 (5'-TTAAAGCATCGGTCTTGTA-3') и H16150 (5'-GCCCTGAAATAGGAACCAGA-3') [3].

Смесь для ПЦР объемом 25 мкл содержала: однократный буфер для Taq-полимеразы (Medigen, Новосибирск), 2,5 mM MgCl₂, 0,25 mM дезокси-нуклеозидтрифосфатов, 1 мкМ праймеров, 0,5 ед. акт. Taq – ДНК – полимеразы (Medigen, Новосибирск).

Температурный профиль реакции: 2 мин при 94°C, далее 35 циклов (денатурация при 94°C – 15 с, отжиг праймеров при 53°C – 30 с, элонгация при 72°C – 60 с) и финальная элонгация – 5 мин при 72°C.

Очистка ПЦР-продуктов из реакционной смеси проводилась с использованием реагентов ExoSAP-IT (Affymetrix) по протоколу производителя. Для проведения секвенантной реакции в объеме 10 мкл замешивали следующие реагенты: 2 мкл 5× BrightDye buffer, 0,25 мкл BrightDye™ Terminators v1.1; 1,25 мкл соответствующего праймера (10 mM); 1,2 мкл исследуемого образца ДНК, ddH₂O до 10 мкл. Полученную реакционную смесь инкубировали в амплификаторе в следующих условиях реакции: 1 цикл – 96°C (4 мин); 35 циклов – 96°C (10 с), 57°C (10 с), 60°C (4 мин); 10°C (хранение). Полученный продукт реакции очищали с использованием BigDye X Terminator Purification Kit по протоколу производителя. Секвенирование проводилина автоматическом се-

квенаторе Genome Analyzer II. Анализ полученных последовательностей проводили с помощью пакета программ Geneious v. 8.0.4 (Biomatters Ltd). В работе были использованы ресурсы Центра коллективного пользования “Молекулярная и клеточная биология” при ИМКБ СО РАН.

Взаимоотношения между гаплотипами анализировали с помощью программного обеспечения Haplotype Viewer (<http://www.cibiv.at/~greg/haploviewer>). Филогенетическое древо строили с помощью метода максимального правдоподобия в программе RAxML-NG (<https://raxml-ng.vital-it.ch/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате анализа последовательностей контрольного района D-петли серебряного караса выявлено девять гаплотипов, принадлежащих двум гаплогруппам (табл. 1). Наиболее широко распространенный, отмеченный нами во всех изученных выборках серебряного караса, гаплотип A0 был ранее описан в дальневосточных популяциях, в том числе и на Амуре [2], а также известен в бассейне Верхнего Иртыша (юго-восточная часть Казахстана) [2]. В оз. Сарглан все изученные особи содержали этот гаплотип. Гаплотип A1, ранее описанный в оз. Ханка (JN790653, JN790655), в бассейне Средней Оби малочислен, но при этом широко распространен — в наших сборах отмечен как в самой Оби, так и в пойме р. Чулым. Гаплотип A2, также известный у карасей в северо-восточной Азии и Китае (JN790652), в наших материалах встречается значительно реже и отмечен только в пойменных озерах бассейна средней Оби. Гаплотип A3 описан нами впервые, выявлен в р. Обь (Александровский р-н) и незначительно отличается от гаплотипа A1 (идентификационный номер в GenBank – MF987725). Гаплотип A4 ранее был описан в оз. Ханка и в Европе (JN790650, JN790655, AV080014, FJ167410.1, JN117600.1) [2]. Мы обнаружили гаплотип A5 в близко расположенных озерах Яркуль и Чаны, он отличается от других гаплотипов группы A делецией восемнадцати нуклеотидов (идентификационный номер в GenBank – MT062975), близкий к нему гаплотип описан ранее в оз. Ханка (JN790668) и в Центральной Европе (FJ167413). Гаплотип A6 встречается в наших выборках в озерах Яркуль, Чаны и Костомар, ранее этот гаплотип был описан в р. Чара, Казахстан (AV274415.1) [2].

Гаплотипы B0 и B1, обнаружены нами в выборке из самой северной точки сбора материала — р. Обь, Александровский р-н, а B0, кроме того, еще и в пойменном оз. Монатка. Эти гаплотипы относятся к гаплогруппе, описанной в Верхнем Иртыше, и, предположительно, характерной для нативной формы [2]. Интересно, что ранее в Иртыше был описан только гаплотип B0, тогда как гаплотип B1 очень похож на гаплотип B0 и отли-

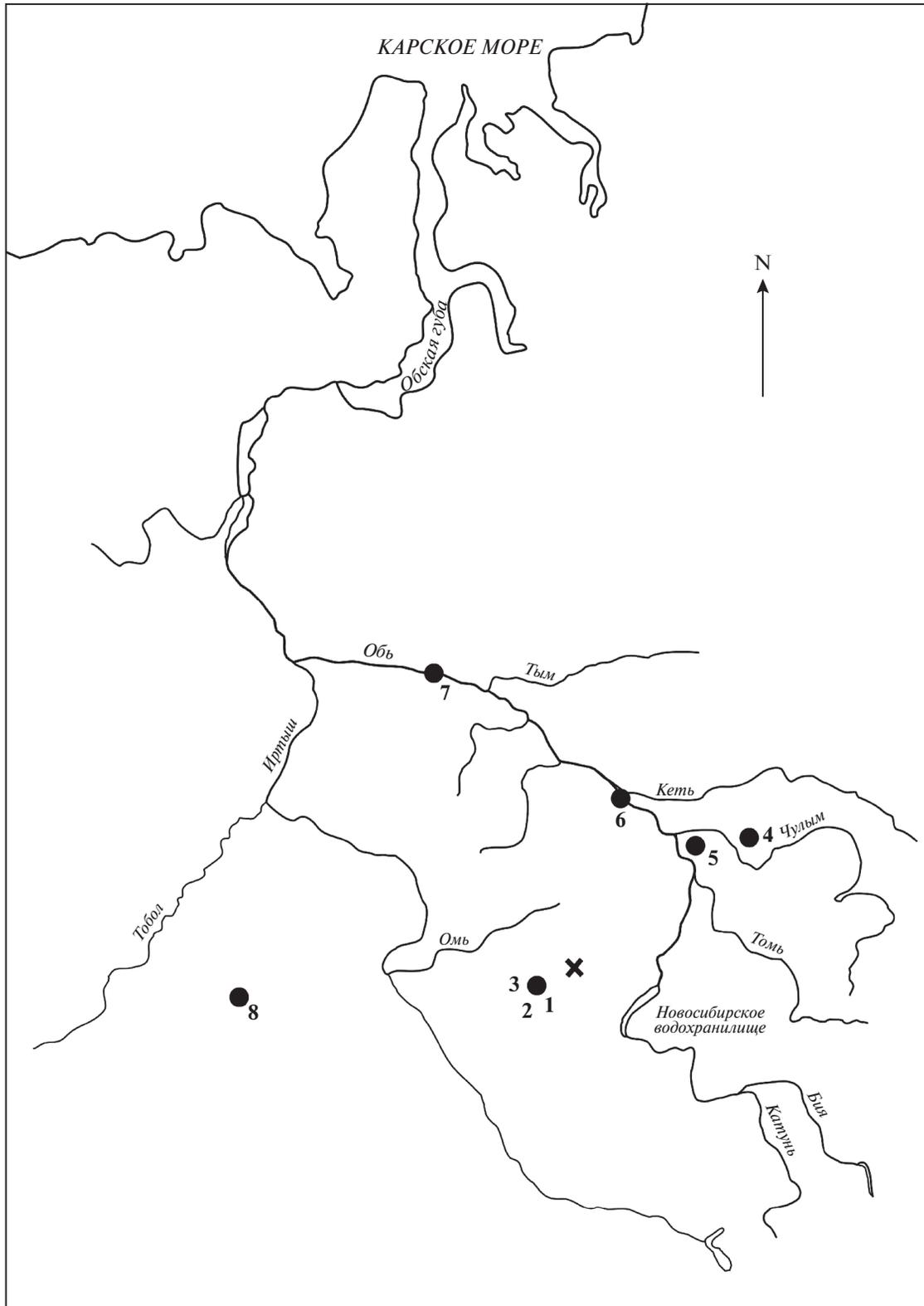


Рис. 1. Карта-схема расположения участков отлова серебряного карася (*Carassius gibelio*) в Западной Сибири в среднем течении р. Оби и Обь-Иртышского междуречья. Новосибирская обл.: 1 – оз. Сарлан, 2 – оз. Яркуль, 3 – оз. Чаны; Томская обл.: 4 – оз. Штаны, Первомайский р-н, 5 – оз. Монатка, Кривошеинский р-н, 6 – р. Обь, Парабельский р-н, 7 – р. Обь, Александровский р-н; 8 – оз. Костомар, Казахстан; X – место первого выпуска амурской формы серебряного карася в Западной Сибири.

Таблица 1. Гаплотипы серебряного карася в Обь-Иртышском бассейне

Название гаплотипов	Кол-во особей	Место сбора материала	Ранее описанные или близкие гаплотипы в GenBank
A0	46	оз. Штаны, р. Обь (Александровский р-н), р. Обь (Парабельский р-н), оз. Сартлан, оз. Монатка	AB274416 – р. Чара, Казахстан [2], GQ985470 – р. Амур, GQ985471 – бассейн р. Волга, JN790649 – оз. Ханка
A1	2	оз. Штаны, р. Обь (Парабельский р-н)	JN790653 – оз. Ханка, JN790655.1 – оз. Ханка
A2	2	оз. Штаны, оз. Монатка	JN790652 – оз. Ханка
A3	1	р. Обь (Александровский р-н)	–
A4	8	оз. Штаны, р. Обь (Парабельский р-н), оз. Монатка, оз. Чаны	JN790650 – оз. Ханка, JN790655 – оз. Ханка, AB080014, FJ167410.1 – Европа, JN117600.1 – Польша [20]
A5	8	оз. Чаны, оз. Яркуль	JN790668.1 – оз. Ханка (близкий гаплотип), FJ167413 (близкий гаплотип), DQ984994.1 (близкий гаплотип)
A6	13	оз. Чаны, оз. Яркуль, оз. Костомар (Казахстан)	AB274415.1 – р. Чара, Казахстан [2]
B0	1	р. Обь (Александровский р-н)	GQ985474 – о. Сахалин, оз. Безымянное, FJ167424.1 – Европа, AB274413 – оз. Михайловское, Казахстан (близкий гаплотип) [2], GQ985481.1 – р. Камчатка (близкий гаплотип), GQ985473.1 – р. Раздольная, Приморье (близкий гаплотип), JN790652.1 – оз. Ханка, Китай (близкий гаплотип)
B1	2	р. Обь (Александровский р-н), оз. Монатка	–

чается на одну замену нуклеотидов (идентификационный номер в GenBank – MT062976). Ранее гаплотип B0 уже был описан на о. Сахалин (GQ985474). Близкие гаплотипы были описаны в водоемах Дальнего Востока (GQ985481 (р. Камчатка), GQ985473 (р. Раздольная), JN790699 (оз. Ханка), JN790661 (оз. Ханка)). В бассейне средней Оби частота встречаемости гаплогруппы B составляет около 7%, хотя эта цифра сильно варьирует в зависимости от района сбора и для описания распространения этой гаплогруппы необходимы дальнейшие исследования.

Результаты проведенного анализа свидетельствуют, что гаплотип A0 доминирует во всех водоемах. Гаплотипы A1, A2, A3, A4 и A6 не сильно отличаются от доминирующего гаплотипа A0. Гаплотип A5 образовался из предкового гаплотипа

A0 в результате делеции в 18 пн. Гаплогруппа B филогенетически значительно отличается от гаплогруппы A (рис. 2, 3). В работе Н. Sakai с соавт. [2] предполагается, что носители данного гаплотипа могут представлять особый подвид серебряного карася, хотя в работе А.В. Подлесных с соавт. [8] гаплогруппа B рассматривается как базальная подгруппа III *C. gibelio*. Распределение гаплотипов данной гаплогруппы характерно именно для северных популяций *C. gibelio*, поскольку они не отмечались в хорошо исследованных популяциях Китая и Японии.

Наиболее высоким нуклеотидным и гаплотипическим разнообразием (табл. 2) обладают караси самой северной выборки из р. Обь (Александровский р-н), а также из оз. Монатка, периодически имеющему связь с р. Обь и материковыми

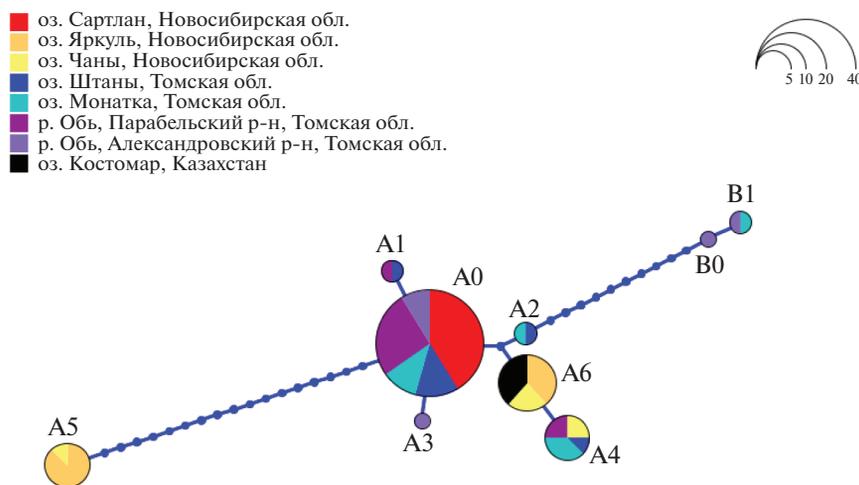


Рис. 2. Взаимоотношения между гаплотипами серебряного карася, полученные с использованием программы Network Viewer. В качестве входной топологии использовалось филогенетическое дерево, построенное по методу максимального правдоподобия. Гаплотипы описаны в табл. 1. Гаплотип А5 отличается от А0 единственной делецией в 18 пн, однако алгоритм расценивает эту мутацию как 18 однонуклеотидных замен.

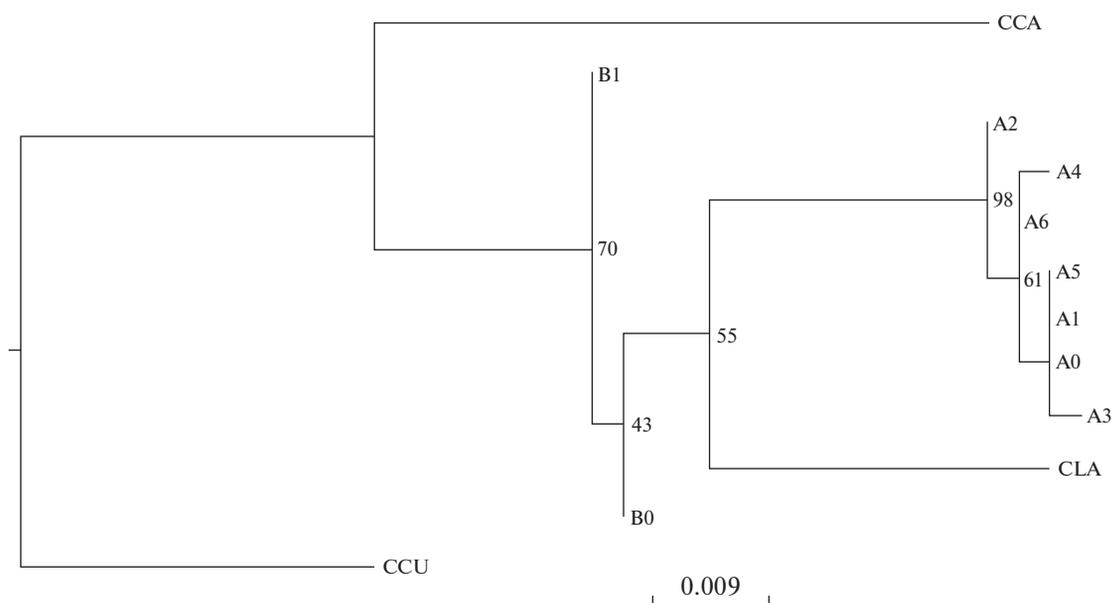


Рис. 3. Филогенетическое дерево гаплотипов серебряного карася из Южной Сибири (А0–А6, В1, В0), построенное методом максимального правдоподобия с моделью GTR+G. CCA – последовательность золотого карася из GenBank (JQ911695.1), CCU – последовательность карася Кювье *C. cuvieri* (AP011237.1), CLA – последовательность подвида “ginbuna” *C. auratus langsdorffii* (DQ985007).

озерами, где, возможно, существуют рефугиумы автохтонных форм вида. Наименьшее разнообразие зарегистрировано в оз. Сартлан (табл. 2), где, возможно, за 20 лет произошло замещение аборигенных форм серебряного карася амурским вселенцем. Хотя в близлежащих озерах Чаны и Яркуль доминируют гаплотипы А5 и А6, которые не были обнаружены в северных районах из нашей выборки. Очевидно, что на популяции серебряного карася в разных водоемах сильно повлияли

процессы генетического дрейфа, эффект основателя и антропогенная интродукция.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенного исследования в бассейне Средней Оби у серебряного карася *Carassius gibelio* выявлено семь гаплотипов, принадлежащих двум гаплогруппам. Серебряный карась гаплогруппы А отличается крайне

Таблица 2. Индексы молекулярного разнообразия популяций последовательностей контрольного района мтДНК серебряного карася, Обь-Иртышский бассейн

Популяция	Кол-во экземпляров	Число полиморфных сайтов	Число гаплотипов	<i>Pi</i>	<i>Hd</i>
оз. Штаны	9	3	3	0.0019	0.583
р. Обь, Александровский р-н	7	14	4	0.015	0.714
р. Обь, Парабельский р-н	15	2	3	0.0012	0.36
оз. Сартлан	19	0	1	0	0
оз. Монатка	10	14	4	0.008	0.711
оз. Чаны	6	2	3	0.003	0.733
оз. Яркуль	12	1	2	0.0013	0.530
оз. Костомар	5	0	1	0	0
Всего	83	14	9	0.0035	0.656

Примечание. *Pi* – нуклеотидное разнообразие, *Hd* – гаплотипическое разнообразие.

низким генетическим разнообразием по сравнению с популяциями Юго-Восточной Азии, что свидетельствует об эффекте основателя. Наличие гаплогруппы В, ранее описанной в Верхнем Иртыше, и базальной для всех описанных гаплотипов, может указывать на сохранение автохтонных форм серебряного карася в регионе. Присутствие в большинстве выборок гаплотипа А, характерного для амурской формы серебряного карася, может свидетельствовать о процессах замещения автохтонных форм данного вида интродуцированными амурскими формами.

Авторы выражают благодарность А.А. Проскуряковой за предоставление материала из оз. Костомар (Казахстан), Д.Л. Сукневу за предоставление материала из оз. Сартлан, и С.Ф. Кливеру за обсуждение проекта.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-14-00034.

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Решетников Ю.С.* Атлас пресноводных рыб России. М.: Наука, 2002. Т. 1. 379 с.
2. *Sakai H., Iguchi K., Yamazaki Y. et al.* Morphological and mtDNA sequence studies on three crucian carps (*Carassius*: Cyprinidae) including a new stock from the Ob River system, Kazakhstan // *J. Fish Biol.* 2009. № 74. P. 1756–1773. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02203.x>
3. *Takada M., Tachihara R., Kon T. et al.* Biogeography and evolution of the *Carassius auratus* – complex in East Asia // *BMC Evol. Biol.* 2010. V. 10. № 1. P. 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-7>
4. *Kottelat M., Freyhof J.* Handbook of European Freshwater Fishes. Cornol and Berlin: Kottelat and Freyhof, 2007. 646 p. <https://doi.org/10.1007/s10228-007-0012-3>
5. *Kalous L., Bohlen J., Petrtye M.* Hidden diversity within the Prussian carp and designation of a neotype for *Carassius gibelio* (Teleostei: Cyprinidae) // *Ichthyol. Exploration of Freshwaters.* 2012. V. 23(1). P. 11–18.
6. *Hensel K.* Some notes on the systematic status of *Carassius auratus gibelio* (Bloch, 1782) with further record of this fish from the Danube River in Czechoslovakia // *Věstník Československé Společnosti Zool.* 1971. № 35. P. 186–198.
7. *Аналикова О.В., Подлесных А.В., Кухлевский А.Д. и др.* Филогенетические отношения серебряных карасей *Carassius auratus gibelio* и *C. auratus cuvieri*, золотого карася *C. carassius* и карпа *Cyprinus carpio* на основе изменчивости митохондриальной ДНК // *Генетика.* 2011. Т. 47. № 3. С. 368–378.
8. *Подлесных А.В., Аналикова О.В., Брыков Вл.А.* Филогенетические отношения серебряного карася в комплексе *Carassius auratus* на основе анализа митохондриальной ДНК // *Генетика.* 2012. Т. 48. № 12. С. 1389–1400.
9. *Подушка С.Б.* О причинах вспышки численности серебряного карася // *Научно-тех. бюлл. лаб. ихтиологии ИНЭНКО.* 2004. № 8. С. 5–15.
10. *Pelz G.R.* *Carassius auratus gibelio* oder *Carassius auratus auratus* // *Natur und Museum.* 1987. V. 17. № 4. P. 118–129.

11. Fraser D., Adams C.E. A crucian carp *Carassius carassius* (L.) in Loch Rannoch, Scotland: Further evidence of the threat posed to unique fish communities by introduction of alien fish species // Aquatic Conserv: Mar Freshw Ecosyst. 1997. № 7. P. 323–326.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0755\(199712\)7:4<323::AID-AQC252>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0755(199712)7:4<323::AID-AQC252>3.0.CO;2-K)
12. Wheeler A. Status of the crucian carp, *Carassius carassius* (L.), in the UK // Fish Manag Ecol. 2000. № 7. P. 315–322.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2400.2000.007004315.x>
13. Vetešník L., Papoušek I., Halačka K. et al. Morphometric and genetic analysis of *Carassius auratus* complex from an artificial wetland in Morava River floodplain, Czech Republic // Fisheries Sci. 2007. № 73. P. 817–822.
<https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2007.01401.x>
14. Copp G.H., Cerný J., Kováč V. Growth and morphology of an endangered native freshwater fish, crucian carp *Carassius auratus*, in English ornamental pond // Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst. 2008. № 18. P. 32–43.
<https://doi.org/10.1002/aqc.820>
15. Hänfling B., Bolton P., Carvalho Y.R. et al. A molecular approach to detect hybridization between crucian carp (*Carassius carassius*) and nonindigenous carp species (*Carassius* spp. and *Cyprinus carpio*) // Freshw. Biol. 2005. № 50. P. 403–417.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2004.01330.x>
16. Holčík J., Žitňan R. On the expansion and origin of *Carassius auratus* in Czechoslovakia // Folia Zool. 1977. № 27. P. 279–288.
17. Japoshvili B., Levan M., Fahrettin K. Invasive *Carassius* Carp in Georgia: Current state of knowledge and future perspectives // Curr. Zool. 2013. V. 59. № 6. P. 732–739.
<https://doi.org/10.1093/czoolo/59.6.732>
18. Kang J.H., Noh E.S., Lim J.H. et al. Genetic differentiation of *Carassius auratus* and *C. cuvieri* by the cytochrome c oxidase I gene analysis // J. Aquaculture Res. and Development. 2014. V. 5. № 3. P. 100–103.
<https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000231>
19. Papoušek I., Vetešník L., Halacka K. et al. Identification of natural hybrids of gibel carp *Carassius auratus gibelio* (Bloch) and crucian carp *Carassius carassius* (L.) from lower Dyje River floodplain (Czech Republic) // J. Fish Biol. 2008. № 72. P. 1230–1235.
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01783.x>
20. Wouters J., Janson S., Luskova V., Olsen K.H. Molecular identification of hybrids of the invasive gibel carp *Carassius auratus gibelio* and crucian carp *Carassius carassius* in Swedish waters // J. Fish Biol. 2012. № 80. P. 2595–2604.
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2012.03312.x>
21. Copp G.H., Vilizzi L., Mumford J. et al. Calibration of FISK, an invasiveness screening tool for nonnative freshwater fishes // Risk Analysis. 2009. № 29. P. 457–467.
<https://doi.org/10.1111/j.1539-6924.2008.01159.x>
22. Luskova V., Lusk S., Vetešník L. *Carassius auratus gibelio* – the most successful invasive fish in waters of the Czech Republic // Russ. J. Biol. Invasions. 2010. № 1. P. 176–180.
<https://doi.org/10.1134/S2075111710030069>
23. Паллас П.С. Путешествие по разным местам Российского государства. Ч. 2. К. 2. СПб.: 1786. 571 с.
24. Иоганзен Б.Г. Этюды по географии и генезису ихтиофауны Сибири // Ученые записки ТГУ. 1946. № 1. С. 23–34.
25. Кривощёков Г.М. Караси Западной Сибири: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Томск, 1950. 11 с.
26. Иванова З.А. Рыбы степной зоны Алтайского края. Барнаул, 1962. 150 с.
27. Иоганзен Б.Г. Зональное и биотопическое распределение рыб в долине Оби // Биологические ресурсы поймы Оби / Под ред. Максимова А.А. Новосибирск, 1972. С. 270–291.
28. Гундризер А.Н. Рыбы пойменных водоемов реки Оби // Тр. Томского ун-та. 1963. Т. 152. С. 126–147.
29. Попов П.А. Видовой состав и характер распространения рыб на территории Сибири // Вопр. ихтиологии. 2009. Т. 49. № 4. С. 451–463.
30. Журавлев В.Б. Биологические особенности карасей (род *Carassius*, Сургинidae) и перспективы их промысла в разнотипных озерах Алтайского края: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Москва, 1989. 25 с.
31. Журавлев В.Б. Рыбы бассейна Верхней Оби. Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2003. 291 с.
32. Журавлев В.Б. Экология рыб Обь-Иртышского бассейна. М.: Т-во научных изданий КМК, 2006. 596 с.
33. Интересова Е.А. Чужеродные виды рыб в бассейне Оби // Росс. журн. биол. инвазий. 2016. № 1. С. 83–100.
34. Попов П.А., Воскобойников В.А., Щенев В.А. Рыбы озера Чаны // Сиб. экол. журн. 2005. Т. 12. № 2. С. 279–293.
35. Воскобойников В.А., Селезнева М.А. Изменение в экосистеме озера Чаны как результат вселения амурского карася (*Carassius auratus gibelio* Bloch) // Экологические эквивалентные и экзотические виды гидробионтов в великих и больших озерах мира. Улан-Удэ: 2002. С. 97–98.
36. Ядренкина Е.Н. Распределение чужеродных видов рыб в озерах умеренного климатического пояса Западной Сибири // Росс. журн. биол. инвазий. 2012. Т. 5. № 1. С. 98–115.
37. Richard G. Harrison. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology // Trends in Ecol. & Evol. V. 4. Is. 1. P. 6–11.
[https://doi.org/10.1016/0169-5347\(89\)90006-2](https://doi.org/10.1016/0169-5347(89)90006-2)
38. Carvalho G.R., Hauser L. Advances in the molecular analysis of fish population structure // Italian J. Zool. 1998. V. 65: S1. P. 21–33.
<https://doi.org/10.1080/11250009809386791>

Genetic Diversity of the Prussian Carp, *Carassius gibelio* (Cyprinidae), in the Middle Ob Basin

M. A. Pobedintseva^{a, *}, S. N. Reshetnikova^{b, c}, N. A. Serdyukova^a,
A. Bishani^d, V. A. Trifonov^{a, d}, and E. A. Interesova^{b, c}

^a*Institute of Molecular and Cellular Biology Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

^b*Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography, Novosibirsk, 630091 Russia*

^c*Tomsk State University, Tomsk, 634050 Russia*

^d*Faculty of Natural Science, Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia*

*e-mail: mapob@mcb.nsc.ru

The aboriginal form of the Prussian in Southern Siberian lakes and rivers is currently being replaced by introduced in the late 1970s of the 21st century Amur forms of the same species. We analyzed the genetic diversity of this species in Southern Siberia based on the polymorphism of D-loop fragment of mitochondrial DNA (460 bp), and revealed the presence of two haplogroups, one of which (B) is extremely rare in South-East Asia and is likely to be an indicator of the autochthonous forms of the Prussian carp, and the other (A) is similar to haplotypes that are characteristic of Far Eastern populations.

Keywords: silver crucian carp, *Carassius gibelio*, Western Siberia, ichthyofauna, invasive species, haplotypes, population diversity.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИИ ГОЛШТИНИЗИРОВАННОГО ЧЕРНО-ПЕСТРОГО СКОТА НА ТЕРРИТОРИИ УРАЛА

© 2021 г. М. В. Модоров¹*, И. В. Ткаченко¹, А. А. Грин¹, М. Ю. Севостьянов¹, Н. Н. Зезин¹

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

*e-mail: mmodorov@gmail.com

Поступила в редакцию 19.05.2020 г.

После доработки 04.12.2020 г.

Принята к публикации 10.12.2020 г.

Проанализирована изменчивость 15 микросателлитных локусов у 15786 особей крупного рогатого скота черно-пестрой, голштинской и тагильской пород, разводимых на территории Урала. Показано, что современная популяция голштинизированного черно-пестрого скота, содержащегося в племязаводах и племрепродукторах Свердловской, Курганской, Тюменской, Челябинской областей, Пермского края и Республики Удмуртия представляет собой единую популяцию. Генетическая дифференциация телят, рожденных в Свердловской обл. в период 2008–2019 гг., и быков голштинской породы, содержащихся в АО “Уралплемцентр”, статистически значимо не отличается от ноля, что позволяет утверждать о принадлежности современной популяции крупного рогатого скота региона к голштинской породе. Показано статистически значимое снижение параметров генетического разнообразия популяции молочного скота Свердловской обл. в период 2010–2019 гг., что свидетельствует о росте инбридинга в популяции.

Ключевые слова: *Bos taurus*, голштинская порода, черно-пестрая порода, тагильская порода, STR, Урал.

DOI: 10.31857/S001667582104010X

Голштинизированный черно-пестрый скот является наиболее массовой породой крупного рогатого скота молочного направления на территории Урала. Численность животных в регионе составляет около 500 тыс. голов [1]. История формирования данной популяции включает несколько этапов миграции генов, а также несколько центров селекции. При формировании местного тагильского скота использовались племенные производители голландской породы, затем в 1932–1936 гг. начались работы по скрещиванию тагильского скота с остфризскими быками-производителями с целью создания уральского черно-пестрого скота, формирование которого завершилось к 1959 г. Последующее совершенствование уральского черно-пестрого скота с 1965 по 1985 гг. осуществлялось путем прилития крови голландского скота, а с 1983 г., когда была принята программа создания нового внутривидного типа, путем межпородного скрещивания с голштинскими быками-производителями [2]. Сходная ситуация имела место в Челябинской, Пермской и Курганской обл. В то же время в Тюменской и Курганской обл. имеется значительное количество черно-пестрого скота, род-

ственно не связанного с тагило-остфризским. Таким образом, при формировании современного молочного скота Урала произошло смешение как минимум четырех пород: тагильской, голландской, черно-пестрой и голштинской [1, 3].

Современным методическим стандартом изучения структуры популяций крупного рогатого скота является использование SNP-чипов средней и высокой плотности [4–8]. Однако относительно высокая цена тестов ограничивает размер выборок животных, которые могут быть типированы в рамках научных проектов. Исторически SNP-чипы пришли на смену микросателлитным маркерам, которые успешно применялись для исследования популяционной структуры крупного рогатого скота до конца нулевых годов XXI в. [9–11]. К настоящему времени в рамках работ по определению достоверности происхождения животных на территории Урала нами типировано несколько тысяч особей голштинизированного черно-пестрого скота по 15 микросателлитным локусам. С учетом большого размера полученной выборки и большого охвата стад животных региона не вызывает сомнения, что полученная база

данных является хорошей основой для анализа пространственной структуры популяции и изменения этой структуры во времени. Целью данной работы является описание генетической структуры голштинизированного черно-пестрого скота Урала и оценка динамики генофонда популяции. Наибольшее внимание будет уделено популяции Свердловской обл.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для анализа послужили данные об изменчивости 15 микросателлитных локусов. Всего было проанализировано 17936 особей крупного рогатого скота. После исключения из базы совпадающих генотипов (монозиготных близнецов) и животных с неидентифицированными аллелями (пропусками данных) выборка составила 15786 образцов. Из них:

1. Голштинизированный черно-пестрый скот, содержащийся в племязаводах и племрепродукторах Свердловской обл. (21 организация из 46 существующих в области) — 13224 особи.

2. Быки-производители голштинской породы, содержащиеся в АО “Уралплемцентр” (выборка **Hol1**) — 48 особей.

3. Животные голштинской породы, эмбрионы которых были привезены на Урал из Канады (выборка **Hol2**) — 6 особей.

4. Голштинизированный черно-пестрый скот, принадлежащий племязаводам и племрепродукторам Курганской, Тюменской, Челябинской обл., Пермского края и Республики Удмуртия (всего 8 организаций) — 1569 особей.

5. Животные тагильской породы **Tag** — 92 особи. Выборка получена из последнего стада данной породы, Пермский край.

6. В качестве внешнего контроля использовали две выборки животных герефордской породы (**Her**), Пермский край, 847 особей.

ДНК животных выделяли из крови, законсервированной в цитрате натрия или ЭДТА, с использованием набора “ДНК-Экстран-1” (“Синтол”, Россия). В анализ были включены 15 микросателлитных локусов, локализованных в различных хромосомах: *BM1824*, *INRA23*, *BM2113*, *SPS115*, *ETH10*, *TGLA122*, *ETH225*, *TGLA126*, *TGLA227*, *BM1818*, *ETH3*, *TGLA53*, *CSRM60*, *CSSM66*, *ILSTS006*. ПЦР проводили с использованием набора *COrDIS Cattle* (“Гордиз”, Россия) согласно протоколу производителя. Длины амплифицированных фрагментов определяли на генетическом анализаторе *ABI 3130* (Applied Biosystems, США) в присутствии маркера молекулярной массы *S-550* (“Гордиз”). Хроматограммы расшифровывали в программе *Gene Mapper v. 4.0*.

Для анализа популяционной структуры использовали метод главных координат (PCoA) и

байесовскую кластеризацию. PCoA проводили в пакете *ade4 v. 1.7-13* [12] *R v. 3.5.2 software* [13]. При расчете брали классические дистанции Эвклида (или дистанции Роджерса), полученные в пакете *ade4 v. 2.1.2* [14]. Данные о годе рождения животных брали из базы Селэкс “Молочный скот”. Байесовскую кластеризацию выполнили в программе *STRUCTURE v. 2.3.4* [15]. Анализ позволил выделить два генофонда ($K = 2$), условно названных “А” и “В”, объединение которых привело к формированию современного генофонда каждого проанализированного стада.

Генетическую дифференциацию выборок (F_{ST}) рассчитывали с использованием пакета *hierfstat v. 0.04-22* по формуле М. Nei [16]. Для тестирования гипотезы об отличии параметра F_{ST} от нуля использовали программу *GenAEx v. 6.1* [17], при расчетах проводили 999 реплик.

Среднее (N_a) и эффективное (N_e) число аллелей на локус, а также индекс фиксации (F) рассчитывали в программе *GenAEx v. 6.1* [17]. Аллельное разнообразие (Ar_{15} , а именно число аллелей, которое будет обнаружено в выборке из 15 особей), ожидаемую (H_e) и наблюдаемую (H_o) гетерозиготности оценивали с использованием пакета *hierfstat v. 0.04-22*. При анализе связи двух параметров использовали линейную регрессионную модель типа:

$$y = a + b \times x.$$

Всего построили три модели. В качестве объясняемой переменной (y) брали параметры Ar_{15} , H_e , H_o . В качестве объясняющей переменной (x), год рождения особей. Связь считали установленной при статистически значимом отличии коэффициента b от нуля ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Индексы, характеризующие генетическую изменчивость голштинизированного черно-пестрого скота Свердловской обл., приведены в табл. 1. В 15 локусах обнаружено 164 аллеля, частота встречаемости 38 из них менее 0.1%. Среднее число аллелей на локус равняется 10.9, эффективное число аллелей на локус — 4.02. Параметры наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготностей близки, они составляют 0.73 (H_o) и 0.72 (H_e).

Для сравнения уровня генетического разнообразия популяции голштинизированного черно-пестрого скота Свердловской обл. с другими популяциями голштинской и черно-пестрой пород использовали параметр ожидаемой гетерозиготности (H_e). Общими микросателлитными маркерами, используемыми в большинстве проанализированных литературных источников, были девять локусов: *BM1824*, *INRA23*, *BM2113*, *SPS115*, *ETH10*, *TGLA122*, *ETH225*, *TGLA126*, *TGLA227*, для которых нами были рассчитаны средние значения па-

Таблица 1. Параметры генетической изменчивости 15 микросателлитных локусов голштинизированной черно-пестрой породы крупного рогатого скота Свердловской обл. ($N = 13224$)

Локус	Ch	Размеры фрагментов (п.н.)*	N_a	N_e	H_o	H_e	F	Редкие аллели**
<i>BM1824</i>	1	174, 178–190	7	3.72	0.73	0.73	–0.005	174, 184
<i>BM2113</i>	2	125–143, 147	11	4.20	0.76	0.76	–0.002	129, 131, 141, 143, 147
<i>ETH3</i>	19	103, 109, 113, 117–131, 139	12	3.40	0.71	0.71	–0.005	103, 109, 113, 139
<i>ETH10</i>	5	209, 213–225	8	4.34	0.78	0.77	–0.011	
<i>ETH225</i>	9	140–152	7	3.38	0.70	0.70	0.008	
<i>INRA23</i>	3	198–216	10	4.15	0.76	0.76	–0.007	
<i>SPS115</i>	15	248–261	8	2.27	0.56	0.56	–0.010	250, 261
<i>TGLA53</i>	16	154, 158–190	18	7.17	0.87	0.86	–0.007	172, 180, 188, 190
<i>TGLA122</i>	21	139–153, 157–165, 169–177, 181–185	21	6.60	0.84	0.85	0.014	157, 159, 165, 169, 175, 177, 185
<i>TGLA126</i>	20	111–123	7	2.60	0.62	0.62	–0.009	111, 113
<i>TGLA227</i>	18	77–103	14	6.10	0.85	0.84	–0.011	85, 95
<i>BM1818</i>	23	258–272	8	2.59	0.62	0.61	–0.010	272
<i>CSRM60</i>	10	86–106	11	2.86	0.66	0.65	–0.009	86, 88, 90, 94
<i>CSSM66</i>	14	179–199, 207	12	4.05	0.75	0.75	0.006	199
<i>ILSTS006</i>	7	282–300	10	3.08	0.67	0.68	0.003	282, 284, 298, 300
Среднее			10.9	4.03	0.73	0.72	–0.004	
SE			1.1	0.39	0.02	0.02	0.002	

Примечание. Ch – хромосома, в которой расположен локус, N_a – среднее число аллелей на локус, N_e – эффективное число аллелей на локус, H_o – наблюдаемая гетерозиготность, H_e – ожидаемая гетерозиготность, F – индекс фиксации, * – все локусы представляют собой динуклеотидные повторы, ** – аллели с частотой встречаемости менее 0.1%.

раметра H_e . В выборках голштинизированного скота Китая значения H_e составили 0.66 [18] и 0.73 [19], в популяции Чехии – 0.75 [20], Ирана – 0.76 [21], Турции – 0.77 [22]. Для черно-пестрой породы, разводимой на территории Республики Беларусь, значение ожидаемой гетерозиготности составляет 0.80 [23]. В популяции голштинизированного черно-пестрого скота Свердловской обл. уровень ожидаемой гетерозиготности для девяти вышеперечисленных локусов равняется 0.73, что меньше большинства значений, отмеченных в других локальных популяциях животных.

Кластеризация всех имеющихся выборок в осях главных координат представлена на рис. 1. Одной выборкой (или стадом) считали животных, принадлежащих одной организации. На рис. 1,а в качестве внешнего контроля для скота молочного направления использовали герефордскую (мясную) породу животных. Первая ось разделила три чистопородные группы (голштинскую, тагильскую и герефордскую). Ожидаемо, что породы молочного направления оказались более близки между собой, уровень генетической дифференциации между выборками Hol1 и Tag составляет $F_{ST} = 0.03$ ($p < 0.01$), выборками Tag и Her $F_{ST} = 0.08$ ($p < 0.01$), Hol1 и Her $F_{ST} = 0.12$ ($p < 0.01$). Голштинизированный черно-пестрый скот уральского

региона по первой оси главных координат расположился между голштинской и тагильской породами.

Для более детального анализа целевой группы животных отдельно была проведена кластеризация скота молочного направления, рис. 1,б. По результатам анализа выборки животных можно разделить на три группы. К первой относятся 27 из 29 стад голштинизированного черно-пестрого скота, содержащиеся на территории различных областей региона, быки, принадлежащие АО “Уралплемцентр”, а также выборка тагильской породы. Значения генетической дифференциации в пределах группы составляет $F_{ST} = 0.004–0.037$ (в среднем $F_{ST} = 0.017$), рис. 1,б. Вторая группа представлена животными из двух хозяйств, расположенных на территории Свердловской обл., данные выборки удалены от основной группы животных как по первой оси главных координат, так и по второй. Средний уровень дифференциации животных первой и второй групп составляет $F_{ST} = 0.04$. Вероятной причиной подобных различий является то, что поставщиком спермопродукции в хозяйства второй группы является не АО “Уралплемцентр”, а другие организации. Уровень генетической дифференциации животных второй группы и выборки быков, принадлежащих АО “Уралплем-

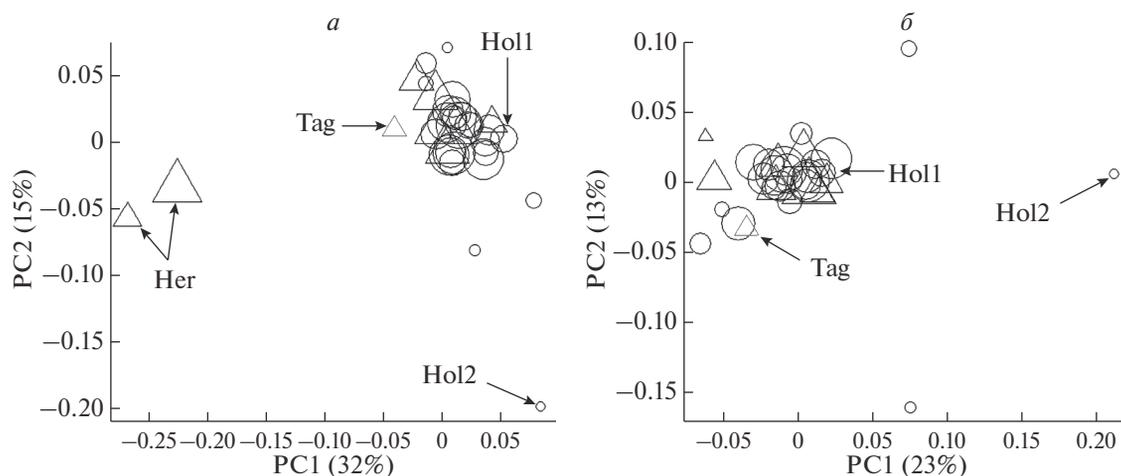


Рис. 1. Положение выборок крупного рогатого скота по осям главных координат. Кругами показаны животные, содержащиеся на территории Свердловской обл., треугольниками – животные, содержащиеся на территории Курганской, Тюменской обл., Пермского края и Республики Удмуртия. Размер фигуры пропорционален десятичному логарифму размера выборки. Обозначения: Hol1 – быки голштинской породы, содержащиеся в АО “Уралплементр”, Hol2 – особи голштинской породы, родиной которых является Канада, Tag – выборка тагильской породы, Her – выборки герефордской породы. Необозначенные выборки представляют голштинизированный черно-пестрый скот. *a* – ординация мясного и молочного скота (включает выборки герефордской породы), *б* – ординация выборок молочного скота.

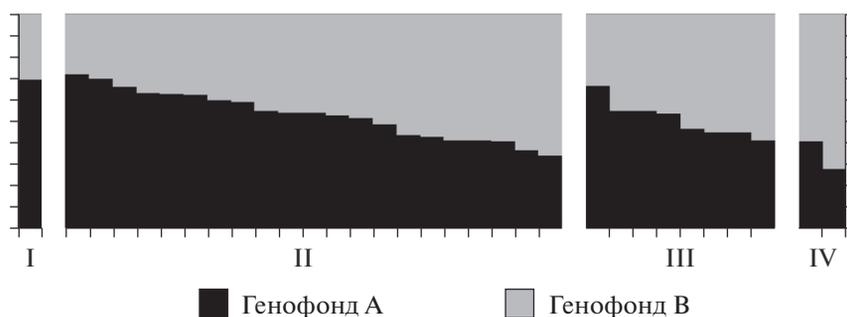


Рис. 2. Результаты байесовской кластеризации крупного рогатого скота ($K = 2$), учетная единица стадо. Колонки показывают доли генофондов “А” и “В” в следующих группах: I – стадо тагильской породы, II – стада, принадлежащие племязаводам и племрепродукторам Свердловской обл., III – стада, принадлежащие племязаводам и племрепродукторам Курганской, Тюменской, Челябинской обл., Пермского края и Республики Удмуртия, IV – группа быков голштинской породы, содержащихся в АО “Уралплементр” (выборка Hol1) и группа животных голштинской породы, привезенная на Урал из Канады (выборка Hol2).

центр”, статистически значимо отличается от нуля ($p < 0.006$). Наиболее дифференцированной группой молочного скота является выборка Hol2, т. е. чистокровные голштины, родиной которых является Канада. Уровень генетической дифференциации выборки Hol2 от других стад молочного скота составляет $F_{ST} = 0.04–0.09$ (в среднем $F_{ST} = 0.06$), рис. 1. Генетическая дифференциация выборок Hol1 и Hol2 статистически значимо отличается от нуля ($F_{ST} = 0.04$, $p = 0.009$) и превышает дифференциацию пары выборок Hol1 и Tag ($F_{ST} = 0.03$, $p < 0.01$).

Результаты байесовской кластеризации стад представлены на рис. 2. При $K = 2$ проанализиро-

ванные стада различаются по соотношению вклада двух генофондов, условно названных “А” и “В”. Доля генофонда “В” в стадах варьирует от 0.28 до 0.74. Максимальное значение показателя отмечено в выборке голштинской породы (Hol2), а в выборке животных тагильской породы наблюдается одно из самых низких значений данного показателя (доля генофонда “В” составляет 0.31), рис. 2.

Ординация выборок голштинизированного черно-пестрого скота, содержащегося в племязаводах и племрепродукторах Свердловской обл., в зависимости от года рождения животного, приведена на рис. 3. Полученные данные указывают на

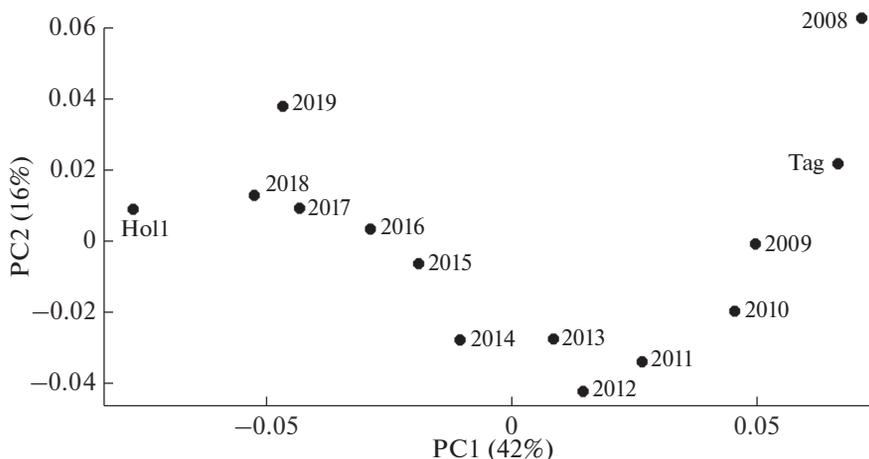


Рис. 3. Ординация выборок голштинизированного черно-пестрого скота, содержащегося в племязаводах и племрепродукторах Свердловской обл., в зависимости от года рождения животного. Цифрами 2008–2019 показаны выборки животных разных годов рождения (размеры выборок приведены в табл. 2), Hol1 – выборка быков голштинской породы, содержащихся в АО “Уралплемцентр”, Tag – животные тагильской породы.

постепенное изменение генофонда популяции Свердловской обл. в период 2008–2019 гг. в сторону увеличения сходства с быками голштинской породы, принадлежащими АО “Уралплемцентр”, и снижения сходства с выборкой тагильской породы. Значения параметров генетической дифференциации между выборками голштинизированного черно-пестрого скота, рожденного в различные годы, и голштинами (Hol1) варьируют от $F_{ST} = 0.002$ до 0.029 (табл. 2), однако статистически значимо не отличаются от нуля ($p < 0.05$).

Динамика показателей генетического разнообразия в выборках животных, рожденных в период 2008–2019 гг. приведена в табл. 2. Можно выявить два тренда. Во-первых, закономерное, статистически значимое снижение показателей в период 2010–2019 гг.: H_o с 0.75 до 0.72 ($p(b) \leq 0.01$), H_e с 0.74 до 0.71 ($p(b) \leq 0.01$), Ar_{15} с 93.3 до 84.2 ($p(b) \leq 0.01$). Во-вторых, рост показателей, характеризующих генетическое разнообразие популяции в период 2008–2010 гг.

ОБСУЖДЕНИЕ

Генетическая дифференциация чистопородного скота

В исследовании проанализированы четыре выборки чистопородных животных, представляющих голштинскую (две выборки), тагильскую и герефордскую породы. Как и ожидалось, наиболее отличной от остальных групп животных оказалась группа животных мясного направления продуктивности (герефордская). Уровень генетической дифференциации между ней и остальными выборками превышает $F_{ST} > 0.08$. Генетическая дифференциация двух выборок животных

голштинской породы ($F_{ST} = 0.04$) была выше величины дифференциации быков голштинской породы, принадлежащих АО “Уралплемцентр” и тагильской породы ($F_{ST} = 0.03$). Полученные данные свидетельствуют о высоком генетическом разнообразии в пределах голштинской породы животных, а также высоком генетическом сходстве локальной уральской породы (тагильской) и

Таблица 2. Показатели генетического разнообразия и генетической дифференциации выборок голштинизированного черно-пестрого скота, содержащегося в племязаводах и в племенных репродукторах Свердловской обл., в зависимости от года рождения животных

Год	N	H_o	H_e	Ar_{15}	$F_{ST} : \text{Hol1} - \text{год}$
2008	18	0.71	0.73	90.7	0.029
2009	60	0.71	0.74	89.9	0.028
2010	120	0.75	0.74	93.3	0.023
2011	273	0.75	0.74	91.9	0.020
2012	486	0.75	0.74	90.7	0.020
2013	812	0.74	0.73	88.4	0.015
2014	1053	0.73	0.72	88.3	0.013
2015	1963	0.73	0.72	86.1	0.006
2016	2852	0.72	0.72	84.7	0.003
2017	3094	0.72	0.71	82.9	0.002
2018	1152	0.71	0.71	82.4	0.002
2019	916	0.72	0.71	84.2	0.006

Примечание. N – размер выборки, H_o – наблюдаемая гетерозиготность, H_e – ожидаемая гетерозиготность, Ar_{15} – разнообразие аллелей (ожидаемое число аллелей 15 локусов, которое будет обнаружено в выборке размером 15 особей). Генетическая дифференциация рассчитана между выборкой Hol1 и выборками уральского скота разных лет рождения.

быков, спермопродукцию которых используют в Свердловской обл. в настоящее время.

Объяснить наблюдаемый уровень дифференциации трех выборок молочных пород можно с использованием данных о регионе происхождения животных. При формировании тагильского скота шла активная миграция генов из популяции Северной Европы, а именно холмогорской и голландской пород, генетически близких к европейской субпопуляции голштинской породы [4, 5]. Значительная часть выборки быков, принадлежащих АО “Уралплемцентр”, также происходит из региона Северной Европы. На контрасте с ними выборка голштинской породы (Hol2) представляет субпопуляцию Северной Америки.

Пространственная структура популяции голштинизированного черно-пестрого скота Урала

Результаты анализа, проведенного с использованием метода главных координат и байесовской кластеризации, свидетельствует о том, что административные границы Уральского региона не являются фактором, влияющим на генетическую дифференциацию стада голштинизированного черно-пестрого скота. Животные, содержащиеся в племязаводах и племрепродукторах Свердловской, Курганской, Тюменской, Челябинской областей, Пермского края и Республики Удмуртия, представляют собой единую популяцию с незначительным уровнем генетической дифференциации. В настоящее время на территории Урала присутствуют, во-первых, стада голштинизированного черно-пестрого скота, генетически сходные со стадом тагильской породы, во-вторых, стада, генетически сходные с группой быков голштинской породы, принадлежащих АО “Уралплемцентр”, в-третьих, стада с “промежуточным” генофондом относительно тагильской и голштинской пород. Стада племенных животных, генетически сходные с североамериканской субпопуляцией голштинской породы, в регионе не обнаружены.

Динамика генофонда популяции голштинизированного черно-пестрого скота Свердловской области в период 2008–2019 гг.

В исследовании были проанализированы генетические характеристики выборок телят, рожденных на территории Свердловской обл. в период 2008–2019 гг. Показана постепенная направленная трансформация генофонда популяции голштинизированного черно-пестрого скота в сторону сходства с генофондом быков голштинской породы, содержащихся в АО “Уралплемцентр”. Генетическая дифференциация выборок телят, рожденных в регионе в 2015–2019 гг. и быков голштинской породы была менее $F_{ST} < 0.01$ и статистически значимо не отличалась от нуля, что позволяет

считать телят и быков АО “Уралплемцентр” принадлежащими к одной породе, а именно голштинской. В период 2010–2019 гг. трансформация генофонда уральской популяции сопровождалась снижением параметров, характеризующих ее генетическое разнообразие, что свидетельствует о росте инбридинга в популяции.

Неожиданностью было то, что животные, рожденные в данном регионе в 2008–2009 гг., были генетически сходны со стадом тагильской породы, хотя миграция генов между этими группами прекратилась в 30-е годы прошлого века. Очевидно, что это результат использования для улучшения уральского черно-пестрого скота в период 1958–1983 гг. голландских быков-производителей из Северной Европы, которые были генетически слабо дифференцированы от животных тагильской породы. После 2010 г. заметное влияние на генофонд уральской популяции стали оказывать быки, происходящие из других субпопуляций голштинской породы, в частности, североамериканской. Более подробно этот вопрос будет изучен в последующих исследованиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные стада голштинизированного черно-пестрого скота, содержащегося в племязаводах и племрепродукторах Свердловской, Курганской, Тюменской, Челябинской обл., Пермского края и Республики Удмуртия, представляют собой единую популяцию. Величина генетической дифференциации телят, рожденных в Свердловской области в 2015–2019 гг. и быков голштинской породы, содержащихся в АО “Уралплемцентр”, составляет менее $F_{ST} < 0.01$ и статистически значимо не отличается от нуля. С учетом того, что с 80-х годов прошлого столетия для улучшения уральского крупного рогатого скота используются исключительно быки голштинской породы и наблюдаемый уровень генетической дифференциации уральского скота и чистопородных голштинских быков минимален, можно актуализировать вопрос о породной принадлежности современных уральских стад племенного молочного скота.

В период 2010–2019 гг. в популяции черно-пестрого скота Свердловской обл. происходит постепенное снижение параметров генетического разнообразия, что свидетельствует о росте инбридинга в популяции. Этот результат показывает принципиальную возможность использования данных, полученных в ходе определения достоверности происхождения крупного рогатого скота с использованием панели из 15 микросателлитных локусов, для мониторинга уровня инбридинга региональной популяции молочного скота.

Отбор и генотипирование образцов выполнены в ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН в рамках госу-

дарственного задания “Разработать селекционно-генетические и теоретические основы сохранения и эффективного использования генофонда крупного рогатого скота в Уральском регионе с применением современных биотехнологий”. Обработка результатов исследования выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Свердловской обл. в рамках научного проекта № 20-416-660008.

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. *Гридина С.Л., Гридин В.Ф., Мырнин В.С. и др.* Характеристика племенных и продуктивных качеств черно-пестрого скота в областях и республиках Урала. Екатеринбург: УрО РАН, 2018. 80 с.
2. *Мырнин В.С.* Черно-пестрый скот на Урале (состояние и методы совершенствования). Екатеринбург: Изд-во УралГАУ, 2003. 145 с.
3. *Гридина С.Л., Мырнин В.С., Гридин В.Ф. и др.* Современное состояние и перспективы развития молочного скотоводства на Урале. Екатеринбург: ООО “Веселый пиксель”, 2018. 150 с.
4. *Sermyagin A.A., Dotsev A.V., Gladyr E.A. et al.* Whole-genome SNP analysis elucidates the genetic structure of Russian cattle and its relationship with Eurasian taurine breeds // *Genet. Sel. Evol.* 2018. V. 50. P. 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12711-018-0408-8>
5. *Yurchenko A., Yudin N., Aitnazarov R. et al.* Genome-wide genotyping uncovers genetic profiles and history of the Russian cattle breeds // *Heredity.* 2018. V. 120. № 2. P. 125–137. <https://doi.org/10.1038/s41437-017-0024-3>
6. *Decker J.E., McKay S.D., Rolf M.M. et al.* Worldwide patterns of ancestry, divergence, and admixture in domesticated cattle // *PLoS Genet.* 2014. V. 10. № 3. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004254>
7. *Iso-Touru T., Tapio M., Vilkkki J. et al.* Genetic diversity and genomic signatures of selection among cattle breeds from Siberia, eastern and northern Europe // *Anim. Genet.* 2016. V. 47. № 6. P. 647–657. <https://doi.org/10.1111/age.12473>
8. *Зиновьева Н.А., Доцев А.В., Сермягин А.А. и др.* Изучение генетического разнообразия и популяционной структуры российских пород крупного рогатого скота с использованием полногеномного анализа SNP // *С.-хоз. биология.* 2016. Т. 51. № 6. С. 788–800. <https://doi.org/10.15389/agrobiol.2016.6.788eng>
9. *Li M.H., Kantanen J.* Genetic structure of Eurasian cattle (*Bos taurus*) based on microsatellites: Clarification for their breed classification // *Anim. Genet.* 2010. V. 41. № 2. P. 150–158. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.01980.x>
10. *Martin-Burriel I., Rodellar C., Canon J. et al.* Genetic diversity, structure, and breed relationships in Iberian cattle // *J. Anim. Sci.* 2011. V. 89. № 4. P. 893–906. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3338>
11. *Medugorac I., Medugorac A., Russ I. et al.* Genetic diversity of European cattle breeds highlights the conservation value of traditional unselected breeds with high effective population size // *Mol. Ecol.* 2009. V. 18. № 16. P. 3394–3410. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04286.x>
12. *Dray S., Dufour A.* The ade4 package: Implementing the duality diagram for ecologists // *J. Stat. Soft.* 2007. V. 22. № 4. P. 1–20. <https://doi.org/10.18637/jss.v022.i04>
13. R Core Team, R: A language and environment for statistical computing. 2019. URL: <http://www.R-project.org/>.
14. *Jombart T.* ADEGENET: A R package for the multivariate analysis of genetic markers // *Bioinformatics.* 2008. V. 24. № 11. P. 1403–1405. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129>
15. *Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P.* Inference of population structure using multilocus genotype data // *Genetics.* V. 155. № 2. P. 945–959.
16. *Nei M.* Molecular Evolutionary Genetics. Columbia: Columbia Univ. Press, 1987. 512 p.
17. *Peakall R., Smouse P.E.* GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // *Mol. Ecol. Notes.* 2006. V. 6. № 1. P. 288–295. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
18. *Tian F., Sun D.X., Zhang, Y.* Establishment of paternity testing system using microsatellite markers in Chinese Holstein // *J. Genet. Genomics.* 2007. V. 35. № 5. P. 279–284. [https://doi.org/10.1016/s1673-8527\(08\)60040-5](https://doi.org/10.1016/s1673-8527(08)60040-5)
19. *Zhang Y., Wang Y.C., Sun D.X., Yu Y.* Validation of 17 microsatellite markers for parentage verification and identity test in Chinese Holstein cattle // *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 2010. V. 23. № 4. P. 425–429. <https://doi.org/10.5713/ajas.2010.90424>
20. *Rehout V., Hradecka E., Citek J.* Evaluation of parentage testing in the Czech population of Holstein cattle // *Czech J. Anim. Sci.* 2006. V. 51. № 12. P. 503–509.
21. *Hashemi M., Amirinia C., Harkinezhad M.T. et al.* Validation of pedigree relationships using a multiplex microsatellite marker assay in Iranian Holstein cattle // *Ann. Anim. Sci.* 2013. V. 13. № 3. P. 481–493. <https://doi.org/10.2478/aoas-2013-0042>
22. *Ozkan E., Soysal M.I., Ozder M. et al.* Evaluation of parentage testing in the Turkish Holstein population based on 12 microsatellite loci // *Livestock Sci.* 2009. V. 124. № 1–3. P. 101–106. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2009.01.004>
23. *Глинская Н.А.* STR-полиморфизм генофонда крупного рогатого скота Белорусской черно-пестрой породы и его использование в селекции: Дис. ... канд. с.-х. наук. Гродно: Гродненский государственный аграрный университет, 2014. 108 с.

Population Genetic Structure of Ural Black Pied Cattle

M. V. Modorov^{a, *}, I. V. Tkachenko^a, A. A. Grin^a, M. Yu. Sevost'yanov^a, and N. N. Zezin^a

^a*Ural Federal Agrarian Scientific Research Centre, Ural Branch of the Russian Academy of Science,
Ekaterinburg, 620142 Russia*

**e-mail: mmodorov@gmail.com*

The variability of 15 microsatellite loci of 15786 Ural Black Pied cattle individuals was analyzed. Genetic differentiation of Ural Black Pied cattle belongs to pedigree farm of Sverdlovsk, Kurgan, Tyumen, Chelyabinsk, Perm and Udmurtia regions is small. Genetic differentiation of Sverdlovsk region calves 2008–2019 years of birth and Ural Holstein bulls are not statistically significantly different from zero. This indicates that these calves belong to Holstein breed. The genetic diversity parameters in Sverdlovsk region dairy cattle population was decrease in 2010–2019 years. That is indicating about population inbreeding increase.

Keywords: *Bos taurus*, Holstein, Black Pied, Tagil breed, STR, Ural.

ИССЛЕДОВАНИЕ РАЗНООБРАЗИЯ ГИДРОБИОНТОВ ЛИСТВЕННИЧНОГО ЗАЛИВА ОЗЕРА БАЙКАЛ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДНК-МЕТАБАРКОДИНГА

© 2021 г. Л. С. Кравцова^{1, *}, Т. Е. Перетолчина¹, Т. И. Трибой¹, И. А. Небесных¹,
А. Б. Купчинский², А. Е. Тупикин³, М. Р. Кабилов³

¹Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, 664033 Россия

²Байкальский музей Иркутского научного центра Сибирского отделения Российской академии наук,
Иркутская область, пос. Листвянка, 664520 Россия

³Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: lk@lin.irk.ru

Поступила в редакцию 30.04.2020 г.

После доработки 07.09.2020 г.

Принята к публикации 01.10.2020 г.

Исследовано таксономическое разнообразие гидробионтов Лиственничного залива оз. Байкал с помощью ДНК-метабаркодинга. Расшифровка нуклеотидных последовательностей фрагмента гена (313 пн) митохондриальной ДНК, кодирующего первую субъединицу цитохром *c* оксидазы (*COI*), после амплификации с внутренних праймеров (mICOIintF, jgHCO2198), проведена с использованием Illumina MiSeq. Биоинформатический анализ прочтений *COI* позволил выявить 187 ОТЕ (операционных таксономических единиц), среди которых преобладают Arthropoda, Annelida, Mollusca, Plathelminthes, на их долю приходится соответственно 52, 30, 10, 4%. В целом видовое разнообразие фауны залива по показателю Шеннона (3.2 бит) сопоставимо с другими районами Байкала. Наиболее разнообразный состав таксонов (22 ОТЕ) видового уровня приходится на личинок хирономид, что подтверждает эффективность метода для идентификации ювенильных стадий беспозвоночных животных. Результаты исследования служат первым шагом на пути совершенствования системы гидробиологического мониторинга оз. Байкал, основанного на синтезе молекулярно-генетической диагностики беспозвоночных животных и классической морфологической таксономии.

Ключевые слова: беспозвоночные животные, *COI*, ДНК-метабаркодинг, высокопроизводительное секвенирование, Байкал.

DOI: 10.31857/S0016675821040056

В настоящее время в связи с глобальным изменением климата стал актуален вопрос как будет меняться биоразнообразие природных экосистем в пространстве и времени? Отклик морских и пресноводных водоемов на изменение природно-климатических факторов регистрируют во всем мире, одним из показателей служит таксономический состав гидробионтов [1–3]. В оз. Байкал обитают 2565 видов и подвидов животных, эндемики составляют около 60% [4]. В результате глобальных климатических изменений температура воздуха в Байкальском регионе увеличилась на 1.2°C, а воды в поверхностном слое оз. Байкал (в мае–сентябре) – на 1°C [5]. В связи с нарастающим региональным потеплением климата важны методы экспресс-оценки состояния фауны Байкала для выявления изменений в ее составе, особенно в эндемичном комплексе, адаптированном

к обитанию в холодноводном озере. Однако исследование фаунистического разнообразия Байкала сопряжено с трудоемким процессом идентификации видов и необходимостью привлечения большого числа специалистов-морфологов. Хотя в изучении и сохранении биоразнообразия любого водоема по-прежнему базовой остается морфология видов, для оценки современного состояния байкальской фауны мы решили апробировать современный молекулярно-генетический метод – ДНК-метабаркодинг на основе высокопроизводительного секвенирования (next generation sequencing – NGS). Этот метод широко применяется для исследования разнообразия пресноводных и морских экосистем, ДНК-метабаркодинг можно рассматривать как альтернативу традиционной морфологической диагностике видов [6–11].

Преимущество ДНК-метабаркодинга заключается в том, что при анализе большого набора организмов не требуется выделения ДНК из отдельных индивидуумов или клонирования. К тому же одновременно можно получить большое количество нуклеотидных последовательностей для каждого организма, смешанного с другими в одной пробе. При этом мини-баркод фрагментов гена мтДНК, кодирующего первую субъединицу цитохром *c* оксидазы (*COI*), позволяет идентифицировать виды с разрешением более 97–98% [12–14].

Цель работы заключается в исследовании таксономического разнообразия гидробионтов на основе ДНК-метабаркодинга на примере Лиственничного залива оз. Байкал.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пробы зообентоса были собраны в 2019 г. в заливе Лиственничный. На глубинах 0.3–0.5 м донные отложения (крупная и мелкая галька с отдельными валунами) отбирали вручную с использованием сачка. На глубинах 2–5 м валуны, неокатанные обломки пород с щебнем, а также заиленный песок отбирали водолазы. Беспозвоночных животных с поверхности камней счищали щеткой в кювету с водой, из заиленного песка их извлекали путем флотации в насыщенном растворе сахара плотностью 1.12. Пробы промывали через сачок из мельничного сита № 23 и фиксировали 100%-ным этанолом. Всего было собрано 15 количественных проб зообентоса.

В лабораторных условиях пробы разбирали под микроскопом МБС-10 при увеличении 2×10 , беспозвоночных животных очищали от остатков терригенного материала (детрита, песка), водорослей. Для выделения ДНК все организмы предварительно вымачивали (один час) в дистиллированной воде, причем от крупных особей (размерами более 5 мм) брали кусочки ткани по 2–3 мм. Беспозвоночных животных с однотипных донных отложений помещали в фарфоровую чашку и растирали пестиком с добавлением 2%-ного раствора СТАВ (в пропорции: на 1 мм³ ткани 300 мкл СТАВ). ДНК экстрагировали по модифицированной методике Дойла и Диксон [15]. Всего для метабаркодинга было подготовлено пять проб геномной ДНК (не менее 20 нг в каждой) беспозвоночных животных, собранных на разных типах донных отложений.

Аmplification проводили с набором реактивов ПЦР с HS-Taq (“Биолабмикс”, г. Новосибирск www.biolabmix.ru) в 25 мкл реакционной смеси в термоциклере Bio-Rad T100 (Bio-Rad, США). Фрагмент гена *COI* амплифицировали с использованием праймеров mlCO1int F: ggw-acw-ggw-tga-acw-gtw-tay-ccy-cc [14] и igHCO2198: ta(I)-acy-tc(I)-ggr-tg(I)-ccr-aar-aay-ca [16].

Условия ПЦР при 30 циклах амплификации были следующими: денатурация 94°C – 1 мин (преденатурация – 5 мин), отжиг 50°C – 1 мин 30 с, элонгация 72°C – 1 мин 20 с (постэлонгация – 5 мин). Продукты реакции анализировали электрофоретически в 1%-ном агарозном геле. Фрагменты ожидаемого размера вырезали и очищали с помощью набора для элюции ДНК из агарозного геля (Biosilica, Новосибирск).

К ампликонам лигировали адаптеры с помощью набора NebNext Ultra II DNA Library Prep Kit (NEB). Полученные ДНК-библиотеки секвенировали в ЦКП “Геномика” СО РАН (ИХБФМ СО РАН) на секвенаторе MiSeq (Illumina), используя набор Reagent Kit v3 (2 × 300, Illumina).

Полученные парные последовательности анализировали с помощью UPARSE-скриптов [17], используя Usearch v11.0.667 [18]. Биоинформатическая обработка включала перекрывание парных прочтений, фильтрацию по качеству и длине, учет одинаковых последовательностей, отбрасывание синглетонов, удаление химер и получение ОТЕ (операционной таксономической единицы) с помощью алгоритма кластеризации UNOISE2 [19]. Таксономическую принадлежность последовательностей ОТЕ определяли с использованием алгоритмов SINTAX [20] и референсной базы MIDORI_UNIQUE_20180221_COI_SINTAX [21], а также BLAST. Анализ репрезентативности выборок ОТЕ проводили с помощью iNEXT 2.0.15 [22]. Все нуклеотидные последовательности выявленных ОТЕ были протестированы на наличие стоп-кодонов с использованием программы Emboss Transeq, размещенной на сервере: www.ebi.ac.uk.

Зависимость между численностью представителей высших таксонов (экз.) в пробах (до экстракции ДНК) и количеством прочтений идентифицированных ОТЕ оценивали по коэффициенту корреляции Спирмена. Видовое β -разнообразие фауны в Лиственничном заливе характеризовали по показателю Шеннона, а степень сходства населения разных биотопов – с помощью кластерного анализа (UPGMA), в качестве меры расстояния использовали коэффициент Жаккара. ОТЕ, представленные менее 10 прочтениями, в расчетах не использовали.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Всего в собранных пробах было найдено 5042 экз., из них 2803 экз. макробеспозвоночных (размеры >2 мм) и 2239 экз. мейобеспозвоночных животных (размеры <2 мм). Наиболее многочисленными были макробеспозвоночные Oligochaeta (972 экз.), Amphipoda (605 экз.), Chironomidae (546 экз.), Mollusca (225 экз.) и мейобеспозвоночные Ostracoda (642 экз.), Nematoda (588 экз.), Rhabdocoela (198 экз.). Зарегистрированы пять

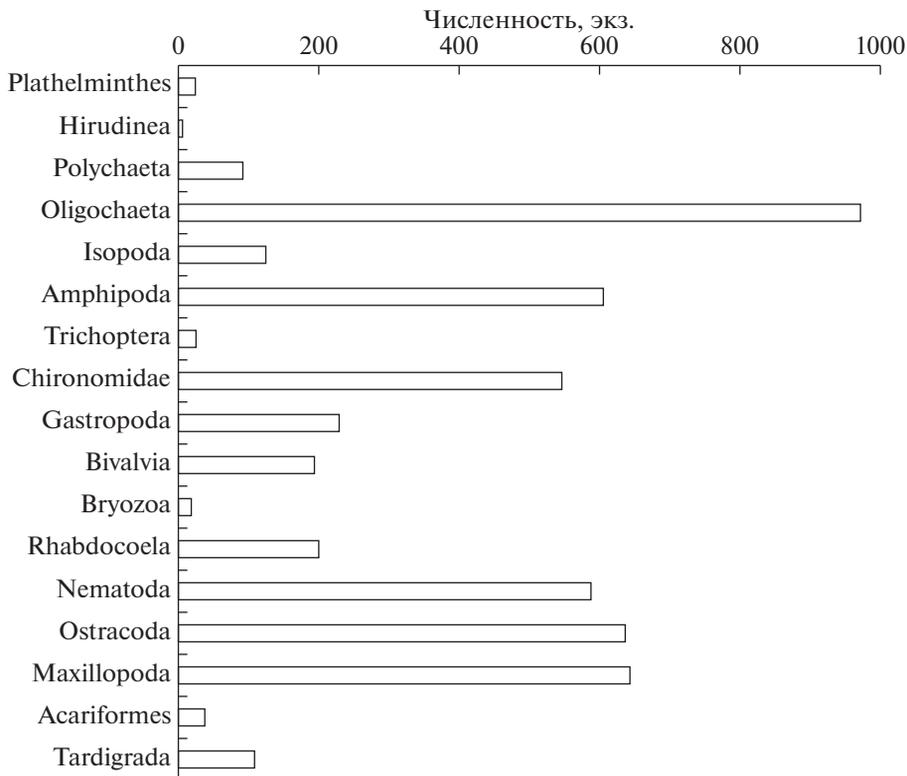


Рис. 1. Численность беспозвоночных животных в бентосных пробах из Лиственничного залива оз. Байкал до экстракции ДНК.

кладок и 62 кокона, а также фрагменты колоний губок. Всего в разобранных пробах (до экстракции ДНК) отмечены представители 17 высших таксонов (рис. 1).

В результате высокопроизводительного секвенирования для каждого образца было получено не менее 75 тыс. парных чтений. Биоинформатический анализ данных позволил выявить 251 ОТЕ на 3% уровне различий между кластерами последовательностей видового ранга. Перед оценкой таксономического разнообразия из полученного массива были удалены: 10 ОТЕ, не соответствующих длине прочтения; 5 ОТЕ, имеющих стоп-кодона; 49 ОТЕ, не идентифицируемых BLAST из-за неопределенности таксономического статуса. Нижняя граница гомологии ОТЕ высших таксонов с референсными последовательностями GenBank была принята на уровне 80% и выше.

Среди идентифицированных таксонов Arthropoda составляют 52% от общего количества ОТЕ, Annelida — 30%, Mollusca — 10%, Plathelminthes — 4%, Nematoda — 2%, представители других типов: губки, колючеголовые черви, рыбы и растительные организмы — <1% (рис. 2,а). Tardigrada и Bryozoa, найденные в бентосных пробах (рис. 1), в прочтениях короткого фрагмента COI геномной ДНК беспозвоночных не отмечены.

Наблюдается прямая зависимость между численностью представителей высших таксонов в бентосных пробах (до экстракции ДНК) и количеством прочтений, коэффициент корреляции Спирмена составляет 0.49 ($p < 0.05$).

До видового и родового уровней (при гомологии ≥ 97 и $\geq 95\%$ соответственно) идентифицированы 68 ОТЕ (табл. 1), на их долю приходится 55% общего количества (189497) прочтений фрагмента COI (табл. 2). Причем зарегистрированные по морфологии в бентосных пробах и детектированные по COI олигохеты рода *Nais* (Oligochaeta/Naididae), водяные ослики *Baicalasellus* (Isopoda), *Cytherissa* (Ostracoda), водяные клещи (Arachnida) не были включены в табл. 1, так как гомология с референсными последовательностями составляла от 80 до 95%.

Судя по коэффициенту Жаккара, состав фауны (по идентифицированным ОТЕ) на валунах и неокатанных обломках пород с щебнем в зоне глубин 2–5 м сходен и значительно отличается от такового на заиленных песках (рис. 3). Это соответствует общим закономерностям пространственного распределения гидробионтов в прибрежной зоне оз. Байкал.

Видовое β -разнообразие беспозвоночных животных в Лиственничном заливе по показателю Шеннона составляет 3.2 бит.

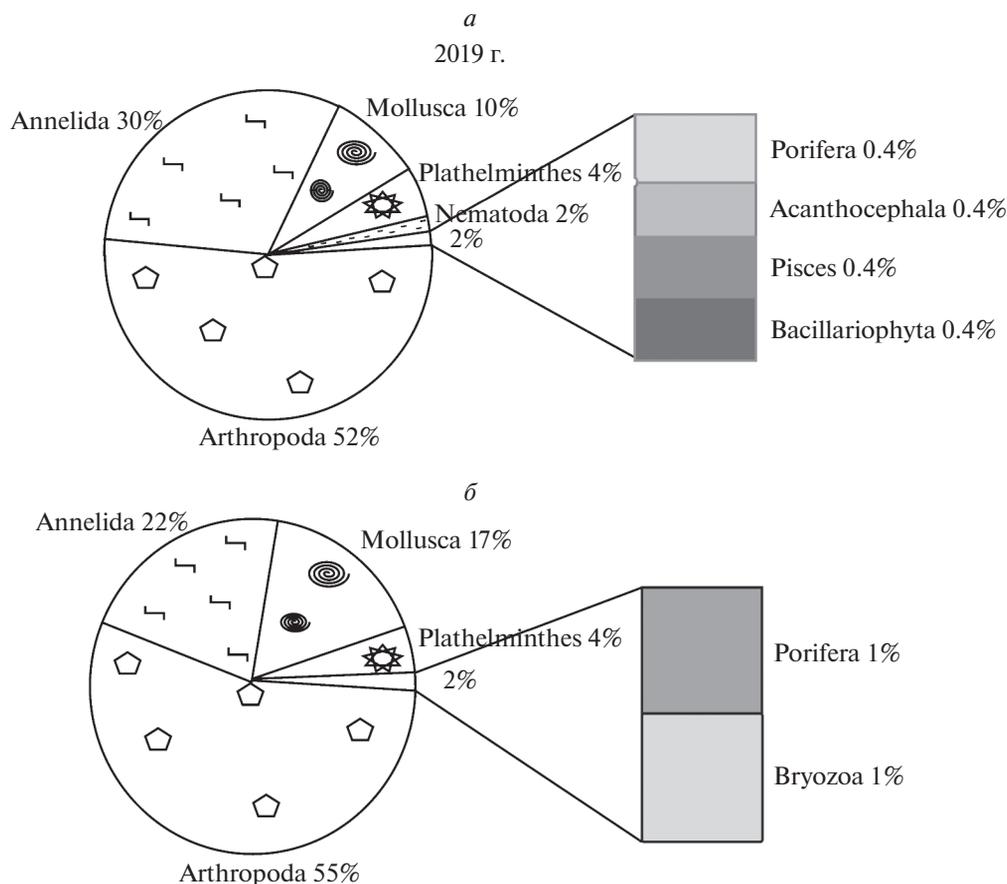


Рис. 2. Процентное соотношение надвидовых таксонов гидробионтов в Ливенничном заливе оз. Байкал. *a* – доля (%) таксонов в общем разнообразии, установленном в 2019 г. с использованием ДНК-метабаркодинга; *b* – доля (%) таксонов в общем разнообразии, установленном ранее классическими морфологическими методами [4].

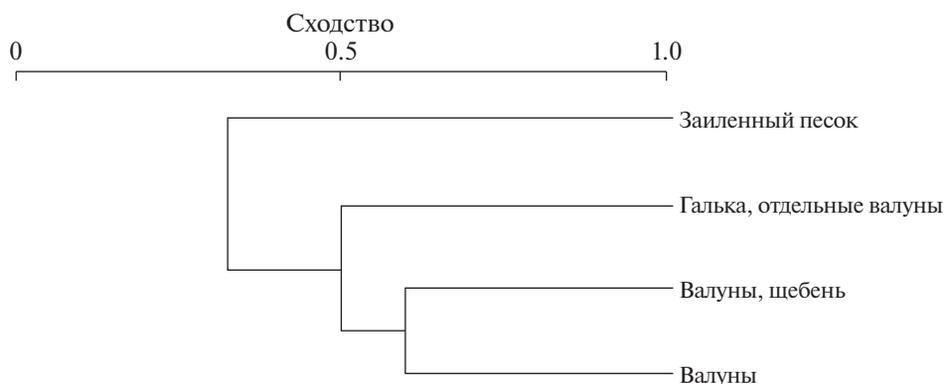


Рис. 3. Фаунистическое сходство донного населения разных биотопов Ливенничного залива оз. Байкал в летний период (2019 г.). Кластерный анализ (на основе идентифицированных ОТЕ) проведен методом UPGMA с использованием коэффициента Жаккара в качестве меры расстояния.

ОБСУЖДЕНИЕ

Митохондриальный ген *COI* в начале 2000 гг. был принят за стандарт таксономического баркода большинства групп животных организмов [23]. Несмотря на универсальность праймеров

(LCO1490 и HCO2198) фолмеровского фрагмента митохондриального гена *COI* [24] при реконструкции филогении возникали проблемы с таксономическим статусом некоторых видов беспозвоночных животных, в частности хирономид

Таблица 1. Состав ОТЕ видового уровня, имеющих сходство с референсными последовательностями GenBank

Таксон	Вид	№ референсной последовательности из GenBank	Сходство с референсной последовательностью из GenBank, %
Porifera	<i>Baikalospongia intermedia</i> Dyb.	KF835270	99.7
Acanthocephala	<i>Echinorhynchus cinctulus</i> Porta	KP261014	98.6
Polychaeta/Fabriciidae	<i>Manayunkia baicalensis</i> (Nusb.)	KF289881	99.6
	<i>Manayunkia godlewskii</i> (Nusb.)	KF289841	100
	<i>Manayunkia</i> sp.	MK393734	95.9
	<i>Manayunkia zenkewitschii</i> Sit., Shcherb. et Kharch.	KF289867	98.8
Oligochaeta	<i>Lamprodrilus</i> sp.	GU328642	95
	<i>Lamprodrilus nigrescens</i> Mich.	GU328643	91.6
	<i>Rhynchelmis alyonae</i> Mart., Ferrag. et Kayg.	GU328669	98.3
	<i>Rhynchelmis</i> sp.	AJ577632	95
	<i>Styloscolex chorioidalis</i> Isoss.	AJ577636	96.2
	<i>Baikalodrilus</i> sp.	MK984619	95.6
	<i>Rhyacodriloides</i> sp.	FN796445	95
	<i>Teleuscolex baicalensis</i> Grube	AJ577630	99
Hirudinea/Piscicolidae	<i>Baicalobdella torquata</i> Grube	AY336018	99.3
Copepoda/Cyclopidae	<i>Diacyclops arenosus</i> (Mazep.)	KT075074	99.6
	<i>Diacyclops incolotaenia</i> (Mazep.)	KT075079	98.3
Amphipoda	<i>Eulimnogammarus vittatus</i> (Dyb.)	MK887750	99.7
	<i>Baikalogammarus pullus</i> (Dyb.)	FJ756303	99.7
	<i>Gmelinoides fasciatus</i> (Stebb.)	KF478573	99.7
	<i>Linevichella vortex</i> (Dyb.)	MN148355	99.7
	<i>Linevichella</i> sp.	MN148355	95.4
	<i>Micruropus wahl</i> (Dyb.)	AY926683	99.7
	<i>Pallaseopsis kessleri</i> (Dyb.)	GQ919207	100
	<i>Pallaseopsis</i> sp.	MG936047	95.7
	<i>Brandtia latissima lata</i> (Dyb.)	FJ756301	97.2
Diptera/Chironomidae	<i>Chironomus nipponensis</i> Tokun.	LC096177	99.3
	<i>Cricotopus bicinctus</i> (Meig.)	JN275346	99.7
	<i>Cricotopus</i> conf. <i>fuscus</i>	MN673037	99
	<i>Cricotopus rufiventris</i> (Meig.)	HQ941597	99.3
	<i>Cricotopus</i> sp.	JF870941	99.3
	<i>Micropsectra radialis</i> Goetgh.	MT048255	99.3
	<i>Microtendipes</i> sp.	LC329125	95
	<i>Orthocladius</i> conf. <i>ashei</i> Sapon.	HQ941639	98.6
	<i>Orthocladius</i> conf. <i>glabripennis</i> Goetgh.	LC462332	97.9
	<i>Orthocladius gregarius</i> Linev.	KC879234	100
	<i>Orthocladius nitidoscutellatus</i> Lundstr.	MT048224	98.6
	<i>Orthocladius</i> sp.	HM421332	95.5
	<i>Orthocladius</i> sp. 1	KC894910	100
	<i>Orthocladius</i> sp. 2	KT248920	100
	<i>Orthocladius</i> sp. 3	KC894908	99.3
	<i>Orthocladius</i> sp. 4	KC894911	99.3

Таблица 1. Окончание

Таксон	Вид	№ референсной последовательности из GenBank	Сходство с референсной последовательностью из GenBank, %
Diptera/Chironomidae	<i>Orthocladius</i> sp. 5	KC894907	100
	<i>Pagastia orientalis</i> (Tshern.)	KY640356	97.6
	<i>Paratanytarsus baicalensis</i> (Tshern.)	MT020734	99.3
	<i>Polypedilum albicorne</i> (Meig.)	MG949931	99.4
	<i>Prodiamesa olivacea</i> (Meig.)	KT248930	99
	<i>Sergentia baicalensis</i> Tshern.	AF116586	99.3
Trichoptera	<i>Baicalina bellicosa</i> Mart.	KR153132	99.7
	<i>Baicalina reducta</i> Mart.	KR153134	99.7
	<i>Baicalinella foliata</i> (Mart.)	KR153101	99.7
	<i>Baicaloides ovalis</i> (Mart.)	KR153105	99.7
	<i>Thamastes dipterus</i> Hag.	KR153094	99.7
Mollusca/Bivalvia	<i>Pisidium casertanum</i> (Poli)	KF483386	99.7
	<i>Pisidium henslowanum</i> (Shepp.)	MN913398	98.9
	<i>Pisidium</i> sp.	KF000182	99.4
Mollusca/Gastropoda	<i>Baicalancylus</i> sp.	KR822545	95
	<i>Pseudancylastrum sibiricum</i> (Gerstf.)	KR822557	100
	<i>Maackia herderiana</i> (Lindh.)	KY697388	99.7
	<i>Parabaikalia dubiosa</i> (Kozh.)	KT885121	99.7
	<i>Pseudobaikalia contabulata</i> (W. Dyb.)	Z92987	99.7
	<i>Teratobaikalia duthiersii</i> (W. Dyb)	KT885132	97.7
	<i>Benedictia baicalensis</i> (Gerstf.)	Z92983	99
	<i>Choanomphalus amauronius</i> Bourg.	Y14721	100
	<i>Choanomphalus aorus</i> Bourg.	Y14718	97.5
	<i>Choanomphalus maacki</i> Gerstf.	EF012168	99.7
<i>Choanomphalus</i> sp.	Y14722	95.8	
Pisces/Cottidae	<i>Batrachocottus baicalensis</i> (Dyb.)	LC125703	99.7

[25], моллюсков Gastropoda: Cypraeidae [26] и др. Для получения лучшего разрешения на дереве или филогенетического сигнала многие исследователи стали использовать разные, наиболее вариабельные участки гена *COI*. Например, для морских нематод в качестве ДНК-баркода использовали районы M1–M6 и I3–M11 [27]. В последнее время, с появлением NGS-технологии, для оценки разнообразия Metazoa стал популярен мини-баркод с внутренними праймеров (mlCOIintF в комбинации с jgHCO2198) фолмеровского фрагмента *COI* длиной 313 пн [11, 14, 16]. Проведенные нами в 2019 г. исследования также показали эффективность применения данных праймеров для беспозвоночных, населяющих Лиственничный залив (табл. 1, 2; рис. 2,а). Выявленное в заливе разнообразие фауны по показателю Шеннона (3.2 бит) сравнимо с таковым в других районах оз. Байкал (в бухте Большие Коты, у восточного побережья в районе р. Утулик–р. Хара-Мурина), установленным с

помощью классического морфологического анализа [28, 29].

В составе донного населения Лиственничного залива преобладают, как и ранее [4], представители Arthropoda, Annelida, Mollusca, Plathelminthes (рис. 2,а, б). Наиболее разнообразен состав ОТЕ членистоногих, особенно хирономид (табл. 1), несмотря на то что среди них были многочисленны личинки младших возрастов, не поддающиеся видовой диагностике по морфологии. Размеры их составляли до 2 мм, а численность более 300 экз. Тем не менее по мини-баркоду фрагментов *COI* выявлены 22 ОТЕ видового уровня, при гомологии прочитанных последовательностей с представленными в GenBank от 97 до 100%. Аналогичная картина наблюдается у личинок ручейников, среди которых по ДНК-метабаркодингу идентифицированы пять видов с гомологией 99.7% с последовательностями из GenBank. Это свидетельствует о преимуществе ДНК-метабаркодинга по сравнению с классической таксономией. Боль-

Таблица 2. Количество прочтений фрагмента гена *COI* мтДНК для ОТЕ надвидовых таксонов гидробионтов, собранных в заливе Лиственничный (оз. Байкал, 2019 г.)

Таксон	Глубина, м			
	0.3–0.5		2–5	
	Донные отложения			
	галька, отдельные валуны	валуны	неокатанные обломки пород, щебень	заиленный песок
Porifera/Lubomirskiidae	0	104	2	0
Plathelminthes/Tricladida	0	26	101	0
Plathelminthes/Rhabdozoa	0	4	23	119
Acanthocephala	3	0	0	611
Nematoda	0	0	36	88
Annelida	12	2016	1185	83
Annelida/Polychaeta/Fabriciidae	14	4308	1968	943
Annelida/Clitellata/Hirudinea	0	37	0	0
Annelida/Clitellata/Oligochaeta	12673	19517	10966	17958
Arthropoda	26	18	21	255
Arthropoda/Copepoda	1	292	0	0
Arthropoda/Cyclopidae	47	659	0	3
Arthropoda/Ostracoda	164	274	0	1858
Arthropoda/Isopoda	3	384	10	0
Arthropoda/Amphipoda	837	8166	6335	720
Arthropoda/Arachnida/Acariformes	90	6	0	323
Arthropoda/Insecta	38	149	292	2057
Arthropoda/Trichoptera/Apataniidae	27	2131	1	0
Arthropoda/Diptera/Chironomidae	26795	5170	8941	1860
Mollusca/Gastropoda	59	26244	13122	28
Mollusca/Bivalvia	29	795	7709	725
Chordata/Cottidae	0	24	0	0
Bacillariophyta	0	9	3	0

шинство видов амфипод, олигохет, полихет и других беспозвоночных, приведенных в списке (табл. 1), встречались в Лиственничном заливе в предыдущие годы исследований [4]. Таким образом, ДНК-метабаркодинг с внутренних праймеров *COI* (mlCOIintF, jgHCO2198) позволяет оценить видовое разнообразие гидробионтов как половозрелых, так и ювенильных стадий, идентификация которых морфологическими методами часто не представляется возможной. Особенно это касается личинок амфибиотических насекомых, а также кладок беспозвоночных животных. О чувствительности метода ДНК-метабаркодинга свидетельствует наличие в массиве данных не только последовательностей рыб *Batrachocottus baicalensis* (Дуб.), типичного обитателя литорали Байкала [4], но и заражающих их червей *Echinorhynchus*

cinctulus Porta, часто встречающихся в пищеварительном тракте большоголовой широколобкой. Непосредственно рыбы *B. baicalensis* не были обнаружены, но присутствие их в смеси геномной ДНК беспозвоночных обусловлено попаданием в пробы отдельных икринок вместе с коконами.

Несмотря на перечисленные выше преимущества ДНК-метабаркодинга, для *Tardigrada* из Лиственничного залива (рис. 1) ОТЕ не идентифицированы. Вероятно, для них приемлем другой маркер (18S), поскольку они также не были детектированы по *COI* при исследовании мейофауны фьордов западного побережья Швеции на основе NGS [30]. Что касается Врузоа, в работе [30] показано, что они могут быть детектированы по короткому фрагменту *COI*, однако мы не получили ни одного прочтения. Для выяснения этого

обстоятельства необходимы дополнительные исследования, поскольку для большинства байкальских мейобеспозвоночных референсные последовательности *COI* отсутствуют в GenBank. К тому же Вгуоза, возможно, не были идентифицированы нами из-за плохой экстракции ДНК, так как в пробах встречались лишь остатки колоний (18 экз.) в виде хитиновых шипов, окружающего ротовое отверстие мшанок.

В целом ДНК-метабаркодинг по короткому фрагменту *COI* позволяет оценить локальное разнообразие фауны Лиственничного залива, отмечены представители 42 родов, 31 семейства, 9 типов. Разнообразие донного населения в 2019 г. сопоставимо с таковым в прошлом столетии [4]. Результаты проведенных исследований указывают на необходимость создания базы данных референсных последовательностей *COI* байкальских гидробионтов. Полученные последовательности могут быть использованы для совершенствования системы мониторинга оз. Байкал, для исследования связей таксономического состава и обилия гидробионтов с трендами природно-климатических факторов.

Работа выполнена по проекту Российского фонда фундаментальных исследований № 19-05-00398_а; частично сбор материала проведен в рамках проекта № 0345–2019–0004 (АААА-А16-116122110060-9) по теме: “Комплексное исследование эволюционных процессов у бентосных организмов в условиях резких изменений экосистемы Байкала”; секвенирование образцов проведено в ЦКП “Геномика” СО РАН (ИХБФМ СО 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. Hampton S.E., Mc Gowan S., Ozersky T. et al. Recent ecological change in ancient lakes // *Limnology and Oceanography*. 2018. V. 63. № 5. P. 2277–2304.
2. Hsieh C.H., Sakai Y., Ban S. et al. Eutrophication and warming effects on long-term variation of zooplankton in Lake Biwa // *Biogeosciences*. 2011. V. 8. № 5. P. 1383–1399.
3. Cohen A.S., Gergurich E.L., Kraemer B.M. et al. Climate warming reduces fish production and benthic habitat in Lake Tanganyika, one of the most biodiverse freshwater ecosystems // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2016. V. 113. № 34. P. 9563–9568.
4. Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна: В 2 томах. Т. 1. Озеро Байкал. Новосибирск: Наука, 2004. 1679 с.
5. Шимараев М.Н., Куимова Л.Н., Синюкович В.Н., Цехановский В.В. О проявлениях на Байкале глобальных изменений климата в XX столетии // *ДАН*. 2002. № 3. С. 397–400.
6. Hajibabaei M., Shokralla S., Zhou X. et al. Environmental barcoding: a next-generation sequencing approach for biomonitoring applications using river benthos // *PLoS One*. 2011. V. 6. P. e17497.
7. Janzen D.H., Hajibabaei M., Burns J.M. et al. Wedding biodiversity inventory of a large and complex Lepidoptera fauna with DNA barcoding // *Philosoph. Transactions Royal Soc. London. Series B. Biol. Sci.* 2005. V. 360. P. 1835–1845.
8. Porazinska D.L., Giblin-Davis R.M., Faller L. et al. Evaluating high-throughput sequencing as a method for metagenomic analysis of nematode diversity // *Mol. Ecol. Resources*. 2009. V. 9. P. 1439–1450.
9. Aylagas E., Borja Á., Rodríguez-Ezpeleta N. Environmental status assessment using DNA metabarcoding: Towards a genetics based marine biotic index (gAMBI) // *PLoS One*. 2014. V. 9. P. e90529.
10. Elbrecht V., Vamos E.E., Meissner K. et al. Assessing strengths and weaknesses of DNA metabarcoding-based macroinvertebrate identification for routine stream monitoring // *Methods Ecol. Evol.* 2017. № 8. P. 1265–1275.
11. Kuntke F., de Jonge N., Hesselsoe M., Nielsen J.L. Stream water quality assessment by metabarcoding of invertebrates // *Ecol. Indicators*. 2020. V. 111. e 105982.
12. Hajibabaei M., Singer G.A., Clare E.L., Hebert P.D.N. Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring // *BMC Biology*. 2007. V. 5. P. 24.
13. Meusnier I., Singer G.A., Landry J.F. et al. A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis // *BMC Genomics*. 2008. V. 9. P. 214.
14. Leray M., Yang J.Y., Meyer C.P. et al. A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents // *Frontiers in Zoology*. 2013. V. 10. P. 34.
15. Doyle J.J., Dickson E. Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis // *Taxon*. 1987. V. 36. P. 715–722.
16. Geller J.B., Meyer C.P., Parker M. et al. Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys // *Mol. Ecol. Resources*. 2013. V. 13. № 5. P. 851–861.
17. Edgar R.C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads // *Nature Methods*. 2013. V. 10. P. 996–998.
18. Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // *Bioinformatics*. 2010. V. 26. № 19. P. 2460–2461.
19. Edgar R.C. UNOISE2: Improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon reads // *bioRxiv*. 2016. <https://doi.org/10.1101/081257>
20. Edgar R.C. SINTAX, a Simple Non-Bayesian Taxonomy Classifier for 16S and ITS Sequences // *bioRxiv*. 2016. <https://doi.org/10.1101/074161>
21. Machida R.J., Leray M., Ho S.-L., Knowlton N. Metazoan mitochondrial gene sequence reference datasets for taxonomic assignment of environmental samples // *Scientific Data*. 2017. V. 4. P. 170027.

22. Hsieh T.C., Ma K.H., Chao A. iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers) // *Methods Ecol. Evol.* 2016. V. 7. P. 1451–1456.
23. Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., De Waard J.R. Biological identifications through DNA barcodes // *Proc. Royal Soc. London. Series B.* 2003. V. 270. P. 313–321.
24. Folmer O., Black M.B., Hoeh W.R. et al. DNA primer for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // *Mol. Marine Biol. Biotechnol.* 1994. V. 3. P. 294–299.
25. Ekrem T., Stur E., Hebert P.D.N. Females do count: Documenting Chironomidae (Diptera) species diversity using DNA barcoding // *Organisms Diversity and Evolution.* 2010. № 10. P. 397–408.
26. Meyer C.P. Molecular systematics of cowries (Gastropoda: Cypraeidae) and diversification patterns in the tropics // *Biol. J. Linnean Society.* 2003. V. 79. P. 401–459.
27. Derycke S., Vanaverbeke J., Rigaux A. et al. Exploring the use of cytochrome oxidase c subunit 1 (COI) for DNA barcoding of free living marine nematodes // *PLoS One.* 2010. V. 5. P. e13716.
28. Кравицова Л.С., Потемкина Т.Г., Механикова И.В. и др. Пространственное распределение бентосных сообществ беспозвоночных животных в южной котловине озера Байкал // *Зоол. беспозвоночных.* 2006. Т. 3. Вып. 1. С. 65–76.
29. Kravtsova L.S., Kamaltynov R.M., Karabanov E.B. et al. Macrozoobenthic communities of underwater landscapes in the shallow-water zone of southern Lake Baikal // *Hydrobiologia.* 2004. V. 522. P. 193–205.
30. Haenel Q., Holovachov O., Jondelius U. et al. NGS-based biodiversity and community structure analysis of meiofaunal eukaryotes in shell sand from Hällö Island, Smögen, and soft mud from Gullmarn Fjord, Sweden // *Biodiversity Data J.* 2017. V. 5. P. e12731.

The Study of the Hydrobionts Diversity from Listvennichny Bay of the Lake Baikal by DNA Metabarcoding

L. S. Kravtsova^{a,*}, T. E. Peretolchina^a, T. I. Triboy^a, I. A. Nebesnykh^a,
A. B. Kupchinskiy^b, A. E. Tupikin^c, and M. R. Kabilov^c

^a*Limnological Institute of the Siberian Branch of the Russian Academy of Science, Irkutsk, 664033 Russia*

^b*Baikal Museum of Irkutsk Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Science, Listvyanka, Irkutskaya oblast, 664520 Russia*

^c*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Science, Novosibirsk, 630090 Russia*

*e-mail: lk@lin.irk.ru

The taxonomic diversity of hydrobionts from Listvennichny Bay was studied by DNA metabarcoding. The sequencing of a gene fragment (313 bp) of mitochondrial DNA encoding the first subunit of cytochrome *c* oxidase (*COI*) was performed using an Illumina MiSeq after amplification from internal primers (mlCOIintF, jgHCO2198). Bioinformatic analysis of *COI* reads revealed 187 OTUs (operational taxonomic units), among which Arthropoda, Annelida, Mollusca, Plathelminthes prevail, accounting for 52, 30, 10, 4%, respectively. In general, the species diversity of the bay's fauna by the Shannon index (3.2 bits) is comparable to other areas of Lake Baikal. The most diverse composition of taxa (22 OTU) of the species rank falls on the larvae of chironomids, which confirms the effectiveness of the method for identifying juvenile stages of invertebrates. The research results are the first step towards improving the system of hydrobiological monitoring of Lake Baikal, based on the synthesis of molecular genetic diagnostics of invertebrates and classical morphological taxonomy.

Keywords: invertebrates, *COI*, DNA metabarcoding, high-throughput sequencing, Lake Baikal.

НЕНЕЙТРАЛЬНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЦИТОХРОМА *b* У БАЛОБАНА *Falco cherrug* Grey, 1834 И КРЕЧЕТА *Falco rusticolus* L.

© 2021 г. Д. Н. Рожкова^{1,2, *}, Л. С. Зиневич^{1,2}, И. В. Карякин¹,
А. Г. Сорокин², В. Г. Тамбовцева¹, А. М. Куликов¹

¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

²Всероссийский научно-исследовательский институт охраны окружающей среды, Москва, 117628 Россия

*e-mail: darroznature@gmail.com

Поступила в редакцию 30.05.2020 г.

После доработки 20.07.2020 г.

Принята к публикации 25.08.2020 г.

Изменчивость митохондриальной ДНК влияет на характеристики метаболизма клеток и свидетельствует об эволюционных процессах. Проанализированы последовательности митохондриального гена цитохрома *b* балобана и кречета. Найдены пять аминокислотных замен, для двух из которых показано изменение физико-химических свойств аминокислот. Сделаны предположения о филогенетической истории формирования и функциональном влиянии найденных вариантов аминокислотных замен.

Ключевые слова: цитохром *b*, аминокислотные замены, молекулярная эволюция, балобан, кречет.

DOI: 10.31857/S0016675821040123

Молекулярная эволюция, происходящая при видообразовании, оставляет регистрируемые следы неслучайного накопления изменчивости в локусах, связанных с изолирующими механизмами и адаптациями [1]. Некоторые адаптации затрагивают характеристики энергетического метаболизма, зависящего от изменчивости митохондриальной ДНК (мтДНК) [2–4]. Значимость вариативности мтДНК была неоднократно показана для различных представителей царства Животные Animalia [5–11]. Изменчивость митохондриальных генов и кодирующих последовательностей используется также в качестве надежных филогенетических маркеров [12–14]. В терминах молекулярной биологии был показан положительный и отрицательный отбор определенных сайтов последовательностей митохондриального генома для представителей отрядов лососеобразные Salmoniformes, хвостатые земноводные Caudata, грызуны Rodentia и парнокопытные Artiodactyla [15–18]. У летающих птиц процессы видообразования определяет также дополнительный фактор – способность к быстрым перемещениям внутри всего ареала обитания вида, что предполагает фенотипическую пластичность ключевых адаптаций, связанных с меняющимися в результате таких перемещений факторами внешней среды. Для некоторых видов птиц проведены исследования, посвященные анализу связи между наличием ненейтральных аминокислотных замен в белках митохондриальной электрон-транспортной

цепи и участием этих белков в адаптации к определенным климатическим условиям [2–4, 19, 20]. В результате в каждом конкретном случае выявлены предполагаемые молекулярные адаптации для некоторых белков комплекса дегидрогеназ, цитохромов, а также для гена *АТР6*. Сопоставление филогенетических данных и анализа ненейтральной изменчивости митохондриального генома позволяет делать предположения об этапах видообразования близкородственных и репродуктивно неизолированных видов, обитающих в различных экологических условиях.

К подобным видам относятся объекты нашего исследования – балобан и кречет – дневные хищные птицы из группы видов *Hierofalco* семейства Falconidae. Балобан обитает в Палеарктике, населяя аридные зоны от Восточной Европы до Дальнего Востока [21, 22]. На этом обширном географическом ареале у балобана выделяют, по данным исследования Д-петли, две митохондриальные гаплогруппы – западную и единую с кречетом восточную [23]. При этом кречет распространен циркумполярно и обитает в зоне тундр и лесотундр [24]. Таким образом, балобан и кречет обитают в разных климатических условиях, которые предположительно, как описано выше, могут быть взаимосвязаны с отбором изменений в митохондриальных белках. Согласно данным Красного листа Международного союза охраны природы балобан имеет “угрожаемый” (Endangered),

Таблица 1. Набор специфических праймеров для получения полной последовательности цитохрома *b* балобана и кречета

Название праймера	Последовательность прямого 5'–3' и обратного 3'–5' праймеров
FCB1f/FCB3r	ATCAATCCTAАСТАТCCTACTC/CAGATGAAGAATAAGGATGC
FCB3f/FCB1r	GACTAATCCGCAACCTACATG/GGAAGGTGAGGTGGATTAGGG
FCB2f/FCB4r	ACTGACCCGATTCTTCGCCC/GTGAAGTAGAGGGCTTAG
FCB4f/FCB2r	CCGCCTCAGTGCTAATCC/GGGTGTGTGGTTGGTGGG

а кречет “близкий к уязвимому” (Near threatened) статус [25]. Эти виды также включены соответственно во II и I Приложения Конвенции о международной торговле видами дикой фауны и флоры, находящимися под угрозой исчезновения [26]. На территории России эти сокола занесены в Красную книгу [27] и им присвоен статус особо ценных видов животных в соответствии с Постановлением Правительства № 978 от 31.10.2013 г. [28]. Охрана балобана и кречета в дикой природе является актуальной задачей, требующей понимания их эволюционной истории и влияния на нее антропогенного воздействия [29]. Проведенное нами исследование основано на изучении полной последовательности гена цитохрома *b* (*cyt b*), кодирующего ключевой мембранный белок комплекса цитохромов *bc1*, обеспечивающего перенос электронов и формирование протонного градиента на мембране митохондрий в процессе окислительного фосфорилирования [30, 31]. Ранее полная последовательность *cyt b* использовалась для расчетов филогенетических отношений видов группы *Hierofalco* без изучения эволюционной значимости олигонуклеотидных замен и соответствующих им физико-химических свойств аминокислот [32]. Нами получены данные о характере аминокислотных замен в гене *cyt b* у балобана и кречета, а также сделаны предположения об эволюционной истории этих видов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Генетический анализ был проведен на основе 16 полученных и четырех референсных полных последовательностей гена *cyt b*. Сбор образцов проведен на базе ФГБУ “ВНИИ Экология” и в рамках реализации проекта по восстановлению генетического разнообразия балобана в Алтае-Саянском регионе [33]. Дополнительные образцы получены из Коллекции линных перьев редких и особо ценных видов хищных птиц Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, большая часть которой собрана в рамках проектов Российской сети изучения и охраны пернатых хищников. В качестве материала использованы различные ткани от неродственных особей из изолированных популяций. Оригинальные данные получены от двух образцов заспиртованных мышечных тканей кре-

четов из Чукотско-Камчатской популяции, шести образцов мезенхимной пульпы линного пера от балобанов Крымского полуострова, восьми образцов заспиртованного растущего пера с дермальной пульпой и кровью от балобанов Алтае-Саянского региона, включая четырех выращенных в неволе птенцов от самок, изъятых из природы в данной местности. Для сравнения использованы последовательности из базы данных NCBI [34] цитохрома *b* балобана и кречета, а также пустельги обыкновенной *Falco tinnunculus* и сапсана *Falco peregrinus* в качестве внешних видов, под номерами KP337902.1, NC_029359.1, EU196361.1, JX029991.1 соответственно. Пробоподготовка заспиртованных образцов включала в себя их просушку и измельчение, а для линного пера проводилась по описанному ранее методу [35]. Выделение ДНК осуществлялось набором ДНК–Экстран-2 (Синтол, Россия) на основе протеиназы К согласно протоколу производителя. Для дальнейшего генотипирования образцов с помощью программ Primer-BLAST (NCBI, США) и PrimerSelect (DNASTAR, США) был разработан набор специфических перекрывающихся праймеров на полную последовательность гена *cyt b* (табл. 1). Амплификация и секвенирование по Сэнгеру проведены с использованием коммерческих наборов реактивов ScreenMix-HS (Евроген, Россия) и BigDye 3.1 (Applied Biosystems, США) соответственно и оборудования Центра коллективного пользования Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН: амплификатора Veriti Fast (Applied Biosystems, США) и секвенатора ABI 3500 (Applied Biosystems). Обработка результатов секвенирования проведена с помощью компонента SeqMan программного пакета Lasergene (DNASTAR).

Сравнение полученных последовательностей с известными митохондриальными вставками ядерного генома (NUMT) балобана [36] осуществлено с помощью программы BLAST (NCBI). Проверенные последовательности длиной 1143 пн загружены в базу данных GenBank (NCBI) под номерами MT431193–MT431208. Соотношение частот несинимичных замен нуклеотидов к синонимичным (dN/dS) рассчитано Z-тестом в программном пакете MEGA X, использованном также для определения соответствующих аминокислотных последовательностей [37]. Построение филогенетического дерева

для расчетов изменения свойств белка в процессе эволюции также осуществлено с помощью алгоритмов MEGA X [38, 39]. Для построения и анализа объемных трехмерных (3D) моделей белка цитохрома *b* исследуемых особей балобана и кречета использованы данные о структуре комплекса цитохромов *bc1* домашней курицы *Gallus gallus* [40]. Моделирование на основе гомологии белков осуществлено на сервере SWISS-MODEL [41–46]. Дополнительная визуализация проведена с помощью программы iCn3D на основе WebGL для интерактивного просмотра трехмерных макромолекулярных структур и химических веществ [47]. Несмотря на известную структуру и функцию белка, были проведены дополнительные расчеты взаимодействия цитохрома с другими белками электрон-транспортной цепи митохондрий методом иерархического прогнозирования I-TASSER (Iterative Threading ASSEMBLY Refinement) [48–50]. Предсказание функционального значения аминокислотных замен осуществлено с помощью сетевого программного инструмента PROVEAN (Protein variation effect analyzer), предсказывающего влияние изменения последовательности гена на функцию белка [51–53]. Расчеты селективного влияния на структурные и биохимические свойства аминокислот в процессе филогенеза на основе качественных и категориальных статистических тестов проведены в программе TreeSAAP (Selection of amino acid properties based on phylogenetic trees) [54]. Алгоритм данной программы опирается на топологию филогенетического дерева, построенного на основе изучаемых последовательностей гена. В процессе расчетов происходит сопоставление наблюдаемого распределения изменений 31 физико-химического свойства аминокислот с распределением, ожидаемым в условиях селективной нейтральности и предполагаемого случайного характера аминокислотных замен. Нахождение свойств заменяемых аминокислотных остатков под рассматриваемым на молекулярном уровне положительным отбором оценивается по положительным значениям *Z*-теста. При этом полученные значения распределяются на восемь категорий значимости, отражающих направление положительного отбора биохимических свойств белка. Первые три категории отражают влияние положительного стабилизирующего отбора, т.е. направленного на поддержание оптимальной активности белка, в то время как в категориях с шестой по восьмую отражен положительный дестабилизирующий отбор, поддерживающий радикальные смещения в структурных и функциональных характеристиках белка. Достоверная оценка имеет величину выше или равную +3.09 и вероятность $p < 0.001$ [15, 54].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Нами были получены 16 полных последовательностей гена *cyt b* балобанов и кречетов из четырех регионов от образцов, хранящихся на базе Коллекции линных перьев редких и особо ценных видов хищных птиц Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (табл. 2). Установлено, что полученные последовательности не являются NUMT. Стандартный метод расчета соотношения частот dN/dS не показал наличия положительного отбора среди 16 исследуемых последовательностей гена *cyt b*, т.е. число синонимичных нуклеотидных замен больше, чем несинонимичных [55]. Выравнивание и сравнение оригинальных аминокислотных последовательностей балобана и кречета друг с другом, а также с референсными последовательностями сапсана, кречета и балобана (JX029991.1, NC_029359.1, KP337902.1 соответственно) показало несколько замен аминокислот (табл. 3). Наиболее распространенная замена неполярной (гидрофобной) аминокислоты Ala на полярную (гидрофильную) Thr отмечена у всех балобанов из Крыма и двух из Алтае-Саянского региона в позиции 191 (571–573 пн). У образца FC16 из Алтае-Саянского региона обнаружена единичная замена неполярной аминокислоты Ile на полярную Thr в позиции 230 (687–690 пн). В последовательности *cyt b* образца FC09 из Крыма произошла замена неполярной аминокислоты Ala на Gly в позиции 294 (880–882 пн). Для образца FC38 из Крыма показаны замены полярных аминокислот Ser на Asn в позиции 305 (913–915 пн) и Thr на неполярную Ala в позиции 331 (991–993 пн).

Для описания степени вариабельности изучаемых аминокислотных последовательностей проведено их выравнивание с последовательностями цитохрома *b* 17 представителей разных родов семейства Falconidae, доступными в базе данных NCBI: EU233073.1 (*Falco jugger*), EU233120.1 (*Falco subniger*), U83309.1 (*Daptrius ater*), KP064202.1: 13708–14850 (*Phalcoboenus australis*), EU233141.1 (*Milvago chimango*), U83314.1 (*Micrastur semitorquatus*), U83319.1 (*Herpetotheres cachinnans*), U83312.1 (*Spizopteryx circumcinctu*), U83317.1 (*Polihierax semitorquatus*), U83318.1 (*Microhierax erythrogenys*), EU233075.1 (*Falco longipennis*), EU233119.1 (*Falco subbuteo*), NC_025579.1: 13705–14847 (*Falco columbarius*), EU233053.1 (*Falco concolor*), NC_039842.1: 13710–14852 (*Falco amurensis*), U83311.1 (*Falco vespertinus*), NC_029846.1: 13578–14720 (*Falco naumanni*). Для представленного списка видов установлено, что сайты аминокислотных замен 191 и 294 показаны только для балобана и кречета, в то время как аминокислотные остатки 230, 305 и 331 имеют различные варианты у многих видов.

Трехмерные модели *cyt b* и расчет функциональной значимости аминокислотных замен построены на основе последовательности гена белка

Таблица 2. Данные об исследованных образцах

Обозначение образца	Материал	Регион/год	Координаты сбора*	Сборщик	Номер в GenBank
FR5/FR5CH	КП	Чукотский автономный округ, 2019	63.06 N 179.33 E	Сарычев Е. И.	MT431197
FR6/FR6KM	ЗМТ	Камчатский край, 2019	Нет данных	Сорокин А. Г.	MT431198
FC6/A25-RUAF1814-D314	ЗРП	Республика Тыва, 2018	51.75 N 94.75 E	Карякин И. В.	MT431206
FC16/MMAL10-RUAF1845-D319	ЗРП	Республика Тыва, 2018	51.25 N 94.75 E	Карякин И. В.	MT431200
FC21/BH-RT504-1-D023	ЗРП	Республика Тыва, 2018	51.25 N 94.75 E	Карякин И. В.	MT431204
FC23/FC-RT01-RUVS1079-D038	ЗРП	Республика Тыва, 2018	51.55 N 94.65 E	Карякин И. В.	MT431202
FC43/FC-RT11-1-D024	ЗРП	Республика Тыва, 2018	50.25 N 94.75 E	Карякин И. В.	MT431205
FC47/FC-RT11-1-RUVS1055-D033	ЗРП	Республика Тыва, 2018	50.25 N 94.75 E	Карякин И. В.	MT431203
FC53/FC-RT229-2-D019	ЗРП	Республика Тыва, 2018	51.25 N 94.25 E	Карякин И. В.	MT431201
FC172/FC-RT277-1-D172	ЗРП	Республика Тыва, 2018	50.25 N 94.75 E	Карякин И. В.	MT431199
FC09/FCCR0907	ЛП	Крымский полуостров, 2019	44.95 N 34.05 E	Прокопенко С. П.	MT431208
FC10/FCCR1007	ЛП	Крымский полуостров, 2019	45.05 N 34.31 E	Прокопенко С. П.	MT431207
FC/FC-RKR48	ЛП	Крымский полуостров, 2015	45.25 N 34.75 E	Карякин И. В.	MT431193
FC23/FC-RKR23-1	ЛП	Крымский полуостров, 2015	45.75 N 33.25 E	Карякин И. В.	MT431195
FC25/FC-RKR25-1	ЛП	Крымский полуостров, 2015	45.75 N 32.75 E	Карякин И. В.	MT431194
FC38/FC-RKR38-1	ЛП	Крымский полуостров, 2015	45.25 N 33.25 E	Карякин И. В.	MT431196

Примечание. КП – контурное перо, ЗМТ – заспиртованная мышечная ткань, ЗРП – заспиртованное растущее перо с кровью, ЛП – линное перо.

* Даны неточные координаты расположения мест сбора с целью охраны птиц.

балобана под номером KP337902.1. Использование алгоритмов SWISS-MODEL и последующая визуализация в программе iCn3D (рис. 1) позволили установить положение 191, 230, 294, 305 и 331 сайтов аминокислотных остатков в *H*-спиралях белка 11, 13, 16, 17 и 18 соответственно. Согласно результатам расчета методами I-TASSER установлено, что активный центр белка, комплементарно связывающийся с железосодержащим лигандом heme *b* (протогем IX), сформирован более чем двадцатью, от 42 до 187, специфичными сайтами посадки. В то же время взаимодействие *сут b* с убихиноном (кофермент Q) осуществляется через 13 аминокислотных остатков, от 18 до 229. Исследуемые сайты

замен, 191 и 230, находятся вблизи от ключевых участков белка *сут b*, взаимодействующих с коферментом Q и протогемом IX. Предположительно они способны влиять на формирование функциональных связей указанных структурных элементов электрон-транспортной цепи с *сут b*. Влияние найденных аминокислотных замен на функцию белка оценено с помощью инструмента PROVEAN, который использует для прогнозирования порог оценки равный –2.5. Если указанная замена аминокислоты получает балл ниже или равный пороговому значению, она рассматривается как вредная, а при баллах выше пороговых как нейтральная. Согласно этой концепции для сайтов 230 и 294 пред-

Таблица 3. Распределение и варианты аминокислот в последовательности цитохрома *b* изучаемых образцов по сравнению с референсными последовательностями сапсана, кречета и балобана

Вариант сравниваемых последовательностей белков <i>сyt b</i>	Позиции несовпадающих аминокислот <i>сyt b</i> и соответствующие им варианты кодонов				
	191: GCA/ACA	230: ATC/ACC	294: GCA/GGA	305: AGC/AAC	331: ACT/GCT
<u>JX029991.1</u>	<u>Ala</u>	<u>Ile</u>	<u>Ala</u>	<u>Ser</u>	<u>Ala</u>
<u>NC_029359.1</u>	<u>Ala</u>	<u>Ile</u>	<u>Ala</u>	<u>Ser</u>	<u>Thr</u>
<u>KP337902.1</u>	<u>Thr</u>	<u>Ile</u>	<u>Ala</u>	<u>Ser</u>	<u>Thr</u>
FR5 Чукотка	Ala	Ile	Ala	Ser	Thr
FR6 Камчатка	Ala	Ile	Ala	Ser	Thr
FC6 АСР	Thr	Ile	Ala	Ser	Thr
FC16 АСР	Ala	Thr	Ala	Ser	Thr
FC21 АСР	Ala	Ile	Ala	Ser	Thr
FC23 АСР	Ala	Ile	Ala	Ser	Thr
FC43 АСР	Thr	Ile	Ala	Ser	Thr
FC47 АСР	Ala	Ile	Ala	Ser	Thr
FC53 АСР	Ala	Ile	Ala	Ser	Thr
FC172 АСР	Ala	Ile	Ala	Ser	Thr
FC09 Крым	Thr	Ile	Gly	Ser	Thr
FC10 Крым	Thr	Ile	Ala	Ser	Thr
FC Крым	Thr	Ile	Ala	Ser	Thr
FC23 Крым	Thr	Ile	Ala	Ser	Thr
FC25 Крым	Thr	Ile	Ala	Ser	Thr
FC38 Крым	Thr	Ile	Ala	Asn	Ala

Примечание. Варианты последовательностей белков *сyt b* птиц: 1) JX029991.1, NC_029359.1, KP337902.1 – референсные последовательности *F. peregrinus*, *F. rusticolus*, *F. cherrug* (выделены нижним подчеркиванием); 2) FR5, 6 – *F. rusticolus* № 5 и 6 из Чукотско-Камчатской популяции; 3) FC6–172 – *F. cherrug* из Алтае-Саянского региона (АСР); 4) FC09–38 – *F. cherrug* из Крыма. Отличия аминокислотных позиций оригинальных последовательностей от большинства референсных выделены полужирным шрифтом.

сказано вредное, а для остальных рассматриваемых замен нейтральное воздействие на функцию цитохрома *b* балобана. При прогнозировании сайты аминокислотных замен 191 и 331 (рис. 1) получили соответственно 1.506 и 1.851 баллов относительно порогового значения. Для выявления степени адаптационной значимости исследуемых нуклеотидных замен в гене *сyt b* проанализированы изменения физико-химических свойств соответствующих аминокислот в ходе эволюции с помощью алгоритмов TreeSAAP. В основе дальнейшего анализа находится филогенетическое дерево из 20 исследуемых последовательностей *сyt b*, построенное в программе MEGA X (рис. 2). Отражены филогенетические связи гаплотипов гена *сyt b* балобанов и кречетов. Среди 16 особей исследуемых видов найдено семь гаплотипов *сyt b*, совокупно имеющих три ненейтральные аминокислотные замены, находящиеся под действием положительного отбора согласно программе TreeSAAP. Примечательно, что замена 191 аминокислоты наблюдается у всех птиц с Крымского полуостро-

ва, при этом у образца FC38 обнаружены еще две аминокислотные замены. У кречетов данные замены отсутствуют. У балобанов Алтае-Саянского региона обнаружены гаплотипы, входящие в гаплогруппы как балобанов с запада ареала, так и кречетов. Установлены изменения двух аминокислотных свойств, соответствующих заданным параметрам: энергия слабых (невалентных) взаимодействий (short and medium range non-bonded energy) и сжимаемость (compressibility) [57]. Эти свойства отнесены к третьей и пятой категориям значимости с вероятностью 99.9% и значениями 3.519 и 3.391 соответственно. Данные изменения аминокислотных свойств зафиксированы для кодона 191 при формировании 23-го предкового и последующих гаплотипов. При переходе от 23-го предкового гаплотипа к образцу FC38 из Крыма для кодона 305 наблюдается изменение свойств энергии слабых (невалентных) взаимодействий, а для кодона 331 – дополнительно свойства сжимаемости. Для аминокислотной замены в позиции 331 цитохрома *b* сапсана (JX029991.1) также обнаруже-

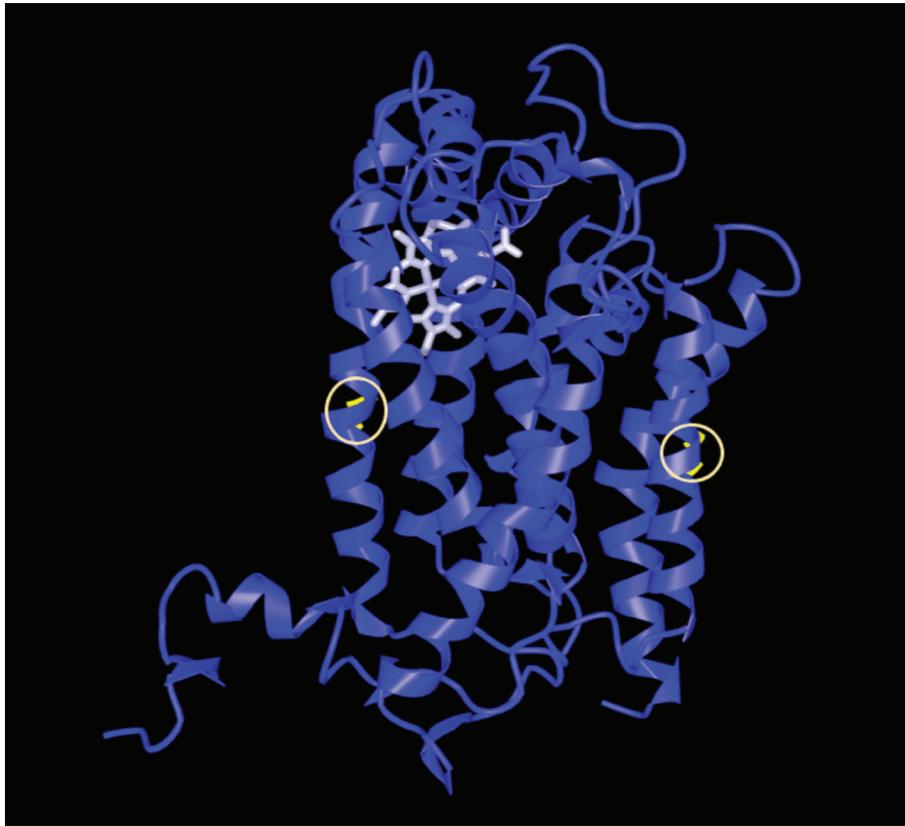


Рис. 1. Трехмерная структура цитохрома *b*, смоделированная на основе гомологии белков на сервере SWISS-MODEL и визуализированная в сетевой программе iCn3D. Желтым выделено положение сайтов аминокислотных замен — 191 на *H*-спирали 11 (слева) и 331 на *H*-спирали 18 (справа). Неме *b* обозначен светло-серым цветом.

но изменение этих двух свойств. Таким образом, предположительно свойства найденных аминокислотных замен (энергия слабых (невалентных) взаимодействий и сжимаемость) находятся под влиянием положительного стабилизирующего отбора и близкого к дестабилизирующему отбора соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение адаптаций энергетического метаболизма птиц к экологическим условиям является актуальной задачей. В ряде работ показаны молекулярные изменения и адаптации белков электрон-транспортной цепи животных из различных сред обитания [2–4, 15, 17–19]. Проведенный анализ изменчивости гена *cyt b* у редких и охраняемых видов соколов группы *Hierofalco* также позволил получить новые данные о молекулярных изменениях, в том числе относительно их эволюционной истории. В настоящее время существует гипотеза о формировании балобана и кречета от единого предка, населявшего обширные территории Палеарктики, в результате изоляции и разности условий местообитаний [58]. Наши данные позволяют предполагать, что в формировании найден-

ных митохондриальных гаплотипов балобанов с запада ареала могли принимать участие не только генетико-автоматические процессы, связанные с прохождением через рефугиумы, но и отбор, поддерживающий стабильную функциональную активность некоторых белков электрон-транспортной цепи. У балобанов, обитающих на Крымском полуострове, на фоне общей низкой изменчивости исследованных последовательностей гена *cyt b* выявлены три аминокислотные замены (191, 305 и 331 кодоны) с изменяющимися физико-химическими свойствами и, возможно, поддерживаемые положительным отбором. При этом замена в кодоне 191 является филогенетически значимой, формирующей отдельную гаплогруппу. Согласно исходным алгоритмам, используемым для расчета программы TreeSAAP, предполагаемое влияние положительного стабилизирующего отбора согласуется с тем, что структура цитохрома *b* и его функции высоко консервативны, т.е. при серьезных изменениях белка происходят радикальные сдвиги энергетического метаболизма. Таким образом, полученные результаты указывают на возможный отбор при формировании исследуемых видов тех вариантов гена *cyt b*, которые обеспечивают адаптации на молекулярном уровне. Мы пред-

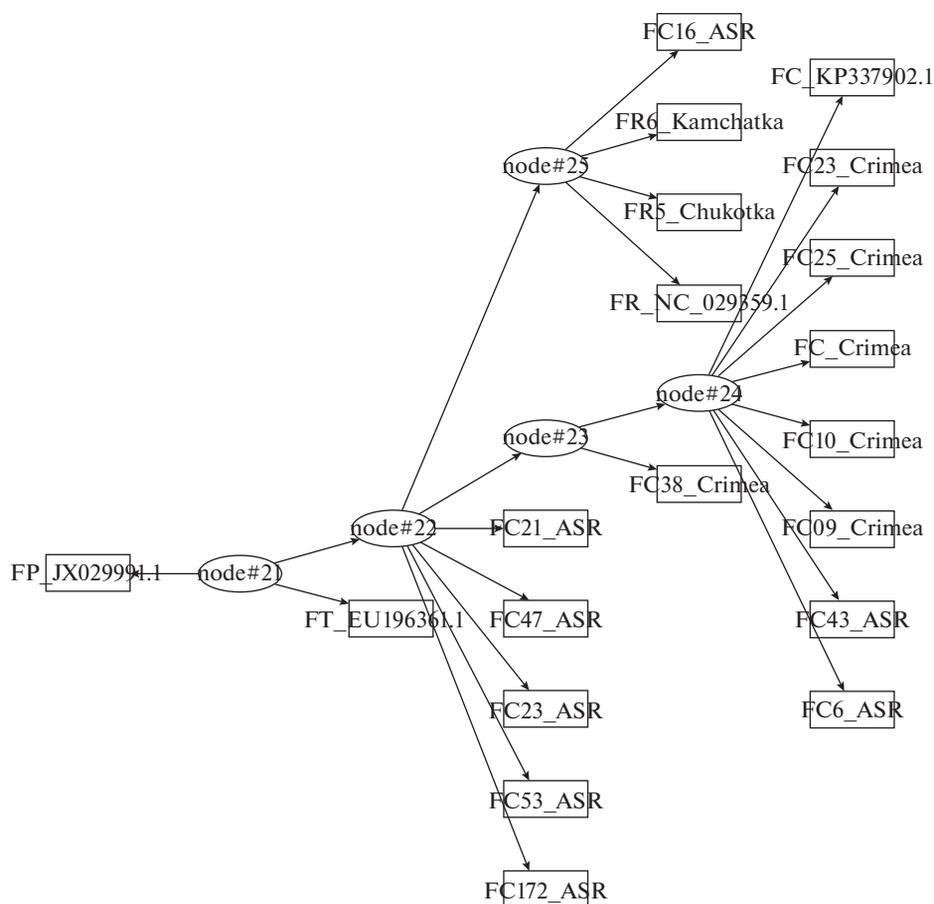


Рис. 2. Реконструкция предковых гаплотипов 20 исследуемых последовательностей гена *cytb*, выполненная с помощью алгоритма *baseml* программного пакета PAML [56] в программе TreeSAAP на основе филогенетической топологии, рассчитанной методом максимального правдоподобия и модели Тамура–Нея с дискретным гамма-распределением (+G, параметр $p = 0.0500$) и 1000 бутстрэп-выборок в MEGA X.

полагаем, что часть изменчивости мтДНК у балобанов и кречетов является ненейтральной, вносящей отдельный вклад в формирование генетической структуры этих видов. Таким образом, необходимы дополнительные исследования филогеографической истории балобана и кречета на основе сравнения кодирующих последовательностей мембранных белков и переносчиков электронов, участвующих в процессах окислительного фосфорилирования.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ “ВНИИ Экология” 2019 года “Выявление генетических маркеров природных популяций редких и особо ценных видов птиц и млекопитающих для обоснования программ по охране и реинтродукции данных видов, а также оценка генетического разнообразия редких и особо ценных видов птиц (соколообразные и журавлеобразные), содержащихся в российских питомниках”, и раздела государственного задания ИБР РАН 2020 года № 0108-2019-0007 “Молекулярно-генетические и экологические механизмы видообразования и ранних этапов эволюции. Разработка подходов для

оценки гомеостаза развития биологических систем (методология популяционной биологии развития)”.

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. *Venditti C., Pagel M.* Speciation as an active force in promoting genetic evolution // *Trends Ecol. Evol.* 2010. V. 25. № 1. P. 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.06.010>
2. *Scott G.R., Schulte P.M., Egginton S. et al.* Molecular evolution of cytochrome C oxidase underlies high-altitude adaptation in the bar-headed goose // *Mol. Biol. Evol.* 2011. V. 28. № 1. P. 351–363. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq205>
3. *Morales H.E., Pavlova A., Joseph L., Sunnucks P.* Positive and purifying selection in mitochondrial genomes of a bird with mitonuclear discordance // *Mol. Ecol.*

2015. V. 24. № 11. P. 2820–2837.
<https://doi.org/10.1111/mec.13203>
4. Lamb A.M., Gan H.M., Greening C. et al. Climate-driven mitochondrial selection: A test in Australian songbirds // *Mol. Ecol.* 2018. V. 27. № 4. P. 898–918.
<https://doi.org/10.1111/mec.14488>
 5. Barton N., Jones J.S. Mitochondrial DNA: New clues about evolution // *Nature*. 1983. V. 306. № 24. P. 317–318.
<https://doi.org/10.1038/306317a0>
 6. Harrison R.G. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology // *TREE*. 1989. V. 4. № 7. P. 6–11.
[https://doi.org/10.1016/0169-5347\(89\)90006-2](https://doi.org/10.1016/0169-5347(89)90006-2)
 7. Pereira S.L. Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics // *Genet. Mol. Biol.* 2000. V. 23. № 4. P. 745–752.
<https://doi.org/10.1590/S1415-47572000000400008>
 8. Hebert P.D.N., Ratnasingham S., de Waard J.R. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species // *Proc. Biol. Sci.* 2003. V. 270. P. S96–S99.
<https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>
 9. Hebert P.D.N., Stoeckle M.Y., Zemlak T.S., Francis C.M. Identification of birds through DNA barcodes // *PLoS Biol.* 2004. V. 2. P. 1657–1663.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020312>
 10. Baker A.J., Tavares E.S., Elbourne R.F. Countering criticisms of single mitochondrial DNA gene barcoding in birds // *Mol. Ecol. Resour.* 2009. V. 9. P. 257–268.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02650.x>
 11. Andrejevic M., Markovic M.K., Bursac B. et al. Identification of a broad spectrum of mammalian and avian species using the short fragment of the mitochondrially encoded cytochrome b gene // *Forensic Sci. Med. Pathol.* 2019. V. 15. P. 169–177.
<https://doi.org/10.1007/s12024-019-00096-4>
 12. Baker A.J., Marshall H.D. Mitochondrial control region sequences as tools for understanding evolution in avian molecular evolution and systematics // *Avian Molecular Evolution and Systematics*. San Diego, CA: Acad. Press, 1997. P. 51–82.
 13. Weir J.T., Schluter D. Calibrating the avian molecular clock // *Mol. Ecol.* 2008. V. 17. P. 2321–2328.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03742.x>
 14. Lavinia P.D., Kerr K.C.R., Tubaro P.L. et al. Calibrating the molecular clock beyond cytochrome b: assessing the evolutionary rate of COI in birds // *J. Avian Biol.* 2016. V. 47. P. 84–91.
<https://doi.org/10.1111/jav.00766>
 15. McClellan D.A., Palfreyman E.J., Smith M.J. et al. Physicochemical evolution and molecular adaptation of the Cetacean and Artiodactyl cytochrome b proteins // *Mol. Biol. Evol.* 2005. V. 22. № 3. P. 437–455.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msi028>
 16. Gering E.J., Opaço J.C., Storz J.F. Molecular evolution of cytochrome b in high- and low-altitude deer mice (genus *Peromyscus*) // *Heredity*. 2009. V. 102. P. 226–235.
<https://doi.org/10.1038/hdy.2008.124>
 17. Garvin M.R., Bielawski J.P., Gharrett A.J. Positive Darwinian selection in the piston that powers proton pumps in complex I of the mitochondria of Pacific salmon // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 8. P. 10.1371.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024127>
 18. Мальярчук Б.А. Селективные процессы и адаптивная эволюция гена цитохрома b углозубов рода *Sal-amandrella* // *Генетика*. 2012. Т. 48. № 6. С. 713–718.
 19. Zhou T., Shen X., Irwin D.M. et al. Mitogenomic analyses propose positive selection in mitochondrial genes for high-altitude adaptation in galliform birds // *Mitochondrion*. 2014. V. 18. P. 70–75.
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2014.07.012>
 20. Gu P., Liu W., Yao Y.F. et al. Evidence of adaptive evolution of alpine pheasants to high-altitude environment from mitogenomic perspective // *Mitochondrial DNA a DNA MappSeq Anal.* 2016. V. 27. № 1. P. 455–462.
<https://doi.org/10.3109/19401736.2014.900667>
 21. Карякин И.В., Бакка С.В., Грабовский М.А. и др. Балобан (*Falco cherrug*) в России // *Инвентаризация, мониторинг и охрана ключевых орнитологических территорий России*. Сб. науч. статей. Вып. 5. М.: Союз охраны птиц России, 2005. С. 48–66.
 22. Kovacs A., Williams N.P., Galbraith C.A. Saker Falcon *cherrug* Global Action Plan (SakerGAP). Abu Dhabi: Coordinating Unit of the Raptors MOU, 2014. 206 p.
 23. Nittinger F., Gamauf A., Pinsker W. et al. Phylogeography and population structure of the saker falcon (*Falco cherrug*) and the influence of hybridization: mitochondrial and microsatellite data // *Mol. Ecol.* 2007. V. 16. P. 1497–1517.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03245.x>
 24. Potapov E., Sale R. The Gyrfalcon. London: T & AD Poyser, 2005. 360 p.
 25. BirdLife International. IUCN Red List for birds. [Electronic resource]. URL: <http://www.birdlife.org>. Accessed 04.2020.
 26. CITES. Checklist of CITES species. [Electronic resource] URL: <http://checklist.cites.org>. Accessed 04.2020.
 27. Красная книга Российской Федерации (животные). М.: Астрель, 2001. 862 с.
 28. Об утверждении перечня особо ценных диких животных и водных биологических ресурсов, принадлежащих к видам, занесенным в Красную книгу Российской Федерации и (или) охраняемым международными договорами Российской Федерации, для целей статей 226.1 и 258.1 Уголовного кодекса Российской Федерации [Электронный ресурс]: Постановление Правительства РФ от 31.10.2013 г., № 978. <http://static.government.ru/media/files/41d49d332fed37b0fcb2.pdf> (дата обращения 15.04.2020).
 29. Wilcox J.J.S., Boissinot S., Idaghdour Y. Falcon genomics in the context of conservation, speciation, and human culture // *Ecol. and Evol.* 2019. V. 9. P. 14523–14537.
<https://doi.org/10.1002/ece3.5864>
 30. Esposti D.M., Vries D.S., Crimi M. et al. Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein // *Biochim. et Biophys. Acta*. 1993. V. 1143. № 3. P. 243–271.
[https://doi.org/10.1016/0005-2728\(93\)90197-n](https://doi.org/10.1016/0005-2728(93)90197-n)

31. Zhang Z., Huang L., Shulmeister V.M. et al. Electron transfer by domain movement in cytochrome *bc₁* // Nature. 1998. V. 392. P. 677–684. <https://doi.org/10.1038/33612>
32. Wink M., Sauer-Gürth H., Ellis D., Kenward R. Phylogenetic relationships in the Hierofalco complex (Saker-, Gyr-, Lanner-, Laggar Falcon) // Reptors Worldwide. WWGBP/MME. 2004. P. 499–504.
33. Шнайдер Е.П., Николенко Э.Г., Карякин И.В. и др. Результаты апробирования методики восстановления популяции балобана в России путем подсадки в естественные гнезда птенцов, выращенных в питомнике (с результатами GPS/GSM-трекинга слетков) // Пернатые хищники и их охрана. 2018. № 37. С. 66–94. <https://doi.org/10.19074/1814-8654-2018-37-66-94>
34. NCBI. [Electronic resource]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Accessed 04.2020.
35. Horvath M.B., Martinez-Cruz B., Negro J.J. et al. An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds // J. Avian Biol. 2005. V. 36. № 1. P. 84–88. <https://doi.org/10.1111/j.0908-8857.2005.03370.x>
36. Nacer D.F., do Amaral F.R. Striking pseudogenization in avian phylogenetics: Numts are large and common in falcons // Mol. Phylogenet. Evol. 2017. V. 115. P. 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.07.002>
37. Kumar S., Stecher G., Li M. et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. P. 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
38. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // Evolution. 1985. V. 39. P. 783–791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
39. Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees // Mol. Biol. Evol. 1993. V. 10. P. 512–526. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>
40. RCSB PDB. PDB ID: 3TGU. Cytochrome bc1 complex from chicken with pfvs-designed moa inhibitor bound. [Electronic resource]. URL: <https://www.rcsb.org/structure/3TGU>. Accessed 04.2020.
41. Guex N., Peitsch M.C., Schwede T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective // Electrophoresis. 2009. V. 30. P. S162–S173. <https://doi.org/10.1002/elps.200900140>
42. Benkert P., Biasini M., Schwede T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models // Bioinformatics. 2011. V. 27. P. 343–350. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq662>
43. Bertoni M., Kiefer F., Biasini M. et al. Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 10480. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09654-8>
44. Bienert S., Waterhouse A., de Beer T.A.P. et al. The SWISS-MODEL Repository – new features and functionality // Nucleic Acids Res. 2017. V. 45. P. D313–D319. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1132>
45. Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S. et al. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes // Nucl. Acids Res. 2018. V. 46. P. W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
46. Studer G., Rempfer C., Waterhouse A.M. et al. QMEANDisCo – distance constraints applied on model quality estimation // Bioinformatics. 2020. V. 36. № 6. P. 1765–1771. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz828>
47. Wang J., Youkharibache P., Zhang D. et al. iCn3D, a web-based 3D viewer for sharing 1D/2D/3D representations of biomolecular structures // Bioinformatics. 2020. V. 36. № 1. P. 131–135. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz502>
48. Roy A., Kucukural A., Zhang Y. I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction // Nat. Protoc. 2010. V. 5. P. 725–738. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5>
49. Yang J., Yan R., Roy A. et al. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction // Nat. Methods. 2015. V. 12. P. 7–8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>
50. Yang J., Zhang Y. I-TASSER server: New development for protein structure and function predictions // Nucl. Acids Res. 2015. V. 43. P. W174–W181. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv342>
51. Choi Y., Sims G.E., Murphy S. et al. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels // PLoS One. 2012. V. 7. № 10. P. e46688. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046688>
52. Choi Y. A fast computation of pairwise sequence alignment scores between a protein and a set of single-locus variants of another protein // Proc. ACM Conference on BCB. N.Y.: ACM, 2012. P. 414–417. <https://doi.org/10.1145/2382936.2382989>
53. Choi Y., Chan A.P. PROVEAN web server: A tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels // Bioinformatics. 2015. V. 31. № 16. P. 2745–2747. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv195>
54. Woolley S., Johnson J., Smith M.J. et al. TreeSAAP: selection on amino acid properties using phylogenetic trees // Bioinformatics. 2003. V. 19. № 5. P. 671–672. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg043>
55. Yang Z., Nielsen R., Goldman N., Pedersen A.M. Codon-substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites // Genetics. 2000. V. 155. P. 431–449.
56. Yang Z. Phylogenetic analysis using parsimony and likelihood methods // J. Mol. Evol. 1996. V. 42. P. 294–307. <https://doi.org/10.1007/BF02198856>
57. Рубин А.Б. Биофизика. М.: Книжный дом “Университет”, 1999. 448 с.
58. Карякин И.В. Популяционно-подвидовая структура ареала балобана // Пернатые хищники и их охрана. 2011. № 21. С. 116–171.

Non-Neutral Cytochrome *b* Variability in the Saker *Falco cherrug* Grey, 1834 and Gyrfalcon *Falco rusticolus* L.

D. N. Rozhkova^{a, b, *}, L. S. Zinevich^{a, b}, I. V. Karyakin^a,
A. G. Sorokin^b, V. G. Tambovtseva^a, and A. M. Kulikov^a

^a*Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia*

^b*All-Russian Research Institute for Environmental Protection, Moscow, 117628 Russia*

*e-mail: darroznature@gmail.com

Mitochondrial DNA variability affects cell metabolism characteristics and reflects evolutionary processes. Saker and gyrfalcon sequences of the cytochrome *b* mitochondrial gene have been analyzed. Five amino acid substitutions have been revealed, and changing of physical and chemical properties have been found for two of them. Suggestions have been made about phylogenetic formation history and functional influence of the detected amino acid substitution variants.

Keywords: cytochrome *b*, amino acid substitutions, molecular evolution, saker, gyrfalcon.

УДК 575.17

Y-ГАПЛОГРУППЫ КОСТНЫХ ОСТАНКОВ ИЗ КУРГАННЫХ ПОГРЕБЕНИЙ ХАЗАРСКОГО ВРЕМЕНИ НА ТЕРРИТОРИИ ЮГА РОССИИ

© 2021 г. И. В. Корниенко^{1, 2, *}, Т. Г. Фалеева^{1, 2, 3, 4}, Т. Г. Шурр⁵, О. Ю. Арамова^{1, 3}, М. А. Очир-Горяева¹, Е. Ф. Батиева⁶, Е. В. Вдовченков³, Н. Е. Мошков^{7, 8, 9}, В. В. Куканова¹, И. Н. Иванов¹⁰, Ю. С. Сидоренко^{2, 11}, Т. В. Татарина^{12, 13, 14, 15}

¹Калмыцкий научный центр Российской академии наук, Элиста, 358000 Россия

²Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук, Ростов-на-Дону, 344006 Россия

³Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, 344090 Россия

⁴111 Главный государственный центр судебно-медицинских и криминалистических экспертиз, филиал № 2, Ростов-на-Дону, 344000 Россия

⁵The University of Pennsylvania Museum of Archeology and Anthropology Philadelphia, 19104 USA

⁶Азовский историко-археологический и палеонтологический музей-заповедник, Азов, 346780 Россия

⁷Synthetic and Systems Biology Unit, Biological Research Centre, Szeged, 6726 Hungary

⁸Doctoral School of Interdisciplinary Medicine, University of Szeged, Szeged, 6720 Hungary

⁹Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва, 101000 Россия

¹⁰Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, 191015 Россия

¹¹Национальный медицинский исследовательский центр онкологии, Ростов-на-Дону, 344037 Россия

¹²Department of Biology, University of La Verne, La Verne, California, 91750 USA

¹³Сибирский федеральный университет, Красноярск, 660041 Россия

¹⁴Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича Российской академии наук, Москва, 127051 Россия

¹⁵Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: ikornienko@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.05.2020 г.

После доработки 12.07.2020 г.

Принята к публикации 25.08.2020 г.

Генетические исследования костных останков человека из археологических комплексов открывают новые возможности для изучения культурно-исторического развития древних популяций, предоставляя объективные данные, которые могут быть использованы для исследования наиболее спорных проблем археологии. В настоящей работе мы проанализировали Y-хромосомы скелетных останков девяти индивидуумов, погребенных в элитных курганах Хазарского каганата на территории современной Ростовской области, относящихся к VII–IX вв. Генотипирование полиморфных Y-STR и Y-SNP локусов позволило установить, что среди девяти исследованных скелетов три из них имели Y-гаплогруппу R1a, два – C2b и по одному – G2a, N1a, Q и R1b Y-гаплогруппы. Такие результаты характерны для смеси западно-евразийских и восточно-азиатских отцовских линий. Результаты типирования Y-хромосомы согласуются с результатами краниологического исследования и полногеномного анализа одних и тех же костных останков, демонстрируя смешанное генетическое происхождение раннесредневековой хазарской знати. Результаты настоящего исследования удивительны, поскольку Хазарский каганат образовался путем отделения от Западного Тюркского каганата и окончательно сформировался в регионах Северного Кавказа и восточноевропейских степей.

Ключевые слова: хазары, восточноевропейские степи, подкурганые погребения, древняя ДНК, Y-STR, Y-SNP.

DOI: 10.31857/S0016675821040044

Для эпохи раннего средневековья восточноевропейских степей сложная и многогранная история Хазарского каганата играет ключевую роль [1–4]. Она отражена в целом комплексе письмен-

ных источников: арабских, византийских и собственно хазарских [5, 6]. Хазарский каганат контролировал в разные периоды своей истории степи от Черного до Аральского моря, пространства

от гор Кавказа на юге до лесов среднего течения рек Волга и Днепр на севере. Степи Нижнего Поволжья и Нижнего Дона были основной (доменной) территорией хазар. В волго-донских степях наблюдается наибольшее скопление разнообразных археологических памятников: необычные по конструкции и размерам культовые сооружения, такие как Цимлянский квадрат, пирамида Синий Мамай и курган Большая Орловка [7]; агломерация городищ-крепостей с мощными оборонительными стенами из кирпича и камня: Саркел, Правобережное Цимлянское, Камышовское, открытые недавно Башанта-I-II [8–11].

В этом регионе наблюдается наибольшая плотность подкурганных захоронений VII–IX вв. (более 300 погребальных памятников). Среди погребального инвентаря здесь чаще были обнаружены византийские монеты, позволяющие датировать погребения с максимальной точностью. Расположение данных подкурганных захоронений на территории домена Хазарского каганата, включая захоронения знатных воинов, которые исследователи уверенно относят к хазарским, дает основание идентифицировать данные погребения как собственно хазарские [9, 12].

Из отобранной выборки погребение 1 из кургана 3 из группы Вербовый Лог-IX датируется с опорой на разработанную классификацию серебряных поясных пряжек, а также по византийской монете – солиду императора Юстиниана II (705–711 гг.). По форме и конструкции более ранней формы серебряной пряжки датируется погребение 1 из кургана 2 группы Кутейников-II (вторая половина VII–начало VIII в.). Типологическая классификация массовых серийных предметов является основным методом выявления относительной хронологии их бытования в археологии как преисторической, так и классической. Для эпохи средневековья имеется возможность обеспечивать типологические цепочки предметов материальной культуры абсолютными датами благодаря наличию монет и обилию письменных источников. Поэтому именно благодаря разработанной типологии удили и стремян установлена датировка кургана 37 из группы Новый второй половиной VIII–началом IX в.

Элитные воинские захоронения исследуемой выборки были устроены под собственным курганом, с ритуальными ровиками вокруг широтно ориентированной могильной ямы с подбоем. Умершие были расположены вытянуто на спине, головой на запад, сопровождалась символическим захоронением взнузданной верховой лошади в виде чучела из снятой целиком шкуры с головой и оставленными путовой костью и копытами. Чучела положены в могильной яме так, что имитировали положение лежащей лошади. Показателем высокого социального ранга является разнообразный инвентарь из

этих погребений, прежде всего предметы роскоши и престижа, такие как металлические наборные пояса, серебряные и позолоченные сосуды, ювелирные изделия, золотые византийские монеты. Последние использовались не по прямому назначению, а в качестве статусных атрибутов [13–19].

Проведенные рядом специалистов краниологические анализы черепов из курганов VII–IX вв. с территории Нижнего Дона и Нижнего Поволжья с использованием различных серий выявили преобладание смешанного монголоидно-европеоидного типа [20–23]. Е.Ф. Батиева на основе изучения серии из 86 взрослых и четырех детских индивидов установила преобладание черепов с монголоидными признаками (70%). Европеоидный компонент мужской выборки имеет сходство с представителями синхронной салтово-маяцкой и, предшествующей по времени, сарматской культур Нижнего Подонья и Нижнего Поволжья. Монголоидные мужские и женские черепа проявляют наибольшее сходство с гуннами Забайкалья и тюркоязычными кочевниками Южной Сибири, Алтая и Казахстана [23].

Генетические исследования древних костных останков открывают новые возможности для изучения проблемы происхождения и этнической консолидации хазар эпохи раннего средневековья [24]. Полученные в настоящей работе результаты должны существенно дополнить отрывочные сведения письменных свидетельств и единичных образцов изобразительного искусства. Но самое главное они обеспечат объективной базой исследованную группу элитных воинских погребений со степной доменной территории Хазарского каганата, выделенных на основе признаков погребального обряда, интерпретация которых не всегда однозначна и создает почву для сомнений и дискуссий в археологической литературе. Описать полный генетический профиль населения всего Каганата – непростая и, вероятно, невозможная задача. На данном этапе проведен анализ гаплогрупп Y-хромосомы населения определенного региона и конкретного времени, а именно скелетов из богатых подкурганных погребений конца VII–начала IX в. Хазарского каганата (современная Ростовская область).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для генетического анализа были отобраны костные останки из курганных погребений по хронологическому признаку (датирующиеся VII–IX вв.), по географическому признаку (доменная территория Хазарского каганата), по половой принадлежности (мужские) и по степени сохранности костного материала (табл. 1).

Таблица 1. Местонахождение, датировка и расовая принадлежность исследованных скелетов

Инв. № скелета (шифр антропологической коллекции)	Местонахождение, датировка	Расовый тип
67	Мг. Криволиманский I, курган № 52, погребение 1, IX в. н.э. [25]. Мартыновский р-н, х. Кривой Лиман	Монголоидный
457	Мг. Кировский V, курган № 2, погребение 1, хазарское время [26]. Мартыновский р-н, х. Новосадковка	Монголоидный?
531	Мг. Подгорненский IV, курган № 22, погребение 1, VIII–IX вв. н.э. [27]. Дубовский р-н, между х. Харсеев и х. Подгорненский	Европеоидный
619	Мг. Подгорненский V, курган № 5, погребение 1, VII–VIII вв. н.э. [14]. Дубовский р-н, х. Подгорненский	Монголоидный
656	Мг. Вербовый лог IX, курган № 3, погребение 1, VII–VIII вв. н.э. [14]. Дубовский р-н, х. Вербовый Лог	Европеоидный
1251	Мг. Кутейников II, курган № 2, погребение 1, конец VII–начало VIII в. н.э. [28]. Зимовниковский р-н, ст. Кутейниковская	Н/д
1564	Мг. Частые курганы, курган № 3, погребение 1, первая половина VIII в. н.э. [29]. Белокалитвенский р-н, к СВ от ст. Краснодонецкая	Европеоидный
1566	Мг. Частые курганы, курган № 9, погребение 1, первая половина VIII в. н.э. [29]. Белокалитвенский р-н, ст. Краснодонецкая	Н/д
1986	Мг. Таловый, курган № 3, погребение 1, вторая половина VIII–начало IX в. н.э. [13, 30]. Орловский р-н, х. Камышовка	Монголоидный/ европеоидный

Примечание. Мг – могильник, Н/д – ввиду отсутствия черепа расовый тип скелетов № 1251 и 1566 установить не удалось.

Объекты исследования

Объектами исследования послужили отдельные длинные трубчатые кости девяти мужских скелетов из элитных воинских погребений, расположенных в нижнем течении р. Дон на территории современной Ростовской области (рис. 1, табл. 1).

Для проведения молекулярно-генетического анализа использованы следующие объекты: левая плечевая кость (скелет № 67), левая локтевая кость (скелет № 457), правая большеберцовая и левая локтевая кости (скелет № 531), левая бедренная кость (скелет № 619), правая большеберцовая кость (скелет № 656), левая плечевая кость (скелет № 1251), левая большеберцовая кость (скелет № 1564), правая плечевая кость (скелет № 1566), правая плечевая и левая большеберцовая кости (скелет № 1986).

Краниологические исследования по общепринятой методике [31] были проведены на скелетах № 67, 531, 619, 656, 1564 и 1986 [23, 32]. Черепа скелетов № 531, 656 и 1564 обладали комплексом краниометрических признаков преимущественно европеоидного расового типа, а № 67 и 619 –

преимущественно монголоидного расового типа. Ввиду плохой сохранности черепа от скелета № 457 проводилась его визуальная оценка, которая показала, что объект обладал предположительно монголоидными чертами. Череп от скелета № 1986 по краниологическим характеристикам был отнесен к смешанному европеоидно-монголоидному типу [32]. У скелетов № 1251, 1566 черепа отсутствовали.

Подготовка помещения для работы с костными объектами

Пробоподготовку костных объектов проводили в помещении, которое в течение двух дней непрерывно подвергали облучению с помощью пятилампового облучателя-рециркулятора закрытого типа “Дезар-7” (суммарная мощность излучения составляла 100 Вт). Далее полы и стены помещения обрабатывали 10%-ным коммерческим раствором “Белизна”, содержащим активный хлор в виде гипохлорита натрия, и оставляли еще на одни сутки с включенным облучателем-рециркулятором “Дезар-7”.



Рис. 1. Карта мест расположения погребений, из которых происходит исследованный антропологический материал: 1 – № 67, 2 – № 457, 3 – № 531, 4 – № 619, 5 – № 656, 6 – № 1251, 7 – № 1564, 8 – № 1566, 9 – № 1986.

Пробоподготовка костных объектов

Пробоподготовку к экстракции ДНК из полученного костного порошка проводили в отдельной комнате с использованием персональных стерильных средств защиты (халатов, одноразовых масок, шапочек и перчаток).

Для минимизации потерь аутентичной древней ДНК обработку костной поверхности растворами, содержащими активный хлор, не проводили. Вместо этого последующую обработку костного порошка осуществляли с помощью собственно разработанного лизирующего раствора “Cell lysis

buffer” (CLB), позволяющего минимизировать потери активной ДНК-матрицы в процессе исследования и устранить возможность контаминации образцов. В основе разработанного метода лежит уникальная методика дифференциального лизиса древнего костного материала с одновременным избирательным лизисом современной контаминирующей ДНК [33].

Поверхность костей очищали при помощи портативной бормашины ПБ-01 с использованием отдельных для каждой кости стерильных фрез. Полученный из поверхностного компактного

слоя костный порошок удаляли. Затем заменяли фрезу и получали от 1 до 2 грамм костного порошка из компактного слоя каждой кости. Порошок переносили в отдельные стерильные пробирки объемом 50 мл. Далее проводили дифференциальное устранение возможной контаминации современной ДНК с помощью лизирующего раствора CLB [33]. Последующую процедуру декальцинирования костных порошков проводили однократной обработкой раствором 1%-ного додецилсульфата натрия в 0.5 М ЭДТА, а затем двукратной обработкой раствором 0.5 М ЭДТА.

Выделение ДНК из костного порошка методом органической экстракции

Выделение ДНК из костных порошков проводили методом фенол-органической экстракции [34]. В пробирки, содержащие очищенный костный порошок, добавляли по 4 мл лизирующего раствора (10 мМ трис-HCL, pH 8.3; 50 мМ KCl; 2.5 мМ MgCl₂; 0.45% Tween 20), 200 мкл протеиназы K (10 мг/мл) и 100 мкл 2 М раствора дитиотреитола. Для контроля чистоты реагентов в процессе выделения ДНК проводили экстракцию пробы, содержащей реактивы, используемые в процессе выделения (холостая проба). Тщательно перемешивали. Инкубировали при температуре 56°C в течение двух часов, затем при температуре 40°C в течение 16 ч в шейкере-инкубаторе SI-300 (JEIOTECH). Далее добавляли равный содержанию пробирки объем смеси фенол-хлороформ-изоамилол (25 : 24 : 1) и в течение 40 с встряхивали на вортексе на максимальных оборотах. Центрифугировали содержимое пробирок в течение 10 мин при 5000 g. Верхнюю водную фазу осторожно, не затрагивая интерфазу, переносили в стерильные пробирки объемом 15 мл. Процедуру экстракции смесью фенол-хлороформ-изоамилол повторяли еще один раз. К водному раствору, содержащему ДНК, добавляли равный объем смеси хлороформ-изоамилол (24 : 1), встряхивали на вортексе 30 с, центрифугировали содержимое пробирок 10 мин при 5000 g. Верхнюю водную фазу с ДНК дополнительно очищали и концентрировали с помощью колонок "Amicon Ultra-4, ultracel30k". Процедуру концентрирования проводили следующим образом. После двукратной промывки стерильной деионизованной водой (по 4 мл) еще один раз промывали стерильным ТЕ-буфером (по 4 мл). Конечный объем очищенных препаратов ДНК составлял около 100 мкл. Выделение ДНК из образцов № 67, 457, 531, 619, 656, 1251, 1564, 1566 и 1986 проводили в трех независимых параллелях.

Аутентичность препаратов ДНК, полученных из костных останков № 67, 531, 619, 656, 1251, 1564, 1566 и 1986, доказана ранее [24] с помощью

биоинформационного анализа геномных библиотек.

Типирование STR-локусов Y-хромосомы по системе Yfiler (DYS456, DYS389I, DYS390, DYS389II, DYS458, DYS19, DYS385a, DYS385b, DYS393, DYS391, DYS439, DYS635, DYS392, YGATA H4, DYS437, DYS438, DYS448)

Аmplification участков Y-хромосомы осуществляли с использованием набора "AmpFISTR Yfiler PCR Reagents" (Applied Biosystems). При постановке полимеразной цепной реакции (ПЦР) в коммерческую реакционную смесь дополнительно добавляли ДНК-полимеразу AmpliTaq Gold DNA-Polymerase (Applied Biosystems) в количестве 1 ед. на каждые 10 мкл ПЦР-смеси.

Энзиматическую амплификацию локусов ДНК осуществляли с помощью термоциклера GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) в режиме эмульсии 1°C/с в течение 30 циклов. Электрофорез образцов проводили с помощью ДНК-анализатора ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems). Инъекция образцов осуществлялась при напряжении 2.0 кВ в течение 13 с. Обработку результатов электрофореза и идентификацию аллелей проводили с помощью программы GeneMapper ID (версия 3.2). Типирование препаратов ДНК образцов № 67, 619, 1564 и 1566 проводили в шести параллелях; образцов № 457, 531 – в семи параллелях; образца № 1251 – в четырех параллелях; образца 656 – в пяти параллелях; образца № 1986 – в девяти параллелях.

Типирование STR-локусов Y-хромосомы по системе CordYs (DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS385a, DYS385b, DYS438, DYS439, DYS437, DYS447, DYS576, DYS449, DYS456, DYS448 и DYS635)

Аmplification участков Y-хромосомы осуществляли с использованием набора CordYs (Гордиз). При постановке ПЦР в коммерческую реакционную смесь дополнительно добавляли ДНК-полимеразу SynTaq (Синтол) в количестве 1 ед. на каждые 10 мкл ПЦР-смеси.

Энзиматическую амплификацию локусов ДНК осуществляли с помощью термоциклера GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) в режиме эмульсии 1°C/с (при этом скорость нагрева с 60 до 72°C устанавливали как 0.3°C/с) в течение 30 циклов. Электрофорез образцов проводили с помощью ДНК-анализатора ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems). Инъекция образцов осуществлялась при напряжении 3.0 кВ в течение 8 с. Обработку результатов электрофореза и идентификацию аллелей проводили с помощью программы GeneMapper ID (версия 3.2). Типирование препаратов ДНК образцов № 531, 656, 1251 и

Таблица 2. Определение Y-гаплогрупп скелетов хазар с помощью SNaPshot типирования

№ п/п	Проверяемая Y-гаплогруппа	Снип	Использованная пара праймеров	Размер ампликонов, пн
1	R	M207 Позиция на Y-хромосоме – 13470103, замена А на G	F ₁₃₄₇₀₀₇₃ 5'-GGG GCA AAT GTA AGT CAA GC-3' R ₁₃₄₇₀₁₇₆ 5'-TGA CTT CTT TTG CCA ATT AGG T-3'	104
2	R1b	M343 Позиция на Y-хромосоме – 3019783, замена С на А	F ₃₀₁₉₇₁₄ 5'-CGT AGC CCG AGA GAA AAC TG-3' R ₃₀₁₉₈₃₁ 5'-CCC AAC ACG TGC CTG GCA GC-3'	118
3	R1a	M420 Позиция на Y-хромосоме – 21311315, замена Т на А	F ₂₁₃₁₁₂₆₆ 5'-AAA TGG TGG AAG CAG ATT GG-3' R ₂₁₃₁₁₃₃₈ 5'-AGC ATC TTT TCA TTG GTT TC-3'	73
4	Q	M242 Позиция на Y-хромосоме – 12906671, замена С на Т	F ₁₂₉₀₆₆₄₄ 5'-TTT GTG CAA AAA GGT GAC CA-3' R ₁₂₉₀₆₇₁₇ 5'-CGT TAA AAT AGA TTT TTT TCA A-3'	74
5	N	M231 Позиция на Y-хромосоме – 13357844, замена G на А	F ₁₃₃₅₇₇₄₄ 5'-CTG GAA AAT GTG GGC TCG T-3' R ₁₃₃₅₇₈₇₁ 5'-AAT TCT TTG ACG ATC TTT CC-3'	128

Примечание. пн – пары нуклеотидов.

1986 проводили в трех параллелях; образцов № 67, 619 и 1566 – в четырех параллелях; образца № 1564 – в шести параллелях; образца № 457 – в семи параллелях.

Статистический анализ

Статистический анализ Y-гаплотипов проводили с использованием базы данных “Y chromosome haplotype reference database” (“YHRD”) [35, 36]. Принадлежность гаплотипов к той или иной гаплогруппе оценивали с помощью онлайн-программы “Haplogroup Predictor” [37–39] и онлайн программы “Y-DNA Haplogroup Predictor – NEVGEN” [40].

Определение Y-гаплогрупп с помощью SNaPshot типирования

Для подтверждения наличия у исследуемых костных останков той или иной гаплогруппы, предсказанной с помощью онлайн-программы “Haplogroup Predictor” [39], были проведены дополнительные исследования снипов с помощью подобранных пар праймеров, приведенных в табл. 2.

Энзиматическую амплификацию проводили при помощи термоциклера GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) при Ramp = max в течение 40 циклов с использованием следующей программы: предварительная инкубация при 95°C в течение 4 мин; этап денатурации при 95°C в течение 15 с, этап отжига праймеров при 60°C (для всех, кроме пары праймеров F₁₂₉₀₆₆₄₄/R₁₂₉₀₆₇₁₇, для которых температуру отжига устанавливали 56°C) в течение 35 с, этап элонгации при 72°C в течение

40 с; этап последующей инкубации при 72°C в течение 10 мин.

Продукты амплификации очищали от избытка дезоксирибонуклеотидтрифосфатов и праймеров с помощью набора реактивов на магнитных частицах CleanMag DNA (Евроген).

SNP-типирование проводили с помощью набора ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit (Thermo Scientific).

Реакционную смесь готовили, как показано в табл. 3.

Амплификацию проводили при помощи термоциклера GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) в режиме эмульсии 1°C/с в течение 25 циклов по стандартной программе: предварительная инкубация при 95°C в течение 1 мин; этап денатурации при 95°C в течение 10 с, этап отжига праймера при 50°C в течение 5 с, этап элонгации при 60°C в течение 30 с.

Продукты амплификации очищали от избытка флуоресцентно меченных дезоксирибонуклеотидтрифосфатов путем инкубации при 37°C в течение 80 мин (с последующей финальной инкубацией при 80°C в течение 15 мин) с ферментом щелочной фосфатазой креветки (Shrimp Alkaline Phosphatase, SAP) из расчета 1 ед. SAP на 10 мкл смеси.

Последующую идентификацию продуктов амплификации проводили с помощью ДНК-анализатора ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems). В качестве размерного стандарта использовали LIZ120.

Таблица 3. Состав реакционной смеси, используемой для постановки SNaPshot реакции

Компоненты	Объем, мкл
SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix	2.0
BigDye Terminator v1.1 & v3.1 5× Sequencing Buffer (Applied Biosystems™)	2.0
Tail-primer M207 (5 мкМ) F 5'-GTA AGT CAA GCA AGA AAT TTA-3', либо tail-primer M420 (5 мкМ) F 5'-GCA AAC TTT TCA TTG CTG GCC TCC A-3', либо tail-primer M343 (5 мкМ) R 5'-CAG CAT AGC CAC CCC CAC ATA TCT CCA GGT GT-3', либо tail-primer M231 (5 мкМ) (T) ₃₈ CATTTACTGTTTCTACTGCTTTC, либо tail-primer M242 (5 мкМ) (T) ₅₃ GTGCAAAAAGGTGACCAAGGTGCT	1.0
Деионизованная вода	3.0
Очищенные ампликоны	2.0

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты типирования полиморфных микросателлитных локусов Y-хромосомы, а также Y-SNP девяти скелетов из курганных погребений хазарского времени, расположенных на территории Ростовской области, приведены в табл. 4.

Как видно из табл. 4, останки трех скелетов имели Y-гаплогруппы R1a (531, 1251, 1986), двух других – Y-гаплогруппы C2b (656, 1564), остальные – G2a (457), N1a (1566), Q (619) и R1b (67). Такое разнообразие характерно для смеси как западноевразийских (G2a, R1a, R1b), так и восточноазиатских (C2b, N1a, Q) гаплогрупп, что указывает на значительные различия патрилиний хазар.

С точки зрения происхождения данных отцовских линий гаплогруппы R1a и R1b распространены в Евразии [42], где R1a достигает своей самой высокой частоты в Восточной Европе [43] и Индии [44], а R1b является самой распространенной гаплогруппой в Западной Европе [45], достигая наибольшей частоты на Британских островах [46] и среди басков [47], а наименьшей частоты – в Восточной Европе и Западной Азии. Гаплогруппа C2b в основном распространена в Восточной Евразии [48], а также встречается во всей Азии, Восточной Сибири, на Кавказе и на Ближнем Востоке. Скорее всего, это связано с распространением тюркских и монгольских народов. N1a распространена в Северной Европе (финны, балты), а также в Западной Сибири (якуты, нганасаны, буряты и ненцы), откуда она, вероятно, и берет свое начало

[49]. Гаплогруппа G2a встречается в Турции [50], на Кавказе и на Ближнем Востоке [51]. Гаплогруппа Q преобладает в Центральной и Восточной Азии, откуда она распространилась в Америку [52].

Сравнительный краниологический и генетический анализ хазарских останков не показал полного соответствия между географическим происхождением Y-гаплогрупп и предполагаемым биологическим происхождением исследуемых скелетов (табл. 5).

В результате проведенного анализа результатов типирования Y-STR и Y-SNP были получены гаплотипы для каждого хазарского индивидуума (табл. 4). Результаты сравнительного анализа хазарских Y-гаплотипов с современными популяциями будут описаны ниже.

В ДНК из костных останков № 1566 зафиксирована редкая мутация (одновременное присутствие аллелей 14 и 15), являющаяся следствием дубликации локуса *DYS389I*. Эта мутация была подтверждена результатами генотипирования как с помощью тест-системы Yfiler (в трех параллельных экспериментах из пяти), так и при помощи тест-системы CordYs (во всех параллельных экспериментах). В базе данных Y-гаплотипов “YHRD” [35, 36] данная дубликация встречается только дважды (в Италии и Китае), соответственно частота данной дубликации составляет 8.1×10^{-6} (95% CI: 1/1019039–1/34164).

Таблица 4. Результаты типирования Y-STR локусов (*DYS389I*, *DYS390*, *DYS389II*, *DYS458*, *DYS19*, *DYS385a*, *DYS358b*, *DYS393*, *DYS391*, *DYS439*, *DYS635*, *DYS392*, *YGATA H4*, *DYS437*, *DYS438*, *DYS448*, *DYS447*, *DYS576*, *DYS449*) исследованных объектов

Локус	67	457	531	619	656	1251	1564	1566	1986
<i>DYS456</i>	15	16	16	16	17	15	16	15	15
<i>DYS389I</i>	14	12	13	13	13	13	13	14,15	13
<i>DYS390</i>	19	23	24	23	24	25	—	23	25
<i>DYS389II</i>	30	31	30	28	29	31	—	31	32
<i>DYS458</i>	17	17	16	16	17	15	17	17	16
<i>DYS19</i>	14	—	16	13	15	16	—	14	16
<i>DYS385a</i>	13	13	11	13	12	10	12	11	11
<i>DYS385b</i>	13	14	14	18	15	14	15	13	15
<i>DYS393</i>	13	14	13	13	13	14	13	14	13
<i>DYS391</i>	11	10	11	10	10	11	10	11	11
<i>DYS439</i>	14	11	10	12	12	10	12	10	10
<i>DYS635</i>	24	21	23	23	21	23	—	22	23
<i>DYS392</i>	13	11	11	16	11	11	11	16	11
<i>YGATA H4</i>	11	—	12	9	11	11	12	11	13
<i>DYS437</i>	15	14	14	14	14	14	14	14	14
<i>DYS438</i>	10	11	11	11	11	11	11	11	11
<i>DYS448</i>	19	20	20	22	NA	20	19	19	20
<i>DYS447</i>	23	23	24	28	30	24	30	26	24
<i>DYS576</i>	16	—	18	18	18	19	—	—	18
<i>DYS449</i>	33	31	32	27	29	33	—	28	32
YHRD Y Haplogroup Prediction	R1b	G2a	R1a	Q	C3	R1a	C3	N	R1a
Fitness score	17	38	87	39	61	54	48	57	65
Probability, %	78.5	67.8	100	100	100	100	99.8	100	100
NEVGEN Y Haplogroup	R1b	G2a2	R1a	Q	C2b1a1b1	R1a	C2b1a1b1	N1a1	R1a
Fitness score	58.4	34.3	56.4	18.7	43.1	40.2	31	43.7	40.2
Probability, %	99.1	16.5	100	3.6	100	100	99.8	87.4	100
Подтверждение SNaPshot	R1b	*	R1a	Q	*	R1a	*	N	R1a

Примечание. Полужирным шрифтом с подчеркиванием выделены локусы, относящиеся к так называемому минимальному гаплотипу (Minimal “YHRD” Core Loci); “—” — получить устойчивые результаты типирования данного локуса не представилось возможным; NA — сокращенное от Null Allele; “*” — Y-гаплогруппа с использованием метода SNaPshot не установлена; C3 — устаревшая классификация (в новом дереве нет гаплогруппы C3) [41].

У скелетов № 656 и 1564, при типировании локуса *DYS447* выявлен редкий аллель 30. Хотя краиниологическое исследование показало, что у этих скелетов были европеоидные типы, этот аллель почти никогда не встречается в европейских популяциях [53]. Вместо этого он наблюдается с низкой частотой в азиатских популяциях, таких как монголы и таджики (где его частота составляет 0.0188 и 0.007 соответственно) [54]. Используя алгоритмы онлайн-ресурса “Haplogroup Predic-

tor” [39], было установлено, что Y-хромосомы обоих скелетов (№ 656, 1564) принадлежат к гаплогруппе C3 (устаревшая классификация), которая в основном встречается среди жителей Восточной Азии [55].

Также стоит отметить, что несмотря на высокую активность ДНК-матриц, выделенных из костных фрагментов скелета № 656, в ходе проведения мультилокусных ПЦР с помощью тест-систем Yfiler и CordYs не удалось получить ампликоны локуса

Таблица 5. Выявленные совпадения в базе “YHRD” на 20.04.2020 г.

“YHRD”		№ 67		№ 531		№ 1251		№ 1986	
Yfiler-гаплотип	Количество совпадений в базе	7/246821		3/246821		0/246821		0/246821	
	Страна/частота совпадений	Китай	7/103994	Афганистан	3/743	—		—	
Минимальный гаплотип	Количество совпадений в базе	88/307169		255/307169		0/307169 43/307169*		14/307169	
	Страна/частота совпадений	Казахстан	15/741	Афганистан	48/743	Литва*	3/634	Индия	3/6121
		Узбекистан	3/176	Эстония	3/186	Венгрия*	3/1641	Испания	2/8369
		Афганистан	3/743	Пакистан	32/3136	Словакия*	2/1201	Китай	3/106194
		Россия	7/3954	Латвия	2/197	Бельгия*	2/1628	—	—
		Китай	55/106194	Словакия	7/1201	Швейцария*	2/1698	—	—
		—	—	Норвегия	11/1574	Индия*	5/6121	—	—
		—	—	Великобритания	16/4351	Россия*	2/3954	—	—
		—	—	Польша	19/7974	Польша*	3/7974	—	—
		—	—	Россия	10/3954	—	—	—	—
—		—	Индия	23/6121	—	—	—	—	
—	—	Иран	6/2565	—	—	—	—		
—	—	Китай	19/106194	—	—	—	—		

Примечание. “*” — при расчете частот минимального гаплотипа locus DYS385 не учитывали, “—” — отсутствие данных.

DYS448, что, вероятно, связано с мутацией (или мутациями) в месте (местах) специфического отжига праймеров. Согласно базе данных Y-гаплотипов “YHRD” нулевой аллель (Null allele) локуса *DYS448* встречается довольно часто – зарегистрировано 729 случаев, что на 1–2 порядка превышает аналогичные показатели для остальных исследованных Y-STR-локусов.

С помощью онлайн-ресурса “Haplogroup Predictor” [39] по результатам типирования 20 микросателлитных локусов Y-хромосомы было предсказано наличие гаплогруппы R у четырех скелетов из девяти. Дальнейшие исследования сипов M207, M420 и M343 подтвердили результаты “Haplogroup Predictor”, что Y-хромосомы четырех из исследованных скелетов принадлежат к гаплогруппе R. Скелет № 67 имеет R1b гаплогруппу, а ДНК остальных трех скелетов, № 531, 1251 и 1986, относятся к гаплогруппе R1a.

В результате типирования Y-STR скелета № 67 был выявлен редкий аллель 19 локуса *DYS390*, частота которого по данным базы “YHRD” составляет 1.09×10^{-3} . Этот аллель в основном встречается в азиатских популяциях, таких как казахи (с частотой 0.0283), узбеки (с частотой 0.0227) и полинезийцы Французской Полинезии (с частотой 0.0167) [35, 36]. Кроме того, у скелета № 67 в локусе *DYS439* был выявлен редкий аллель 14, присутствующий в основном полинезийцам Французской Полинезии и ласцам с частотами 0.2778 и 0.1111 соответственно.

Согласно ресурсу “YHRD” [35, 36] 17-локусный гаплотип системы Yfiler, характерный для скелета № 67, обнаружен в Китае, тогда как минимальный 9-локусный Y-гаплотип (*DYS19*, *DYS389I*, *DYS389II*, *DYS390*, *DYS391*, *DYS392*, *DYS393*, *DYS385a*, *DYS385b*) распространен по всей Азии: в Китае, а также в Казахстане, Узбекистане, Афганистане (табл. 5).

17-Локусный гаплотип системы Yfiler скелета № 531 с Y-гаплогруппой R1a обнаружен только в Афганистане (табл. 5). Его минимальный Y-гаплотип также наиболее распространен в Афганистане, где его частота достигает 6.5%. В противоположность этому 17-локусные Y-гаплотипы для двух других скелетов, принадлежащих к гаплогруппе R1a (№ 1251, 1986), были уникальными для базы Y-HRD. Для скелета № 1251 его минимальный 9-локусный гаплотип уникален, тогда как гаплотип скелета № 1986 встречается с крайне низкой частотой в различных популяциях (индейцы, испанцы и китайцы (0.049, 0.039 и 0.003% соответственно)).

Дальнейшее сравнение было сделано с открытыми базами данных FamilyTreeDNA.com, а именно с проектами “R1b and Subclades Project for

R1b” [56], “R1b Basal Subclades” [57], “R-U152 and Subclades Research Project” [58] для образца № 67. Для образцов № 531, 1251, 1986 было проведено сравнение с базой FamilyTreeDNA.com “R1a1a and Subclades Y-DNA Project” [59]. Сравнение проводилось по минимальному гаплотипу (*DYS389I*, *DYS390*, *DYS389II*, *DYS19*, *DYS385a*, *DYS385b*, *DYS393*, *DYS391*, *DYS392*). Для образца № 67 было найдено 22 совпадения в популяциях по всей Евразии; для № 531 было выявлено 56 совпадений, в основном из европейских стран; а для образцов № 1251, 1986 обнаружено всего несколько совпадений в европейских странах.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании проанализирована вариация Y-хромосомы девяти хазарских скелетов, датированных концом VII–началом IX в. нашей эры. Путем генотипирования Y-STR и Y-SNP были определены Y-гаплогруппы и охарактеризованы Y-гаплотипы исследованных останков. Обнаружены как западноевразийские (G2a, R1a, R1b), так и восточноазиатские (C2, N1a, Q) Y-гаплогруппы.

При сравнении результатов молекулярно-генетического анализа с данными антропологических типов, определенных с помощью краниологического анализа, были выявлены некоторые несоответствия в отношении географического происхождения Y-гаплогрупп и биологического происхождения, предсказанного из краниологических исследований. Эти результаты свидетельствуют о сложном генетическом происхождении изучаемых объектов.

Сравнение полученных результатов с данными предыдущих генетических исследований этих же останков [24] показало, что ни один из скелетов не имеет 100%-ного западноевразийского генетического происхождения. Процент восточноазиатских предков варьировался от 10 (№ 1251) до 75 (№ 1566).

Установлено соответствие Y-гаплогруппы скелета № 619 (Q) с прогнозируемым краниологическим типом, в то время как у скелетов № 457 (G2a) и 1566 (N1a) такое соответствие не обнаружено. Кроме того, люди с восточноазиатской гаплогруппой C2b1a1b1 имели европеоидный (№ 656) и смешанный европеоидно-монголоидный (№ 1564) краниологические типы.

Наблюдаемый сложный паттерн генетического сродства также наблюдался в данных полногеномного анализа исследованных останков. Скелет № 656 демонстрирует генетическое сходство с башкирами и киргизами, а № 1564 генетически сходен с лезгинами [24]. При этом все популяции имеют смешанное генетическое происхождение.

Кроме того, для скелета № 619 выявлено генетическое сходство с популяциями Ближнего Востока, а для скелета № 1566 – с популяциями Восточной Азии.

С точки зрения происхождения исследованных костных останков хазар по материнской линии ранее было установлено, что скелеты № 619, 1564 имели гаплогруппы митохондриальной ДНК (мтДНК), свойственные населению Западной Евразии (H1a3 и H13c1 соответственно), а скелеты № 656, 1566 – гаплогруппы мтДНК Восточной Евразии (C4a1 и D4b1a1a соответственно) [24].

Этот паттерн соответствовал индивидуумам, имеющим Y-хромосомы, принадлежащие к гаплогруппе R (скелеты № 67, 531, 1251, 1986). Среди принадлежащих к гаплогруппе R1a скелеты № 531 и 1251 имеют европеоидный антропологический тип, а скелет № 1986 классифицируется как смешанный европеоидно-монголоидный тип. Напротив, скелет № 67 принадлежит к гаплогруппе R1b, наиболее распространенной в Европе, и имеет монголоидный краниологический тип [24].

Данные результаты исследования Y-хромосомы согласуются с данными полногеномного анализа исследованных останков. Скелет № 67 имеет тесную генетическую связь с казахами, бурятами и ханьцами [24]. Кроме того, скелеты № 531, 1251 генетически сходны с популяциями Ближнего Востока, а скелет № 1986 – сходен с популяциями Восточной Азии.

Скелеты № 1251, 531 относятся к митогруппе, распространенной в Европе, на Кавказе, в Турции и на Ближнем Востоке (H5b и X2e соответственно). В отличие от этого скелет № 1986 имеет митогруппу C4a1c, которая обычно наблюдается в Восточной Азии [24], а скелет № 67 с гаплогруппой Y-хромосомы R1b имеет типичную для Восточной Азии митогруппу D4e5. Таким образом, независимо от части анализируемого генома, образцы хазар показали смешанную генетическую родословную [24].

Подводя итог, можно сказать, что анализ древней ДНК костных останков человека из хазарских археологических комплексов, представленный в настоящем и предыдущем исследованиях, выявил среди них значительное генетическое разнообразие. Результаты генетического исследования не полностью соответствуют биологическому происхождению, предсказанному из антропологических исследований или их общей этнокультурной принадлежности. Это разнообразие, вероятно, произошло в результате этнической консолидации, возникшей в результате военных и политических конфедераций изначально разнообразных

племен во время образования Хазарского каганата. Фактически сочетание биологического разнообразия в этнических и социальных группах наблюдается с раннего железного века в Восточной Евразии (Сибирь и Центральная Азия) и с первых веков Общей эпохи в восточноевропейских степях [60]. Смешанные антропологические типы также типичны для современных народов, как это видно из недавних широкомасштабных генетических исследований современных татар [61]. Таким образом, мы приходим к выводу, что хазарская знать раннего средневековья имела смешанную географическую родословную, отражающую тысячелетний процесс этногенеза и формирования населения.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Правительства Российской Федерации № 075-15-2019-1879 “От палеогенетики до культурной антропологии: комплексное междисциплинарное исследование традиций народов трансграничных регионов: миграции, межкультурное взаимодействие и картина мира”. Пробоподготовка биологических образцов выполнена в рамках реализации госзадания ЮНЦ РАН, № гр. проекта 01201363186.

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.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Артамонов М.И.* История хазар. Л.: Изд-во гос. Эрмитажа, 1962. 523 с.
2. *Плетнева С.А.* Хазары. М.: Наука, 1976. 96 с.
3. *Новосельцев А.П.* Хазарское государство и его роль в истории Восточной Европы и Кавказа. М.: Наука, 1990. 264 с.
4. *Калинина Т.М.* Хазарский каганат // Кочевые империи Евразии: особенности исторической динамики / Под ред. Базарова Б.В., Крадина Н.Н. М.: Наука-Вост. лит., 2019. С. 214–232.
5. *Шорохов В.А.* Хазарский каганат и сфера его влияния в IX в. (по данным “Анонимной записки” и “Книги путей и стран” Ибн Хордадбега) // Труды исторического факультета Санкт-Петербургского ун-та. 2010. С. 88–98.
6. *Ludwig D.* Struktur und gesellschaft des Chazaren-Reiches im Licht der schriftlichen Quellen. Berlin, 1982. P. 127–156.
7. *Флёров В.С.* Цимлянский комплекс хазарского времени на Нижнем Дону // Поволжская археоло-

- гия. 2015. Т. 11. № 1. С. 4–40.
<https://doi.org/10.24852/pa2015.1.11.4.39>
8. *Флёров В.С.* “Города” и “замки” Хазарского каганата: Археологическая реальность. М.: Мосты культуры/Гешарим, 2011. 264 с.
 9. *Афанасьев Г.Е.* О территории Хазарского каганата и хазарского “домена” в IX веке // Дивногорский сборник. Воронеж, 2016. Вып. 6. С. 41–72.
 10. *Очир-Горяева М.А., Ситдииков А.Г., Кияшко Я.А., Нага Т.* К изучению памятника эпохи раннего средневековья Башанта-II // Поволжская археология. 2016. Т. 18. № 4. С. 23–36.
<https://doi.org/10.24852/pa2016.4.18.23.36>
 11. *Очир-Горяева М.А., Ситдииков А.Г., Кекеев Э.А., Буратаев Е.Г.* Первые результаты археологических раскопок на поселении эпохи раннего средневековья Башанта-II // Бюл. Калмыцкого науч. Центра РАН. 2017. № 3(3). С. 12–55.
<https://doi.org/10.22162/2587-6503-2017-3-3-12-55>
 12. *Афанасьев Г.Е., Атавин А.Г.* Что же такое хазарский погребальный обряд? (Проблемы материала, археологического анализа и интерпретации) // Хазары: Тез. Второго Междунар. коллоквиума. М., 2002. С. 11–14.
 13. *Глебов В.П., Иванов А.А.* Кочевническое погребение хазарского времени из курганного могильника Таловый II Дону // Средневековые древности Дона: Материалы и исследования по археологии Дона / Под ред. Гугуева Ю.К. М.: Мосты культуры/Гешарим, 2007. С. 154–176.
 14. *Иванов А.А., Копылов В.П.* Хазарские серебряные поясные наборы из курганов междуречья Дона и Сала // Донская археология. 2000. № 1. С. 81–90.
 15. *Иванов А.А.* Раннесредневековые подкурганные кочевнические захоронения второй половины VII–первой половины IX в. Нижнего Дона и Волго-Донского междуречья: Дис. ... канд. ист. наук. Волгоград: Волгоград. гос. ун-т, 2000. 252 с.
 16. *Иванов А.А., Копылов В.П., Науменко С.А.* Поясные наборы из курганов хазарского времени междуречья Дона и Сала // Донская археология. 2000. № 1. С. 84–85.
 17. *Копылов В.П., Иванов А.А.* Погребение знатного воина хазарского времени из могильника Саловский // Средневековые давности Дона: Сб. статей. М.: Мосты культуры/Гешарим, 2007. С. 119–153.
 18. *Науменко В.Е.* К вопросу об образовании Хазарского каганата // Хазарский альманах. Харьков, 2004. Т. 2. С. 64–70.
 19. *Науменко С.А.* Отчет об исследованиях в зоне строительства Цимлянской оросительной системы в 1989 году // Архив археол. лаб. РГУ. 1990. Ф-12, д. 5.
 20. *Гинзбург В.В.* Антропологические данные по этногенезу хазар // Сов. этнография. 1946. № 2. С. 81–86.
 21. *Балабанова М.А.* Особенности антропологического состава погребальных комплексов хазарского времени // Некоторые актуальные проблемы современной антропологии. СПб.: МАЭ РАН, 2006. С. 59–61.
 22. *Балабанова М.А.* Антропологическая структура населения хазарского времени восточноевропейских степей // Население Юга России с древнейших времен до наших дней (Донские антропологические чтения). Ростов-на-Дону, 2013. С. 76–79.
 23. *Батиева Е.Ф.* Антропология населения Нижнего Подонья в хазарское время // Донская археология. Ростов-на-Дону. 2002. № 3–4. С. 71–101.
 24. *Mikheyev A.S., Qiu L., Zarubin A. et al.* Diverse genetic origins of medieval steppe nomad conquerors // Biorxiv, December 16, 2019.
<https://doi.org/10.1101/2019.12.15.876912>
 25. *Савченко Е.И.* Отчет об исследованиях археологических памятников в зоне строительства Мартыновской оросительной системы в 1981 г. // Архив археол. лаб. РГУ. 1981. Ф-10, д. 2/1.
 26. *Ильюков Л.С.* Отчет об исследовании курганного могильника у х. Нового Мартыновского района Ростовской области в 1982 году // Археол. лаб. РГУ. 1983. Ф-10, д-1.
 27. *Науменко С.А.* Отчет об исследованиях в зоне строительства Цимлянской оросительной системы в 1986 г. // Археол. лаб. РГУ. 1987. Ф-12, д-2.
 28. *Парусимов И.Н.* Раскопки курганов в Зимовниковском районе. Могильник Кутейникова И.И. // Тр. Новочеркасской археол. экспедиции. 1998. № 3. С. 15–16.
 29. *Ильюков Л.С., Максименко В.Е., Ключников В.В., Гуркин С.В.* Исследование нижнедонских Частых курганов в 2001 году // Историко-археологические исследования в г. Азове и на Нижнем Дону в 2001 году. Вып. 18. Азов, 2002. С. 162–163.
 30. *Глебов В.П.* Раннесредневековое погребение из курганного могильника Таловый II // Историко-археологические исследования в г. Азове и на Нижнем Дону в 2001 году. Вып. 21. Азов, 2006. С. 86–89.
 31. *Алексеев В.П., Дебец Г.Ф.* Краниометрия // Методика антропологических исследований. М.: Наука, 1964. 128 с.
 32. *Батиева Е.Ф.* Антропология погребения хазарского времени из могильника Таловый II // Средневековые древности Дона: Материалы и исследования по археологии Дона. Вып. II. М.: Мосты культуры/Гешарим, 2007. С. 177–181.
 33. *Корниенко И.В., Фалеева Т.Г., Махоткин М.А. и др.* Инновационный метод выделения древней ДНК // Материалы Междунар. науч. конф. “Азак и мир вокруг него” (Азов, 14–18 октября 2019 г.). Азов, 2019. С. 268–271.
 34. *Корниенко И.В., Харламов С.Г.* Методы исследования ДНК человека. Выделение ДНК и ее количественная оценка в аспекте судебно-медицинского исследования вещественных доказательств биологического происхождения: учебно-методическое пособие. Ростов-на-Дону: ЮФУ, 2012. 216 с.

35. Willuweit S., Roewer L. Y chromosome haplotype reference database (YHRD): update // *Forensic Sci. Intern.: Genetics*. 2007. V. 1. № 2. P. 83–87. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2007.01.017>
36. Y chromosome haplotype reference database (YHRD) <https://yhrd.org> (дата обращения: 20.04.2020).
37. Athey T.W. Haplogroup prediction from Y-STR values using an allele frequency approach // *J. Genet. Geneal.* 2005. V. 1. P. 1–7.
38. Emmerova B., Ehler E., Comas D. et al. Comparison of Y-chromosomal haplogroup predictors // *Forensic Sci. Intern.: Genetics Suppl. Series*. 2017. V. 6. P. 145–147. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2017.09.025>
39. Онлайн-программа “Haplogroup Predictor” <http://www.hprg.com/hapest5/index.html> (дата обращения: 20.04.2020).
40. Онлайн программа Y-DNA Haplogroup Predictor – NEVGEN <https://www.nevgen.org/> (дата обращения: 20.04.2020).
41. International society of genetic genealogy. Y-DNA haplogroup C and its subclades – 2019–2020. <https://docs.google.com/spreadsheets/d/1XTMjVny-bYEFj4mL1UwzDACTy9fZdCbENwdfvKWETO/edit#gid=928240711> (дата обращения: 20.04.2020).
42. Underhill P., Poznik G., Rootsi S. et al. The phylogenetic and geographic structure of Y-chromosome haplogroup R1a // *Eur. J. Hum. Genet.* 2015. V. 23. P. 124–131. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.50>
43. Luccote G. The major Y-chromosome haplotype XI – haplogroup R1a in Eurasia // *Hered. Genet.* 2015. V. 4. № 2. P. 1000150. <https://doi.org/10.4172/2161-1041.1000150>
44. Sharma S., Rai E., Sharma P. et al. The Indian origin of paternal haplogroup R1a1* substantiates the autochthonous origin of Brahmins and the caste system // *J. Hum. Genet.* 2009. V. 54. P. 47–55. <https://doi.org/10.1038/jhg.2008.2>
45. Adams S.M., King T.E., Bosch E., Jobling M.A. The case of the unreliable SNP: recurrent back-mutation of Y-chromosomal marker P25 through gene conversion // *Forensic Sci. Intern.* 2005. V. 159. № 1. P. 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.06.003>
46. Helgason A., Sigurðardóttir S., Nicholson J. et al. Estimating scandinavian and gaelic ancestry in the male settlers of Iceland // *Am. J. Hum. Genet.* 2000. V. 67. № 3. P. 697–717. <https://doi.org/10.1086/303046>
47. Semino O., Passarino G., Oefner P.J. et al. The genetic legacy of paleolithic *Homo sapiens sapiens* in extant Europeans: A Y chromosome perspective // *Science*. 2000. V. 290. № 5494. P. 1155–1159. <https://doi.org/10.1126/science.290.5494.1155>
48. Wu Q., Cheng H., Sun N. et al. Phylogenetic analysis of the Y-chromosome haplogroup C2b-F1067, a dominant paternal lineage in Eastern Eurasia // *J. Hum. Genet.* 2020. V. 65. P. 823–829. <https://doi.org/10.1038/s10038-020-0775-1>
49. Shi H., Qi X., Zhong H. et al. Genetic evidence of an East Asian origin and paleolithic Northward migration of Y-chromosome haplogroup N // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 6. P. 66102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066102>
50. Cinnioğlu C., King R., Kivisild T. et al. Excavating Y-chromosome haplotype strata in Anatolia // *Hum. Genet.* 2004. V. 114. № 2. P. 127–148. <https://doi.org/10.1007/s00439-003-1031-4>
51. Rootsi S., Myres N.M., Lin A.A. et al. Distinguishing the co-ancestries of haplogroup G Y-chromosomes in the populations of Europe and the Caucasus // *Eur. J. Hum. Genet.* 2012. V. 20. № 12. P. 1275–1282. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.86>
52. Zegura S.L., Karafet T.M., Zhivotovsky L.A., Hammer M.F. High-resolution SNPs and microsatellite haplotypes point to a single, recent entry of native American Y chromosomes into the Americas // *Mol. Biol. Evol.* 2004. V. 21. № 1. P. 164–175. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh009>
53. Seman A., Abu Bakar Z., Isa M.N. First Y-short tandem repeat categorical dataset for clustering applications // *Dataset Papers in Biology*. 2013. V. 2013. Article ID 364725. P. 1–9. <https://doi.org/10.7167/2013/364725>
54. Di Cristofaro J., Pennarun E., Mazières S. et al. Afghan hindu kush: Where Eurasian sub-continent gene flows converge // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 10. P. 76748. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076748>
55. Malyarchuk B., Derenko M., Denisova G. et al. Phylogeography of the Y-chromosome haplogroup C in Northern Eurasia // *Ann. Hum. Genet.* 2010. V. 74. № 6. P. 539–546. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.2010.00601.x>
56. База данных FamilyTreeDNA.com, проект “R1b and Subclades Project for R1b”. <https://www.familytreedna.com/public/r1b?iframe=yresults> (дата обращения: 20.04.2020).
57. База данных FamilyTreeDNA.com, проект “R1b Basal Subclades”. <https://www.familytreedna.com/public/R1bBasalSubclades?iframe=yresults> (дата обращения: 20.04.2020).
58. База данных FamilyTreeDNA.com, проект “R-U152 and Subclades Research Project”. <https://www.familytreedna.com/public/r1b?iframe=yresults> (дата обращения: 20.04.2020).
59. База данных FamilyTreeDNA.com, проект “R1a1a and Subclades Y-DNA Project”. <https://www.familytreedna.com/public/R1a?iframe=yresults> (дата обращения: 20.04.2020).
60. Чикишева Т.А. Динамика антропологической дифференциации населения юга Западной Сибири в эпохи неолита – раннего железа. Новосибирск: ИАЭТ СО РАН, 2012. 468 с.
61. Балановская Е.В., Агджоян А.Т., Жабегин М.К. и др. Татары Евразии: своеобразие генофондов крымских, поволжских и сибирских татар // *Вестник МГУ. Серия XXIII. Антропология*. 2016. № 2. С. 75–85.

Y-Chromosome Haplogroup Diversity in Khazar Burials from Southern Russia

**I. V. Kornienko^{a, b, *}, T. G. Faleeva^{a, b, c, d}, T. G. Schurr^e, O. Yu. Aramova^{a, c}, M. A. Ochir-Goryaeva^a,
E. F. Batieva^f, E. V. Vdovchenkov^c, N. E. Moshkov^{g, h, i}, V. V. Kukanova^a,
I. N. Ivanov^j, Yu. S. Sidorenko^{b, k}, and T. V. Tatarinova^{l, m, n, o}**

^a*Kalmyk Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Elista, 358000 Russia*

^b*Federal Research Center The Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Rostov-on-Don, 344006 Russia*

^c*Southern Federal University, Rostov-on-Don, 344090 Russia*

^d*111th Main State Center of Medical Forensic and Criminalistics Examinations, Branch № 2, Rostov-on-Don, 344000 Russia*

^e*The University of Pennsylvania Museum of Archeology and Anthropology, Philadelphia, PA, 19104 USA*

^f*Azov Historical, Archaeological and Paleontological Museum-Reserve, Azov, 346780 Russia*

^g*Synthetic and Systems Biology Unit, Biological Research Centre, Szeged, 6726 Hungary*

^h*Doctoral School of Interdisciplinary Medicine, University of Szeged, Szeged, 6720 Hungary*

ⁱ*National Research University Higher School of Economics, Moscow, 101000 Russia*

^j*Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, 191015 Russia*

^k*National Medical Oncology Research Center, Rostov-on-Don, 344037 Russia*

^l*Department of Biology, University of La Verne, La Verne, California, CA, 91750 USA*

^m*Siberian Federal University, Krasnoyarsk, 660041 Russia*

ⁿ*Kharkevich Institute for Information Transmission Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127051 Russia*

^o*Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

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

Genetic studies of archaeological burials open up new possibilities for investigating the cultural-historical development of ancient populations, providing objective data that can be used to investigate the most controversial problems of archeology. In this work, we analyzed the Y-chromosomes of nine skeletons recovered from elite burial mounds attributed to the 7th–9th centuries of the Khazar Khaganate in the modern Rostov region. Genotyping of polymorphic microsatellite loci of the Y chromosome made it possible to establish that among the nine skeletons studied, three individuals had R1a Y-haplogroup, two had C2b, and one each had G2a, N1a, Q, and R1b Y-haplogroups. Such results were noteworthy for the mixture of West Eurasian and East Asian paternal lineages in these samples. The Y-chromosome data are consistent with the results of the craniological study and genome-wide analysis of the same individuals in showing mixed genetic origins for the early medieval Khazar nobility. These findings are not surprising in light of the history of the Khazar Khaganate, which arose through its separation from the Western Turkic Khaganate and establishment in the North Caucasus and East European steppes.

Keywords: Khazars, East European steppes, burial mounds, ancient DNA, Y-STR, Y-SNP.

ДНК-ШТРИХКОДИРОВАНИЕ: ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ

© 2021 г. Д. М. Шадрин*

Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения
Российской академии наук, Сыктывкар, 167982 Россия

*e-mail: shdima@ib.komisc.ru

Поступила в редакцию 16.05.2020 г.

После доработки 09.07.2020 г.

Принята к публикации 25.08.2020 г.

Метод ДНК-штрихкодирования в руках опытного таксономиста становится надежным инструментом, позволяющим быстро и точно проводить идентификацию и инвентаризацию биоразнообразия. Благодаря простоте исполнения и экономической выгоде данный метод, помимо основного своего предназначения — описания и обнаружения новых видов живых организмов, приобрел популярность и в других сферах человеческой деятельности. Представлены примеры использования и показан потенциал метода ДНК-штрихкодирования живых организмов в таких областях, как экологический мониторинг (выявление инвазивных видов, паразитов и их переносчиков, насекомых-вредителей), пищевая и фармацевтическая промышленности (выявление фальсификатов, определение качества продукции) и криминалистика.

Ключевые слова: ДНК-штрихкодирование, применение, таксономия, экология, фармакогнозия, криминалистика.

DOI: 10.31857/S0016675821040135

За последние полтора десятка лет опубликовано много работ, посвященных методу ДНК-штрихкодирования (ДНК-ШК) и раскрывающих суть и принципы данного подхода [1–7], в связи с чем позволим себе не останавливаться на этом. Упомянем лишь о том, что пару десятилетий назад Хеберт предложил разработать международную программу “Barcode of Life”, суть которой сводилась к определению нуклеотидной последовательности одного и того же короткого участка ДНК у представителей всех видов живых существ на Земле. Этот короткий участок впоследствии должен был стать своеобразным ДНК-штрихкодом видового разнообразия планеты [8, 9]. Консорциумом программы “Barcode of Life” (CBOL) был регламентирован перечень маркерных последовательностей, которые могут быть использованы в качестве ДНК-штрихкода для идентификации представителей царства растений, животных и грибов. Для растений — это пластидные гены *rbcL*, *matK* и межгенный спейсер *trnH-psbA*, а также ядерный внутренний транскрибируемый спейсер 2 (ITS2); для животных — митохондриальный ген первой субъединицы цитохромоксидазы (*COI*); для грибов — внутренние транскрибируемые спейсеры 1 и 2 (ITS1 и ITS2) [2, 10, 11]. Первая программа “Barcode 500K” была завершена в 2015 г. В настоящее время реализуется второй крупный международный проект “BIOSCAN” (2019–2026 гг.),

который является логическим продолжением программы “Barcode 500K”. Основная задача нового проекта заключается в выявлении изменений в биоразнообразии планеты в ответ на действие антропогенных факторов. Если целью проекта “Barcode 500K” было получить последовательности ДНК-штрихкодов для 500 тыс. видов, то целью проекта “BIOSCAN” является получение последовательностей ДНК-штрихкодов для более двух миллионов видов, обитающих на планете (<https://ibol.org/programs/bioscan/>). С учетом роста количества работ с применением высокопроизводительного секвенирования для целей ДНК-ШК — это вполне выполнимая задача [12–15]. Отметим, что вышеупомянутый тезис нельзя отнести к методу ДНК-метабаркодинга, несмотря на то что его методическое исполнение основано на использовании высокопроизводительного секвенирования. ДНК-метабаркодинг — это идентификация таксономического состава того или иного сообщества с использованием генов баркодов [16]. Идентификация набора выявленных таксонов — это идеальный случай результата данного метода, но часто приходится оперировать операционными таксономическими единицами (OTU) или рекомендованными вместо них точными вариантами си-квенсов (ESV) [16, 17]. ДНК-ШК или ДНК баркодинг — это идентификация конкретного образца в идеале до вида [5]. Таким образом, ис-

пользование ставшего столь популярным метода ДНК-метабаркодинга с целью идентификации представителей исследуемого биоразнообразия до вида будет иметь смысл только при наличии в библиотеке ДНК-штрихкодов эталонных маркерных последовательностей для всех образцов. Эталонные последовательности, в свою очередь, можно получить только систематическим секвенированием как впервые обнаруженных видов, так и видов уже имеющихся в коллекциях [18, 19]. В противном случае мы будем иметь гигантский набор последовательностей, никак не позволяющих себя идентифицировать.

Метод ДНК-ШК находится в непрерывном процессе разработки и совершенствования. Это связано с тем, что рекомендованные SVOB последовательности для ряда организмов достаточно консервативны на видовом уровне, а для некоторых наоборот обладают выраженным внутривидовым полиморфизмом, все это требует поиска и применения новых маркерных последовательностей и их комбинаций, с последующей верификацией протокола использования [20–23].

Результаты анализа последовательностей ДНК обычно изображаются в виде филогении (филогенетическое дерево с узлами и ветвями). Информация, полученная из филогений, может использоваться для составления гипотез о процессах видообразования, биогеографии, эволюции генов, ко-эволюции, сохранения природы и экологии. Метод ДНК-ШК изначально был предложен как дополнительный инструмент для быстрой идентификации таксономического биоразнообразия. Но развиваясь данный метод помимо своего основного предназначения (изучение биоразнообразия) начал использоваться во многих других сферах деятельности человека. Любая классификация областей применения данного метода будет условной, так как в конечном счете все они сводятся к идентификации образца в лучшем случае до вида. Тем не менее нами были выделены две группы. В первую группу вошли сферы использования метода ДНК-ШК, связанные с получением нового знания о биоразнообразии растительного и животного мира (таксономические, экологические исследования и т.п.), которое так или иначе является основой для остальных более утилитарных сфер использования данного метода. Во вторую группу были отнесены такие сферы использования метода ДНК-ШК как фармакогнозия, пищевая промышленность и криминалистика. Данные сферы применения метода ДНК-ШК опираются на уже проделанную классическими и молекулярными систематиками работу по поиску и присваиванию молекулярных баркодов для идентификации той или иной таксономической единицы. Но это не является абсолютным правилом, есть работы, в которых новые молеку-

лярные маркеры разрабатывались в процессе решения той или иной утилитарной задачи [24, 25].

Опираясь на уже имеющиеся обзоры в данной области [26–30] и дополнив их последними исследованиями, нами приведены примеры использования метода ДНК-ШК (ДНК-штрихкодирование, ДНК-метабаркодинг) в различных областях как самостоятельного метода, так и совместно с методом анализа кривых плавления с высоким разрешением (Barcode High Resolution Melting, Bar-HRM). Bar-HRM — относительно недавно появившийся метод, который позволяет обнаружить небольшие различия (до одного нуклеотида) в нуклеотидных последовательностях (баркодах) без необходимости их дальнейшего секвенирования [31]. Метод основан на изменении флуоресценции, вызванной высвобождением интеркалирующего красителя из молекулы ампликона (в случае Bar-HRM — последовательности баркода), медленно деградирующей при постепенном повышении температуры. Данное изменение флуоресценции (профиль плавления) зависит от содержания GC-пар, длины продукта амплификации и комплементарности последовательностей [32].

ДНК-ШК В ТАКСОНОМИИ

Идентификация и подтверждение видовой принадлежности организмов с использованием ДНК-ШК особенно актуальны в тех случаях, когда невозможно или проблематично проведение таксономической экспертизы традиционными методами. Это может быть связано с трудностями морфологического определения, например в случае видов-двойников как среди растений, так и среди животных. За последние несколько лет опубликовано много работ в данной области [33–38], поэтому позволим себе на этом подробно не останавливаться, а приведем лишь некоторые из них. Интересным примером является работа по идентификации 810 образцов трех видов длинноухих летучих мышей (*Plecotus auritus* L., *P. macrobullaris* Kuzjakin, 1965 и *P. austriacus* Fischer, 1829), обитающих в Западной Европе [39]. Использование авторами работы метода ДНК-ШК способствовало пересмотру ареалов распространения изучаемых ими видов летучих мышей [39]. Также трудности таксономического определения традиционными методами могут быть связаны с невозможностью проведения исследований в определенный период онтогенеза организма, соответствующий наличию диагностических признаков, таких как, например, цвет чашелистиков у растений, морфологических признаков плодов и др.

С применением маркеров, используемых в ДНК-ШК, в некоторых случаях можно разделить не только близкородственные виды, но и сорта [22, 40]. Примером этому является работа по разде-

лению сортов декоративного вечнозеленого растения *Tabernaemontana divaricata* (L.) R. Br. [22]. В данной работе было протестировано семь маркеров (*rpoC*, *rpoB*, *matK*, *atpF-atpH*, *rbcL*, *psbK-psbI*, *trnH-psbA*), из которых только пять (*rpoB*, *atpF-atpH*, *psbK-psbI*, *rbcL*, *trnH-psbA*) удалось амплифицировать для дальнейшего использования, при этом только два из пяти показали хорошую разрешающую способность для разделения сортов *T. divaricata* [22]. Данная работа ценна и служит примером поисковой работы. Зачастую в публикациях по ДНК-ШК информация о поиске маркеров остается “за кадром”, и мы видим лишь успешно используемые в качестве ДНК-штрихкода последовательности, что в свою очередь ограничивает доступ к ценной информации.

ДНК-ШК В ЭКОЛОГИИ

Необходимая в экологических исследованиях идентификация видового состава сообществ определенных территорий не всегда может быть выполнена традиционными методами. Это может быть связано как с высокой плотностью сообществ, так и с труднодоступностью мест их нахождения. Благодаря внедрению методов ДНК-ШК появилась возможность быстрой оценки видового состава сообществ, что позволило снять ряд ограничений в их изучении [35]. Проведение экологического мониторинга растительного и животного биоразнообразия с использованием ДНК-ШК позволило к настоящему времени не только помочь идентифицировать известные виды, обитающие в сообществе, но и открыть множество новых. Также использование данного метода в экологическом мониторинге позволило расширить представление о границах распространения сообществ и определить влияние на них факторов окружающей среды, что в свою очередь способствовало в ряде случаев выявлению видов, нуждающихся в охране [26, 41–46].

Довольно интересным аспектом применения ДНК-ШК в экологических исследованиях является анализ диеты вымерших и ныне живущих травоядных животных. Ксионгом с соавт. [47] был исследован рацион двух плотоядных животных из семейства кошачьих — леопардовой кошки (*Prionailurus bengalensis* Kerr, 1792) и золотой кошки (*Catopuma temminckii* Horsfield, 1827), находящихся под угрозой исчезновения, обитающих в экосистеме горных лесов умеренного пояса на юго-западе Китая. В данной работе с использованием ДНК-метабаркодинга из 93 образцов фекалий было идентифицировано 40 таксонов, из которых 27 относились к млекопитающим, 11 — к птицам, один — к ящерицам и один — к рыбам. Трудно не согласиться с авторами, что столь полные сведения о рационе этих кошачьих несут ценную информацию для планирования их со-

хранения. Другим не менее значимым и интересным объектом исследования пищевого рациона с применением метода ДНК-метабаркодинга был находящийся под охраной итальянский заяц (*Lepus corsicanus* De Winton, 1898), являющийся эндемичным видом для Центральной и Южной Италии, экология которого, по мнению авторов, практически не изучена [48]. Исследование рациона питания зайца по анализу фекалий показало наличие в нем большого разнообразия растений (99 таксонов), позволив авторам получить информацию о его пищевых предпочтениях, что имеет большое значение для выбора стратегии сохранения данного вида [48]. В исследовании пищевого рациона диких свиней (*Sus scrofa* L.) по анализу фекалий удалось установить, что их рацион питания значительно различался по составу растений и животных между тремя участками, в которых происходил отбор, тем самым указывая на местообитание каждой из групп [49]. Для достижения полученных результатов авторы [49] разработали блокирующие праймеры, способствовавшие получению большего количества считываний последовательностей. Данное исследование подтверждает вышеупомянутый тезис о том, что метод ДНК-ШК находится в непрерывном развитии и становлении. Еще одним примером использования метода ДНК-ШК в экологических исследованиях является работа по оценке рациона питания травоядных животных на предмет вхождения в него местных и экзотических видов растений. Эриксоном с соавт. [50] была выдвинута гипотеза о том, что численность белохвостого оленя (*Odocoileus virginianus* Zimmermann, 1780) коррелирует с увеличением в его рационе питания инвазивных видов растений. Использование в качестве маркера последовательности гена *rbcL* позволило идентифицировать 72% из полученных ампликонов до вида, из которых 70% принадлежало местной флоре, что указывает на пищевые предпочтения оленей [50]. Подобные исследования, по мнению авторов, очень актуальны, особенно в контексте изучения инвазивных видов и их влияния на экосистемы [50]. Особого внимания заслуживают исследования, направленные на установление пищевого рациона опылителей, имеющие первостепенное значение для сохранения биоразнообразия. Де Вере с соавт. [51] был исследован выбор медоносными пчелами (*Apis mellifera* L.) цветковых растений для сбора нектара в Национальном ботаническом саду Уэльса. В работе установлена тесная связь между фенологией цветущих растений и растений, ДНК которых была извлечена из меда, и показано, что для сбора меда все три исследованные колонии пчел используют только 11% из всех цветущих растений [51]. Подобные исследования могут помочь в разработке стратегии поддержки опылителей путем увеличения числа ви-

дов растений, которым последние отдают предпочтение.

Отдельным направлением использования методов ДНК-ШК в экологических исследованиях можно обозначить изучение экологических сетей, позволяющих разобраться в архитектуре экологических сообществ, включая такие взаимодействия как конкуренция, симбиоз, хищник—жертва, растение—опылитель и др. [42]. Подобных работ мало, так как динамическое связывание биофизических процессов и взаимодействий между видами, которые разворачиваются в совершенно разных пространственно-временных масштабах, не дает возможности в полной мере воспользоваться ресурсом метода ДНК-ШК [43].

Еще одним аспектом применения метода ДНК-ШК в области экологических исследований, в частности экологической безопасности, является идентификация инвазивных видов растений и животных. Точная и быстрая идентификация инвазивных видов является крайне важной задачей, своевременное решение которой может предупредить их распространение. Прежде всего это относится к видам-вредителям сельского хозяйства, а также к видам-переносчикам патогенных микроорганизмов. Например, многие виды комаров трудно поддаются морфологической дифференциации и при этом являются переносчиками различных заболеваний. В подобных случаях метод ДНК-ШК является принципиальным инструментом, который может помочь в быстрой и точной идентификации. Частный пример этого — успешная идентификация 1413 особей антропофаговых комаров семейства Culicidae (Meigen, 1818), обитающих в Мексике и являющихся потенциальными переносчиками патогенов [52]. Авторам путем сравнения последовательностей *COI* удалось идентифицировать практически всех особей, за исключением нескольких близкородственных видов, для идентификации которых было рекомендовано использовать последовательность ITS2 [52]. Еще один пример — работа Шернандес-Триано с соавт. [53], которым с использованием последовательностей гена *COI* в качестве баркода удалось идентифицировать комаров, обитающих в Великобритании. Авторами было идентифицировано 42 вида комаров, из которых семь оказались инвазивными, и показано, что для успешной таксономической идентификации исследуемых видов необходимо совместное применение морфологического и молекулярно-филогенетического анализа [53]. Идентификация инвазивных видов имеет большое значение для экологии отдельных регионов. Беспалой с соавт. [54] с применением метода ДНК-ШК удалось обнаружить и исследовать две митохондриальные линии мидий (*Sinanodonta*) в р. Енисей. В результате проведенного исследования не только была показана возможность успешного совместного вторжения различных видов *Sinanodonta* в одну реку, но и был

сделан вывод о том, что данные виды мидий могут представлять собой упущенную угрозу для пресноводных экосистем России [54]. В исследовании Колесниковой с соавт. [55] с использованием последовательности гена *COI* в качестве баркода был обнаружен инвазивный вид дождевого червя *Dendrodrilus rubidus tenuis* Eisen, 1874 в г. Воркута (Республика Коми, Россия).

Можно отметить, что метод ДНК-ШК стал любимым инструментом среди таксономистов и экологов, так как позволяет не только расширить представление об окружающем биоразнообразии и идентифицировать состав сообществ, но и ответить на вопросы: “что входит в состав рациона питания организмов?”, “к каким последствиям могут привести его изменения?”

ДНК-ШК В ФАРМАКОГНОЗИИ

Знание компонентного состава лекарственного сырья как растительного, так и животного происхождения имеет большое значение. Прежде всего это необходимо для своевременного выявления и избегания фальсификатов на рынке лекарственных препаратов. ДНК-ШК как инструмент для быстрой и точной идентификации состава лекарственного сырья нашел себе достойное применение в данной области. Подтверждением этому является большое количество работ, обсуждающих внедрение протоколов метода ДНК-ШК в государственные фармакопеи как гаранта надежного и высокопроизводительного скрининга растительного сырья [56–61], в том числе в промышленных масштабах [28, 62].

Интересным примером служит исследование по выявлению на рынке Ирана фальсификатов среди лекарственных растений *Ziziphora clinopoidodes* Lam. и *Z. tenuior* L., схожих с *Thymus kotschyanus* Boiss. & Hohen., *Th. vulgaris* L., *Th. daenensis* Celak. и *Th. trautvetteri* Klokov & Des.-Shost как по морфологическим признакам, так и по запаху [23]. В результате данного исследования, которое было проведено с привлечением ДНК-ШК, установлено, что все образцы, взятые на анализ, содержали примеси других видов растений [23]. Еще одним примером использования ДНК-ШК в фармакогнозии является идентификация ядовитых растений, которые так или иначе могут попасть в лекарственное сырье. Так, анализ 106 видов лекарственных растений, входящих в китайскую фармакопею, и связанных с ними ядовитых растений показал, что последовательности ITS2 обладают достаточным уровнем полиморфизма для идентификации ядовитых растений и других примесей растительного происхождения среди исследуемых видов лекарственных растений [21]. В ряде других работ использование последовательностей ITS2 также позволило эффективно разделить схожие по морфологии, но различающиеся по химическому со-

ДНК-ШК В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

ставу близкородственные виды лекарственных растений. Например, в работе Янга с соавт. [63] баркод ITS2 позволил различить корневища *Panax notoginseng* (Burkill) F.H. Chen и *P. vietnamensis* var. *fuscidicus* K. Komatsu, S. Zhu & S.Q. Cai, одно из которых используется для приготовления клинических препаратов. С использованием в качестве баркода последовательностей ITS2 были идентифицированы фенотипически схожие виды лекарственных растений рода *Uncaria* [20], рода *Mucuna* [64], корней и корневищ лекарственного ревеня (*Rheum officinale* Baill., *Rh. palmatum* L. и *Rh. tanguticum* Maxim. семейство Polygonaceae) [65] и лекарственного растения *Spatholobus suberectus* Dunn [66]. В целом высокий полиморфизм последовательностей ITS2, по сравнению с другими маркерами, делает данный фрагмент достаточно популярным в изучении таксономического разнообразия растений. Но встречаются работы, в которых последовательность ITS2 не показала достаточного полиморфизма для идентификации видов, и в качестве ДНК-штрихкода были использованы другие маркерные последовательности ДНК. Например, в исследовании Минга с соавт. [67], посвященном идентификации 15 видов лекарственных растений с использованием последовательностей ITS2, *psbA-trnH*, *rbcL*, *matK*, интрона *trnL* (UAA) и его Р6-петли, было показано, что только интрон *trnL* (UAA) и его Р6-петля являются удачными кандидатами для таксономического разделения исследуемых видов растений. Так, идентификация лекарственного растения *Hypericum perforatum* L. (зверобой продырявленный) с использованием последовательностей ITS2 и *matK*, в совокупности с HRM-анализом, позволила определить, что только последовательность гена *matK* обладает достаточной разрешающей способностью для распознавания вида *H. perforatum* среди других видов рода [68].

Иногда в результате описания таксономического биоразнообразия с использованием молекулярных маркеров идентифицируются виды, которых не предполагалось обнаружить. Так, например, в процессе изучения семи популяций мексиканского лекарственного растения *Galphimia glauca* Cav. (Malpighiaceae), широко используемого в лечении расстройств нервной системы, с применением в качестве молекулярных маркеров последовательностей генов *matK*, *rpoC1* и *rbcL* авторам удалось идентифицировать еще три вида из этого же рода [69].

Можно отметить, что сегодня мониторинг состава лекарственного сырья не обходится без применения методов ДНК-ШК. Совершенствуются протоколы применения тех или иных ДНК-последовательностей, используемых в качестве маркеров для идентификации компонентов лекарственных препаратов, основанных на сырье растительного и животного происхождения.

Рынок продуктов питания непрерывно растет, в связи с чем контроль качества продуктов является актуальной задачей, в том числе на предмет обнаружения в них примесей растительного и животного происхождения. Особенно востребован на сегодняшний день эффективный скрининг продуктов питания на наличие опасных для жизни растительных компонентов и их смесей, являющийся важным и необходимым на всех этапах, от получения сырья до конечного продукта [29, 70, 71]. К тому же быстрая диагностика в случае интоксикации ядовитыми растениями (фрукты, овощи, специи и прочие травосмеси, употребляемые в пищу) необходима для обеспечения максимально надежного лечения. В качестве примера можно привести работу, в которой авторам благодаря использованию молекулярных маркеров (*rbcL*, *matK*, ITS2 и *psbA-trnH*) в сочетании с HRM-анализом удалось успешно идентифицировать ядовитые виды растений *Melientha suaveis* Pierre и *Sauropus androgynus* (L.) Merr., морфологически схожие с употребляемым в пищу видом *Urobotrya siamensis* Hierko [72].

Еще одним аспектом применения метода ДНК-ШК в сфере пищевой промышленности является определение частоты вхождения тех или иных растений в состав готовых пищевых продуктов. Тнах с соавт. [73] с использованием последовательностей гена *rbcL* и межгенного спейсера *trnH-psbA* хлоропластной ДНК в качестве ДНК-штрихкода провел идентификацию 112 видов тропических растений и, основываясь на полученных данных, создал систему определения частоты встречаемости данных видов растений в составе пищевых продуктов.

Частный случай идентификации продуктов питания методом ДНК-ШК — определение компонентного состава специй и чая на рынке пищевой промышленности. В данной продукции фальсификат можно встретить чаще всего [74–77]. В работе Света с соавт. [74] на основании анализа четырех ДНК-локусов (*rbcL*, *matK*, ITS2 и *psbA-trnH*) была проведена идентификация образцов пряности *Myristica fragrans* Houtt. на наличие примеси из *M. malabarica* Lam. в продаваемых специях. Результаты проведенного анализа показали высокий потенциал межгенного спейсера *psbA-trnH* хлоропластной ДНК по сравнению с остальными маркерами [74]. Данный локус имел 60 полиморфных сайтов и девять инделей, специфичных для *M. malabarica* Lam. [74]. В следующем исследовании с использованием метода Var-HRM была показана возможность аутентификации шафрана (*Crocus sativus* L.), являющегося самой дорогой и самой подделываемой пряностью в мире [75]. Используя данный подход, авторы установили, что

последовательности ITS1 и *matK* являются специфичными только на уровне рода *Crocus*, и только последовательность ITS2 специфична для видов *Crocus sativus* L. и *C. cartwrightianus* Herb. [75]. Еще в одной работе с использованием последовательностей ITS2 и *psbA-trnH* было проанализировано 16 типов специй (91 коммерческий продукт) [76]. Использование данных последовательностей в качестве баркодов позволило авторам не только доказать эффективность работы метода ДНК-ШК, но и показать “состояние дел” на рынке пряностей. Большинство проанализированных коммерческих продуктов не соответствовало заявленному составу (было обнаружено различное количество дешевых заменителей с похожим цветом и внешним видом) и только два типа натуральных пряностей (фенхель и солодка) не имели примесей [76]. В следующей работе по применению метода ДНК-ШК, посвященной анализу 133 образцов чая, выращиваемого на о. Тайвань, показано, что использование данного метода может удовлетворить потребность в быстрой и недорогой дифференцировке большого количества чая, производимого как в Тайване, так и за его пределами [77].

Еще одним аспектом применения метода ДНК-ШК в пищевой промышленности может быть повышение социальной осведомленности о забытых, недостаточно используемых видах растений, имеющих ценные питательные свойства. Компонаро с соавт. [78] было показано, что на протяжении всей истории человечества выращивалось около 7000 видов и еще большее количество сортов растений, из которых в настоящее время используется менее 0.5%. Авторы предположили, что введение “новых” (забытых) продуктов растительного происхождения может решить проблему дефицита питания на планете, но для их продвижения и выращивания в глобальном масштабе наряду со знаниями о пригодности для питания человека необходимы надежные системы их идентификации (в том числе ДНК-ШК), чтобы гарантировать адекватную аутентичность по всей цепочке их поставок [78].

Таким образом, определение единичных примесей, преимущественно растительного происхождения, а также состава пищевых продуктов стало возможным благодаря использованию методов ДНК-ШК и ДНК-метабаркодинга. В настоящее время повсеместное распространение данных методов в пищевой промышленности затруднено из-за отсутствия эталонных библиотек и аккредитованных лабораторий [79].

ДНК-ШК В КРИМИНАЛИСТИКЕ

Перспектива применения методов ДНК-ШК в криминалистике в качестве инструмента, позволяющего добыть косвенные улики в расследова-

нии происшествий, не вызывает сомнений. Но для реализации этого направления в данной области необходимо создание собственной референсной базы эталонных образцов растений и животных, которая должна отвечать повышенным требованиям к качеству вводимых данных. Попытки создания такой референсной базы данных для использования в области криминалистики предпринимаются [80]. Имеющиеся на сегодня базы генетических данных, в том числе база данных Barcode of Life Data Systems (BOLD Systems), обладающие повышенными требованиями к качеству вносимой информации, не входят в правовое поле, чтобы быть использованными в сфере криминалистики [81]. Прежде всего это связано с тем, что невозможно установить ответственных за недостоверно внесенную информацию об образце, а также за идентификацию, которую должен проводить, в первую очередь, опытный таксономист с привлечением как классических, так и современных методов, гарантирующих высокий уровень достоверности. Но даже последнее не исключает попадание недостоверных сведений в базу данных BOLD Systems, например во время идентификации образцов в ходе выполнения студенческих проектов [81]. Несмотря на вышеперечисленные сложности, методологическая возможность применения методов ДНК-ШК в данной области представляет большой интерес. Примером такой работы является исследование Фанга с соавт. [82], в котором ими была создана модель тонущего животного с целью проверки гипотезы о возможности определения источника воды по идентификации планктона, обитающего в этой воде, с применением метода ДНК-метабаркодинга. Авторы подтвердили выдвинутую ими гипотезу и заключили, что использование данного метода в качестве инструмента установления источника воды может быть надежным помощником в судебно-медицинской экспертизе [82]. Остатки растений, собранные на месте преступления, также могут служить косвенными уликами в судебной практике после их идентификации [83, 84]. Еще один интересный аспект – возможность применения метода ДНК-метабаркодинга в судебной палинологии, что со временем, по мнению авторов работы, может снять необходимость привлечения палинологов с высоким уровнем специализации [85]. Полагаем, что создание отдельной базы данных ДНК-штрихкодов для использования в криминалистике не является далекой перспективой и со своим появлением разрешит потребность криминалистов в использовании методов молекулярной идентификации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение метода ДНК-ШК для ряда задач имеет существенные ограничения. Одно из таких

ограничений – отсутствие на сегодняшний день полной референсной базы маркерных последовательностей для всех видов. Утверждение Н.И. Абрамсон, сделанное в работе “Молекулярные маркеры, филогеография и поиск критерия разграничения видов”, о том, что “Неполная база данных позволит пользователю лишь определить насколько данная последовательность отличается от остальных уже представленных в базе”, спустя десятилетие не потеряло актуальности [86]. Еще один “подводный камень” – это отсутствие единой точки зрения на то, каким должен быть уровень полиморфизма последовательности ДНК-штрихкода для определенной группы живых организмов, позволяющий хотя бы примерно определить ранг. В настоящее время невозможно дать однозначного ответа на этот вопрос, но некоторые исследователи в данной области полагают, что образцы, для которых уровень изменчивости ДНК-штрихкодов слишком мал, чтобы разделить их на виды, возможно не согласуются с настоящим пониманием границ вида [87]. Для снятия указанных ограничений в применении метода ДНК-ШК необходимо наращивать темпы внесения маркерных последовательностей в базы данных, с повышением требований к качеству и достоверности вносимых данных. Особенно это касается таких сфер применения как фармакогнозия, пищевая промышленность и криминалистика, где цена ошибочной идентификации слишком высокая. Но несмотря на имеющиеся ограничения, метод ДНК-ШК в настоящее время применяется во многих сферах человеческой деятельности, перечень которых намного шире представленного в данной работе. При снятии ключевых ограничений метод ДНК-ШК будет иметь большой потенциал для дальнейшего расширения областей его применения.

Работа была выполнена в рамках государственного задания “Разнообразие растительного мира западного макросклона Приполярного Урала” (AAAA-A19-119011790022-1) и “Распространение, систематика и пространственная организация фауны и населения животных таежных и тундровых ландшафтов и экосистем европейского северо-востока России” (AAAA-A17-117112850235-2).

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. Шнеер В.С. ДНК ШК – новое направление в сравнительной геномике растений // Генетика. 2009. Т. 45. № 11. С. 1436–1448.
2. Hollingsworth P.M. Refining the DNA barcode for land plants // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. P. 19451–19452. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116812108>
3. Li X., Yang Y., Robert J. et al. Plant DNA barcoding: from gene to genome // Biol. Rev. 2015. V. 90. P. 157–166. <https://doi.org/10.1111/brv.12104>
4. Coissac E., Hollingsworth P.M., Lavergne S., Taberlet P. From barcodes to genomes: extending the concept of DNA barcoding // Mol. Ecol. 2016. V. 25(7). P. 1423–1428. <https://doi.org/10.1111/mec.13549>
5. Шеховцов С.В., Шеховцова И.Н., Пельтек С.Е. ДНК-штрихкодирование: методы и подходы // Успехи соврем. биологии. 2019. Т. 139. № 3. С. 211–220. <https://doi.org/10.1134/S0042132419030074>
6. Шнеер В.С., Родионов А.В. ДНК-штрихкоды растений // Успехи соврем. биологии. 2018. Т. 138. № 6. С. 531–537. <https://doi.org/10.7868/S0042132418060017>
7. De Salle R., Goldstein P. Review and interpretation of trends in DNA barcoding // Front. Ecol. Evol. 2019. V. 7. 302. <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00302>
8. Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L. Biological identifications through DNA barcodes // Proc. R. Soc. B. Biol. Sci. 2003. V. 270. № 1512. P. 313–321.
9. Hebert P.D.N., Ratnasingham S., de Waard J.R. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species // Proc. R. Soc. B. Biol. Sci. 2003. V. 270. Suppl. 1. P. 596–599.
10. Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. P. 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
11. Ratnasingham S., Hebert P.D.N. A DNA-based registry for all animal species: The Barcode Index Number (BIN) system // PLoS One. 2013. V. 8(7). e66213. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066213>
12. Massana R., Gobet A., Audic S. et al. Marine protist diversity in European coastal waters and sediments as revealed by high-throughput sequencing // Environmental Microbiol. 2015. V. 17(10). P. 4035–4049. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12955>
13. Valentini A., Taberlet P., Miaud C. et al. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding // Mol. Ecol. 2016. V. 25(4). P. 929–942. <https://doi.org/10.1111/mec.13428>
14. Batovska J., Cogan N.O., Lynch S.E., Blacket M.J. Using next-generation sequencing for DNA barcoding: Capturing allelic variation in ITS2 // Genes, Genomes, Genetics. 2017. V. 7(1). P. 19–29. <https://doi.org/10.1534/g3.116.036145>
15. Schenk J., Fontaneto D. Biodiversity analyses in freshwater meiofauna through DNA sequence data. Review // Hydrobiologia. 2020. V. 847. P. 2597–2611. <https://doi.org/10.1007/s10750-019-04067-2>

16. Семенов М.В. Метабаркодинг и метагеномика в почвенно-экологических исследованиях: успехи, проблемы и возможности // Журн. общей биологии. 2019. Т. 80(6). С. 403–417.
17. Callahan B.J., Mc Murdie P.J., Holme S.P. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis // ISME J. 2017. V. 11(12). P. 2639–2943. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>
18. Dormontt E.E., Van Dijk K., Bell K.L. et al. Advancing DNA barcoding and metabarcoding applications for plants requires systematic analysis of herbarium collections – an Australian perspective // Front. Ecol. Evol. 2018. V. 6. 134. <https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00134>
19. Weigand H., Beermann A.J., Čiamporet F. et al. DNA barcode reference libraries for the monitoring of aquatic biota in Europe: Gap-analysis and recommendations for future work // Sci. Total Environment. 2019. V. 678(15). P. 499–524. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.247>
20. Zhong-Lian Z., Mei-Fang S., Yan-Hong G. et al. DNA barcoding in medicinal plants: Testing the potential of a proposed barcoding marker for identification of *Uncaria* species from China // Biochem. System. and Ecol. 2015. V. 60. P. 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2015.02.017>
21. Liu M., Xi-Wen L.I., Bao-Sheng L. et al. Species identification of poisonous medicinal plant using DNA barcoding // Chinese J. Nat. Medicines. 2019. V. 17(8). P. 585–590. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(19\)30060-3](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(19)30060-3)
22. Jena B., Kumar G.A., Biswal B. et al. Cultivar identification in *Tabernaemontana divaricata* (L.) R. Br. ex Roem. & Schult. using universal barcode markers // Gene Reports. 2019. V. 17. 100467. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2019.100467>
23. Sheidai M., Tabaripour R., Talebi S.M. et al. Adulteration in medicinally important plant species of Ziziphora in Iran market: DNA barcoding approach // Industrial Crops and Products. 2019. V. 130. P. 627–633. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.025>
24. Loneac S.A., Hassanac Q.P., Gupta S. Development of DNA barcode for rapid identification of *Epimedium elatum* (Morren & Decne) from Northwestern Himalayas in India // J. Applied Res. on Medicinal and Aromatic Plants. 2019. V. 13. 100205. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2019.100205>
25. Zahn R.J., Silva A.J., Hellberg R.S. Development of a DNA mini-barcoding protocol targeting COI for the identification of Elasmobranch species in shark cartilage pills // Food Control. 2020. V. 109. 106918. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106918>
26. Joly S., Davies T.J., Archambault A. et al. Ecology in the age of DNA barcoding: The resource, the promise and the challenges ahead // Mol. Ecol. Res. 2014. V. 14. P. 221–232. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12173>
27. Kress J.W. Plant DNA barcodes: Applications today and in the future. Review // J. Systematics and Evol. 2017. V. 55(4). P. 291–307. <https://doi.org/10.1111/jse.12254>
28. Sgamma T., Lockie-Williams C., Kreuzer M. et al. DNA barcoding for industrial quality assurance // Planta Med. 2017. V. 83. P. 1117–1129. <https://doi.org/10.1055/s-0043-113448>
29. Galimberti A., Casiraghi M., Bruni I. From DNA barcoding to personalized nutrition: the evolution of food traceability // Current Opinion in Food Sci. 2019. V. 28. P. 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.07.008>
30. Tilocca B., Costanzo N., Mari V. et al. Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production // J. Prot. 2020. V. 210. 103534. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103534>
31. Sun W., Li J.-J., Xiong C. et al. The potential power of Bar-HRM technology in herbal medicine identification // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. 367. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00367>
32. Xanthopoulou A., Ganopoulos I., Kalivas A. et al. Multiplex HRM analysis as a tool for rapid molecular authentication of nine herbal teas // Food Control. 2016. V. 60. P. 113–116. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.07.021>
33. Beebe N.W. DNA barcoding mosquitoes: advice for potential prospectors. Review // Parasitology. 2018. V. 145(5). P. 622–633. <https://doi.org/10.1017/S0031182018000343>
34. De Oliveira E.A., Penhacek M., Guimaraes K.L. et al. Pristimantis in the Eastern Brazilian Amazon: DNA barcoding reveals underestimated diversity in a megadiverse genus: Review // Mitochondrial DNA. Part A. 2019. V. 30(6). P. 731–738. <https://doi.org/10.1080/24701394.2019.1634696>
35. Bennett R., Blagoev G., Copley C. Araneae of Canada. Review // Zookeys. 2019. V. 819. P. 41–56. <https://doi.org/10.3897/zookeys.819.26391>
36. Abdessamad A.I. Transitions from single- to multi-locus approach in determining cryptic and describing new species within *Beauveria* genus (Cordycipitaceae, Hypocreales): a review // Phytotaxa. 2019. V. 413(4). P. 257–273. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.413.4.1>
37. Arroyave J., Martinez C.M., Stiassny M.L.J. DNA barcoding uncovers extensive cryptic diversity in the African long-fin tetra *Bryconalestes longipinnis* (Alestidae: Characiformes) // J. Fish Biol. 2019. V. 95(2). P. 379–392. <https://doi.org/10.1111/jfb.13987>
38. Cryer J., Wynne F., Price S.J., Puschendorf R. Cryptic diversity in *Lithobates warszewitschii* (Amphibia, Anura, Ranidae) // ZooKeys. 2019. V. 838. P. 49–69. <https://doi.org/10.3897/zookeys.838.29635>
39. Andriollo T., Ruedi M. Novel molecular tools to identify *Plecotus bats* in sympatry and a review of their distribution in Switzerland. Review // Revue Suisse De Zoologie. 2018. V. 125. P. 61–72. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1196013>
40. Пунина Е.О., Мачс Э.М., Крапивская Е.Е. и др. Полиморфные сайты в транскрибируемых спейсерах генов 35S рРНК пионов как индикатор происхождения сортов // Генетика. 2017. Т. 53. № 2. С. 181–191.

41. Ruppert K.M., Kline R.J., Rahman M.S. Past, present and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA // *Global Ecol. and Conservation*. 2019. V. 17. e00547. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00547>
42. Toju H. High-throughput DNA barcoding for ecological network studies // *Popul. Ecol. Review*. 2015. V. 57(1). P. 37–51. <https://doi.org/10.1007/s10144-014-0472-z>
43. Kress W.J., Garcia-Robledo C., Uriarte M., Erickson D.L. DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. Review // *Trends in Ecol. & Evol.* 2015. V. 30(1). P. 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.10.008>
44. Fahner N.A., Shokralla S., Baird D.J. et al. Large-scale monitoring of plants through environmental DNA metabarcoding of soil: recovery, resolution and annotation of four DNA markers // *PLoS One*. 2016. V. 11(6). e0157505. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157505>
45. Hering D., Borja A., Jones J.I. et al. Implementation options for DNA-based identification into ecological status assessment under the European water framework directive // *Water Res.* 2018. V. 138. P. 192–205. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.03.003>
46. Bagley M., Pilgrim E., Knapp M. et al. High-throughput environmental DNA analysis informs a biological assessment of an urban stream // *Ecol. Indicators*. 2019. V. 104. P. 378–389. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.04.088>
47. Xiong M.Y., Wang D.J., Bu H.L. Molecular dietary analysis of two sympatric felids in the Mountains of Southwest China biodiversity hotspot and conservation implications // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. 41909. <https://doi.org/10.1038/srep41909>
48. Buglione M., Maselli V., Ripa D. et al. A pilot study on the application of DNA metabarcoding for non-invasive diet analysis in the Italian hare // *Mamm. Biol.* 2018. V. 88. P. 31–42. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2017.10.010>
49. Robeson M.S., Khanipov K., Golovko G. et al. Assessing the utility of metabarcoding for diet analyses of the omnivorous wild pig (*Sus scrofa*) // *Ecol. Evol.* 2018. V. 8. P. 185–196. <https://doi.org/10.1002/ece3.3638>
50. Erickson D.L., Reed E., Ramachandran P. et al. Reconstructing a herbivore's diet using a novel *rbcL* DNA mini-barcode for plants // *AoB Plants*. 2017. V. 9(3). <https://doi.org/10.1093/aobpla/plx015>
51. De Vere N., Jones L.E., Gilmore T. et al. Using DNA metabarcoding to investigate honey bee foraging reveals limited flower use despite high floral availability // *Sci. Reports*. 2017. 42838. <https://doi.org/10.1038/srep42838>
52. Chan-Chable R.J., Martínez-Arce A., Mis-Avila P.C., Ortega-Morales A.I. DNA barcodes and evidence of cryptic diversity of anthropophilous mosquitoes in Quintana Roo, Mexico // *Ecol. Evol.* 2019. V. 9. P. 4692–4705. <https://doi.org/10.1002/ece3.5073>
53. Hernández-Triana L.M., Brugman V.A., Nikolova N.I. et al. DNA barcoding of British mosquitoes (Diptera, Culicidae) to support species identification, discovery of cryptic genetic diversity and monitoring invasive species // *ZooKeys*. 2019. V. 832. P. 57–76. <https://doi.org/10.3897/zookeys.832.32257>
54. Bessalaya Y.V., Bolotov I.N., Aksenova O.V. et al. DNA barcoding reveals invasion of two cryptic *Sinanodonta mussel* species (Bivalvia: Unionidae) into the largest Siberian river // *Limnologica*. 2017. V. 69. P. 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2017.11.009>
55. Kolesnikova A.A., Baturina M.A., Shadrin D.M. et al. New records of Lumbricidae and Collembola in anthropogenic soils of East European tundra // *ZooKeys*. 2019. V. 885. P. 15–25. <https://doi.org/10.3897/zookeys.885.37279>
56. Shilin C., Xiaohui P., Jingyuan S. et al. A renaissance in herbal medicine identification: From morphology to DNA. Review // *Biotechnol. Adv.* 2014. V. 32. P. 1237–1244. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.07.004>
57. Mishra P., Kumar A., Nagireddy A. et al. DNA barcoding: an efficient tool to overcome authentication challenges in the herbal market // *Plant Biotechnol.* 2015. V. 14(1). P. 8–21. <https://doi.org/10.1111/pbi.12419>
58. Osathanunkul M., Suwannapoom C., Osathanunkul K. et al. Evaluation of DNA barcoding coupled high resolution melting for discrimination of closely related species in phytopharmaceuticals // *Phytomedicine*. 2016. V. 23(2). P. 156–165. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.11.018>
59. Mezzasalma V., Ganopoulos I., Galimberti A. et al. Poisonous or non-poisonous plants? DNA-based tools and applications for accurate identification. Review // *Int. J. Legal. Med.* 2017. V. 131. P. 1–19. <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1460-y>
60. Pei Y.F., Zhang Q.Z., Wang Y.Z. Application of authentication evaluation techniques of ethnobotanical medicinal plant genus *Paris*: a review // *Critical Rev. in Analytical Chem.* 2019. V. 50(5). P. 405–423. <https://doi.org/10.1080/10408347.2019.1642734>
61. Жохова Е.В., Родионов А.В., Повыдыш М.Н. и др. Современное состояние и перспективы использования ДНК ШК и ДНК-фингерпринтинга для анализа качества лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов // *Успехи современной биологии*. 2019. № 1. С. 25–40. <https://doi.org/10.1134/s0042132419010095>
62. Techen N., Parveen I., Pan Z., Khan I.A. DNA barcoding of medicinal plant material for identification // *Curr. Opinion in Biotechnol.* 2014. V. 25. P. 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.09.010>
63. Yang J., Dong L., Wei G. et al. Identification and quality analysis of *Panax notoginseng* and *Panax vietnamensis* var. *fuscidicus* through integrated DNA barcoding and HPLC // *Chinese Herbal Med.* 2018. V. 10(2). P. 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.chmed.2018.03.008>
64. Rashmi K.V., Sathyanarayana N., Vidya S.M. Validation of DNA barcoding markers in common *Mucuna* spe-

- cies of India for taxonomy and pharmacognosy applications // *Plant Gene*. 2017. V. 12. P. 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2017.09.001>
65. Zhou Y., Du X., Zheng X. et al. ITS2 barcode for identifying the officinal rhubarb source plants from its adulterants // *Biochem. Systematics and Ecol.* 2017. V. 70. P. 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2016.12.004>
66. Zhou H., Ma Sh., Song J. et al. QR code labeling system for Xueting-related herbs based on DNA barcode // *Chinese Herbal Med.* 2019. V. 11(1). P. 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.chmed.2018.09.006>
67. Ming S., Gang-Qiang D., Ya-Qin Z. et al. Identification of processed Chinese medicinal materials using DNA mini-barcoding // *Chinese J. Nat. Med.* 2017. V. 15(7). P. 481–486. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(17\)30073-0](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(17)30073-0)
68. Costa J., Campos B., Amaral J.S. et al. HRM analysis targeting ITS1 and *matK* loci as potential DNA mini-barcodes for the authentication of *Hypericum perforatum* and *Hypericum androsaemum* in herbal infusions // *Food Control*. 2016. V. 61. P. 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.035>
69. Sharma A., Folch J.L., Cardoso-Taketa A. et al. DNA barcoding of the Mexican sedative and anxiolytic plant *Galphimia glauca* // *J. Ethnopharmacol.* 2012. V. 144(2). P. 371–378. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.09.022>
70. Frigerio J., Pellesi R., Mezzasalma V. et al. Development of a DNA barcoding-like approach to detect mustard allergens in wheat flours // *Genes*. 2019. V. 10(3). 234. <https://doi.org/10.3390/genes10030234>
71. Gao Z.T., Liu Y., Wang X.Y. et al. DNA mini-barcoding: a derived barcoding method for herbal molecular identification // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. 987. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00987>
72. Thongkhao K., Tungphatthong Ch., Phadungcharoen T., Sukrong S. The use of plant DNA barcoding coupled with HRM analysis to differentiate edible vegetables from poisonous plants for food safety // *Food Control*. 2020. V. 109. 106896. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106896>
73. Tnah L.H., Lee S.L., Tan A.L. et al. Nurul Farhanah. DNA barcode database of common herbal plants in the tropics: a resource for herbal product authentication // *Food Control*. 2019. V. 95. P. 318–326. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.08.022>
74. Swetha V.P., Parvathy V.A., Sheeja T.E., Sasikuma B. Authentication of *Myristica fragrans* Houtt. using DNA barcoding // *Food Control*. 2017. V. 73. P. 1010–1015. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.10.004>
75. Villa C., Costa J., Meira L. et al. Exploiting DNA mini-barcodes as molecular markers to authenticate saffron (*Crocus sativus* L.) // *Food Control*. V. 2016. V. 65. P. 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.01.008>
76. Zhang M., Shi Y., Sun W. et al. An efficient DNA barcoding based method for the authentication and adulteration detection of the powdered natural spices // *Food Control*. 2019. V. 106. 106745. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106745>
77. Lee Sh., Wang Ch., Yen Ch., Chang Ch. DNA barcode and identification of the varieties and provenances of Taiwan's domestic and imported made teas using ribosomal internal transcribed spacer 2 sequences // *J. Food and Drug Anal.* 2017. V. 25(2). P. 260–274. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.06.008>
78. Campanaro A., Tommasi N., Guzzetti L. et al. DNA barcoding to promote social awareness and identity of neglected, underutilized plant species having valuable nutritional properties // *Food Res. Intern.* 2018. V. 115. P. 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.031>
79. Haynes E., Jimenez E., Pardo M.A., Helyar S.J. The future of NGS (Next Generation Sequencing) analysis in testing food authenticity // *Food Control*. 2019. V. 101. P. 134–143. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.02.010>
80. Chimeno C., Morinière J., Podhorna J. et al. DNA barcoding in forensic entomology-establishing a DNA reference library of potentially forensic relevant arthropod species // *J. Forensic Sci.* 2019. V. 64(2). P. 593–601. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13869>
81. Kotrba M. Commentary on: Chimeno C., Morinière J., Podhorna J., Hardulak L., Hausmann A., Reckel F. et al. DNA barcoding in forensic entomology-establishing a DNA reference library of potentially forensic relevant arthropod species // *J. Forensic Sci.* 2019. V. 64(4). P. 593–601. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.14094>
82. Fang T., Liao S., Chen X. et al. Forensic drowning site inference employing mixed pyrosequencing profile of DNA barcode gene (*rbcL*) // *Int. J. Legal. Med.* 2019. V. 133. P. 1351–1360. <https://doi.org/10.1007/s00414-019-02075-4>
83. Ferri G., Corradini B., Ferrari F. et al. Forensic botany II, DNA barcode for land plants: Which markers after the international agreement? // *Forensic Sci. Intern.: Genetics*. 2015. V. 15. P. 131–136. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.10.005>
84. Park E., Kim J., Lee H. Plant DNA barcoding system for forensic application // *Forensic Sci. Intern.: Genetics. Suppl. Series*. 2017. V. 6. P. e282–e283. <https://doi.org/10.1016/j.fsigs.2017.09.141>
85. Karen L., Bella K.S., Burgessb K.C. et al. Review and future prospects for DNA barcoding methods in forensic palynology // *Forensic Sci. Intern.: Genetics*. 2016. V. 21. P. 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.12.010>
86. Абрамсон Н.И. Молекулярные маркеры, филогеография и поиск критерия разграничения видов // *Тр. Зоол. ин-та РАН*. 2009. № 1. С. 185–198.
87. Saarela J.M., Sokoloff P.C., Gillespie L.J. et al. DNA barcoding the Canadian Arctic flora: Core plastid barcodes (*rbcL* + *matK*) for 490 vascular plant species // *PLoS One*. 2013. V. 8(10) P. e77982. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077982>

DNA Barcoding: Applications

D. M. Shadrin*

Institute of Biology of Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, 167982 Russia
**e-mail: shdima@ib.komisc.ru*

The method of DNA barcoding has become a reliable tool that allows the fast and accurate identification and verifies of biodiversity in the hands of an experienced taxonomist. This method is very popular in various fields of human activity because of its ease of use and economic benefit. Examples of use are presented and the potential of the DNA barcoding method of living organisms in areas such as environmental monitoring (identification of invasive species, parasites and their carriers, pests), food and pharmaceutical industries (detection of counterfeit products, determination of product quality) and forensics are shown.

Keywords: DNA barcode, application, taxonomy, ecology, pharmacognosy, forensics.