# СОДЕРЖАНИЕ

## Том 57, номер 6, 2021

Обзорные и теоретические статьи	
Генетический контроль инфицирования человека SARS-CoV-2	
А. Н. Кучер, Н. П. Бабушкина, А. А. Слепцов, М. С. Назаренко	615
Происхождение и ресурсный потенциал диких и культурных видов рода овес (Avena L.)	
И. Г. Лоскутов, А. А. Гнутиков, Е. В. Блинова, А. В. Родионов	632
Генетика микроорганизмов	
Транскрипция гена hlyIIR Bacillus cereus	
А. С. Нагель, Ж. И. Андреева-Ковалевская, А. В. Сиунов, М. О. Нагорных, М. В. Захарова, А. С. Солонин	653
Генетика растений	
Генетическое разнообразие сортов яблони народной селекции ( <i>Malus × domestica</i> Borkh.) Поволжья из коллекции ВИР по данным NBS-профайлинга	
А. А. Трифонова, А. В. Шлявас, Л. В. Дедова, К. В. Борис, А. М. Кудрявцев	661
Генетика животных	
Цитогенетическая дифференциация популяций мышей Apodemus peninsulae Северного и Южного Прибайкалья по добавочным хромосомам	
Ю. М. Борисов, А. А. Калинин, З. З. Борисова, И. В. Крищук, Б. И. Шефтель	674
Генетическая структура тихоокеанской сельди <i>Clupea pallasii</i> Vallenciennes, 1847 на макрогеографической шкале	
А. В. Семенова, А. Н. Строганов, Г. А. Рубцова, М. О. Рыбаков	682
Филогенетические отношения подвидов пчел <i>Apis mellifera caucasia</i> и <i>Apis mellifera carpathica</i> по последовательностям митохондриального генома	
Р. А. Ильясов, Г. Ю. Хан, М. Л. Ли, К. В. Ким, Д. Х. Парк, Д. И. Такахаши, Х. В. Квон, А. Г. Николенко	697
Генетическое разнообразие популяций горного суслика ( <i>Spermophilus musicus</i> Menetries, 1832; Sciuridae, Rodentia) — основного носителя чумы на территории Центрально-Кавказского высокогорного природного очага	
Е. С. Котенев, Е. А. Котенева, Л. А. Кот, А. Ю. Жильцова, Д. В. Сердюкова, В. В. Сердюков, Н. Х. Пшихачев, К. Д. Гергоков, А. Н. Куличенко	711

#### Генетика человека

Важность накопления данных экзомного секвенирования российских больных при поиске причины наследственного заболевания в семье на примере аденоматозного полипоза

А. С. Цуканов, А. А. Баринов, В. П. Шубин, А. Н. Логинова, Т. А. Савельева, Д. Ю. Пикунов, А. М. Кузьминов, В. Н. Кашников, А. В. Поляков, Ю. А. Шелыгин

## Краткие сообщения

Генетическое разнообразие *Kalopanax septemlobus* (Thunb.) Koidz. на северной границе ареала по данным секвенирования регионов хлоропластной ДНК

Е. А. Васюткина, И. Ю. Адрианова

728

# Contents

Vol. 57, No. 6, 2021	
Reviews and Theoretical Articles	
Genetic Control of Human Infection SARS-CoV-2	
A. N. Kucher, N. P. Babushkina, A. A. Sleptcov, and M. S. Nazarenko	615
Origin and Resource Potential of Wild and Cultivated Species of the Genus Oats ( <i>Avena</i> L.)	
I. G. Loskutov, A. A. Gnutikov, E. V. Blinova, and A. V. Rodionov	632
Genetics of Microorganisms	
Transcription of the hlyIIR Gene of Bacillus cereus	
A. S. Nagel, Zh. I. Andreeva-Kovalevskaya, A. V. Siunov, M. O. Nagornykh, M. V. Zakharova, and A. S. Solonin	653
Plant Genetics	
Genetic Diversity of Old and Local Apple ( <i>Malus × domestica</i> Borkh.) Cultivars of Volga Region from VIR Collection Inferred from NBS-Profiling	
A. A. Trifonova, A. V. Shlyavas, L. V. Dedova, K. V. Boris, and A. M. Kudryavtsev	661
Animal Genetics	
Kariological Differentiation of Mice <i>Apodemus peninsulae</i> North and South Pribaikal by Additional Chromosomes	
Yu. M. Borisov, A. A. Kalinin, Z. Z. Borisova, I. V. Krischuk, and B. I. Sheftel	674
Genetic Structure of the Pacific Herring <i>Clupea pallasii</i> Valenciennes 1847, on a Macrogeographic Scale	
A. V. Semenova, A. N. Stroganov, G. A. Rubtsova, and M. O. Rybakov	682
Phylogenetic Relationships among Honey Bee Subspecies <i>Apis mellifera caucasia</i> and <i>Apis mellifera carpathica</i> according to the Sequences of the Mitochondrial Genome	
R. A. Ilyasov, G. Y. Han, M. L. Lee, K. W. Kim, J. H. Park, J. I. Takahashi, H. W. Kwon, and A. G. Nikolenko	697
Genetic Diversity of Populations of Mountain Ground Squirrel ( <i>Spermophilus musicus</i> Menetries, Sciuridae, Rodentia), the Main Carrier of the Plague, in the Territory of the Central Caucasian High-Mountain Natural Focus	
E. S. Kotenev, E. A. Koteneva, L. A. Kot, A. Yu. Zhiltsova, D. V. Serdyukova, V. V. Serdyukov, N. Kh. Pshikhachev, K. D. Gergokov, and A. N. Kulichenko	711

#### **Human Genetics**

Finding the Cause of Hereditary Disease in a Family with Adenomatous Polyposis: Why It Is Important to Accumulate Whole Exome Sequencing Data in Russian Population

A. S. Tsukanov, A. A. Barinov, V. P. Shubin, A. N. Loginova, T. A. Savelieva, D. Yu. Pikunov, A. M. Kuzminov, V. N. Kashnikov, A. V. Polyakov, and Yu. A. Shelygin

## **Short Communications**

Genetic Diversity of *Kalopanax septemlobus* (Thunb.) Koidz. at the Northern Range Edge according to Chloroplast DNA Sequencing Data

E. A. Vasyutkina and I. Yu. Adrianova

728

#### ОБЗОРНЫЕ И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 757.22:616.9

## ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ИНФИЦИРОВАНИЯ ЧЕЛОВЕКА SARS-CoV-2

© 2021 г. А. Н. Кучер<sup>1, \*</sup>, Н. П. Бабушкина<sup>1</sup>, А. А. Слепцов<sup>1</sup>, М. С. Назаренко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, 634050 Россия

\*e-mail: aksana.kucher@megenetics.ru

Поступила в редакцию 23.06.2020 г. После доработки 26.07.2020 г. Принята к публикации 25.08.2020 г.

В 2019 г. впервые обнаружен бета-коронавирус SARS-CoV-2, ставший причиной пандемии тяжелой острой респираторной вирусной инфекции COVID-19 (от COronaVIrus Disease 2019). Восприимчивость к SARS-CoV-2 и характер течения клинической картины COVID-19 определяются многими факторами, в том числе и генетическими особенностями как возбудителя, так и человека. Геном SARS-CoV-2 имеет сходство с геномами других патогенных для человека коронавирусов, вызываюших тяжелое течение инфекции: 79% – с геномом SARS-CoV и 50% – с геномом MERS-CoV. Наиболее значимые различия между SARS-CoV-2 и другими коронавирусами регистрируются в структуре гена S-белка – ключевого белка, отвечающего за связывание вируса с рецептором клеток организма-хозяина. В частности, в S-белке SARS-CoV-2 выявлены замены, приводящие к формированию сайта расщепления фурином, отсутствующего у других SARS-подобных коронавирусов, что может объяснять высокую патогенность SARS-CoV-2. У человека к числу генов, значимых для начальных этапов инфицирования, можно отнести АСЕ2, АNPEP, DPP4 (кодируют рецепторы связывания коронавируса); TMPRSS2, FURIN, TMPRSS11D, CTSL, CTSB (кодируют протеазы, участвующие в процессах проникновения коронавируса в клетку); DDX1 (ген АТФ-зависимой РНК-хеликазы DDX1. способствующей репликации коронавирусов): IFITM1. IFITM2 и IFITM3 (кодируют интерферон-индуцируемые трансмембранные белки, обладающие противовирусным эффектом). Данные гены экспрессируются во многих тканях (в том числе восприимчивых к воздействию SARS-CoV-2), в них описаны редкие и частые варианты, влияющие на структуру кодируемого белка, его свойства и уровень экспрессии. Для ряда частых генетических вариантов с доказанной функциональной значимостью характерна вариабельность частоты аллелей в популяциях мира, что может определять межпопуляционные различия в распространенности COVID-19 и в клинических особенностях течения данной патологии. На уровень экспрессии генов, значимых для формирования восприимчивости к SARS-CoV-2, влияют эпигенетические модификации, наличие сопутствующих заболеваний на момент инфицирования, прием лекарственных препаратов, вредные привычки.

*Ключевые слова:* геном SARS-CoV-2, COVID-19, гены-кандидаты восприимчивости к SARS-CoV-2, SNV, eQTL, экспрессия, метилирование ДНК.

DOI: 10.31857/S0016675821050052

Коронавирус SARS-CoV-2, впервые выявленный в 2019 г., привел к пандемии тяжелой острой респираторной вирусной инфекции, известной как COVID-19 (от COronaVIrus Disease 2019). По данным официальной статистики на 21 июня 2020 г. пандемия охватила 215 стран (территорий), COVID-19 заразились более 8.8 млн человек, более 465 тыс. скончались [1].

SARS-CoV-2 относится к РНК-содержащим бета-коронавирусам (CoV). Для человека известны семь коронавирусов: альфа-коронавирусы

HCoV-229E, HCoV-NL63 и бета-коронавирусы HCoV-OC43, HCoV-HKU1, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-COV-2 [2]. Коронавирусы различаются по патогенности: 229E, OC43, NL63 и HKU1 вызывают легкие формы инфекционного заболевания, а SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2 являются высокопатогенными (SARS-CoV явился причиной атипичной пневмонии в 2002–2003 гг., MERS-CoV – ближневосточного респираторного синдрома в 2015 г.) [2, 3]. Клиническая картина заболеваний, вызванных высокопатогенными

коронавирусами, имеет как общие, так и специфические черты [4-6]. В частности, по сравнению с инфекционным заболеванием, вызываемым MERS-CoV, для COVID-19 характерны большая контагиозность, но меньшая летальность, существенная гетерогенность клинических симптомов, в том числе в разных возрастных группах и в различных странах мира [5, 7–9]. Наиболее частыми симптомами COVID-19 являются кашель, лихорадка, одышка, регистрируются также миалгия, диарея, тошнота и рвота [6, 8]. Однако индивидуальные клинические симптомы широко варьируют: от бессимптомного течения и легкой простуды до таких осложнений как бронхит, пневмония, тяжелый острый респираторный дистресс-синдром, полиорганная недостаточность [6].

Подверженность человека коронавирусной инфекции и клиническая картина заболевания зависят от многих причин, среди которых определенная роль принадлежит генетическим особенностям как вирусов, так и человека [10-13]. Начальным этапом инфицирования организма является контакт коронавируса с восприимчивыми к нему клетками. У человека известно около 100 генов, продукты которых вовлечены в процесс проникновения вирусов в клетку, отнесенных к пяти категориям "Gene Ontology": проникновение вируса в клетку организма-хозяина (GO: 0046718); вирус-рецепторная активность (GO: 0001618); слияние вирусной оболочки с плазматической мембраной клеток организма-хозяина (GO: 0019064); клатрин-зависимый эндоцитоз вируса клеткой-хозяином (GO: 0075512); рецептор-опосредованный эндоцитоз вируса клеткойхозяином (GO: 0019065) [14, 15]. По мере изучения взаимодействий между вирусами и клетками организма-хозяина число известных генов, от которых зависит восприимчивость к коронавирусной инфекции, будет увеличиваться. В то же время коронавирусы также различаются по структуре генома и ключевых молекул, отвечающих за их проникновение в клетки [11, 16, 17]. Поэтому не все гены человека, продукты которых вовлечены в регуляцию проникновения вирусов в клетки, оказываются значимыми в отношении формирования риска развития инфекции, вызванной разными коронавирусами.

В настоящем обзоре анализируются особенности генома SARS-CoV-2 и структурно-функциональных свойств генов и белков человека, отвечающих за восприимчивость к данному возбудителю.

#### ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ ОСОБЕННОСТИ ГЕНОМА SARS-COV-2

Геном SARS-CoV-2 близок по структуре к геномам двух коронавирусов летучих мышей bat-SL-CoVZC45 и bat-SL-CoVZXC21 (идентичность составляет 88–96%) и значительно меньшим сходством обладает с геномами SARS-CoV (79–80%) и MERS-CoV (около 50%) [17, 18]. Геномы отдельных образцов SARS-CoV-2, полученных от китайских пациентов, характеризовались высоким сходством, превышающим 99% [18], но оценки генетического разнообразия уточняются по мере роста количества исследований структуры геномов SARS-CoV-2019 из различных регионов мира [19, 20].

По сравнению с SARS-CoV и MERS-CoV для генома SARS-CoV-2 свойственны более низкие значения эффективного числа кодонов, что предполагает более высокую эффективность экспрессии генов, в том числе генов, кодирующих структурные белки – шипа (S), оболочки (E), мембраны (M), нуклеокапсида (N) [2, 21]. S-белок (белок "шипа", или spike-белок), отвечающий за прикрепление SARS-CoV-2 к мембранному рецептору, рассматривается в качестве критичного для проникновения в клетку организма-хозяина [22]. Коронавирус SARS-CoV-2 (как и HCoV-NL63, SARS-CoV, MERS-CoV) использует в качестве рецептора мембранно-связанный ангиотензин-превращающий фермент 2 (ACE2) [17, 23-25]. Соответственно SARS-COV-2 может проникать во все клетки, экспрессирующие АСЕ2. Однако коронавирусы для проникновения в клетки организма-хозяина могут использовать в качестве рецепторов и ряд других молекул [25-27].

По сравнению с другими коронавирусами структура S-белка SARS-CoV-2 имеет некоторые важные для проникновения в клетку организмахозяина особенности [16, 17, 28]. Идентичность между S-белками SARS-COV и SARS-COV-2 составляет 72-75% [16, 17]. Р. Zhou с соавт. [17] к числу основных отличий в структуре последовательности гена, кодирующего S-белок SARS-CoV-2, отнесли три короткие вставки в N-концевом домене, а также изменения в четырех из пяти ключевых остатков в рецептор-связывающем мотиве. По сравнению с SARS-CoV для SARS-CoV-2 характерны: более высокая аффинность к связыванию с рецептором АСЕ2 вследствие замен в С-терминальном домене S-белка (наблюдается больше взаимодействий с АСЕ2, Н-связей и др.) [16, 28, 29], лучшая способность к слиянию с плазматической мембраной клетки организмахозяина в связи с аминокислотными заменами в HR1 домене S2 субъединицы S-белка [30] и в целом более высокая активность [23].

В результате сравнительного анализа геномов изолятов SARS-CoV-2 из различных регионов мира установлены множественные мутации, в том числе и в генах, кодирующих структурные белки (включая S-белок) [20]. Например, в клинических изолятах Индии обнаружена мутация в рецептор-связывающем домене S-белка в положении 407, приводящая к изменению вторичной структуры белка, так как положительно заряженная аминокислота аргинин заменяется на гидрофобную С-бетаразветвленную аминокислоту изолейшин [19]. Обнаружены аминокислотные замены в S-белке и у SARS-CoV-2 из других географических регионов [31]. Мутации, приводящие к изменению структуры ключевых белков, ответственных за связывание коронавируса со своим рецептором, могут влиять на патогенность коронавируса.

После связывания S-белка с рецептором ACE2 происходит расщепление белка на S1 и S2 субъединицы, что инициирует слияние вирусной оболочки с клеточной мембраной и проникновение HCoV в клетку [22]. Для этих целей коронавирусы (как и другие вирусы) используют различные протеазы клеток организма-хозяина, "выбор" которых определяется особенностями структуры и доступностью сайта для протеолитического расщепления S-белка [32]. Например, было показано, что по сравнению с лабораторными штаммами 1966 г. современные клинические изоляты альфа-коронавируса HCoV-229Е используют для проникновения не катепсин L, a TMPRSS2, что связано с двумя аминокислотными заменами (R642M и N714K) в S-белке [33]. SARS-CoV-2 для активации и расщепления S-белка также использует TMPRSS2 [34-36]. Кроме того, у SAR-CoV-2 в гене S-белка выявлены замены, приводящие к формированию фурин-подобного сайта расщепления, отсутствующего у других SARS-подобных коронавирусов [25, 37]. Наличие сайта расщепления фурином в SARS-CoV-2 обусловливает способность слияния "вирус-клетка" и "клеткаклетка", что обеспечивает высокую патогенность SARS-CoV-2 по сравнению с другими бета-коронавирусами [38, 39].

Так как проникновение коронавирусов в клетку происходит при участии белковых продуктов клеток организма-хозяина, можно ожидать, что особенности в структуре генов, кодирующих данные белки, будут определять индивидуальные различия в восприимчивости к коронавирусам, в том числе и SARS-CoV-2.

#### ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ВОСПРИИМЧИВОСТИ К SARS-COV2 У ЧЕЛОВЕКА

На основании классического близнецового исследования были рассчитаны коэффициенты наследуемости для некоторых симптомов COVID-19: для лихорадки данный показатель составил 41 (95%-ный доверительный интервал 12–70)%, для аносмии – 47 (27–67)%, для делирия – 49 (24–75)%, что позволило оценить предсказанный коэффициент наследуемости COVID-19 в 50 (29–70)% [40]. Эти оценки свидетельствуют о значимом генетическом компоненте в формировании симптомов данного заболевания. Исследования, посвященные выявлению генетических маркеров восприимчивости к SARS-CoV-2, немногочисленны [12, 41, 42].

Известен ряд генов, продукты которых могут принимать участие в процессе инфицирования человека коронавирусами, включая SARS-CoV-2 (табл. 1). Помимо генов рецепторов (*ACE2, ANPEP, DPP4*) и генов протеаз (*TMPRSS2, FURIN, TMPRSS11D, CTSL, CTSB*), способствующих проникновению коронавируса в клетку, к их числу можно отнести ген ATФ-зависимой PHK-хеликазы DDX1 (*DDX1*), которая способствует репликации коронавирусов (как это было показано для SARS-CoV) [56], а также гены *IFITM1, IF-ITM2* и *IFITM3*, кодирующие интерферон-индуцируемые трансмембранные белки [12, 57, 58].

Роль ACE2 в качестве рецептора SARS-CoV-2 считается доказанной [16, 23, 25, 28, 39, 60]. Данные о возможности использования SARS-CoV-2 других рецепторов, известных для коронавирусов, неоднозначны. Ряд исследователей [27, 48], на основании моделирования структурных взаимодействий между S-белком и рецепторами других коронавирусов, к потенциальным рецепторам SARS-CoV-2 отнесли дипептидилпептидазу 4 (DPP4, известна также как CD26), выступающую в качестве рецептора для MERS-CoV [49]. Причем для SARS-CoV-2 и MERS-CoV характерно наличие идентичных критически значимых для связывания с S-белком участков DPP4 [47]. В то же время Р. Zhou с соавт. [17] в исследовании in vitro установили, что SARS-CoV-2 не использует в качестве рецептора DPP4. Эти же авторы не подтвердили значение аминопептидазы N (ANPEP, известна также как APN и CD13) в качестве рецептора SARS-CoV-2. Интересно, что ANPEP является рецептором для HCoV-229E, но не обладает такими свойствами для HCoV-OC43 [26]. Однако для ANPEP и DPP4 характерны близкие паттерны экспрессии с АСЕ2 в 13 тканях, что поз-

617

× ~ -	, Ó	.				<del>, ,</del>	
Коронавирусы, использующие продукты данны: генов для проникновения 1 клетки организма хозяина	SARS-CoV-2; SARS CoV; HCoV-NL63 [1 16, 23, 24, 28, 35, 39]	SARS-CoV-2; hCoV- EMC (MERS-CoV) [47–49]	HCV-229E [26, 50]	SARS-CoV-2 [29, 37, 51]	SARS-CoV; HCoV- 229E [35, 52]	SARS-CoV-2; SARS CoV; MERS-CoV [3 <sup>2</sup> 35, 39, 51, 53, 54]	SARS-CoV-2;
Участие в процессах корования коронавирусом	Рецептор коронавируса [25]	Рецептор коронавируса [47]	Рецептор коронави- руса [26]	Расщепление S-белка; способствует проник- новению вируса в клетку [25, 29, 37]	Расщепление S-белка и ACE2; способствует слиянию вирусной и клеточной мембран [35]	Расщепление S-белка; способствует проник- новению вируса в клетку [14, 34, 54]	Активация S-белка;
Число известных еQTL-вариантов (по [45, 46])	288	130	594	295	161	203	258
Миссенс-варианты с частотой МАF > 1%: гs (аллель: min—тах частота) (по [14, 43, 44]) (по [14, 43, 44])	Her	rs1129599 (A: 04%)	rs8192297 (C: 16–37%) rs25651 (T: 23–51%) rs25653 (C: 10–61%) rs17240268 (A: 0–14%)* rs41276922 (A: 0–9%)* rs17240212 (A: 0–3%)	rs16944971 (T: 0–9%)	0	rs12329760 (T: 15–36%)* rs75603675 (A: 2–40%)	rs11541204 (A: 0–5%)
Число LoF/ миссенс-вариантов с частотой МАF ≤ 1% (по [43])	5/239	60/391	47/547	5/339	17/210	39/332	14/192
Белок	Ангиотензин- превращающий фермент 2	Дипептидилпептидаза 4	Аминопептидаза N	Фурин	Трансмембранная протеаза серина 11D	Трансмембранная протеаза серина 2	Катепсин L
Ген (альтернативные названия <sup>#</sup> ), хромосомная локализация	ACE2 (ACEH), Xp22.2	<i>DPP4</i> ( <i>CD26</i> ), 2q24.2	ANPEP (APN, CD13), 15q26.1	FURIN (FUR), 15q26.1	<i>TMPRSS11D</i> ( <i>HAT</i> ), 4q13.2	<i>TMPRSS2</i> , 21q22.3	CTSL,
ğ		2	ε	4	S	9	7

Таблица 1. Характеристика генов-кандидатов восприимчивости к SARS-CoV-2 человека

ГЕНЕТИКА том 57 № 6 2021

КУЧЕР и др.

	Коронавирусы, использующие продукты данных генов для проникновения в клетки организма- хозяина	SARS-CoV-2; SARS- CoV; MERS-CoV [14, 29, 55]	SARS-CoV [56]	SARS-CoV [14, 57]	SARS-CoV и другие вирусы [57, 58]	SARS-CoV-2; SARS- СоV и другие вирусы [12, 57, 58]	(иально патогенный" эф- год од отдержиется и отдержи
	хеосатие в процессах кинаворисони моэудиавнодоя	Активирует слияние мембран вируса и клетки хозяина [14, 55]	Способствует репли- кации коронавируса ( <i>in vitro</i> ) [56]	Ограничение репли- кации и проникнове- ния вирусов в клетку хозяина [14, 57]	Ограничение репли- кации и проникнове- ния вирусов в клетку хозяина [14, 57]	Ограничение репли- кации и проникнове- ния вирусов в клетку хозяина; инактива- ция новых вирусов, выходящих из зара- женной клетки [59]	к источниках; * — "потени енину в бизузер Ерсетріе
	Число известных еQTL-вариантов (по [45, 46])	2553	463	201	220	439	итературны)
	Миссенс-варианты с частотой МАF > 1%: гs (аллель: min-max частота) (по [14, 43, 44])	rs12338 (G: 49–67%)* rs1803250 (C: 0–15%)* rs17573 (T: 0–17%)*	0	0	rs1059091 (A: 31–67%)* rs1058900 (T: 0–42%) rs14408 (T: 4–62%)	rs1136853 (T: 0–8%)*	ощиеся в использованных л эффекта тепетинских гари
	Число LoF√ миссенс-вариантов с частотой МАF ≤ 1% (по [43])	41/369	14/305	4/72	11/123	6/92	белков, встречаю
	Белок	Катепсин В	АТФ-зависимая РНК- хеликаза DDX1	Интерферон-индуцируе- мый трансмембранный белок 1	Интерферон-индуцируе- мый трансмембранный белок 2	Интерферон-индуцируе- мый трансмембранный белок 3	њтернативные названия генов и зования программ предихнии ф
а 1. Окончание	Эганаитвиратага) нэ , ( <sup>#</sup> гирагари каромосомная покализация	<i>CTSB</i> , 8p23.1	<i>DDX1,</i> 2p24.3	<i>IFTTM I</i> , 11p15.5	<i>IFITM2</i> , 11p15.5	<i>IFITM3</i> , 11p15.5	ание. # – указаны ал
Таблиц	å	×	6	10	11	12	Примеч Фект по

nuchen Примечание. <sup>#</sup> – указаны альтернативные фект, по результатам использования прографункции, МАF – частота редкого аллеля. волило F. Qi с соавт. [61] рассматривать их в качестве потенциальных рецепторов для SARS-CoV-2. Для разрешения противоречия относительно рецепторных свойств DPP4 и уточнения возможной рецепторной роли ANPEP для SARS-CoV-2 необходимо проведение дополнительных исследований.

После прикрепления SARS-CoV-2 к рецептору ACE2 для обеспечения проникновения коронавируса в клетку необходимы протеазы, в том числе – TMPRSS2 и FURIN [29, 37, 39]. D. Bestle с соавт. [51] установили, что для проникновения SARS-CoV-2 в клетки его S-белок должен быть расщеплен в двух разных местах протеазами клеток организма-хозяина: TMPRSS2 в сайте S2 и FURIN в сайте S1/S2.

Трансмембранная протеаза TMPRSS2 и родственные протеазы (такие как TMPRSS11D) способствуют проникновению коронавируса в клетку двумя механизмами: путем расщепления рецептора АСЕ2 (что может стимулировать поглощение коронавируса) и путем расщепления S-белка коронавируса (что приводит к активации белка и слиянию вирусной оболочки с мембраной клетки организма-хозяина) [35, 39]. В исследовании S. Bertram с соавт. [52] показано, что TMPRSS2 активирует катепсин-независимое проникновение HCoV-229E в клетку хозяина, причем активация TMPRSS2 защищает 229E-S-зависимый вход в клетку от ингибирования интерферон-индуцируемыми трансмембранными белками. На модельных животных установлено, что дефицит данной протеазы в клетках дыхательных путей снижает тяжесть течения SARS-CoV и MERS-CoV, что свидетельствует о важности TMPRSS2 в процессах инфицирования [62].

Проникновение в клетку SARS-CoV-2 активируют также лизосомные катепсины [29]. В отличие от TMPRSS2 катепсины способствуют проникновению коронавирусов в клетку через эндоцитоз (лизосомный путь); при этом "выбор" протеазы для проникновения определяется структурными особенностями S-белка вирусов [33]. Протеаза TMPRSS2 и лизосомные катепсины оказывают кумулятивное с фурином влияние на активацию проникновения SARS-CoV-2 в клетки организмахозяина [29].

Интерферон-индуцируемые трансмембранные белки (IFITM1, IFITM2, IFITM3) способны ограничивать репликацию коронавирусов, их проникновение в клетки и инактивировать новые коронавирусы при выходе из зараженных клеток (показано для SARS-CoV и других вирусов, таких как вирус гриппа A, вирус Денге и вирус Западного Нила) [57–59, 63]. Поскольку белки IFITM индуцируются интерферонами типа I и II, считают, что они имеют решающее значение для противовирусного действия интерферона [63]. В исследовании Y. Zhang с соавт. [12] установлено, что структурные особенности гена *IFITM3* ассоциированы с тяжестью течения COVID-19.

Таким образом, большинство из включенных в табл. 1 генов относятся к категории с доказанной или потенциальной значимостью в отношении участия их белковых продуктов в процессе заражения клеток SARS-CoV-2. Пять генов (*TMPRSS11D*, *ANPEP*, *DDX1*, *IFITM1*, *IFITM2*) можно рассматривать как вероятно значимые, так как кодируемые ими продукты вовлечены в процессы проникновения других коронавирусов (SARS-CoV, HCoV-229E) и ряда других вирусов в клетки организма-хозяина [35, 52, 56–58] (см. табл. 1). Далее в статье все эти гены будут обозначены как гены-кандидаты восприимчивости к SARS-CoV-2.

Из числа привлеченных к рассмотрению генов только *ACE2* локализован на X-хромосоме, что может выступать в качестве возможной причины гендерных различий подверженности к SARS-CoV-2 [64–66], другие гены локализованы на восьми разных хромосомах (табл. 1).

Гены-кандидаты восприимчивости к SARS-CoV-2 экспрессируются во многих органах/тканях, в том числе и чувствительных к данному коронавирусу (по данным клинических наблюдений [7—9]). Однако отмечаются различия по уровню их экспрессии в разных органах (рис. 1). На основании уровня экспрессии генов-кандидатов восприимчивости к SARS-CoV-2 ткани группируются в несколько кластеров (рис. 1). В один кластер объединены ткани легких, аорты, коронарной артерии, щитовидной железы, висцеральной и подкожной жировой тканей; второй кластер объединяет ткани других привлеченных к сравнению органов, наибольшие отличия наблюдались по уровню экспрессии в клетках крови.

Различий по уровню экспрессии генов ACE2, TMPRSS2, CTSB и CTSL между мужчинами и женщинами не выявлено [67]. Коэкспрессия белков является важным условием проникновения в клетки и распространения вирусов в организме человека [68], а органы и ткани, где экспрессируются эти гены, могут быть потенциально восприимчивы к коронавирусной инфекции [69].

На индивидуальные различия по восприимчивости к SARS-CoV-2 могут оказывать влияние варианты в генах-кандидатах, изменяющие структуру белка или его экспрессию. Кроме того, экспрессия



**Рис. 1.** Теплокарта, отражающая уровень экспрессии генов-кандидатов восприимчивости к SARS-CoV-2 в различных органах/тканях человека (построено по медианным значениям числа транскриптов на миллион (TPM) по [45]). Уровень экспрессии нормализован по генам, где ноль соответствует среднему уровню экспрессии генов. Значения в ячейках отражают число статистически значимых eQTL, влияющих на уровень экспрессии генов в соответствующих тканях.

генов может зависеть от уровня метилирования их промоторных регионов.

#### Генетические варианты, влияющие на структуру белков

Несинонимичные замены регистрируются во всех генах-кандидатах восприимчивости к SARS-CoV-2, но в большинстве случаев они являются крайне редкими, низкополиморфными или регистрируются не во всех этно-территориальных группах (табл. 1; [44]). Это может быть связано с функциональной значимостью кодируемых данными генами белков и ферментов, а также их локализацией в клетке: все рассматриваемые белки,

ГЕНЕТИКА том 57 № 6 2021

за исключением DDX1, локализуются в клеточной мембране [14]. В то же время в гене ACE2 зарегистрировано большое число редких вариантов, которые важны для проникновения SARS-CoV-2 в клетки организма-хозяина и развития инфекции, в том числе: S19P, I21T/V, E23K, A25T, K26R, T27A, E35D/K, E37K, Y50F, N51D/S, M62V, N64K, K68E, F72V, E75G, M82I, T92I, Q102P, G220S H239Q, G326E, E329G, G352V, D355N, H378R, Q388L, P389H, E467K, H505R, R514G/\* и Y515C; для некоторых из них (выделены полужирным шрифтом) регистрировались межрасовые различия по частоте встречаемости вариантов [67]. Так как ген ACE2 локализован на X-хромосоме, наличие таких вариантов у мужчин в гемизиготном состоянии может выступать в качестве неблагоприятного фактора инфицирования SARS-CoV-2. В генах-кандидатах восприимчивости к SARS-CoV-2 установлено большое число вариантов, приводящих к аминокислотным заменам или к потере функции белков, с частотой регистрации менее 1% (см. табл. 1). Не исключено, что именно такие редкие варианты как в гене ACE2 [67], так и в других рассматриваемых генах могут выступать в качестве генетических факторов, определяющих индивидуальную восприимчивость к SARS-CoV-2.

К числу высокополиморфных миссенс-вариантов в генах-кандидатах восприимчивости к SARS-CoV-2 во всех территориальных группах, охарактеризованных в рамках проекта 1000 геномов (1000 Genomes Project, Phase 3), относятся: rs12329760 (p.Val160Met) гена *TMPRSS2*; rs25653 (p.Arg86Gln), rs8192297 (p.Ile603Met) и rs25651 (p.Ser752Asn) гена *ANPEP*; rs12338 (p.Leu26Met, p.Leu26Val) гена *CTSB* и rs1059091 (p.Ile121Leu) гена *IFITM2* (табл. 1). Причем rs12329760 гена *TMPRSS2*, rs12338 гена *CTSB* и rs1059091 гена *IFITM2* отнесены к категории "потенциально патогенных", согласно программам SIFT, PolyPhen, Mutation Assessor и MetaLR, встроенным в Ensemble [44].

Для большинства миссенс-вариантов частота регистрации аллелей различается в 2 и более раза между изученными этно-территориальными группами (табл. 1). Интерес для рассмотрения представляют также SNP, которые существенно различаются по уровню полиморфизма между регионами мира (в некоторых случаях частота редких аллелей варьирует 0 до 42%). Так, по данным проекта "1000 Геномов" [44] аллель A по rs75603675 (p.Gly8Asp) гена TMPRSS2 регистрируется с частотой 2% в популяциях Восточной Азии, 22% в популяциях Южной Азии, 0% в Африке, 27% в Америке и 40% в европейских популяциях; частота аллеля Т по rs1058900 (p.Val33Ala) гена IFITM2 составляет 0, 7, 4, 20 и 42% соответственно, частота аллеля Т по rs14408 (p.Met41Arg) гена *IFITM2* – 4, 27, 24, 33 и 60% соответственно.

Важную роль с точки зрения формирования восприимчивости к коронавирусам могут играть миссенс-замены в функционально-значимом участке белковой молекулы (как, например, в случае rs12329760 гена *TMPRSS2* замена р.Val160Met происходит в функциональном SRCR домене белка (опосредует межбелковые взаимодействия и связывание лигандов) [14]). В гене *ANPEP* в регионе, критичном для связывания с HCoV-229E (аминокислоты 260–353), выявлены варианты, в том числе приводящие к несинонимичным заменам [14, 50]. Такие замены могут сказаться на свойствах белков и соответственно на различиях в степени подверженности коронавирусной инфекции обладателей разных генотипов по данным вариантам.

Среди полиморфных вариантов, локализованных в экзонах привлеченных к рассмотрению генов-кандидатов восприимчивости к SARS-CoV-2, только для одного SNP ранее была установлена патогенетическая значимость в отношении риска развития инфекционных заболеваний – для rs12252 гена IFITM3 (ОМІМ: 605579, предрасположенность к тяжелому течению гриппа) [70, 71]. Ассоциация с более высоким риском тяжелого течения гриппа H1N1/09 была зарегистрирована для индивидов с аллелем C rs12252 [71]. Авторы процитированного исследования в условиях in vitro показали, что клеточные линии с генотипом СС характеризовались более низким уровнем экспрессии IFITM3 и более высокой восприимчивостью к инфекции, чем линии с генотипом ТТ по данному SNP. Несмотря на то что полиморфный вариант rs12252 приводит к синонимичной замене (p.Ser14Ser), для некоторых транскриптов эта замена локализована в регионе сплайсинга или 5'UTR [44]. Клетки, экспрессирующие укороченный на 22 аминокислоты белок, не способны ограничивать репликацию вируса по сравнению с белком IFITM3 дикого типа [71]. Частота "неблагоприятного" аллеля С варьирует от 4% в европейских популяциях до 53% в популяциях Южной Азии [44].

Показано, что носители генотипа CC rs12252 гена IFITM3 также имеют риск более тяжелого течения COVID-19 (доля носителей такого генотипа среди пациентов со средней степенью тяжести заболевания составляет 28.57%, с тяжелым течением -50% и среди умерших -66.7%) [12]. Несмотря на то что это исследование выполнено на небольшой выборке, с учетом ранее полученных данных об ассоциации rs12252 с тяжелым течением гриппа H1N1/09 [70, 71], о молниеносном развитии вирусной пневмонии с тяжелой клинической картиной у мышей с нокаутом гена Ifitm3 при заражении вирусом гриппа с низкой патогенностью [71], о неспособности гомозигот СС в случае синтеза укороченного белка IFITM3 ограничивать репликацию вируса гриппа H1N1/09 [71] и о критической роли 21 N-концевой аминокислоты IFITM3 (как и С-концевой трансмембранной области белка) для противовирусной активности в отношении вируса везикулярного стоматита in vitro [72], можно предположить, что данный вариант обладает высокой прогностической значимостью в отношении оценки риска развития COVID-19 и для определения характера течения инфекции, вызванной SARS-CoV-19.

#### Генетические варианты с регуляторным потенциалом

В генах-кандидатах восприимчивости к SARS-CoV-2 регистрируются многочисленные SNP, в том числе и варианты, которые могут оказать влияние на уровень экспрессии генов. Известны eQTL для генов-кандидатов восприимчивости к коронавирусной инфекции, число и спектр которых различны для разных органов и тканей (см. табл. 1, рис. 1; см. также [45]). Например, по сравнению с другими генотипами в легких более высокий уровень экспрессии гена TMPRSS2 характерен для обладателей генотипа АА по rs35074065, генотипа *TT* по rs34783969. генотипа *AA* по rs463727 и т.д. У индивидов с генотипом AA по rs1622599 более высокий уровень экспрессии гена СТЅВ наблюдался в тканях легких, клетках крови, поджелудочной железе, большеберцовой артерии, но более низкий – в слизистой оболочке пищевода и щитовидной железы [45].

К категории eQTL для гена *TMPRSS2* относятся rs2070788 и rs383510, для *GG* и *TT* генотипов которых соответственно характерен более высокий уровень экспрессии данного гена (в том числе и в ткани легких) [45]. Эти же генотипы ассоциированы с восприимчивостью к вирусу гриппа A (H7N9) и с риском тяжелого течения гриппа A (H1N1) [73]. Между территориальными группами населения регистрируются различия по частоте "неблагоприятных" аллелей и соответственно генотипов ряда eQTL [44]. Например, "неблагоприятный" аллель *G* по rs2070788 гена *TMPRSS2* встречался с частотой 27% в африканских популяциях, 36% в восточно-азиатских и более 46% в европейских, южно-азиатских и американских популяциях.

Интересно, что ген *TMPRSS2* локализован в непосредственной близости с генами *MX1* и *MX2*, которые кодируют две интерферон-индуцируемые динамин-подобные ГТФазы. MX1 обладает противовирусной активностью в отношении широкого спектра РНК-вирусов и некоторых ДНК-вирусов; для MX2 характерен сильный противовирусный эффект в отношении вируса иммунодефицита человека типа 1. Маркеры rs2070788 и rs383510 являются также eQTL для гена *MX1* [14, 45, 74].

Ассоциированный с заболеваниями сердечнососудистой системы (гипертонией, ишемической болезнью сердца, атеросклерозом коронарных артерий) аллель *A* rs17514846, расположенного в интроне гена *FURIN* [75–77], приводит к более высокой, чем альтернативный аллель, транскрипционной активности данного гена в эндотелиальных клетках сосудов [45, 78]. Эти данные хорошо согласуются с клиническими наблюдениями, согласно которым большая подверженность заражению SARS-CoV-2 и более тяжелое течение COVID-19 наблюдаются у лиц с заболеваниями сердечно-сосудистой системы [79]. Частота регистрации "неблагоприятного" аллеля *A* rs17514846 варьирует от 16% в популяциях Восточной Азии до 88% в африканских популяциях; в европейских популяциях этот аллель встречается с частотой 46% [44].

Влияние на уровень экспрессии гена CTSL оказывают генотипы по rs3118869 и rs2378757 [45, 80]. Для первого указанного eQTL зависимость уровня экспрессии от генотипов различалась в органах/тканях (более высокий уровень экспрессии *CTSL* регистрировался у носителей аллеля *C* – в коже, большеберцовом нерве и ободочной кишке, у обладателей гомозиготных генотипов АА и СС – в подкожной жировой ткани и большеберцовой артерии, у носителей гетерозиготного генотипа – в крови). N. Mbewe-Campbell с соавт. [80] показано, что генотип CC rs3118869, который расположен в промоторе гена *CTSL*, ассоциирован с артериальной гипертензией. Не исключено, что пациенты с артериальной гипертензией и генотипом СС rs3118869 гена CTSL более подвержены к SARS-CoV-2 и поражению тех органов, где носительство генотипа СС приводит к более высокому уровню экспрессии данного гена. Для rs2378757 в 11 органах/тканях (в том числе в легких, аорте, подкожной жировой ткани) уровень экспрессии гена CTSL снижался в зависимости от числа аллелей А: AA > AC > CC.

Специфичность экспрессионных профилей генов-кандидатов восприимчивости к SARS-CoV-2 (в том числе и вследствие генетических особенностей индивидов) может определять межпопуляционные различия в распространении COVID-19. В частности, с особенностями уровня экспрессии гена *FURIN* (одного из ключевых генов, продукт которого участвует в процессе проникновения коронавируса в клетку организма-хозяина) некоторые исследователи связывают разные клинические сценарии течения COVID-19 в регионах мира (в частности, в Китае и в Италии) [81]. Для гена *FURIN* известно около 300 eQTL (табл. 1), но их число (рис. 1) и спектр отличаются в разных органах и тканях [45].

Приведенные примеры функционально-значимых полиморфных вариантов не отражают всего их разнообразия. А. Paniri с соавт. [82], используя *in silico* анализ предсказания функциональной значимости вариабельности гена TMPRSS2, выявили 21 SNPs, которые влияют на функцию и структуру кодируемого им белка – на фолдинг, посттрансляционную модификацию, сплайсинг, а также на регуляторный потенциал микроРНК. В частности, rs12329760 изменяет форму белка таким образом, что de novo формируется "карман" белка; rs875393 создает новый донорный сайт, сайты в сайленсерах и разрушает три сайта в энхансерном мотиве. Ряд SNP (rs12627374, rs456142, rs462574, rs456298) приводят к разрушению/созданию сайтов связывания, ослаблению или усилению эффектов различных микроРНК (hsa-miR-548c-3p, hsa-miR-127-3p, hsa-miR1324, hsa-miR-5089, hsamiR-204-5p, hsa-miR-211-5p, hsa-miR-4685-3p, hsamiR-4716-5p). Все эти структурно-функциональные особенности гена TMPRSS2, как и других геновкандидатов восприимчивости к SARS-CoV-2, могут лежать в основе индивидуальных различий в подверженности данному инфекционному заболеванию и определять характер его течения.

#### Факторы, влияющие на экспрессию геновкандидатов восприимчивости к SARS-CoV-2

Клинические наблюдения показывают, что наличие патологических состояний (заболеваний сердечно-сосудистой системы, почек, эндокринные нарушения) и пожилой возраст выступают в качестве факторов риска развития, а также тяжелого течения COVID-19 [8, 64, 83, 84]. При некоторых заболеваниях и с увеличением возраста могут регистрироваться изменения в уровне экспрессии генов-кандидатов восприимчивости к SARS-CoV-2, в том числе и вследствие эпигенетических модификаций.

С возрастом увеличивается экспрессия генов *ACE2* и *TMPRSS2* в сустентакулярных (вспомогательных) клетках обонятельного эпителия (показано на модельных объектах) [85]. У людей старшего возраста регистрируются более высокие активность DPP4 [86] и уровень CTSB (уровень CTSL не менялся) в различных тканях и органах [87]. Эти наблюдения могут объяснять более высокую подверженность COVID-19 лиц пожилого возраста [88].

При многих заболеваниях регистрируется изменение уровня экспрессии генов-кандидатов восприимчивости к SARS-CoV-2. У пациентов с идиопатической дилатационной кардиомиопатией и ишемической кардиомиопатией увеличивается экспрессия гена *ACE2* в миокарде желудочков [66]. При этом показан более высокий риск развития COVID-19 и осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы у лиц, страдающих заболеваниями данной системы [83, 84, 88].

Следует отметить, что уровень экспрессии АСЕ2 в соскобах эпителиальных клеток носа и бронхов у пациентов с бронхиальной астмой и респираторными аллергиями был снижен и показал обратно-пропорциональную зависимость от тяжести клинической картины (экспрессия АСЕ2 была самой низкой у пациентов с высоким уровнем аллергической сенсибилизации и с аллергической астмой), но неатопическая астма не была связана с пониженной экспрессией данного гена [89]. Авторы отмечают, что эти данные могут объяснить такое неожиданное клиническое наблюдение, как более мягкое течение COVID-19 у пациентов с респираторной аллергией, и в то же время подчеркивают, что экспрессия АСЕ2 – это один из факторов, который может влиять на ответ данных лиц на инфицирование SARS-CoV-2. Действительно, в бронхах при аллергической астме наблюдали увеличение экспрессии генов DPP4 и ANPEP [90], что также может влиять на восприимчивость к SARS-CoV-2. Кроме того, в легких регистрируется экспрессия всех привлеченных к рассмотрению генов-кандидатов восприимчивости к SARS-CoV-2, и для многих генов установлены eOTL, влияющие на уровень экспрессии в легких (рис. 1). Возможно, именно с генетическими особенностями территориальных групп населения связана противоречивость результатов в отношении влияния астмы на риск развития и характер течения COVID-19. Так, Z. Zhu с соавт. [91] отмечают, что взрослые с астмой имеют более высокий риск тяжелого COVID-19, причем повышенный риск наблюдался именно среди пациентов с "неаллергической" астмой.

Повышение уровня экспрессии гена DPP4 зарегистрировано в альвеолярном эпителии и альвеолярных макрофагах у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), с муковисцидозом [92], при инсулинорезистентности (показано на модельных животных и в культуре клеток) [93] и в условиях гипоксии [47]. Повышенный уровень белка DPP4 рассматривается в качестве предиктора возникновения метаболического синдрома [86]. У лиц с сахарным диабетом типа 2 (СД2) по сравнению со здоровыми индивидами в плазме наблюдали более высокий уровень и активность DPP4; повышенный уровень данного белка (но не активность) регистрировался также у пациентов с СД2 и ожирением по сравнению с СД2 без ожирения [94].

Модифицирующие эффекты на регуляцию работы генов-кандидатов восприимчивости к

SARS-CoV-2 и синтез кодируемых ими белков может оказывать прием лекарственных препаратов. Так, уровень экспрессии гена *TMPRSS11D* в биоптатах легких пациентов с ХОБЛ зависел от приема лекарственных препаратов (флутиказона и сальметерола – комбинация ингаляционных стероидов и бета-агонистов длительного действия) [95]. Между пациентами с воспалительными заболеваниями кишечника и здоровыми индивидами не выявлено различий по уровню экспрессии генов *ACE2* и *TMPRSS2* в подвздошной кишке и толстой кишке, но медикаментозная терапия у пациентов (в частности, прием блокаторов фактора некроза опухолей) приводила к снижению уровня экспрессии *ACE2* [96].

Уровень экспрессии генов-кандидатов восприимчивости к SARS-CoV-2 может модифицироваться наличием в организме других вирусов, причем направленность изменения экспрессии зависит от инфекционного агента. Несколько неожиданным является то, что некоторые вирусы (в частности, вирус птичьего гриппа H5N1) увеличивают экспрессию генов IFITM1, IFITM2 и IFITM3 [97], обладающих противовирусным эффектом [57-59, 63]. В то же время вирусы папилломы человека высокого онкогенного риска (hrHPV) подавляют экспрессию гена IFITM1 в кератиноцитах уже через 48 ч после инфицирования [98]. Возможно, изменение уровня экспрессии при воздействии вирусов зависит не только от инфекционного агента, но и от длительности инфекционного процесса, а также от генетических особенностей организма и его функционального состояния на момент инфицирования.

В качестве модифицирующих функционирование генов-кандидатов восприимчивости к SARS-CoV-2 могут выступать и другие экзогенные факторы. В легких у курильщиков выявлено повышение экспрессии генов *ACE2* и *FURIN*, но на уровень экспрессии гена *TMRPSS2* курение влияния не оказывало [99]. Курение ассоциировано с увеличением экспрессии гена *ACE2* в жировой ткани [100]. Некоторые исследователи предполагают, что жировая ткань у индивидов с ожирением может выступать в качестве источника для более широкого распространения вирусов, повышенного их выделения, иммунной активации и амплификации цитокинов [64].

В ряде работ показано влияние курения на уровень метилирования сайта cg23161492, расположенного в 1-м интроне гена *ANPEP* (курение снижает уровень метилирования ДНК) в лейкоцитах крови [101–104]. Изменение уровня метилирования данного CpG-сайта сказывается на

ГЕНЕТИКА том 57 № 6 2021

экспрессии гена АNPEP в ткани легкого [105]. Интересно, что для сg23161492 установлено шесть генетических вариантов (rs28565347, rs12442778, rs12440213, rs8030857, rs8031576 и rs748508), которые могут влиять на паттерн метилирования СрG-сайтов (mQTLs) в лейкоцитах крови [106]. Уровень метилирования другого cg05312779, локализованного в 3'UTR гена ANPEP, статистически значимо ассоциирован с функцией легких, в частности увеличение метилирования ДНК было связано со снижением индекса Тиффно у девушек-подростков [107]. Эти данные согласуются с клиническими наблюдениями, согласно которым курильщики имеют более высокий риск развития симптомов COVID-19 при инфицировании SARS-CoV-2 [100]. Однако оценки влияния курения на риск развития COVID-19 неоднозначны (см., например, [65]), что еще раз подчеркивает сложность регуляции ответа организма-хозяина на инфицирование SARS-CoV-2.

В качестве фактора, модулирующего ответ на инфицирование SARS-CoV-2, рассматривают также нарушение уровня метилирования ДНК и в других генах [108]. Предполагают, что гипометилирование регуляторных участков гена *ACE2* в CD4+ Т-клетках у пациентов с системной красной волчанкой, вследствие вызванного вирусной инфекцией окислительного стресса, может приводить к увеличению экспрессии гена *ACE2* [108]. Гипометилирование CpG-сайтов и высокий уровень экспрессии гена *ACE2* характерны для многих онкозаболеваний [109], и это может объяснять высокий риск осложнений у пациентов с COVID-19 и такими сопутствующими патологиями [83].

Таким образом, несмотря на непродолжительный период исследований, к настоящему времени накоплены данные, свидетельствующие о том, что восприимчивость и характер течения инфекции, вызванной SARS-CoV-2 могут определяться генетическими особенностями коронавируса и организма человека. Структурно-функциональные особенности S-белка SARS-CoV-2 и генов человека, кодирующих рецепторы, протеазы и другие белки и ферменты, значимые для проникновения и репликации коронавируса, а также модифицирующие функционирование данных генов факторы (в том числе — наличие сопутствующих заболеваний, вредных привычек, инфицирование другими вирусами, прием лекарственных препаратов и др.) могут определять на индивидуальном уровне восприимчивость и клиническую картину COVID-19, а на популяционном - особенности эпидемиологической ситуации.

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. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard [Electronic resource]. URL: https://covid19.who. int/. Accessed 23.06.2020.
- 2. *Malik Y.A.* Properties of coronavirus and SARS-CoV-2// Malays J. Pathol. 2020. V. 42(1). P. 3–11.
- de Wit E., van Doremalen N., Falzarano D. SARS and MERS: Recent insights into emerging coronaviruses // Nat. Rev. Microbiol. 2016. V. 14. P. 523–534. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.81
- 4. *Liu J., Zheng X., Tong Q. et al.* Overlapping and discrete aspects of the pathology and pathogenesis of the emerging human pathogenic coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and 2019-nCoV // J. Med. Virol. 2020. V. 92(5). P. 491–494. https://doi.org/10.1002/jmv.25709
- Tu Y.F., Chien C.S., Yarmishyn A.A. et al. Review of SARS-CoV-2 and the ongoing clinical trials // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21(7). pii: E2657. https://doi.org/10.3390/ijms21072657
- Zimmermann P., Curtis N. Coronavirus infections in children including COVID-19: An overview of the epidemiology, clinical features, diagnosis, treatment and prevention options in children // Pediatr. Infect. Dis. J. 2020. V. 39(5). P. 355–368. https://doi.org/10.1097/INF.00000000002660
- Park S.E. Epidemiology, virology, and clinical features of severe acute respiratory syndrome – coronavirus-2 (SARS-CoV-2; Coronavirus Disease-19) // Clin. Exp. Pediatr. 2020. V. 63(4). P. 119–124. https://doi.org/10.3345/cep.2020.00493
- Goyal P., Choi J.J., Pinheiro L.C. et al. Clinical characteristics of Covid-19 in New York City // N. Engl. J. Med. 2020. V. 382(24). P. 2372–2374. https://doi.org/10.1056/NEJMc2010419
- Liu K., Chen Y., Lin R., Han K. Clinical features of COVID-19 in elderly patients: A comparison with young and middle-aged patients // J. Infect. 2020. V. 80(6). e14–e18. https://doi.org/10.1016/j.jiinf.2020.03.005

https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.03.005

 Li W., Zhang C., Sui J. et al. Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2 // EMBO J. 2005. V. 24(8). P. 1634–1643. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600640

- Li X., Geng M., Peng Y. et al. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19 // J. Pharm. Anal. 2020. V. 10(2). P. 102–108. https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.03.001
- Zhang Y., Qin L., Zhao Y. et al. Interferon-induced transmembrane protein-3 genetic variant rs12252-C is associated with disease severity in COVID-19 // J. Infect. Dis. 2020. pii: jiaa224. https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa224
- Clohisey S., Baillie J.K. Host susceptibility to severe influenza A virus infection // Critical Care (London, England). 2019. V. 23(1): 303. https://doi.org/10.1186/s13054-019-2566-7
- The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase // Nucl. Acids Res. 2017. V. 45. D158–D169 [Electronic resource]. URL: http:// www.uniprot.org/. Accessed 10.2019.
- 15. QuickGO. [Electronic resource]. URL: https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/. Accessed 06.2020.
- Chen Y., Guo Y., Pan Y., Zhao Z.J. Structure analysis of the receptor binding of 2019-nCoV // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2020. V. 525(1). P. 135–140. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.02.071
- Zhou P., Yang X.-L., Wang X.-G. et al. Pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin // Nature. 2020. V. 579(7798). P. 270–273. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7
- Lu R., Zhao X., Li J. et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: Implications for virus origins Wenjie and receptor binding // Lancet. 2020. V. 395(10224). P. 565–574. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8
- Saha P., Banerjee A.K., Tripathi P.P. et al. A virus that has gone viral: Amino-acid mutation in S protein of Indian-isolate of Coronavirus COVID-19 might impact receptor-binding, thus infectivity // Biosci. Rep. 2020. V. 40(5). pii: BSR20201312. https://doi.org/10.1042/BSR20201312
- Yin C. Genotyping coronavirus SARS-CoV-2: methods and implications // Genomics. 2020. pii: S0888-7543(20)30318-9. https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.04.016
- Kandeel M., Ibrahim A., Fayez M., Al-Nazawi M. From SARS and MERS CoVs to SARS-CoV-2: Moving toward more biased codon usage in viral structural and nonstructural genes // J. Med. Virol. 2020. V. 92(6). P. 660–666. https://doi.org/10.1002/jmv.25754
- Pillay T.S. Gene of the month: the 2019-nCoV/SARS-CoV-2 novel coronavirus spike protein // J. Clin. Pathol. 2020. V. 73(7). P. 366–369. https://doi.org/10.1136/jclinpath-2020-206658
- 23. Zhu Y., Yu D., Yan H. et al. Design of potent membrane fusion inhibitors against SARS-CoV-2, an

emerging coronavirus with high fusogenic activity // J. Virol. 2020. V. 94(14):e00635-20. https://doi.org/10.1128/JVI.00635-20

- 24. Hofmann H., Pyrc K., van der Hoek L. et al. Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratorv syndrome coronavirus receptor for cellular entry // PNAS USA. 2005. V. 102(22). P. 7988-7993. https://doi.org/10.1073/pnas.0409465102
- 25. Walls A.C., Park Y.J., Tortorici M.A. et al. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein // Cell. 2020. V. 181(2). P. 281-292.e6. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058
- 26. Yeager C.L., Ashmun R.A., Williams R.K. et al. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E // Nature. 1992. V. 357(6377). P. 420-422. https://doi.org/10.1038/357420a0
- 27. Li Y., Zhang Z., Yang L. et al. The MERS-CoV receptor DPP4 as a candidate binding target of the SARS-CoV-2 spike // iScience. 2020. V. 23(6): 101160. https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101160
- 28. Wang O., Zhang Y., Wu L. et al. Structural and functional basis of SARS-CoV-2 entry by using human ACE2 // Cell. 2020. V. 181(4). P. 894-904.e9. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.045
- 29. Shang J., Wan Y., Luo C. et al. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2 // PNAS USA. 2020. V. 117(21). P. 11727-11734.

https://doi.org/10.1073/pnas.2003138117

- 30. Xia S., Liu M., Wang C. et al. Inhibition of SARS-CoV-2 (previously 2019-nCoV) infection by a highly potent pancoronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that harbors a high capacity to mediate membrane fusion // Cell Res. 2020. V. 30(4). P. 343-355. https://doi.org/10.1038/s41422-020-0305-x
- 31. Chang T.J., Yang D.M., Wang M.L. et al. Genomic analysis and comparative multiple sequence of SARS-CoV2 // J. Chin. Med. Assoc. 2020. V. 83(6). P. 537-543.

https://doi.org/10.1097/JCMA.00000000000335

- 32. Garten W., Braden C., Arendt A. et al. Influenza virus activating host proteases: Identification, localization and inhibitors as potential therapeutics // Eur. J. Cell. Biol. 2015. V. 94(7-9). P. 375-383. https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2015.05.013
- 33. Shirato K., Kanou K., Kawase M., Matsuyama S. Clinical isolates of human coronavirus 229E bypass the endosome for cell entry // J. Virol. 2016. V. 91(1). pii: e01387-16.

https://doi.org/10.1128/JVI.01387-16

34. Shulla A., Heald-Sargent T., Subramanya G. et al. A transmembrane serine protease is linked to the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor and activates virus entry // J. Virol. 2011. V. 85(2). P. 873-882.

https://doi.org/10.1128/JVI.02062-10

ГЕНЕТИКА том 57 Nº 6 2021

- 35. Heurich A., Hofmann-Winkler H., Gierer S. et al. TMPRSS2 and ADAM17 cleave ACE2 differentially and only proteolysis by TMPRSS2 augments entry driven by the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein // J. Virol. 2014. V. 88(2). P. 1293-1307. https://doi.org/10.1128/JVI.02202-13
- 36. Reinke L.M., Spiegel M., Plegge T. et al. Different residues in the SARS-CoV spike protein determine cleavage and activation by the host cell protease TMPRSS2 // PLoS One. 2017. V. 12(6): e0179177. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179177
- 37. Coutard B., Valle C., de Lamballerie X. et al. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade // Antiviral Res. 2020. V. 176: 104742. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104742
- 38. Rabaan A.A., Al-Ahmed S.H., Haque S. et al. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-COV: A comparative overview // Infez. Med. 2020. V. 28(2). P. 174-184.
- 39. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S. et al. SARS-CoV-2 Cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor // Cell. 2020. V. 181(2). P. 271-280. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052
- 40. Williams F.M.K., Freydin M., Mangino M. et al. Selfreported symptoms of covid-19 including symptoms most predictive of SARS-CoV-2 infection, are heritable // medRxiv. The Preprint server for Health Sciences. 2020. https://www.medrxiv.org/. https://doi.org/10.1101/2020.04.22.20072124
- 41. Zietz M., Tatonetti N.P. Testing the association between blood type and COVID-19 infection, intubation, and death // medRxiv. The Preprint server for Health Sciences 2020. V. 2020. https://doi.org/10.1101/2020.04.08.20058073
- 42. Zaidi F.Z., Zaidi A.R.Z., Abdullah S.M., Zaidi S.Z.A. COVID-19 and the ABO blood group connection // Transfus. Apher Sci. 2020. V. 59(5): 102838. https://doi.org/10.1016/j.transci.2020.102838
- 43. Genome Aggregation Database (gnomAD). [Electronic resource]. https://gnomad.broadinstitute.org/. Accessed 06.2020.
- 44. Ensembl Genome Browser 88. [Electronic resource]. https://www.ensembl.org/. Accessed 05.2020.
- 45. Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. [Electronic resource]. https://www.gtexportal.org/home/. Accessed 05.2020.
- 46. GTEx Consortium. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project // Nat. Genet. 2013. V. 45(6). P. 580-585. https://doi.org/10.1038/ng.2653
- 47. Li Y., Yang L., Dong L. et al. Crosstalk between the Akt/mTORC1 and NF-kB signaling pathways pro-

motes hypoxia-induced pulmonary hypertension by increasing DPP4 expression in PASMCs // Acta Pharmacol. Sin. 2019. V. 40(10). P. 1322–1333. https://doi.org/10.1038/s41401-019-0272-2

- Vankadari N., Wilce J.A. Emerging COVID-19 coronavirus: glycan shield and structure prediction of spike glycoprotein and its interaction with human CD26 // Emerg. Microbes Infect. 2020. V. 9(1). P. 601–604. https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1739565
- Raj V.S., Mou H., Smits S.L. et al. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC // Nature. 2013. V. 495(7440). P. 251– 254.

https://doi.org/10.1038/nature12005

- Kolb A.F., Maile J., Heister A., Siddell S.G. Characterization of functional domains in the human coronavirus HCV 229E receptor // J. Gen. Virol. 1996. V. 77. Pt. 10. P. 2515–2521. https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-10-2515
- 51. Bestle D., Heindl M.R., Limburg H. et al. TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation and spread of SARS-CoV-2 in human airway epithelial cells and provide promising drug targets (Preliminary Report) // BioRxiv. The Preprint server for Biology. 2020. https://www.biorxiv.org/. https://doi.org/10.1101/2020.04.15.042085
- Bertram S., Dijkman R., Habjan M. et al. TMPRSS2 activates the human coronavirus 229E for cathepsinindependent host cell entry and is expressed in viral target cells in the respiratory epithelium // J. Virol. 2013. V. 87(11). P. 6150–6160. https://doi.org/10.1128/JVI.03372-12
- 53. Matsuyama S., Nao N., Shirato K. et al. Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells // PNAS USA. 2020. V. 117(13). P. 7001–7003. https://doi.org/10.1073/pnas.2002589117
- 54. Shirato K., Kawase M., Matsuyama S. Middle East respiratory syndrome coronavirus infection mediated by the transmembrane serine protease TMPRSS2 // J. Virol. 2013. V. 87(23). P. 12552–12561. https://doi.org/10.1128/JVI.01890-13
- 55. Simmons G., Gosalia D.N., Rennekamp A.J. et al. Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry // PNAS USA. 2005. V. 102(33). P. 11876–11881. https://doi.org/10.1073/pnas.0505577102
- 56. Xu L., Khadijah S., Fang S. et al. The cellular RNA helicase DDX1 interacts with coronavirus nonstructural protein 14 and enhances viral replication // J. Virol. 2010. V. 84(17). P. 8571–8583. https://doi.org/10.1128/JVI.00392-10
- 57. *Huang I.C., Bailey C.C., Weyer J.L. et al.* Distinct patterns of IFITM-mediated restriction of filoviruses, SARS coronavirus, and influenza A virus // PLoS

Pathog. 2011. V. 7(1): e1001258. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001258

- Jiang D., Weidner J.M., Qing M. et al. Identification of five interferon-induced cellular proteins that inhibit west nile virus and dengue virus infections // J. Virol. 2010. V. 84(16). P. 8332–8341. https://doi.org/10.1128/JVI.02199-09
- Amini-Bavil-Olyaee S., Choi Y.J., Lee J.H. et al. The antiviral effector IFITM3 disrupts intracellular cholesterol homeostasis to block viral entry // Cell Host Microbe. 2013. V. 13(4). P. 452–464. https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.03.006
- Wrapp D., Wang N., Corbett K.S. et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation // Science. 2020. V. 367(6483). P. 1260– 1263. https://doi.org/10.1126/science.abb2507
- Qi F., Qian S., Zhang S., Zhang Z. Single cell RNA sequencing of 13 human tissues identify cell types and receptors of human coronaviruses // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2020. V. 526(1). P. 135–140. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.03.044
- Iwata-Yoshikawa N., Okamura T., Shimizu Y. et al. TMPRSS2 contributes to virus spread and immunopathology in the airways of murine models after coronavirus infection // J. Virol. 2019. V. 93(6). e01815-18. https://doi.org/10.1128/JVI.01815-18
- 63. Brass A.L., Huang I.C., Benita Y. et al. The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus // Cell. 2009. V. 139(7). P. 1243–1254. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.017
- Ryan P.M., Caplice N.M. Is adipose tissue a reservoir for viral spread, immune activation and cytokine amplification in COVID-19 // Obesity (Silver Spring). 2020. V. 28(7). P. 1191–1194. https://doi.org/10.1002/oby.22843
- 65. Gaibazzi N., Tuttolomondo D., Guidorossi A. et al. Smoking prevalence is low in symptomatic patients admitted for COVID-19. // medRxiv. The Preprint server for Health Sciences. 2020. https://www.medrxiv.org//.

https://doi.org/10.1101/2020.05.05.20092015

- 66. Goulter A.B., Goddard M.J., Allen J.C., Clark K.L. ACE2 gene expression is up-regulated in the human failing heart // BMC Med. 2004. V. 2: 19. https://doi.org/10.1186/1741-7015-2-19
- 67. *Darbani B*. The expression and polymorphism of entry machinery for COVID-19 in human: juxtaposing population groups, gender, and different tissues // Int. J. Environ. Res. Public Health. 2020. V. 17(10): 3433. https://doi.org/10.3390/ijerph17103433
- 68. *Bertram S., Heurich A., Lavender H. et al.* Influenza and SARS-coronavirus activating proteases TMPRSS2 and HAT are expressed at multiple sites in

628

human respiratory and gastrointestinal tracts // PLoS One. 2012. V. 7(4). e35876. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035876

- Fu J., Zhou B., Zhang L. et al. Expressions and significances of the angiotensin-converting enzyme 2 gene, the receptor of SARS-CoV-2 for COVID-19 // Mol. Biol. Rep. 2020. May 14. P. 1–10. https://doi.org/10.1007/s11033-020-05478-4
- Online Mendelian Inheritance in Man [Electronic resource]. URL: http://www.omim.org/. Accessed 06.2020.
- 71. Everitt A.R., Clare S., Pertel T. et al. IFITM3 restricts the morbidity and mortality associated with influenza // Nature. 2012. V. 484. P. 519–523. https://doi.org/10.1038/nature10921
- Weidner J.M., Jiang D., Pan X.-B. et al. Interferon-induced cell membrane proteins, IFITM3 and tetherin, inhibit vesicular stomatitis virus infection via distinct mechanisms // J. Virol. 2010. V. 84(24). P. 12646– 12657.

https://doi.org/10.1128/JVI.01328-10

- 73. Cheng Z., Zhou J., To K.K. et al. Identification of TMPRSS2 as a susceptibility gene for severe 2009 pandemic A(H1N1) influenza and A(H7N9) influenza // J. Infect. Dis. 2015. V. 212(8). P. 1214–1221. https://doi.org/10.1093/infdis/jiv246
- EBI Search. [Electronic resource]. https://www.ebi. ac.uk/ebisearch/overview.ebi/about. Accessed 06.2020.
- 75. van der Harst P., Verweij N. Identification of 64 novel genetic loci provides an expanded view on the genetic architecture of Coronary Artery Disease // Circulation Research. 2017. V. 122(3). P. 433–443. https://doi.org/10.1161/circresaha.117.312086
- 76. Nikpay M., Goel A., Won H.H. et al. A comprehensive 1,000 Genomes-based genome-wide association meta-analysis of coronary artery disease // Nat. Genet. 2015. V. 47(10). P. 1121–1130. https://doi.org/10.1038/ng.3396
- 77. Takeuchi F., Akiyama M., Matoba N. et al. Interethnic analyses of blood pressure loci in populations of East Asian and European descent // Nat. Communications. 2018. V. 9(1): 5052. https://doi.org/10.1038/s41467-018-07345-0
- Yang X., Yang W., McVey D.G. et al. FURIN expression in vascular endothelial cells is modulated by a coronary artery disease—associated genetic variant and influences monocyte transendothelial migration // J. Am. Heart Assoc. 2020. V. 9(4). e014333. https://doi.org/10.1161/JAHA.119.014333
- Li B., Yang J., Zhao F. et al. Prevalence and impact of cardiovascular metabolic diseases on COVID-19 in China // Clin. Res. Cardiol. 2020. V. 109(5). P. 531– 538.

https://doi.org/10.1007/s00392-020-01626-9

- Mbewe-Campbell N., Wei Z., Zhang K. et al. Genes and environment: novel, functional polymorphism in the human cathepsin L (*CTSL1*) promoter disrupts a xenobiotic response element (XRE) to alter transcription and blood pressure // J. Hypertens. 2012. V. 30(10). P. 1961–1969. https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e328356b86a
- Afsar C.U. 2019-nCoV-SARS-CoV-2 (COVID-19) infection: Cruciality of Furin and relevance with cancer //
- Med. Hypotheses. 2020. V. 140: 109770. https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109770
- Paniri A., Hosseini M.M., Akhavan-Niaki H. First comprehensive computational analysis of functional consequences of TMPRSS2 SNPs in susceptibility to SARS-CoV-2 among different populations // J. Biomol. Struct. Dyn. 2020. P. 1–18. https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1767690
- Mason K.E., McHale P., Pennington A. Age-adjusted associations between comorbidity and outcomes of COVID-19: a review of the evidence. // medRxiv. The Preprint server for Health Sciences. 2020. https://www.medrxiv.org/. https://doi.org/10.1101/2020.05.06.20093351
- Lippi G., Wong J., Henry B.M. Hypertension in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19): A pooled analysis // Pol. Arch. Intern. Med. 2020. V. 130(4). P. 304–309. https://doi.org/10.20452/pamw.15272
- 85. Bilinska K., Jakubowska P., Von Bartheld C.S., Butowt R. Expression of the SARS-CoV-2 entry proteins, ACE2 and TMPRSS2, in cells of the olfactory epithelium: identification of cell types and trends with age // ACS Chem. Neurosci. 2020. V. 11(11). P. 1555–1562. https://doi.org/10.1021/acschemneuro.0c00210
- Bassendine M.F., Bridge S.H., McCaughan G.W., Gorrell M.D. Covid-19 and co-morbidities: a role for Dipeptidyl Peptidase 4 (DPP4) in disease severity? // J. Diabetes. 2020. V. 12(9). P. 649–658. https://doi.org/10.1111/1753-0407.13052
- Kakimoto Y., Sasaki A., Niioka M. et al. Myocardial cathepsin D is downregulated in sudden cardiac death // PLoS One. 2020. V. 15(3). e0230375. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230375
- Siordia J.A., Jr. Epidemiology and clinical features of COVID-19: A review of current literature // J. Clin. Virol. 2020. V. 127. 104357. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104357
- Jackson D.J., Busse W.W., Bacharier L.B. et al. Association of respiratory allergy, asthma, and expression of the SARS-CoV-2 receptor ACE2 // J. Allergy Clin. Immunol. 2020. V. 146(1). P. 203–206.e3. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.04.009
- 90. van der Velden V.H., Wierenga-Wolf A.F., Adriaansen-Soeting P.W. et al. Expression of aminopeptidase N and dipeptidyl peptidase IV in the healthy and asth-

matic bronchus // Clin. Exp. Allergy. 1998. V. 28(1). P. 110–120. https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.1998.00198.x

- *Zhu Z., Hasegawa K., Ma B. et al.* Association of asthma and its genetic predisposition with the risk of severe COVID-19 // J. Allergy Clin. Immunol. 2020. V. 146(2). P. 327–329.e4. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.06.001
- Meyerholz D.K., Lambertz A.M., McCray P.B., Jr. Dipeptidyl peptidase 4 distribution in the human respiratory tract: Implications for the Middle East Respiratory Syndrome // Am. J. Pathol. 2016. V. 186(1). P. 78–86. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.09.014
- 93. Cheng F., Yuan G., He J. et al. Dysregulation of DPP4 is associated with the AMPK/JAK2/STAT3 pathway in adipocytes under insulin resistance status and liraglutide intervention // Diabetes Metab. Syndr. Obes. 2019. V. 12. P. 2635–2644. https://doi.org/10.2147/DMSO.S229838
- 94. Sarkar J., Nargis T., Tantia O. et al. Increased plasma dipeptidyl peptidase-4 (DPP4) activity is an obesityindependent parameter for glycemic deregulation in Type 2 Diabetes patients // Front. Endocrinol. (Lausanne). 2019. V. 10: 505. https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00505
- 95. van den Berge M., Steiling K., Timens W. et al. Airway gene expression in COPD is dynamic with inhaled corticosteroid treatment and reflects biological pathways associated with disease activity // Thorax. 2014. V. 69(1). P. 14–23.

https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2012-202878

- 96. Burgueno J.F., Reich A., Hazime H. et al. Expression of SARS-CoV-2 entry molecules ACE2 and TMPRSS2 in the gut of patients with IBD // Inflamm Bowel. Dis. 2020. V. 26(6). P. 797–808. https://doi.org/10.1093/ibd/izaa085
- 97. Wang H., Chen L., Luo J., He H. NP and NS1 proteins of H5N1 virus significantly upregulated IFITM1, IFITM2, and IFITM3 in A549 cells // Afr. Health Sci. 2019. V. 19(1). P. 1402–1410. https://doi.org/10.4314/ahs.v19i1.13
- 98. Ma W., Tummers B., van Esch E.M. et al. Human papillomavirus downregulates the expression of *IFITM1* and *RIPK3* to escape from IFNγ- and TNFα-mediated antiproliferative effects and necroptosis // Front Immunol. 2016. V. 7: 496. https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00496
- 99. Cai G., Bossé Y., Xiao F. et al. Tobacco smoking increases the lung gene expression of ACE2, the receptor of SARS-CoV-2 // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2020. V. 201(12). P. 1557–1559. https://doi.org/10.1164/rccm.202003-0693LE
- 100. *Hopkinson N.S., Rossi N., El-Sayed Moustafa J. et al.* Current tobacco smoking and risk from COVID-19: results from a population symptom app in over 2.4 mil-

lion people // medRxiv. The Preprint server for Health Sciences. 2020. https://www.medrxiv.org/. https://doi.org/10.1101/2020.05.18.20105288

- 101. Zhang X., Hu Y., Aouizerat B.E. et al. Machine learning selected smoking-associated DNA methylation signatures that predict HIV prognosis and mortality // Clin. Epigenetics. 2018. V. 10: 155. https://doi.org/10.1186/s13148-018-0591-z
- 102. Li S., Wong E.M., Bui M. et al. Causal effect of smoking on DNA methylation in peripheral blood: a twin and family study // Clin. Epigenetics. 2018. V. 10: 18. https://doi.org/10.1186/s13148-018-0452-9
- 103. Zeilinger S., Kühnel B., Klopp N. et al. Tobacco smoking leads to extensive genome-wide changes in DNA methylation // PLoS One. 2013. V. 8(5): e63812. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063812
- 104. Sayols-Baixeras S., Lluís-Ganella C., Subirana I. et al. Identification of a new locus and validation of previously reported loci showing differential methylation associated with smoking. The REGICOR study // Epigenetics. 2015. V. 10(12). P. 1156–1165. https://doi.org/10.1080/15592294.2015.1115175
- 105. Lee M.K., Hong Y., Kim S.-Y. et al. DNA methylation and smoking in Korean adults: epigenome-wide association study // Clin. Epigenetics. 2016. V. 8: 103. https://doi.org/10.1186/s13148-016-0266-6
- 106. Gao X., Thomsen H., Zhang Y. et al. The impact of methylation quantitative trait loci (mQTLs) on active smoking-related DNA methylation changes // Clin. Epigenetics. 2017. V. 9: 87. https://doi.org/10.1186/s13148-017-0387-6
- 107. Sunny S.K., Zhang H., Rezwan F.I. et al. Changes of DNA methylation are associated with changes in lung function during adolescence // Respir. Res. 2020. V. 21(1): 80. https://doi.org/10.1186/s12931-020-01342-y
- 108. Sawalha A.H., Zhao M., Coit P., Lu Q. Epigenetic dysregulation of ACE2 and interferon-regulated genes might suggest increased COVID-19 susceptibility and severity in lupus patients // Clin. Immunol. 2020. V. 215: 108410. https://doi.org/10.1016/j.clim.2020.108410
- 109. Chai P, Yu J., Ge S. et al. Genetic alteration, RNA expression, and DNA methylation profiling of coronavirus disease 2019 (COVID-19) receptor ACE2 in malignancies: a pan-cancer analysis // J. Hematol. Oncol. 2020. V. 13(1): 43.
  https://doi.org/10.1186/s12045\_020\_00882\_5

https://doi.org/10.1186/s13045-020-00883-5

### Genetic Control of Human Infection SARS-CoV-2

A. N. Kucher<sup>a, \*</sup>, N. P. Babushkina<sup>a</sup>, A. A. Sleptcov<sup>a</sup>, and M. S. Nazarenko<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Research Institute of Medical Genetics, National Research Medical Center of the Russian Academy of Science, Tomsk, 634050 Russia \*e-mail: aksana.kucher@medgenetics.ru

SARS-CoV-2 belong to the genus Coronavirus and was first identified in 2019. This strain of coronavirus causes the pandemic of severe acute respiratory syndrome or COVID-19 (COronaVIrus Disease 2019). The susceptibility to SARS-CoV-2 and clinical features of COVID-19 are determined by many factors, including genetic characteristics of both pathogen and host-organism. The SARS-CoV-2 genome has similarities with the genomes of other human-pathogenic coronaviruses that cause a severe disease: 79% – with the genome SARS-CoV and 50% – with the genome MERS-CoV. The most significant differences between SARS-CoV-2 and other coronaviruses in the structure of the S-protein gene are registered. This protein is responsible for binding the virus to the host cellular receptors. Specific amino acid substitutions are found in the S-protein of SARS-CoV-2, which leads to the acquisition of the furin cleavage site and may explain the high pathogenicity of virus. There are important host genes for the initial stages of infection such as ACE2. ANPEP, and DPP4 (encode coronavirus binding receptors), TMPRSS2, FURIN, TMPRSS11D, CTSL, and CTSB (encode proteases involved in coronavirus cell entry), DDX1 (DEAD-Box Helicase 1, which promotes coronavirus replication), IFITM1, IFITM2, and IFITM3 (encode interferon-induced transmembrane proteins with antiviral effects). These genes expressed in many tissues, including those susceptible to the SARS-CoV-2. Common and rare variants have been established for these genes. These variants affect the structure and properties of the encoded proteins, as well as the protein expression levels. Several common genetic variants with medical and functional relevance are characterized by variability in the allele frequencies in different populations. These genetic variants may determine interpopulation differences in the prevalence of COVID-19 and the clinical features of the course of this pathology. The expression level of host genes involved in susceptibility to SARS-CoV-2 is influenced by epigenetic modifications, comorbidities, taking medication, and bad habits.

**Keywords:** SARS-CoV-2, COVID-19, candidate genes of susceptibility to SARS-CoV-2, SNV, eQTL, expression, DNA methylation.

#### ОБЗОРНЫЕ И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 575.224:633.13

## ПРОИСХОЖДЕНИЕ И РЕСУРСНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ДИКИХ И КУЛЬТУРНЫХ ВИДОВ РОДА ОВЕС (Avena L.)

© 2021 г. И. Г. Лоскутов<sup>1, 2</sup>, А. А. Гнутиков<sup>1, 2, \*</sup>, Е. В. Блинова<sup>1</sup>, А. В. Родионов<sup>2, 3</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, 190000 Россия <sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

<sup>3</sup>Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук, Санкт-Петербург, 197376 Россия

\*e-mail: alexandr2911@yandex.ru Поступила в редакцию 04.08.2020 г. После доработки 21.09.2020 г. Принята к публикации 10.10.2020 г.

Род Avena L. представлен культурными видами, имеющими большое практическое значение, сегетальными сорняками и дикими видами, интересными как объекты потенциальных источников ценных признаков для селекции. До настоящего времени существуют значительные разногласия в понимании объема рода, особенно касающиеся выделения редких специализированных видов из видов-агрегатов. В обзоре проанализированы собственные и литературные данные по сравнительной геномике и систематике видов рода, обсуждается использование при молекулярно-генетических исследованиях различных генных маркеров для идентификации видов овса. В настоящее время современные исследования рода в значительной степени опираются на молекулярно-филогенетические и кариологические данные. Так, много работ посвящено родству единственного многолетнего тетраплоидного вида A. macrostachya и диплоидных видов рода Avena. В настоящей статье рассмотрены связи генома этого уникального автотетраплоидного вида, образовавшегося еще до эволюционного разделения рода на отдельные геномы, с А- и С-геномам других видов. С другой стороны, овес – хорошо изученная культура по агрономическим и хозяйственно ценным признакам с использованием традиционных полевых и лабораторных методов. Молекулярные маркеры часто используются для выделения источников устойчивости к биотическим стрессам. Отбор генотипов овса, устойчивых к заболеваниям и, в частности, к заражению фузариозом и накоплению микотоксина дезоксиниваленола (ДОН) в зерне, проводят с помощью картирования локусов количественных признаков (QTLs). Установлены QTLs, контролирующие устойчивость к накоплению микотоксина. Кроме того, были найдены QTLs, которые при увеличении продолжительности вегетационного периода и высоты растений уменьшают накопление микотоксина ДОН в зерновке овса. Обсуждается использование маркер-вспомогательной селекции (MAS) для выделения генотипов, устойчивых к основным заболеваниям овса, и для других селекционных признаков. Рассмотрены современные подходы к генотипировнию селекционно значимых признаков.

*Ключевые слова: Avena*, геномы, злаки, межвидовая гибридизация, молекулярные маркеры, oвес, QTLs, Poaceae, полиплоидия, происхождение культурных видов, резистентность к факторам среды, селекция.

DOI: 10.31857/S0016675821060060

Род Avena L. представлен несколькими культурными видами и немногочисленными сегетальными (сорно-полевыми) и дикими видами, интересными как потенциальные источники ценных признаков для селекции. Один из видов – A. sativa L. (овес посевной) – наиболее важная зерновая сельскохозяйственная культура, занимающая в мире около 10 млн га пахотных земель. Овес посевной дает один из лучших концентрированных кормов для скота, а зеленый корм и сено из овса, которые обычно используют в смеси с бобовыми культурами, имеют большое значение в животноводстве. Получаемые из зерна овса крупа и мука, и продукты питания на их основе, благодаря оптимальному соотношению питательных веществ обладают высокими пищевыми, диетическими и функциональными достоинствами.

Ареал диких и особенно сорно-полевых видов овса охватывает весь зерновой пояс земного шара. Широкий диапазон адаптации диких видов к неблагоприятным факторам внешней среды, их приспособленность к разнообразным почвенноклиматическим условиям, устойчивость к патогенным организмам, некоторые признаки, связанные с элементами повышенной продуктивности и качества, представляют уникальный источник исходного материала для селекции [1–5].

#### СИСТЕМА РОДА *Avena* В ТАКСОНОМИЧЕСКОМ ОТНОШЕНИИ И ПРОИСХОЖДЕНИЕ КУЛЬТУРНЫХ ВИДОВ

В основе современной системы рода Avena L. лежит обработка К. Линнея [6, 7]. Линней в первом издании "Species Plantarum" в составе рода Avena из настоящих овсов описал два вида – A. sativa L. и A. fatua L. и восемь видов, которые сейчас рассматриваются как представители других родов (Achnatherum, Haeupleria, Trisetaria и др.). Интересно, что К. Линней считал таксономически значимым признаком для разделения A. sativa и А. fatua наличие (A. fatua) или отсутствие (A. sati*va*) волосков на цветковых чешуях, в то время как яркий отличительный для них признак - легко распадающаяся ось колоска при сочленениях у основания нижних цветковых чешуй у A. fatua — Линней не счел важным. Между тем, признак этот не только яркий, но и практически важный: именно неосыпание зерновок и сохранение целостности колоса до обмолота благоприятствовало превращению A. sativa в культурный вид и значимую сельскохозяйственную культуру [8]. Впрочем, в полном соответствии с законом гомологических рядов изменчивости [9], растения с "фатуоидным колосом" встречаются среди A. sativa, признак этот, по-видимому, контролируется одним геном и "фатуоидный" аллель рецессивен [10].

Форма с белыми цветковыми пленками культурного овса *A. sativa* L. – тип рода. Однако Линней описал *A. sativa* по формам с черными цветковыми пленками (овес с белыми пленками он считал вариантом последнего и обозначал " $\beta$ ") [6]. Таким образом, считать типовым образцом рода *Avena* форму с белыми пленками было незаконно, до тех пор, пока Баум из аутентичного материала не выбрал лектотип Baum, 1974: 579: Негb. Clifford: 25, хранящийся в Британском музее, тем самым узаконив тип *A. sativa* L. (форму с белыми цветковыми пленками) [11].

Учитывая, что современные представления о видовом составе рода *Avena* со времен Линнея существенно изменились и число видов, подвидов и разновидностей, когда-либо относимых к роду *Avena*, обозреть в рамках одной статьи невозможно (их не менее 436 [12] и только для флоры России их число превышает 100 [13, 133, 134]), далее мы будем говорить только о видах, отношение которых к роду *Avena* не вызывает сомнений у ведущих современных специалистов [1, 2, 12, 13].

Расхождение в числе принимаемых разными авторами видов в роде *Avena*, которое колеблется от 12–13 [14] до 27 [10], объясняется, с одной сто-

ГЕНЕТИКА том 57 № 6 2021

роны, тем, что часть видов овса на уровне макроморфологии ("образа" растений) неразличимы, различия между ними лежат в области микроморфологии [2, 10, 13]. С другой стороны, систематики расходятся во мнениях об относительном весе (таксономической значимости) того или иного признака и, прежде всего, такого признака как репродуктивная изоляция.

Одним из подходов, направленных против субъективности в определении границ видов, который был использован при исследовании внутриродового разнообразия в роде Avena, была численная систематика. При этом вся выборка анализируется по возможно большему числу признаков равного веса или также численно, но с учетом веса отобранных экспертом "значимых признаков". Используя эти приемы, Баум [10] изучил изменчивость 29 морфологических признаков на нескольких тысячах гербарных образцов из основных гербариев мира и у семенного потомства 5 тыс. образцов овса из разных природных популяций и селекционных сортов. В результате было предложено разделить все разнообразие овса на 26 видов плюс два варианта культурного овса A. sativa, типовой и фестукоидный [10].

С другой стороны, с генетической точки зрения среди таксономически значимых признаков особое место должна занимать генетическая обособленность (репродуктивная изоляция) вида [14-18]. Если считать критерием вида этот признак, как это делает Ладизинский [14, 18], то число известных сейчас видов рода Avena снижается до 12 (без учета вида A. macrostachya, который по мнению Ладизинского следовало бы отнести к роду *Helictotrichon*). Аргументация у Ладизинского следующая: вследствие вавиловского закона рядов гомологичной изменчивости морфологические признаки, которые представители классической школы таксономии считают видоспецифичными, с той или иной частотой встречаются у разных видов овсаи потому морфологический критерий вида не может раскрыть реального генетического и таксономического разнообразия рода. Так, поскольку диплоидные культурные виды овса A. brevis, A. hispanica, A. nuda, A. strigosa и дикие -A. hirtula, A. wiestii, A. atlantica могут быть скрещены в эксперименте и дают жизнеспособное и плодовитое потомство, нет оснований делить их на отдельные виды. Два других диплоидных диких вида, A. eriantha и A. clauda, различаются тем, что у A. clauda колосок ломкий в основании каждого цветка, а у *А. eriatha* только в основании колоска. Но признак этот, скорее всего, находится под моногенным контролем, виды в эксперименте легко скрещиваются и дают плодовитое потомство. По мнению Ладизинского, есть все основания считать их одним видом A. clauda. Все гексаплоидные виды овса – A. sativa, A. fatua, A. sterilis, A. byzantina легко скрещиваются между собой, при этом A. fatua, по-видимому, вообще не встречается в дикой природе, фактически не имеет своего специфического ареала и известен только как сорно-полевое растение, причем часто как интрогрессивный гибрид с *A. sativa*; по мнению Ладизинского все эти растения — лишь формы вида *A. sativa* [14, 18]. И наоборот, диплоидные виды *A. damascena* и *A. prostrata* морфологически неразличимы или трудно различимы, однако при скрещивании получить от них потомство не удается — это два хороших криптических вида [14].

Взгляды Ладизинского не нашли поддержки у большинства систематиков и генетиков [2–5, 13, 19-22]. Помимо причин психологических (традиционная система рода против новой), основанием для неприятия предложения сократить число видов в роде до числа репродуктивно изолированных групп служит то, что среди систематиков-флористов распространена тенденция к восприятию вида как вида "монотипного", внутривидовая вариабельность которого касается только признаков несущественных [23, 24]. Объединение "морфологических" видов в виды "биологические" преобразования, подобные тем, что предлагал для рода Avena L. Ладизинский, с точки зрения традиционной ботанической систематики ведут к тому, что пониженные в статусе до уровня подвидов, разновидностей и форм бывшие "виды" выпадают из системы исследования, учета и сохранения биологического разнообразия [17, 24].

Но есть и иные, более принципиальные возражения против радикальной редукции числа видов в роде *Avena* на основании результатов экспериментов по скрещиванию. Как отметил Баум [10], признание какого-либо вида видом "биологическим", генетически (репродуктивно) изолированным от других, совсем не опровергается тем, что эти виды могут давать жизнеспособное и продуктивное потомство в условиях эксперимента; в природе виды *Avena* могут быть полностью или почти полностью изолированы друг от друга вследствие разных ареалов (географически), фенологически (разное время цветения) или вследствие склонности к самоопылению.

В табл. 1 приведены основные сведения о распространении, кариотипах и геномах 27 видов рода *Avena* L. Возможно, со временем, по мере появления новых данных о генетических расстояниях между природными расами диких и сорно-полевых видов рода *Avena* среди уже известных видов будут выявлены новые виды, виды-двойники (сестринские и криптические виды) и/или будет показано, что некоторые из непризнанных пока видов, которые сейчас рассматриваются как синонимы уже известных видов [см.: 10, 12, 13], в действительности представляют собой генетически изолированные природные популяции. Ожидать это есть все основания: на сегодняшний день

далеко недостаточно изучены эколого-географические популяции видов Avena Средиземноморской флористической области, особенно островов Средиземного моря, стран Магриба, популяции Средней Азии, Индии, Ирана, Ирака, Турции. Немногочисленные экспедиции с целью изучения генетического разнообразия природных популяций овса с завидной регулярностью приводили к открытию новых видов и эколого-географических рас [1, 2, 14, 25-29]. Совершенно особая задача с точки зрения раскрытия и сохранения генетического разнообразия овса – поиск, сбор и изучение в значительной мере утраченной в условиях интенсивного земледелия группы эколого-географических рас и видов сорно-полевых овсов.

Есть все основания думать, что некоторые из географически изолированных популяций, не всегда имеющих специфический синдром морфологических признаков (снова вспомним закон рядов гомологичной изменчивости Н.И. Вавилова), могут оказаться весьма удаленными друг от друга на филогенетическом древе видами-двойниками или близко родственными, но репродуктивно изолированными сестринскими видами (sibling species) [16, 17]. Если говорить о нашей стране, то представляет интерес исследование природных популяций A. barbata var. caspica Housskn., отличающихся от типовых образцов A. barbata по морфологии нижних цветковых чешуй [2, 13]. Требует изучения группа родства A. sativa (A. aggr. sativa), в частности пока неподтвержденные виды, такие как эндемик Поволжья A. volgensis (Vavilov) Nevski, европейско-среднеазиатский A. macrantha (Hack.) Nevski, европейско-кавказско-сибирский A. georgica Zuccagni и евросибирско-дальневосточный A. orientalis Schreb., а в составе A. aggr. fatua такие формы, как A. septentrionalis Malzew, A. cultiformis (Malzew) Malzew и A. aemulans Nevski – все это специализированные сорняки полбы и овса, ныне, в условиях интенсивного земледелия, встречающиеся довольно редко [13].

Генетически обоснованная система рода может быть построена, если мы правильно определим геномный состав диплоидных и полиплоидных видов рода *Avena*. Пионером исследования геномной конституции видов рода *Avena* был Нишияма, изучавший конъюгацию хромосом у межвидовых гибридов диплоидов и полиплоидов и обозначивший гаплоидный геном *A. strigosa* как A, геном тетраплоида *A. barbata* как AB' и геном *A. fatua* как ABC, причем B' и B были разными геномами [30]; поэтому по предложению Райхати и Моррисона [31] геномную конституцию тетраплоида стали обозначать как AB, а гексаплоиды как ACD.

Сравнительный анализ морфологии митотических хромосом Avena показал, что диплоидные

	1					
ГЕНЕТИКА	Вид рода А <i>vena</i>	"Биологический вид" по Ладизинскому [14]*	Геномная конституция	Распространенность	Размер генома 1Cn/1Cx***	Размер генома хлоропластов, тпн <sup>#</sup>
том 57	A. macrostachya Balansa ex Coss. & Durieu	<i>Helictotrichon</i> <i>macrostachyum</i> (Balansa ex Coss. & Durieu) Henrard	2n = 28, CmCm	Алжир	10.65/4.19	
№ 6 2	A. clauda Durieu	clauda	2n = 14, Cp	Алжир, Сирия, Южная Европа, Иран, Ср. Азия, Крым, Дагестан	5.04	135.557
021	A. eriantha Duricu	clauda	2n = 14, Cp	Алжир, Южная Европа, Иран, Ср. Азия, Крым, Сев. Кавказ	4.98	135.560
	A. ventricosa Balansa	ventricosa	2n = 14, Cv	Алжир, Кипр, Ливия, Азербайджан	5.03	135.681
	A. bruhnsiana Gruner	I	2n = 14, Cv	Азербайджан		
	A. canariensis B.R. Baum, Rajhathy et D.R. Sampson	canariensis	2n = 14, Ac	Канарские острова	4.30	135.955
	<i>A. damascena</i> Rajhathy & B.R. Baum	damascena	2n = 14, Ad	Сирия, Марокко	4.12	135.925
	A. longiglumis Durieu	longiglumis	2 <i>n</i> = 14, Al	Алжир, Египет, Израиль, Испания	4.51	135.728
	A. prostrata Ladiz.	prostrata	2 <i>n</i> = 14, Ap	Испания, Марокко		
	A. strigose Schreb.	strigosa	2n = 14, As	@ Северная Африка, Европа, Юг Сибири	4.43	135.938
	A. wiestii Steud.	strigosa	2 <i>n</i> = 14, As	Афганистан, Сев. Африка, Малая Азия	4.44	135.944
	A. hirtula Lag.	strigosa	2n = 14, As	Средиземноморье	4.44	
	A. atlantica B.R. Baum et G. Fedak	strigosa	2 <i>n</i> = 14, As	Марокко	4.51	136.006
	A. nuda L.**		2n = 14, Ac	Ср. Европа	4.44	135.934

Таблица 1. Виды рода Аvena и геномный состав их кариотипов

ПРОИСХОЖДЕНИЕ И РЕСУРСНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ

635

ГЕНЕТИКА

Вид рода <i>Аvena</i>	"Биологический вид" по Ладизинскому [14]*	Геномная конституция	Распространенность	Размер генома lCn/lCx***	Размер генома хлоропластов, тпн <sup>#</sup>
A. barbata Pott ex Link	barbata	2n = 28, AB	Средиземноморье, Мал. Азия, Ср. Азия, Крым	8.03/4.01	135.946
A. abyssinica Hochst.	barbata	2n = 28, AB	@Эфиопия, Эритрея, Йемен	8.18/4.09	135.942
A. vaviloviana (Malzew) Mordv.	barbata	2n = 28, AB	Эфиопия, Эритрея, Йемен	8.01/4.00	135.946
A. agadiriana B.R. Baum & G. Fedak	agadiriana	2n = 28, AB	Марокко	8.55/4.27	135.945
A. insularis Ladiz.	insularis	2n = 28, CD	Сицилия, Тунис	9.09/4.54	135.967
A. maroccana Gand.	magna	2n = 28, CD	Марокко	9.05/4.52	135.887
A. murphyi Ladiz.	murphy	2n = 28, CD	Испания	9.14/4.57	135.892
A. sativa L.	sativa	2n = 42, ACD	@Повсеместно	12.57/4.19	135.886
A. fatua L.	sativa	2n = 42, ACD	Повсеместно	12.62/4.21	135.889
A. sterilis L.	sativa	2n = 42, ACD	Средиземноморье, Мал. Азия, Иран, Закавказье, Ср. Азия	12.59/4.20	135.888
A. byzantina K. Koch	sativa	2n = 42, ACD	@Турция, Вост. Закавказье, Ср. Азия		
A. Iudoviciana Durieu		2n = 42, ACD	Ср. Европа, Мал. Азия, Иран, Ср. Азия, Крым, Нижн. Дон		
A. occidentalis Durieu		2n = 42, ACD	Евразия	12.58/4.19	135.893
Примечание. * Не являясь сторонник: возможность межвиловой гибрилизац	ами предложенных Ладизи ии и получения плодовито	нским [14, 18] грани го потомства в услон	ц видов <i>Аvena</i> (пояснение см. в тексте), автор виях эксперимента – важнейшая характеристи	ы настоящего обз ика, отражающая	ора полагают, что генетическое род-

пределах рода *Avena.* \*\* Известны диплоидные и гексаплоидные линии голозерного овса. Признак этот простой и контролируется одним геном. Предложено сохранить линнеевское название вида *A. nuda* L. за диплоидными овсами, именуя гексаплоид *A. sativa* var. *nuda* [133]. Доказано, что голозерные формы являются подвидами плен-чатого вида: *A. strigosa* subsp. *strigosa* (пленчатый) и *A. strigosa* subsp. *nidibrevis* (Vav.) Kobyl. et Rod. (голозерный); овес пленчатый (*A. sativa* subsp. *sativa* L.) и голозерный

ство между видами [35], поэтому "биологические виды" Ладизинского понимаются нами как внеранговые внутриродовые группы родства одного уровня плоидности в

(*A. sativa* subsp. *nudisativa* (Husn.) Rod. et Sold.) [134]. \*\*\* Размер ядерного генома по [19]. Сп – размер гаплоидного генома в млрд пн, Сх – средний размер субгенома у тетра- и гексаплоидов.

Знаком @ отмечены культурные виды. # Размер генома хлоропластов из [21].

636

Таблица 1. Окончание

ГЕНЕТИКА том 57 2021 <u>№</u> 6

виды овса могут иметь геномы А- или С-типа, при этом было предложено различать два варианта С-геномов, Су и Ср, и пять вариантов А-геномов (As, Ap, Al, Ad, Ac) (табл. 1). Средний размер гаплоидного генома у диплоидных видов с А-геномами около 4.4 млрд пн, размер гаплоидного генома у диплоидов с С-геномами 5.0 млрд пн. У тетраплоидов гаплоидные геномы более разнообразны по размеру, причем AB < AC(DC) < CC (средний размер 1C = 8.2, 9.1 и 10.6 млрд пн соответственно). Размер гаплоидного генома у разных видов гексаплоидов примерно одинаков 12.6 млрд пн [19]. Легко видеть, что у полиплоидных видов Avena с AC-геномами суммарный размер генома меньше, чем можно было бы ожидать (AC < C + A), наблюдаются редукция величины Cx (genome downsizing) [32] – обычное для полиплоидов явление, природа которого состоит в постепенной потере полиплоидами части дуплицированных генов, прежде всего таких, продукты которых не работают в составе мультипротеиновых комплексов [16, 33, 34], и возможно "сброс" части рассеянных повторов одного из субгеномов аллополиплоида.

Варианты геномов А различаются по числу акроцентрических хромосом. Геномы Ар, Аl, Ad видоспецифичны, в то время как As встречается у нескольких диплоидных видов (*A. atlantica, A. strigosa* и *A. wiestii*) – эти виды с геномом As имеют разные ареалы, но в эксперименте скрещиваются, потомство их фертильно [14, 18, 35]. Сравнение нескольких тысяч SNPs в геномах As этих трех видов показывает лишь незначительные вариации – это генетически близкие эколого-географические расы [36].

Признак, который отличает Ср-геном от Су-генома, - это число хромосом со спутниками: в геномах Ср две спутничные хромосомы, с большим и малым спутником, в Cv – одна пара хромосом с малым спутником. Хромосомы А-и С-геномов различаются не только тем, что в геномах и субгеномах А-типа хромосомы более равноплечные, чем в геномах и субгеномах С-типа [37-40], но и совсем разным рисунком С-окрашивания [38-41]. Хромосомы С-геномов диплоидов и С-субгеномов полиплоидов не только несут более крупные блоки С-гетерохроматина, но и в целом окрашиваются после С-бэндинга в более темный цвет красителями Гимза-Романовского и Райта. Джеллен [41] и Бадаева [38] называют этот тип окрашивания "диффузным гетерохроматином". Феномен этот заслуживает обсуждения. Напомним, что факультативный гетерохроматин (транскрипционно инертный эухроматин, инактивированная Х-хромосома самок млекопитающих и обедненные генами темные G-блоки плеч хромосом) при C-бэндинге не окрашивается [42, 43]. Темноокрашенные С-блоки – это обогащенные тандемными повторами и характерными для конститутивного гетерохроматина протеинами (НР1, Н3К9те3,

H4K20me3 и др.) районы хромосом [43, 44]. Темное окрашивание плеч хромосом у диплоидных видов Avena с С-геномами и С-субгеномов полиплоидов свидетельствует о том, что в них по всей длине плеч хромосом распределены участки хроматина особого, не характерного для плеч хромосом состава, устойчивые к депуринизации и бета-элиминации ДНК после С-обработок [45]. В эухроматине плеч хромосом диплоидных видов овса с А-геномамии их дериватов у полиплоидов такого хроматина мало или нет совсем. Наиболее вероятно, что различия связаны с экспансией в С-геномах и С-субгеномах рассеянных по длине плеч относительно протяженных и/или многочисленных кластеров тандемных повторов, связанных с НР-1 и другими, характерными для тандемных повторов протеинами, а не с ретротранспозонами. Характерные для плеч А-субгеномов микросателлиты (например, [46]) или недостаточно многочисленны в А-субгеномах, чтобы влиять на С-окрашивание, или связанные с ними протеины иные, такие, которые не дают темного окрашивания плеч хромосом при С-бэндинге. Прямым указанием на то, что в геномах видов Avena с А- и С-геномами среди распределенных по плечам хромосом тандемных повторов доминируют разные семейства, служит TO, ЧТО при тотальном секвенировании генома A. atlantica (А-геном) оказалось, что у этого вида наиболее массовыми микросателлитами, рассеянными по плечам, являются  $(AT)_n$  и  $(AAC)_n$ , а у вида с С-геномом A. eriantha – микросателлиты  $(GGC)_n$  и  $(TTTA)_n$  [36]. Кроме того, при тотальном секвенировании А-и С-геномов было показано, что в хромосомах A. eriantha кластеры субтеломерного сателлита 665 пн найдены и

Диплоидные виды с разными геномами не скрещиваются, гибриды между разными вариантами А-генома могут быть получены, однако они полностью или почти полностью стерильны [35].

во внутренних районах плеч хромосом [36].

Тетраплоидные виды рода Avena разнообразны по геномной конституции: тетраплоид A. macrostachya имеет кариотип CmCmCmCm [38, 47], у A. barbata, A. vaviloviana, A. abissinica, A. agadariana, кариотип AABB [37, 39], у A. maroccana, A. murphyi, A. insularis DDCC [38, 46]. Все гексаплоиды имеют кариотип AACCDD [37, 40].

А- и С-геномы современных диплоидных видов рода *Avena* дивергировали по разным оценкам 5–13 [36] или 19–21 млн лет назад [20]. 2–4-кратные различия в хронологии обусловлены неясностью в определении времени дивергенции основных ветвей злаков. Инда и соавт. [48], например, полагают, что линии *Avena* и *Triticum* дивергировали примерно 15 млн лет назад [88], Фу [20] полагает, что это имело место 25 млн лет назад, а Ванг и соавт. [49] относят это событие ко времени не ранее 25, но не позже 51 млн лет назад. За время дивергенции А- и С-геномы накопили достаточно различий, чтобы заметно различаться в экспериментах по геномной *in situ*-гибридизации (GISH) [50–52]. В то же время с помощью этого метода неудается дифференцировать ни А- и В-субгеномы тетрапоидов [50, 53], ни А- и D-субгеномы гексаплоидов в роде *Avena* [50, 51].

Насколько существенно это различие при попарном сравнении геномов А/С, А/В, А/D? Универсальной шкалы для оценки аналитической силы метода GISH, к сожалению, пока не существует, но, как правило, хромосомы разного происхождения у аллополиплоидов и гибридов, произошедших от скрещивания близких родов, различимы с помощью GISH (обзор: [54]). Редкое исключение из этого правила демонстрируют хромосомы двух близких родов злаков *Leymus* Hochst. и *Psathyrostachys* Nevski, сходным образом "красящиеся" при GISH [55].

Использование FISH и GISH выявило интересную особенность эволюции геномов полиплоидных видов Avena — в кариотипе/геноме Avena относительно часто встречаются транслокации, часть из которых видоспецифична, но есть и транслокации, найденные только в отдельных природных популяциях, линиях и сортах овса. Транслокации могут быть как в пределах одного субгенома, так и между хромосомами разных субгеномов [22, 36, 38, 46, 56, 57]. При этом у A. sativa транслокации чаще происходили между хромосомами субгеномов С и D, чем между С- или D-субгеномами и А-субгеномом [22, 58, 59]. Сравнение групп сцепления A. atlantica и A. eriantha с генетическими картами Hordeum vulgare L. показало, что А-геном овса (*A. atlantica*) сохранил протяженные синтенные группы с ячменем, в то время как геном С-типа (A. eriantha) претерпел множественные транслокации [36]. Не отличаясь от А-субгеномов по рисунку GISH, В-геномы отличаются от А большим числом хромосомных перестроек, что косвенно свидетельствует в пользу того, что тетраплоиды с АВ-геномами не авто-, а аллополиплоиды [22].

Ядерные геномы диплоидных видов овса A. atlantica (As-тип генома) и A. eriantha (Ср-тип генома) секвенированы [36]. Аннотированные последовательности охватывают 3.69 и 3.78 млрд пн соответственно (для сравнения с размерами геномов, определенными цитофотометрически – табл. 1, предполагается, что несеквенированными и неаннотированными остались районы, насыщенные повторами [36]). Средний процент GC-пар в секвенированных участках генома был 44.4 (A. atlantica) и 43.9 (A. eriantha), что согласуется с результатами, полученными ранее при секвенировании геномов других злаков (Sorghum bicolor (L.) Moench- 43.9; Oryza sativa L. -43.6% G + C), но значительно выше, чем процент G + C у двудольных (*Carica papava* L.– 34; Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. – 36) [60]. Примерно 83% диплоидных геномов А- и С-типа представлены транспозонами, среди которых наиболее многочисленны LTR-содержащие, что типично для геномов растений. В частности, более 60% генома овса – Gypsy-и Соріа-подобные транспозоны (в соотношении между ними 2.3 : 1 и 3.5 : 1 для *A. atlantica* и *A. eriantha* соответственно). Следующий по частоте копий в геномах *Avena* транспозон – 5% генома – это ДНК-транспозон СМС-EnSm [36]. Интересно, что 10–14% повторов генома овса с А- и С-геномами ранее не были известны – возможно, они специфичны для геномов рода *Avena* [36].

Многократно повторенный тандемный повтор (159)<sub>n</sub> лежит у *A. atlantica* и *A. eriantha* в центромерных районах [36]. Сателлитные последовательности с близкой длиной повторяющейся единицы 156 пн найдены в центромерах *Brachypodium distachyon* (L.) Р. Beauv. и *Zea mays* L., 154 пн длина центромерного повтора у *Oryza brachyantha* A. Chev. & Roehrich [61], однако центромерный повтор *Avena* отличается по последовательностям от повторов в геномах других родов [36].

Как и у других злаков, число протеин-кодирующих генов в геномах овса значительно больше, чем в геноме человека, их не менее 51100 у *A. atlantica* и 49100 у *A. eriantha*, средняя длина транскрипта при этом 3 тпн [36]. Гены *Avena* относительно GC-обогащены (в среднем ~52% у обоих видов при среднем по геному ~44% G + C). Тенденция к GC-обогащению значительной части генов за счет высокой частоты G + C в третьем положении кодона — свойство, характерное как для злаков, что отличает их от двудольных [62, 63], так и для теплокровных позвоночных, в отличие от беспозвоночных, амфибий и рыб [64, 65].

Только 2.2–2.3% протеин-кодирующих генов в изученных геномах диплоидных видов *Avena* дуплицированы [36] — удивительно мало. Возможно, этот результат требует проверки — это самый низкий показатель среди всех растений, геномы которых секвенированы. Для сравнения укажем, что в геноме ячменя *Hordeum vulgare* таких генов не менее 16%, в геноме риса *Oryza sativa* — не менее 49% [66], а в среднем в геномах растений дуплицированы 64.5% генов [67].

Бекеле и соавт. [68] недавно опубликовали генетическую карту *A. sativa*с высокой плотностью полиморфных маркеров по всем 21 группам сцепления. Сравнение ее с результатами секвенирования А- и С-геномов диплоидных видов овса показало, что частота кроссинговера в перицентрических районах хромосом у *Avena* сильно подавлена [36]. Картирование молекулярных маркеров было выполнено на основе популяции рекомбинантных имбредных линий (RIL), полученных от скрещивания различных сортов овса [22, 36, 69]. Построение карт молекулярных маркеров облегчает картирование селекционно-ценных генетических локусов. Особый интерес для селекции овса представляет картирование генов устойчивости к болезням. Среди них такие, как толерантность к вирусу желтой карликовости ячменя (BYDV) [70], устойчивость к корончатой ржавчине [71], мучнистой росе [72], головне [73]. Были проведены многочисленные работы по картированию генов, контролирующих качественные признаки — это содержание белка, масла, фенольных алкалоидов и β-глюканов в зерновке овса [74—78].

Гены-кандидаты, ответственные за такие критически важные признаки овса, как устойчивость к заражению фузариозом и накоплению микотоксина дезоксиниваленола (ДОН) в зерне, картируют используя технологию QTL. QTL чаще всего идентифицируют путем картирования сцепления с использованием экспериментальных семей F<sub>2</sub>, обратного скрещивания, продвинутых инбредных или двойных гаплоидных семейств [74]. Альтернативным подходом к обнаружению OTL являются исследования геномных ассоциаций (GWAS) [78-81]. Установлено, что основные QTLs, контролирующие устойчивость к накоплению микотоксина, находятся на хромосомах 17А/7С, 5С, 9D, 13А, 14D 13A [81, 82]: в частности, собственно накопление микотоксина наиболее тесно связано с локусом avgbs 6K 95238.1, продукт которого относится к классу zinc-finger-протеинов — это липазо-подобный протеин или предшественник липазы [81]. Найдены QTLs, которые при увеличении продолжительности вегетационного периода и высоты растений уменьшают накопление микотоксина в зерновке овса [83]. При изучении большого массива образцов овса с использованием маркеров Diversity Array Technology (DArT) было установлено, что три независимых SNPs были достоверно связаны с содержанием бета-глюканов в зерновке овса [78].

GWAS был использован для идентификации OTLs, связанных с таким важным агрономическим признаком овса, как полегание растений. Материалом для исследования послужили 126 яровых и озимых сортов овса (как современных селекционных, так и староместных), собранных в 27 европейских странах. Было показано, что QTLs, ассоциированные с высотой растения, сконцентрированы в группах сцепления Mrg01, Mrg08, Mrg09, Mrg11 и Mrg13 [58, 80]. Обращает на себя внимание, что QTLs, ассоциированные с высотой растения и картированные в группах сцепления Mrg01 иMrg13, совпадали по локализации с OTLs, определяющими время колошения, а "отвечающий за высоту" QTL на Mrg11 колокализовался с геном, отвечающим за устойчивость к заморозкам [75, 76, 79, 80].

Признаком, прямо связанным с продуктивностью и зависящим от большого числа локусов, является продолжительность периода развития растения до выметывания (колошения). Исследование SNPs в геномах 682 линий европейских сортов овса показало, что связанные с этим признаком локусы сконцентрированы в группах сцепления Mrg02 и Mrg24, а также в Mrg12, Mrg13 и Mrg33 [58, 84, 85]. Эти результаты позволяют целенаправленно вести подбор исходного материала для селекции уже на ранних этапах развития растений и в ранних гибридных поколениях при проведении маркер-вспомогательной селекции (marker assisted selection, MAS) [85].

При технологии MAS, в принципе, могут использоваться молекулярные маркеры не только генома ядра, но и геномов органелл. До настоящего времени опубликовано описание митохондриального генома только культурного вида овса — A. sativa [86]. Митохондриальный геном посевного овса кольцевой, 596 тпн, содержит шесть прямых повторов 1–7 тпн длиной и два инвертированных повтора длиной 12 и 3 тпн. Есть все основания думать, что в клетке митохондриальный геном может присутствовать в виде нескольких изомерных форм и в виде нескольких кольцевых молекул разного размера. 14 генов митохондриального генома Avena кодируют белки, три гена – pPHK (rrn26, rrn18 и rrn5) и 18 генов – тРНК. Из них два гена – coxI и rrn26 представлены в митохондриальном геноме овса в двух копиях [86]. То, что ген coxI у A. sativa дуплицирован, заставляет вспомнить, что дупликация этого гена у сарептской горчицы (Brassica juncea (L.) Czern.) сопровождалась цитоплазматической мужской стерильностью [87].

Исследование полиморфизма мтДНК с помощью рестриктаз показало, что митохондрии гексаплоидных и тетраплоидных видов овса происходят от видов с АА-геномами. NGS-секвенирование мт-геномов 25 видов *Avena* выявило в них 1243 парсимонично-информативных SNPs [20], однако детальное аннотированное описание мт-геномов диких видов пока не опубликовано.

Геномы хлоропластов 25 видов рода Avena недавно были секвенированы и аннотированы Фу с соавт. [20, 21]. Сравнительный анализ полученных последовательностей показал, что размер хлоропластных геномов Avena варьирует в диапазоне от 135557 до 136006 пн (табл. 1). В геноме 130 генов и по 4–6 псевдогенов в каждом геноме. Среди них 84 гена кодировали протеины, восемь – pPHK и 38 генов – тPHK. 13 протеин-кодирующих и восемь генов тPHK имели интроны. Степень сходства хп-геномов разных видов Avena при попарном сравнении нуклеотидных последовательностей варьировала от 98.38 до 99.996% при среднем 99.5%. Вариации в основном были связаны с межгенны-

ми районами. Сравнение геномов 25 видов выявило 1313 позиций, в которых отмечены SNPs, 583 SNPs (44.4%) были найдены в генах, 714 (54.4%) – в межгенных районах, 15 SNPs (1.2%) – в псевдогенах. Число кластеров микросателлитов (SSRs) на геном варьировало от 256 (A. clauda и *A. eriantha*) до 280 (*A. atlantica*), при среднем 276.8. Наиболее часто встречались следующие SSRs:  $A_{8-18}$ , С<sub>8-14</sub>, (AT)<sub>5-7</sub>, (AG)<sub>5</sub>. Авторы цитируемой работы [21] справедливо полагают, что результаты исследования полиморфизма хлоропластных геномов могут быть использованы для разработки ДНКштрих-кодов, применимых для ДНК-паспортизации сортового разнообразия и верификации заключений о таксономической принадлежности образцов к диким видам Avena.

#### ПРОИСХОЖДЕНИЕ СУБГЕНОМОВ ПОЛИПЛОИДНЫХ ВИДОВ *AVENA* – РЕЗУЛЬТАТЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СЕКВЕНИРОВАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

Все вилы наземных растений и вилы рода Avena. в частности, прошли через несколько раундов полногеномных дупликаций и межвидовых гибридизаций [16, 34, 89]. В результате возвратных скрещиваний, межгеномных транслокаций, потери части генов одного из родителей, экспансии транспозонов, постепенно идущей вторичной диплоидизации кариотипов [16, 34] ядерные геномы современных растений имеют сложное, мозаичное по происхождению строение, в котором в тех или иных пропорциях представлены гены нескольких предков. По этой причине митохондриальные и хлоропластные геномы, на первый взгляд, должны быть более удобны для реконструкции происхождения родов и видов растений. Показано, что у большинства растений, в том числе у злаков, хлоропластные и митохондриальные ДНК наследуются преимущественно по материнской линии, хотя известны и исключения из этого правила [90, 91]. У большинства растений, в том числе у злаков, хлоропластные и митохондриальные геномы отца теряются в ходе микроспорогенеза, либо во время оплодотворения. Во время развития пыльцы сигналы ДНК в органеллах обнаруживаются в микроспорах, но на более поздних стадиях и в зрелой пыльце цитофотометрически уже определимы. Деградация хлоропластной и митохондриальной ДНК в микроспорогенезе идет путем разрушения нуклеоидов хлоропластов и митохондрий [90, 91]. У злаков хлоропластная ДНК отцовского происхождения иногда обнаруживается в потомстве [91-93], но вероятность передачи отцовского хлоропластного генома потомству у злаков низка например, у Setaria P. Beauv. она была равна  $3 \times 10^{-4}$ [93]. Однако следует помнить, что у межвидовых и возвратных гибридов злаков вероятность обнаружить у потомства отцовские хлоропласты возрастает [94, 95].

Можно предположить, что "традиционное" для злаков материнское наследование митохондриального и хлоропластного геномов находится под согласованным контролем ядерного и митохондриального геномов и механизм этот перестает надежно работать, когда в одной клетке объединяются ядерный и цитоплазматические геномы разного происхождения. Это, как раз, наш случай: все полиплоидные виды в роде Avena, кроме, может быть, A. macrostachya, - аллополиплоиды с геномными композициями AC, AB, CD, ACD (табл. 1). Фу с соавт. [20, 21] попытались рассчитать время, когда сформировались А- и С-геномы Avena, когда появились варианты геномов А- и С-типа, когда появились тетраплоиды. При всей условности абсолютной хронологической шкалы, используемой для определения времени дивергенции основных филогенетических ветвей злаков, относительное время дивергенции видов, которое они дают, по-видимому, должно быть верным. Фу [20], сравнивая паттерны SNPs в геномах митохондрий и хлоропластов, рассчитал, что если линии диплоидных видов овсов с А-геномами и С-геномами дивергировали около 20 млн лет назад, то линия A. ventricosa (Сv-геном) отделилась от A. clauda и *А. eriantha* (Ср-геном) около 10–11 млн лет назад. Среди видов с ядерным геномом А ранее всех, около 13-15 млн лет назад, отделился от общей ветви A. canariensis (Ас-геном).Затем, около 11-12 млн лет назад, сформировалась ветвь А. damascena (Ad-геном). Ветвь A. longiglumis стала самостоятельной около 9-10 млн лет назад; хлоропластный геном, родственный A. longiglumis, 8-9 млн лет назад получил предок тетраплоидов с АС/DС-геномом, около 6-7 млн лет появился тетраплоидный предоквидов с DC-геномом ядра (A. murphyi и A. maroccana), от которого дериват хлоропластного генома A. longiglumis получили гексаплоиды A. sterilis, A. sativa, A. hybrida, A. occidentalis и A. fatua. Возможно, разные гексаплоидные виды A. sativa + A. sterilia, A. occidentalis + + A. hybrida, A. fatua возникали в разных частях ареала независимо – во всяком случае по данным Фу [20] хлоропластный геном тетраплоидов A. murphyi и A. maroccana заметно ближе к хлоропластному геному A. fatua, чем к хп-геномам A. sativa и A. sterilis. Филогенетические ветви гексаплоидов (A. sativa + A. sterilis) и (A. occidentalis + A. fatua), по данным Фу [20], разошлись 7.4 млн лет назад, время разделения A. sativa от A. sterilis было оценено в 4.9 млн лет, а A. fatua от A. occidentalis – в 6.5 млн лет. Одна из ветвей среди диплоидных видов рода Avena, отделившаяся от общего древа около 10 млн лет назад, дала диплоиды с Аѕ-геномами, хлоропластный геном этой ветви около 6-7 млн лет назад достался предку тетраплоидных овсов с геномной формулой AB (A. abyssinica,

*А. barbata, A. vaviloviana*). Интересно, что *А. agadiriana* (ядерный геном AB), по-видимому, возник 6–7 млн лет назад независимо – у этого вида другой тип хлоропластного генома – его хпДНК ближе других к хлоропластному геному *А. longiglumis* [20].

Исследуя происхождение полиплоидных видов Avena с помощью методов локус-специфичного секвенирования нового поколения, мы показали [96], что полиплоидные виды Avena утратили большую часть генов 35S pPHK, пришедших от предков с С-субгеномами. Теоретически их могло бы быть 50% у A. insularis (кариотип DDCC) и 30% у гексаплоидов (кариотип AACCDD). На деле их оказалось около 3.2% у A. insularis и 1.4-2.4% у гексаплоидов. Во всех случаях среднее *p*-расстояние (*p*-distance). измеряемое как доля различий в нуклеотидах между попарно сравниваемыми последовательностями, для последовательностей 18S pPHK, ITS1 и 5.8S pДНК в С-субгеномах было на порядок выше, чем в последовательностях А-субгеномов [96].

Результаты молекулярно-филогенетического анализа сходства С-субгеномных последовательностей показывают, что ни один из современных диплоидных видов *Avena* с С-геномами не был прямым предком полиплоидных видов. Каждый из полиплоидных видов имеет в своем геноме несколько разных семейств С-субгеномных последовательностей (рис. 1). Бутстреп-индексы во всех случаях низкие, что связано с малым числом замен, по которым различаются сравниваемые последовательности геномов и субгеномов.

Результаты молекулярно-филогенетического анализа сходства А-субгеномных последовательностей полиплоидов показывают, что ни один из современных диплоидных видов Avena с А-геномами не был прямым предком полиплоидных видов. Каждый из полиплоидных видов имеет в своем геноме несколько разных семейств А-субгеномных последовательностей. В геноме A. insularis имеется относительно много транскрибируемых спейсеров, близких по последовательностям одного из исследованных ранее образцов A. hirtula (рис. 2).

Далее мы обработали результаты targeted-секвенирования "популяции" ITS-последовательностей полиплоидных геномов *Avena* с помощью программы TCS [97]. Алгоритм TCS основан на вероятностном методе статистической парсимонии и позволяет определять вероятность связи между всеми гаплотипами с индикацией числа мутаций, по которым различаются исследуемые гаплотипы. Результаты TCS-расчетов мы обрабатывали в программе tcsBU [98]. Близость (родство) рДНК С-субгеномов и А-субгеномов полиплоидных видов *A. insularis*, *A. fatua*, *A. ludovociana*, *A. sterilis* можно видеть на рис. 3, 4.

Из данных, представленных на рис. 3, следует, что A. pilosa (синоним A. eriantha) и A. clauda действительно имеют общий С-геном (Ср), отличный от С-генома типа Су, характерного для A. ventricosa, и Ст-генома A. macrostachya. С-субгеномы исследованных полиплоидных видов разнообразны, но среди них можно выделить основной (core) вариант, примерно равноудаленный от ITS диплоидов, несущих С-геном, и от A. macrostachya. Система субгеномов А-типа у исследованных полиплоидов иная. А-субгеномы A. insularis представлены несколькими семействами, одно из которых близко к А-геномам A. longiglumis и A. canariensis. Что касается A. fatua, A. sterilis и A. ludoviciana, то в их геномах выявлено два или три семейства рДНК А-типа, возможно соответствующих субгеномам, именуемым цитогенетиками А и D. Последовательность рДНК (строго говоря, участок ITS1) вариантов предполагаемого D-субгенома дальше отстоит от рДНК А-геномов диплоидов и вариантов предполагаемого А-субгенома (рис. 4).

Эти результаты не только расширяют знания об эволюции генома овса, но также имеют значение для сохранения и использования гермоплазмы овса в селекции.

#### РЕСУРСНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ДИКИХ И КУЛЬТУРНЫХ ВИДОВ РОДА ОВЕС

Эффективное использование всего потенциала внутривидового разнообразия видов рода Avena по селекционноценным признакам невозможно без предварительной оценки генетического разнообразия диких видов и староместных сортов культивируемых видов рода Avena [1–5]. При этом важной задачей является паспортизация новых и староместных сортов Avena, для чего наиболее информативным методом на сегодняшний день, по-видимому, является SSR-анализ [74, 99, 100]. В условиях интенсивного сельского хозяйства результаты паспортизации сортов в ряде случаев могут быть важны при установлении приоритетов, авторства сортов и утверждения исключительных прав на результаты селекции.

В условиях интенсивного сельского хозяйства в последнюю четверть XX—начале XXI в. и на Западе, и на Востоке отмечались признаки "генетической эрозии" у современных селекционных сортов [100—102]. Молекулярно-генетические исследования (SSR, AFLP и DArT) показывают, что местные и старые сорта овса имеют большее генетическое разнообразие по сравнению с современными коммерческими сортами по широкому спектру изученных признаков, что подтвердило ценность местных сортов в качестве источников для проведения селекционных работ [100, 103]. При этом у сортов с разным типом развития (озимые, яровые) степень генетического разнообразия может существенно различаться. Например, в работе



ITS1 - последовательности полиплоидных геномов Avena

Рис. 1. Молекулярно-филогенетическое древо (алгоритм минимальная эволюция ME) сходства ITS1-последовательностей С-субгенома и ITS-последовательностей диплоидных видов Avena.

Клос с соавт. [84] 635 линий овса посевного сравнивались по 4561 SNPs. Было показано, что у линий ярового овса генетическое разнообразие меньше, чем у сортов, культивируемых в южных штатах, где овес возделывается как зимующая культура.

В этих условиях критически важным становится разработка эффективных программ сохранения и обогащения генетического разнообразия овса за счет воспроизводства староместных сортов в генетических коллекциях и использования в качестве селекционноценных локусов диких видов овса [1–5, 74, 100]. Так, скрещивание *A. sativa* с *A. sterilis* может быть использовано для введения в геном селекционных сортов генов устойчивости к мучнистой росе, корончатой и стеблевой ржавчине [5, 104, 105]. *А. fatua* был задействован в программах по получению линий овса, устойчивых к вирусу желтой карликовости ячменя (BYDV)



Рис. 2. Молекулярно-филогенетическое древо (алгоритм минимальная эволюция ME) сходства ITS1-последовательностей А-субгенома и ITS-последовательностей диплоидных видов *Avena*.

[106]. Гексаплоид *A. byzantina* был донором для передачи *A. sativa* признака устойчивости к мучнистой росе и корончатой ржавчине [107]. Аллель *Pc91* гена устойчивости к корончатой ржавчине был интрогрессирован в культивируемый овес из генома тетраплоида *A. magna* [108], тогда как аллель *Pc94* был интрогрессирован в *A. sativa* из диплоида *A. strigosa* [109].

Гексаплоидные виды *A. fatua, A. sterilis* и тетраплоид *A. macrostachya* использовались и используются в селекционных программах при выведении холодоустойчивых сортов овса посевного [110, 111].

Метаболомный анализ — новый эффективный подход к оценке ресурсного потенциала отдельных сортов и популяций диких видов овса. Проведенное нами метаболомное профилирование зерновок сортов и диких видов *Avena* показало, что диапазон изменчивости метаболомного профиля у селекционных сортов по сравнению с дикими видами значительно уже. Выявлены метаболиты, содержание которых уменьшалось в процессе окультуривания или по которым дикие виды овса отличаются от сортов этой культуры [112]. Предполагается, что это может быть связано с отбором при доместикации овса, снижением разнообразия метаболома при формировании признаков "domestication syndrome" [113]. Разнообразие метаболомных профилей может быть утрачено в



Рис. 3. Система гаплотипов С-типа у диплоидов и полиплоидов.

процессе отбора при создании высокоспециализированных узколинейных современных сортов интенсивного типа, так как этот процесс всегда сопровождается снижением генетического полиморфизма объекта селекции в сравнении с метагеномом множества экотипов и местных сортов, сотен природных рас десятка диких видов [112, 113]. При изучении метаболомных спектров зерновок у образцов овса, подверженных заражению фузариозом, были выявлены корреляционные связи между этими показателями. Установлено, что высокобелковые формы овса поражаются фузариозом слабее и накапливают меньше токсинов, они более адаптивны к биотическому стрессу [114]. При изучении голозерных и пленчатых форм посевного овса было показано различие метаболомных профилей у этих форм, что служит еще одним подтверждением в пользу разделения этих подвидов посевного овса [112, 115]. Сравнение метаболомных профилей групп сортов овса — местных, примитивных, а также современных – российской и французской селекции продемонстрировало достоверные различия между изученными группами. Различия были получены при сравнении метаболитов, имеющих важное значение для формирования признаков устойчивости культуры к стрессорам, а также пищевых, лечебных, диетических достоинств зерновой продукции. Выделены наиболее информационно ценные признаки, позволившие достоверно разделить образцы овса различного происхождения и с разной степенью селекционной проработки. Исследование показало, что при проведении селекционных работ на улучшение биохимических показателей зерновок овса необходимо использовать ресурсы генетического разнообразия российских местных и примитивных селекционных сортов, собранных и созданных в 20– 30-е гг. ХХ столетия [116].

В последнее время овес посевной становится одной из перспективных и востребованных сельскохозяйственных культур, поскольку обладает рядом ценных свойств, отвечающих требованиям к продуктам "функционального питания". Одним из классов таких соединений являются полифенольные авенантрамиды, обладающие антиоксидантными, противовоспалительными и антиатерогенными свойствами [117]. Показано, что разные сорта овса различаются по содержанию в них авенан-



Рис. 4. Система геномов А-типа (гаплотипов ITS1) у диплоидов и полиплоидов рода *Avena*. Выделены кластеры предполагаемых А- и D-субгеномов и кластер, объединяющий диплоидные виды с А-геномами.

трамидов: сорт Jaak (1.1-2.7 г/кг) содержал неизменно высокую концентрацию по сравнению с другими стандартными сортами (Belinda – 0.5– 1.2 г/кг; Ivory – 0.3–1.7 г/кг). При этом диплоидный культурный вид A. strigosa показал очень высокое содержание авенантрамидов – до 4.1 г/кг, а гексаплоидный A. byzantina – 3.0 г/кг. Напротив, дикие виды разной плоидности A. hirtula, A. barbata, A. fatua, A. sterilis отличались относительно низким содержанием авенантрамидов (240-1585 мг/кг) [118]. Еще большее разнообразие по содержанию авенантрамидов в зерновке было получено при изучении представительного набора образцов культурных и диких видов овса [119]. Овес также содержит два класса сапонинов: авенакозиды (сахара, связанные со стероидами) и авенацины (сахара, связанные с тритерпеноидом), которые, как было показано, снижают уровень холестерина, стимулируют иммунную систему и обладают антиканцерогенными свойствами [120]. Целенаправленная селекция на увеличение содержания этих веществ в линиях овса ранее не проводилась, однако меж-

ГЕНЕТИКА том 57 № 6 2021

линейные и межвидовые различия по этому показателю были найдены [121].

Среди многих продуктов биосинтеза овса пожалуй наибольшую роль для человека играют растворимые волокна клетчатки и прежде всего В-глюканы (а также арабиноксилан, ксилоглюкан и некоторые другие второстепенные компоненты клетчатки), которые снижают уровень холистерина в крови и заметно снижают риск сердечно-сосудистых заболеваний [122-124]. Многочисленные доказательства полезной роли овсяных β-глюканов заставили Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) официально заявить, что растворимые пищевые волокна из цельной зерновки овса в виде хлопьев, отрубей и муки способствуют снижению риска сердечно-сосудистых заболеваний, для чего требуется принимать с пищей по меньшей мере 3 г β-глюканов в день. Затем аналогичные рекомендации были одобрены Европейской комиссией и компетентными органами Австралии, Новой Зеландии, Канады, Бразилии, Малайзии, Индонезии и Южной Кореи [124].

Генетическое разнообразие овса по содержанию В-глюканов в зерновке оценивалось в рамках двух европейских программ. В проекте HEALTHGRAIN Diversity Screen v изученных пяти сортов овса содержание В-глюканов и антиоксидантов в зерновке существенно различалось [125]. В проекте "Генетические ресурсы овса для качественного питания людей" (European Project – "Avena genetic resources for quality in human consumption") изучение 658 сортов овса подтвердило вклад как генетической, так и экологической составляющей в формирование признака [126]. Интересно, что высокое содержание β-глюканов и других антиоксидантов в зерновке по сравнению с культурными и другими дикорастушими ди- и тетраплоидными видами овса обнаружено у гексаплоидных видов A. fatua, A. occidentalis, A. byzantina и у диплоида A. atlantica [123, 126-129].

Сикора с соавт. [130] проанализировали 1700 линий овса, выделенных из сорта Belinda (Швеция) и несущих мутации, индуцированные EMS, и выявили 10 линий, у которых концентрация  $\beta$ -глюканов в зерновках была выше 6.7%, и 10 линий, у которых их содержание было менее 3.6% (у сорта Belinda концентрация  $\beta$ -глюкана 4.9%). Максимальный размах в содержании указанных полисахаридов среди 1700 мутантных линий составил от 1.8 до 7.5%.

На сегодняшний день уже положено начало исследований ассоциаций между генотипом и содержанием  $\beta$ -глюканов и жирных кислот в овсе методом GWAS. Так, исследователями были определены четыре локуса, которые способствуют изменению содержания и состава жирных кислот в зерне овса. Однако остаются неизученными геномные районы, способствующие изменению содержания белков, масел, сахарных и уроновых кислот, которые в свою очередь непосредственно влияют на качество зерна [77].

Информация, полученная с использованием молекулярно-метаболомного подхода mOTL (metabolite quantitative trait loci) и mGWAS (metabolome-based GWAS), позволяет на новом уровне качественно и количественно охарактеризовать вторичные метаболиты, представляющие интерес для селекции. Такой анализ может дать информацию о взаимосвязи метаболитов друг с другом, а также с важными селекционными признаками. что может привести к разработке более рациональных моделей, связывающих конкретный метаболит с признаками продуктивности или качества конечной продукции. Еще более многообещающей является возможность изучения связи между количественным изменением метаболитов и изменением фенотипа растения [131].

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, дикие и культурные виды рода Avena L. являются объектами таксономических, филогенетических, генетических, молекулярногенетических, "омиксных" исследований. Результаты этих исследований можно было видеть на прошедшей в 2016 г. последней 10-й Международной конференции по овсу (10th International Oat Conference) в Санкт-Петербурге [132]. К сожалению, в России виды рода Avena L. не являются объектами многочисленных исследований, хотя овес посевной – одна из ведущих зерновых культур, которая широко используется в сельскохозяйственном производстве на кормовые цели и в последнее время для получения пищевых, диетических и функциональных продуктов питания.

Изучение путей происхождения, "доместикации" и систематического положения видов рода Avena позволяет лучше понять генетическую природу всех видов и, в свою очередь, наметить направления сохранения их биологического разнообразия и использования ресурсного потенциала. Наиболее перспективное направление изучения и идентификации генетического разнообразия применительно к задачам селекции – использование техники секвенирования и молекулярных маркеров. В настоящее время ни одно направление исследований не обходится без использования ДНК-технологий, позволяющих на новом уровне достаточно быстро проводить генотипирование. генетическое картирование и маркер-вспомогательную селекцию (MAS) для выявления генотипов с ценными аллелями генов, контролирующих различные селекционно ценные признаки, что многократно сокращает путь на поля высокоустойчивых и высокопродуктивных сортов овса.

Работа выполнена на средства гранта РФФИ № 19-116-50133 Экспансия. Часть собственных экспериментов, описанных в статье, финансировалась из средств грантов РФФИ 17-00-00340, 17-00-0037, 17-00-0038, а также грантом СПбГУ PURE ID 60256916.

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

- Лоскутов И.Г. Овес (Avena L.). Распространение, систематика, эволюция и селекционная ценность. СПб: ГНЦ РФ ВИР, 2007. 336 с.
- Loskutov I.G., Rines H.W. Wild crop relatives: genomic and breeding resources // Avena. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2011. P. 109–183.
- 3. *Loskutov I.G., Melnikova S.V., Bagmet L.V.* Eco-geographical assessment of *Avena* L. wild species at the VIR herbarium and Genebank collection // Genet. Resour. Crop Evol. 2017. V. 64. P. 177–188. https://doi.org/10.1007/s10722-015-0344-1
- Gagkaeva T.Y., Gavrilova O.P., Orina A.S. et al. Response of wild Avena species to fungal infection of grain // The Crop J. 2017. V. 5. P. 499–508.
- Ociepa T. The oat gene pools—review about the use of wild species in improving cultivated oat // J. Central Eur. Agriculture. 2019. V. 20. P. 251–261. https://doi.org/10.5513/JCEA01/20.1.2044
- 6. Linnaeus C. Species Plantarum. V. 1. 1753. 500 p.
- 7. Linnaeus C. Species Plantarum. V. 1. 1762. 784 p.
- Fuller D.Q., Allaby R. Seed dispersal and crop domestication: Shattering, germination and seasonality in evolution under cultivation // Annual Plant Reviews. 2009. V. 38. P. 238–295. https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0414
- Vavilov N.I. The law of homologous series in variation // J. Genet. 1922. V. 12. P. 47–89.
- Baum B.R. Oats: Wild and Cultivated. A Monograph of the Genus Avena L. (Poaceae). Ottawa: Minister of Supply and Services Canada, 1977. 463 p.
- 11. *Baum B.R.* Typification of linnaean species of oats, *Avena //* Taxon. 1974. V. 23. P. 579–583.
- The Plant List. 2013. Version 1.1. Publ. on the Internet; http://www.theplantlist.org/ (accessed 1st January).
- 13. *Цвелев Н.Н., Пробатова Н.С.* Злаки России. М.: Т-во науч. изд. КМК, 2019. 646 с.
- 14. *Ladizinsky G.* Studies in Oats Evolution. Heidelberg e.a.: Springer, 2012. 87 p.
- Dobrzhansky T. A critique of the species concept in biology // Philosophy of Science. 1935. V. 2. P. 344– 355.
- 16. Родионов А.В., Шнеер В.С., Гнутиков А.А. и др. Диалектика видов: от исходного единообразия, через максимально возможное разнообразие к конечному единообразию // Бот. журн. 2020. Т. 105. № 7. С. 3–21. https://doi.org/10.31857/S0006813620070091
- 17. *Родионов А.В., Шнеер В.С., Пунина Е.О. и др.* Закон гомологических рядов и систематика // Генетика. 2020. Т. 56. № 11. С. 1227–1238.
- Ladizinsky G., Zohary D. Notes on species delimitation, species relationships and polyploidy in Avena L. // Euphytica. 1971. V. 20. P. 380–395.
- Yan H., Martin S.L., Bekele W.A. et al. Genome size variation in the genus Avena // Genome. 2016. V. 59. P. 209–220.

https://doi.org/10.1139/gen-2015-0132

 Fu Y.B. Oat evolution revealed in the maternal lineages of 25 Avena species // Sci. Rep. 2018. V. 8. P. 4252. https://doi.org/10.1038/s41598-018-22478-4

- Fu Y.B., Li P., Biligetu B. Developing chloroplast genomic resources from 25 Avena species for the characterization of oat wild relative germplasm // Plants. 2019. V. 8. № 11. P. 438. https://doi.org/10.3390/plants8110438
- Latta R.G., Bekele W.A., Wight C.P., Tinker N.A. Comparative linkage mapping of diploid, tetraploid, and hexaploid Avena species suggests extensive chromosome rearrangement in ancestral diploids // Sci. Rep. 2019. V. 9. P. 12298. https://doi.org/10.1038/s41598-019-48639-7
- Tutin T.G. et al. (eds). Flora Europaea, 2nd ed. V. 1. Psilotaceae to Platanaceae. N.Y.: Cambr. Univ. Press, 1993. 581 p.
- Цвелев Н.Н. О внутривидовых таксонах у высших растений // Цвелев Н.Н. Проблемы теоретической морфологии и эволюции высших растений. М., СПб.: Т-во науч. изд. КМК, 2005. С. 60–68.
- Baum B.R., Rajhathy T., Sampson D.R. An important new diploid Avena species discovered on the Canary Islands // Can. J. Bot. 1973. V. 51. P. 759–762.
- Baum B.R., Fedak G. Avena atlantica, a new diploid species of the oat genus from Morocco // Can. J. Bot.1985. V. 63. P. 1057–1060.
- Baum B.R., Fedak G. A new tetraploid species of Avena discovered in Morocco // Can. J. Bot. 1985. V. 63. P. 1379–1385.
- Morikawa T., Leggett J.M. Isozyme polymorphism and genetic differentiation in natural populations of a new tetraploid species Avena agadiriana, from Morocco // Genet Resour Crop Evol. 2005. V. 52. P. 363–370. https://doi.org/10.1007/s10722-005-2248-y
- Шнеер В.С., Коцеруба В.В. Криптические виды растений и их выявление по генетической дифференциации популяций // Экол. генетика. 2014. Т. 12. № 3. С. 12–31.
- Nishiyama I. Cytogenetical studies in Avena // Cytologia. 1936. V. 7. P. 276–281.
- Rajhathy T., Morrison J.W. Chromosome morphology in the genus Avena // Can. J. Bot. 1959. V. 37. P. 331– 337.
- 32. *Leitch I., Bennett M.* Genome downsizing in polyploid plants // Biol. J. Linn. Soc. 2004. V. 82. P. 651–663.
- D'Hont A., Denoeud F., Aury J.M. et al. The banana (Musa acuminata) genome and the evolution of monocotyledonous plants // Nature. 2012. V. 488. P. 213– 217.

https://doi.org/10.1038/nature11241

- 34. Родионов А.В., Амосова А.В., Беляков Е.А. и др. Генетические последствия межвидовой гибридизации, ее роль в видообразовании и фенотипическом разнообразии растений // Генетика. 2019. Т. 55. № 3. С. 255–272.
- 35. Лоскутов И.Г. Межвидовые скрещивания вроде *Avena* L. // Генетика. 2001. Т. 37. № 5. С. 581–590.
- 36. *Maughan P.J., Lee R., Walstead R. et al.* Genomic insights from the first chromosome-scale assemblies of

oat (*Avena* spp.) diploid species // BMC Biology. 2019. V. 17. P. 92. https://doi.org/10.1186/s12915-019-0712-y

- 37. *Rajhathy T., Thomas H*. Cytogenetics of oats (*Avena* L.) // Ottawa: Genet. Soc. Can. Misc. Publ. 1974. № 2. P. 1–90.
- Badaeva E.D., Shelukhina O.Y., Diederichsen A. et al. Comparative cytogenetic analysis of Avena macrostachya and diploid C-genome Avena species // Genome. 2010. V. 53. P. 125–137. https://doi.org/10.1139/G09-089
- Badaeva E.D., Shelukhina O.Y., Goryunova S.V. et al. Phylogenetic relationships of tetraploid AB-genome *Avena* species evaluated by means of cytogenetic (C-banding and FISH) and RAPD analyses // J. Botany. 2010. V. 2010. P. 742307. https://doi.org/10.1155/2010/742307
- 40. Бадаева Е.Д., Шелухина О.Ю., Дедкова О.С. и др. Сравнительное цитогенетическое исследование гексаплоидных видов Avena L. // Генетика. 2011. Т. 47. № 6. С. 783–795.
- Jellen E.N., Phillips R.L., Rines H.W. C-banded karyotypes and polymorphisms in hexaploid oat accessions (Avena spp.) using Wright's stain // Genome. 1993. V. 36. P. 1129–1137.
- 43. *Sumner A.T.* Chromosome Banding. London: Unwin, Hyman, 1990. 434 p.
- Nishibuchi G., Déjardin J. The molecular basis of the organization of repetitive DNA-containing constitutive heterochromatin in mammals // Chromosome Res. 2017. V. 25. P. 77–87. https://doi.org/10.1007/s10577-016-9547-3
- Holmquist G. The mechanism of C-banding: depurination and β-elimination // Chromosoma. 1979.
  V. 72. P. 203–224.
- 46. Fominaya A., Loarce Y., Montes A., Ferrer E. Chromosomal distribution patterns of the (AC) 10 microsatellite and other repetitive sequences, and their use in chromosome rearrangement analysis of species of the genus Avena // Genome. 2017. V. 60. P. 216–227. https://doi.org/10.1139/gen-2016-0146
- 47. Родионов А.В., Тюпа Н.Б., Ким Е.С. и др. Геномная конституция автотетраплоидного овса Avena macrostachya, выявленная путем сравнительного анализа последовательностей ITS1 и ITS2: к вопросу об эволюции кариотипов овсов и овсюгов на ранних этапах дивергенции видов рода Avena // Генетика. 2005. Т. 41. № 5. С. 646–656.
- Inda L.A., Segarra-Moragues J.G., Müller J. et al. Dated historical biogeography of the temperate Loliinae (Poaceae, Pooideae) grasses in the northern and southern hemispheres // Mol. Phylogenet. Evol. 2008. V. 46. P. 932–957. https://doi.org/10.1016/j.vmpev.2007.11.022

49. Wang X., Wang J., Jin D. et al. Genome alignment spanning major Poaceae lineages reveals heterogeneous evolutionary rates and alters inferred dates for key evolutionary events // Mol. Plant. 2015. V. 8. P. 885–898.

https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.04.004

- Leggett J.M., Markhand G.S. The genomic structure of Avena revealed by GISH // Proc. Kew Chromosome Conf. IV. Kew: The Royal Bot. Gardens, 1995. P. 133–139.
- Jellen E.N., Gill B.S., Cox T.S. Genomic in situ hybridization differentiates between A/D- and C-genome chromatin and detects intergenomic translocations in polyploid oat species (genus Avena) // Genome. 1994. V. 37. P. 613–618.
- Luo X., Tinker N.A., Zhou Y. et al. Genomic relationships among sixteen species of Avena based on (ACT) 6 trinucleotide repeat FISH // Genome. 2018. V. 61. P. 63–70. https://doi.org/10.1139/gen-2017-0132
- Katsiotis A., Hagidimitriou M., Heslop-Harrison J.S. The close relationship between the A and B genomes in Avena L. (Poaceae) determined by molecular cytogenetic analysis of total genomic, tandemly and dispersed repetitive DNA sequences // Ann. Bot. 1997. V. 79. P. 103–109.
- Raina S.N., Rani V. GISH technology in plant genome research // Methods in Cell Sci. 2001. V. 23. P. 83– 104.
- Orgaard M., Heslop-Harrison J.S. Investigations of genome relationships between Leymus, Psathyrostachys and Hordeum inferred by genomic DNA: DNA in situ hybridization // Ann. Bot. 1994. V. 73. P. 195–203.
- Hayasaki M., Morikawa T., Tarumoto I. Intergenomic translocations of polyploid oats (genus Avena) revealed by genomic *in situ* hybridization // Genes Genet. Syst. 2000. V. 75. P. 167–171.
- Linares C., Irigoyen M.L., Fominaya A. Identification of C-genome chromosomes involved in intergenomic translocations in *Avena sativa* L., using cloned repetitive DNA sequences // Theor. Appl. Genet. 2000. V. 100. P. 353–360.
- 58. *Chaffin A.S., Huang Y.F., Smith S. et al.* A consensus map in cultivated hexaploid oat reveals conserved grass synteny with substantial sub genome rearrangement // Plant Genome. 2016. V. 9. № 2. P. 1–21. https://doi.org/10.3835/plantgenome2015.10.0102
- Yan H., Bekele W.A., Wight C.P. et al. High-density marker profiling confirms ancestral genomes of Avena species and identifies D-genome chromosomes of hexaploid oat // Theor. Appl. Genet. 2016. V. 129. P. 2133–2149. https://doi.org/10.1007/s00122-016-2762-7
- Singh R., Ming R., Yu Q.Y. Comparative analysis of GC content variations in plant genomes // Trop. Plant Biol. 2016. V. 9. P. 136–149. https://doi.org/10.1007/s12042-016-9165-4

648

- Jiang J., Birchler J.A., Parrott W.A., Dawe R.K. A molecular view of plant centromeres // Trends Plant Sci. 2003. V. 8. № 12. P. 570–575.
- Matassi G., Montero L.M., Salinas J., Bernardi G. The isochore organization and the compositional distribution of homologous coding sequence in the nuclear genome of plants // Nucleic Acids Res. 1989. V. 17. P. 5273–5290.
- Tatarinova T.V., Alexandrov N.N., Bouck J.B., Feldmann K.A. GC<sub>3</sub> biology in corn, rice, sorghum and other grasses // BMC Genomics. 2010. V. 11. P. 308. https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-308
- Andreozzi L., Federico C., Motta S. et al. Compositional mapping of chicken chromosomes and identification of the gene-richest regions // Chromosome Res. 2001. V. 9. P. 521–532.
- Costantini M., Musto H. The isochores as a fundamental level of genome structure and organization: A general overview // J. Mol. Evol. 2017. V. 84. P. 93–103. https://doi.org/10.1007/s00239-017-9785-9
- Blanc G., Wolfe K.H. Widespread paleopolyploidy in model plant species inferred from age distributions of duplicate genes // Plant Cell. 2004. V. 16. P. 1667– 1678.
- Panchy N., Lehti-Shiu M., Shiu S.H. Evolution of gene duplication in plants // Plant Physiol. 2016. V. 171. P. 2294–2316. https://doi.org/10.1104/pp.16.00523
- Bekele W.A., Wight C.P., Chao S.M. et al. Haplotypebased genotyping-by-sequencing in oat genome research // Plant Biotechnol. J. 2018. V. 16. P. 1452– 1463.

https://doi.org/10.1111/pbi.12888

- O'Donoughue L.S., Sorrells M.E., Tanksley S.D. et al. A molecular linkage map of cultivated oat // Genome. 1995. V. 38. P. 368–380.
- 70. Foresman B.J., Oliver R.E., Jackson E.W. et al. Genome-wide association mapping of barley yellow dwarf virus tolerance in spring oat (Avena sativa L.) // PLoS One. 2016. V. 11. № 5. P. e0155376. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155376
- 71. Loarce Y, Navas E., Paniagua C. et al. Identification of genes in a partially resistant genotype of Avena sativa expressed in response to Puccinia coronate infection // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. P. 731. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00731
- 72. Admassu-Yimer B., Bonman J.M., Esvelt Klos K. Mapping of crown rust resistance gene Pc53 in oat (Avena sativa) // PLoS One. 2018. V. 13. № 12. P. e0209105. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209105
- Rines H.W., Miller M.E., Carson M. et al. Identification, introgression, and molecular marker genetic analysis and selection of a highly effective novel oat crown rust resistance from diploid oat, Avena strigosa // Theor. Appl. Genet. 2018. V. 131. P. 721–733. https://doi.org/10.1007/s00122-017-3031-0
- 74. *Rines H.W., Molnar S.J., Tinker N.A., Phillips R.L.* Oat // Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants.

V. 1. Cereals and Millets. Berlin; Heidelberg: Springer, 2006. P. 211–242.

- 75. Orr W., Molnar S.J. Development of PCR-based SCAR and CAPS markers linked to β-glucan and protein content QTL regions in oat // Genome. 2008. V. 51. P. 421–425. https://doi.org/10.1139/G08-026
- 76. Tanhuanpää P., Manninen O., Beattie A. et al.An updated doubled haploid oat linkage map and QTL mapping of agronomic and grain quality traits from Canadian field trials // Genome. 2012. V. 55. P. 289–301. https://doi.org/10.1139/g2012-017
- 77. Carlson M.O., Montilla-Bascon G., Hoekenga O.A. et al. Multivariate genome-wide association analyses reveal the genetic basis of seed fatty acid composition in oat (Avena sativa L.) // G3: Genes, Genomes, Genetics. 2019. V. 9. P. 2963–2975. https://doi.org/10.1534/g3.119.400228
- Newell M.A., Asoro F.G., Scott M.P. et al. Genomewide association study for oat (Avena sativa L.) betaglucan concentration using germplasm of worldwide origin // Theor. Appl. Genet.2012. V. 125. P. 1687– 1696.

https://doi.org/10.1007/s00122-012-1945-0

- Tumino G., Voorrips R.E., Rizza F. et al. Population structure and genome-wide association analysis for frost tolerance in oat using continuous SNP array signal intensity ratios // Theor. Appl. Genet. 2016. V. 129. P. 1711–1724. https://doi.org/10.1007/s00122-016-2734-y
- Tumino G., Voorrips R.E., Morcia C. et al. Genomewide association analysis for lodging tolerance and plant height in a diverse European hexaploid oat collection // Euphytica. 2017. V. 213. P. 163. https://doi.org/10.1007/s10681-017-1939-8
- Isidro-Sánchez J., D'Arcy Cusack K., Verheecke-Vaessen C. et al. Genome-wide association mapping of Fusarium langsethiae infection and mycotoxin accumulation in oat (Avena sativa L.) // The Plant Genome. 2020. V. 2020. P. e20023. https://doi.org/10.1002/tpg2.20023
- He X., Skinnes H., Oliver R.E. et al. Linkage mapping and identification of QTL affecting deoxynivalenol (DON) content (*Fusarium* resistance) in oats (*Avena* sativa L.) // Theor. Appl. Genet. 2013. V. 126. P. 2655–2670. https://doi.org/10.1007/s00122-013-2163-0
- Bjørnstad Å., Skinnes H. Resistance to Fusarium infection in oats (Avena sativa L.) // Cereal Res. Commun. 2008. V. 36. Suppl. 6. P. 57–62. https://doi.org/10.1556/crc.36.2008.suppl.b.9
- 84. Esvelt Klos K., Huang Y.F., Bekele W.A. et al. Population genomics related to adaptation in elite oat germplasm // The Plant Genome. 2016. V. 9. № 2. P. 1–12. https://doi.org/10.3835/plantgenome2015.10.0103
- 85. Zimmer C.M., Ubert I.P., Pacheco M.T., Federizzi L.C. Molecular and comparative mapping for heading date

and plant height in oat // Euphytica. 2018. V. 214. P. 101. https://doi.org/10.1007/s10681-018-2182-7

- Siculella L., Damiano F., Cortese M.R. et al. Gene content and organization of the oat mitochondrial genome // Theor. Appl. Genet. 2001. V. 103. P. 359–365.
- Pathania A., Kumar R., Kumar V.D. et al. A duplicated coxI gene is associated with cytoplasmic male sterility in an alloplasmic *Brassica juncea* line derived from somatic hybridization with *Diplotaxis catholica* // J. Genet.2007. V. 86. P. 93–101.
- Soltis P.S., Soltis D.E. Ancient WGD events as drivers of key innovations in angiosperms // Curr. Opin. Plant. Biol. 2016. V. 30. P. 159–165. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.03.015
- Rines H.W., Gengenbach B.G., Boylan K.L., Storey K.K. Mitochondrial DNA diversity in oat cultivars and species // Crop Sci. 1988. V. 28. P. 171–176.
- 90. Kuroiwa T. Review of cytological studies on cellular and molecular mechanisms of uniparental (maternal or paternal) inheritance of plastid and mitochondrial genomes induced by active digestion of organelle nuclei (nucleoids) // J. Plant Res. 2010. V. 123. P. 207– 230.

https://doi.org/10.1007/s10265-009-0306-9

- Ramsey A.J., Mandel J.R. When one genome is not enough: Organellar heteroplasmy in plants // Annu. Plant Rev. Online. 2018. V. 2. P. 619–658. https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0616
- 92. Moon E., Kao T.H., Wu R. Rice chloroplast DNA molecules are heterogeneous as revealed by DNA sequences of a cluster of genes // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. P. 611–630.
- Wang T., Li Y., Shi Y. et al. Low frequency transmission of a plastid-encoded trait in Setaria italica // Theor. Appl. Genet. 2004. V. 108. P. 315–320.
- 94. Kiang A.S., Connolly V., McConnell D.J., Kavanagh T.A. Paternal inheritance of mitochondria and chloroplasts in *Festuca pratensis–Lolium perenne* intergeneric hybrids // Theor. Appl. Genet. 1994. V. 87. P. 681–688.
- 95. Бильданова Л.Л., Бадаева Е.Д., Першина Л.А., Салина Е.А. Молекулярно-генетический анализ и С-окрашивание хромосом аллоплазматических линий мягкой пшеницы, полученных на основе беккроссных потомков ячменно-пшеничных гибридов Hordeum vulgare L. (2n = 14) × Triticum aestivum L. (2n = 42) и различающихся по проявлению фертильности // Генетика. 2004. Т. 40. № 12. С. 1668–1677.
- 96. Родионов А.В., Амосова А.В., Крайнова Л.М. и др. Феномен высокой частоты мутаций в генах 35S рРНК С-субгенома у полиплоидных видов Avena L. // Генетика. 2020. Т. 56. № 6. С. 657–666.
- Clement M., Posada D.C.K.A., Crandall K.A. TCS: A computer program to estimate gene genealogies // Mol. Ecol. 2000. V. 9. P. 1657–1659.
- 98. Murias dos Santos A., Cabezas M.P., Tavares A.I. et al. tcsBU: A tool to extend TCS network layout and visu-

alization visualization // Bioinformatics. 2015. V. 32. P. 627–628.

https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv636

- 99. Montilla-Bascón G., Sánchez-Martín J., Rispail N. et al. Genetic diversity and population structure among oat cultivars and landraces // Plant Mol. Biol. Rep. 2013. V. 31. P. 1305–1314. https://doi.org/10.1007/s11105-013-0598-8
- 100. Nikoloudakis N., Bladenopoulos K., Katsiotis A. Structural patterns and genetic diversity among oat (Avena) landraces assessed by microsatellite markers and morphological analysis // Genet. Res. Crop Evol. 2016. V. 63. P. 801–811. https://doi.org/10.1007/s10722-015-0284-9
- Baohong G., Zhou X., Murphy J.P. Genetic variation within Chinese and Western cultivated oat accessions // Cereal Res. Commun. 2003. V. 31. P. 339–346.
- 102. Achleitner A., Tinker N.A., Zechner E., Buerstmayr H. Genetic diversity among oat varieties of worldwide origin and associations of AFLP markers with quantitative traits // Theor. Appl. Genet. 2008. V. 117. P. 1041–1053. https://doi.org/10.1007/s00122-008-0843-v
- 103. He X., Bjørnstad Å. Diversity of North European oat analyzed by SSR, AFLP and DArT markers // Theor. Appl. Genet. 2012. V. 125. P. 57–70. https://doi.org/10.1007/s00122-012-1816-8
- 104. Paczos-Grzęda E., Sowa S., Boczkowska M., Langdon T. Detached leaf assays for resistance to crown rust reveal diversity within populations of Avena sterilis // Plant Disease. 2019. V. 103. P. 832–840. https://doi.org/10.1094/PDIS-06-18-1045-RE
- 105. Okoń S., Paczos-Grzęda E., Ociepa T. et al. Avena sterilis L. genotypes as a potential source of resistance to oat powdery mildew // Plant Disease. 2016. V. 100. P. 2145–2151.
  - https://doi.org/10.1094/PDIS-11-15-1365-RE
- 106. Comeau A. Barley yellow dwarf virus resistance in the genus Avena // Euphytica. 1984. V. 33. P. 49–55. https://doi.org/10.1007/BF00022749
- 107. Mohler V., Stadlmeier M., Sood A. et al. Genetic analysis of new sources of seedling resistance to powdery mildew and crown rust in oat // Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, 69. Jahrestagung 2018, 19–21 November, Raumberg-Gumpenstein. Vienna: BOKU-Univ. Nat. Resources and Life Sci., 2019. P. 29–31.
- 108. McCartney C.A., Stonehouse R.G., Rossnagel B.G. et al. Mapping of the oat crown rust resistance gene Pc91 // Theor. Appl. Genet. 2011. V. 122. P. 317–325. https://doi.org/10.1007/s00122-010-1448-9
- 109. Rines H.W., Porter H.L., Carson M.L., Ochocki G.E. Introgression of crown rust resistance from diploid oat Avena strigosa into hexaploid cultivated oat A. sativa by two methods: Direct crosses and through an initial 2x, 4x synthetic hexaploid // Euphytica. 2007. V. 158. P. 67–79.

https://doi.org/10.1007/s10681-007-9426-2

- 110. Suneson C.A., Marshall H.G. Cold resistance in wild oats // Crop Sci. 1967. V. 7. P. 667–668.
- 111. Лапински Б., Рачвалска А. Использование Avena macrostachya для улучшения зимостойкости овса в Польше // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2017. Т. 178. № 1. С. 58–67. https://doi.org/10.30901/2227-8834-2017-1-58-67
- 112. Loskutov I.G., Shelenga T.V., Konarev A.V. et al. The metabolomic approach to the comparative analysis of wild and cultivated species of oats (Avena L.) // Rus. J.Genet. Appl. Res. 2017. V. 7. № 5. P. 501–508. https://doi.org/10.1134/s2079059717050136
- Beleggia R., Rau D., Laido G. et al. Evolutionary metabolomics reveals domestication-associated changes in tetraploid wheat kernels // Mol. Biol. Evol. 2016. V. 33. P. 1740–1753. A. https://doi.org/10.1093/molbev/msw050A
- 114. Лоскутов И.Г., Шеленга Т.В., Конарев А.В. и др. Биохимические аспекты взаимоотношений грибов и растений на примере фузариоза овса // С.-х. биология. 2019. Т. 54. № 3. С. 575–588. https://doi.org/10.15389/agrobiology.2019.3.575rus
- 115. Лоскутов И.Г., Шеленга Т.В., Конарев А.В. и др. Новый подход к структурированию сортового разнообразия голозерных и пленчатых форм культурного овса (Avena sativa L.) // Экол. генетика. 2020. Т. 18. № 1. С. 27–41. https://doi.org/10.17816/ecogen12977
- 116. Loskutov I.G., Shelenga T.V., Konarev A.V. et al. Differentiation among oat varieties from the VIR collection according to their degree of breeding level on the basis of metabolomic profiling // Euphytica. 2021. В печати.
- 117. Tripathi V., Mohd A.S., Ashraf T. Avenanthramides of oats: Medicinal importance and future perspectives // Phcog. Rev. 2018. V. 12. P. 66–71. https://doi.org/10.4103/phrev.phrev\_34\_17
- Redaelli R., Dimberg L., Germeier C. U. et al. Variability of tocopherols, tocotrienols and avenanthramides contents in European oat germplasm // Euphytica. 2016. V. 207. P. 273–292. https://doi.org/10.1007/s10681-015-1535-8
- 119. Leonova S., Gnutikov A., Loskutov I. et al. Diversity of avenanthramide content in wild and cultivated oats // Proc. Applied Botany, Genetics and Breeding. 2020. V. 181. № 1. P. 30–47. https://doi.org/10.30901/2227-8834-2020-1-30-47
- 120. *Sang S., Chu Y.* Whole grain oats, more than just a fiber: Role of unique phytochemicals // Mol. Nutr. Food Res. 2017. V. 61. № 7. P. 1600715. https://doi.org/10.1002/mnfr.201600715
- Carraro-Lemes C.F., Scheffer-Basso S.M., Deuner C., Berghahn S. Analysis of genotypic variability in Avena spp. regarding allelopathic potentiality // Planta Daninha. 2019. V. 37. P. 1–12. https://doi.org/10.1590/S0100-83582019370100100
- 122. *Tiwari U., Cummins E.* Meta-analysis of the effect of beta-glucan intake on blood cholesterol and glucose

ГЕНЕТИКА том 57 № 6 2021

levels // Nutrition. 2011. V. 27. P. 1008–1016. https://doi.org/10.1016/j.nut.2010.11.006

- 123. Лоскутов И.Г., Полонский В.И. Селекция на содержание β-глюканов в зерне овса как перспективное направление для получения продуктов здорового питания, сырья и фуража (обзор) // С.-х. биология. 2017. Т. 52. № 4. С. 646–657.
- 124. Joyce S.A., Kamil A., Fleige L., Gahan C.G. The cholesterol-lowering effect of oats and oat beta glucan: Modes of action and potential role of bile acids and the microbiome // Front. Nutr. 2019. V. 6. P. 171. https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00171
- 125. Shewry P.R., Piironen V., Lampi A.-M. et al. Phytochemical and fiber components in oat varieties in the HEALTHGRAIN diversity screen // J. Agr. Food Chem. 2008. V. 56. P. 9777–9784. https://doi.org/10.1021/jf801880d
- 126. *Redaelli R., Del Frate V., Bellato S. et al.* Genetic and environmental variability in total and soluble β-glucan in European oat genotypes // J. Cereal Sci. 2013. V. 57. P. 193–199. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2012.09.003
- 127. Polonskiy V., Loskutov I., Sumina A. Biological role and health benefits of antioxidant compounds in cereals // Bio. Comm. 2020. V. 65. № 1. P. 53–67. https://doi.org/10.21638/spbu03.2020.105
- 128. Welch R.W., Leggett J.M., Lloyd J.D. Variation in the kernel  $(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 4)$ - $\beta$ -D-glucan content of oat cultivars and wild *Avena* species and its relationship to other characteristics // J. Cereal Sci. 1991. V. 13. P. 173–178.

https://doi.org/10.1016/S0733-5210(09)80034-9

- 129. Welch R.W., Brown J.C.W., Leggett J.M. Interspecific and intraspecific variation in grain and groat characteristics of wild oat (*Avena*) species: Very high groat  $(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)$ - $\beta$ -D-glucan in an *Avena atlantica* genotype // J. Cereal Sci. 2000. V. 31. P. 273–279. https://doi.org/10.1006/jcrs.2000.0301
- 130. Sikora P., Tosh S.M., Brummer Y., Olsson O. Identification of high  $\beta$ -glucan oat lines and localization and chemical characterization of their seed kernel  $\beta$ -glucans // Food Chem. 2013. V. 137. P. 83–91. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.007
- Carreno-Quintero N., Bouwmeester H.J., Keurentjes J.J. Genetic analysis of metabolome-phenotype interactions: From model to crop species // Trends Genet. 2013. V. 29. P. 41–50. https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.09.006
- 132. Abstracts of oral and poster presentation. The 10th Intern. Oat Conf.: Innovation for Food and Health "OATS 2016". Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR). 2016.
- 133. *Leggett J.M.* Classification and speciation in *Avena //* Oat Science and Technology. 1992. V. 33. P. 29–52.
- 134. Родионова Н.А., Солдатов В.Н., Мережко В.Е. и др. Овес. Культурная флора. Т. 2. Ч. 3. / Под ред. Кобылянского В.Д., Солдатова В.Н. М.: Колос, 1994. 367 с.

# Origin and Resource Potential of Wild and Cultivated Species of the Genus Oats (Avena L.)

I. G. Loskutov<sup>a, b</sup>, A. A. Gnutikov<sup>a, b, \*</sup>, E. V. Blinova<sup>a</sup>, and A. V. Rodionov<sup>b, c</sup>

<sup>a</sup>Vavilov Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, 190000 Russia
 <sup>b</sup>Saint-Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia
 <sup>c</sup>Komarov Botanical Institute, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 197376 Russia
 \*e-mail: alexandr2911@vandex.ru

The genus Avena L. is represented by cultivated species of great practical importance, segetal weeds and wild species, which are interesting as objects of potential sources of valuable traits for breeding. Until now, there are significant disagreements in understanding the size of the genus, especially regarding the isolation of rare specialized species from aggregate species. The review analyzes our own and published data on comparative genomics and taxonomy of species of the genus, discusses the use of various gene markers in molecular genetic studies for identifying oat species. Currently, modern studies of the genus are largely based on molecular phylogenetic and karvological data. Thus, many works are devoted to the relationship of the only perennial tetraploid species A. macrostachya and diploid species of the genus Avena. The article examines the relationship of the genome of this unique autotetraploid species, formed even before the evolutionary division of the genus into separate genomes, with the A and C genomes of other species. On the other hand, oats are a wellstudied crop for agronomic and economically valuable traits using traditional field and laboratory methods. Molecular markers are often used to highlight sources of resistance to biotic stress. The selection of genotypes of oats resistant to diseases, and, in particular, to fusarium infection and the accumulation of mycotoxin deoxynivalenol (DON) in grain is carried out by mapping quantitative trait loci (QTLs). Established QTLs that control resistance to mycotoxin accumulation. In addition, QTLs were found that, with an increase in the length of the growing season and plant height, reduce the accumulation of mycotoxin DON in the oat caryopsis. The use of the marker of auxiliary selection (MAS) for the isolation of genotypes resistant to the main diseases of oats and for other breeding traits is discussed. The article discusses modern approaches to genotyping of selectively significant traits.

**Keywords:** *Avena*, genomes, cereals, interspecific hybridization, molecular markers, oats, QTLs, Poaceae, polyploidy, origin of cultivated species, resistance to environmental factors, breeding.

## ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

УДК 579.61

## ТРАНСКРИПЦИЯ ГЕНА hlyIIR Bacillus cereus

© 2021 г. А. С. Нагель<sup>1</sup>, Ж. И. Андреева-Ковалевская<sup>1</sup>, А. В. Сиунов<sup>1</sup>, М. О. Нагорных<sup>1</sup>, М. В. Захарова<sup>1</sup>, А. С. Солонин<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup> Пущинский научный центр биологических исследований, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской академии наук, Московская область, Пущино, 142290 Россия

> \**e-mail: solonin.a.s@yandex.ru* Поступила в редакцию 24.06.2020 г. После доработки 07.09.2020 г. Принята к публикации 10.09.2020 г.

Изучена транскрипция гена *hlyIIR Bacillus cereus*, который является негативным транскрипционным регулятором гена гемолизина II (*hlyII*) — фактора патогенности *B. cereus*. Выявлена последовательность промотора перед геном *hlyIIR* и определена стартовая точка транскрипции. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* проведен анализ влияния белка-регулятора на транскрипцию с собственного промотора. В клетках *B. cereus* выявлен конститутивный характер синтеза конечного продукта. Полученные результаты могут указывать на отсутствие авторегуляции гена *hlyIIR* и участия промотора гена гемолизина II в регуляции экспрессии гена *hlyIIR*.

*Ключевые слова: Bacillus cereus, hlyIIR*, гемолизин II, регуляция транскрипции, авторегуляция, факторы патогенности.

**DOI:** 10.31857/S0016675821060072

Bacillus cereus sensu lato — видовой комплекс спорообразующих грамположительных бактерий, которые распространены повсеместно [1]. *В. cereus* sensu stricto является условным патогеном человека, вызывающим желудочно-кишечные инфекции [2]; В. thuringiensis – энтомопатогенный микроорганизм, широко использующийся в сельском хозяйстве [3]; *B. anthracis* – возбудитель смертельно опасного для млекопитающих заболевания - сибирской язвы [4]. В то же время анализ геномных последовательностей бактерий этой группы выявляет высокую степень подобия. Классификация этих бактерий основана на фенотипических отличиях, кодируемых в ряде случаев генами, локализованными на плазмидах, наличие которых и определяет существование этих микроорганизмов в различных условиях окружающей среды. Продукция факторов патогенности этими бактериями может быть связана не только с наличием или отсутствием генов самих токсинов, но также с регуляцией их экспрессии [5].

Одним из факторов патогенности *B. cereus* является гемолизин II (HlyII). Он принадлежит к обширному семейству  $\beta$ -складчатых каналообразующих цитолизинов, которые встраиваются в мембрану с образованием пор [6]. Гемолизин II широко распространен как среди штаммов *B. cereus*, так и *B. thuringiensis* [7]. Ген гемолизина II был впервые изолирован из библиотеки хромосомной ДНК *B. cereus. Eco*RIфрагмент хромосомной ДНК размером 2.9 тпн при введении в *E. coli* в составе плазмидного вектора приводит к возникновению у трансформантов гемолитического фенотипа [8]. На том же участке ДНК за геном *hlyII* обнаружен ген транскрипционного регулятора (*hlyIIR*), продукт которого осуществляет регуляцию экспрессии гена гемолизина II [9]. HlyIIR принадлежит к TetR/AcrRгруппе транскрипционных регуляторов [10].

Регуляция экспрессии гена может осуществляться как путем прямого контроля его экспрессии, так и опосредованно, путем регуляции экспрессии генов самих регуляторов или путем модуляции функции этих регуляторов.

Настоящая статья посвящена описанию промотора и транскрипции гена *hlyIIR B. cereus*.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### Бактериальные штаммы

Для большинства операций использовался штамм *Escherichia coli* Z85 (*thi*,  $\Delta$ (*lac-pro*AB),  $\Delta$ (*srl-rec*A), *hsdR*, *supE*, Tn10(Tc<sup>r</sup>), (F',-*traD*, *pro*AB, *LacI*  $\Delta$ M15)) [11], для экспрессии белка HlyIIR – *E. coli* M15pRep4 (pHR) (Km<sup>r</sup>, *lac*, *ara*, *gal*, *mtl*, F<sup>-</sup>) [9];

Таблица	1.	Плазмидь
Таблица	1.	Плазмидь

Название	Описание	Источник
pUJ1	2.9 тпн <i>Eco</i> RI-фрагмент хромосомной ДНК <i>В. cereus</i> VKM-B771, содержащий гены <i>hlyII, hlyIIR</i> в pUC19	[15]
p15KS-	Ap, Cm	Stratagene
pRH2	Ген <i>hlyIIR</i> в векторе p15KS	[9]
pF	Ген <i>lacZ</i> , клонированный в pUC19 по сайтам рестрикции <i>Bam</i> HI— <i>Hin</i> dIII	[16]
pFHR217	Промотор <i>hlyII</i> , ген <i>hlyII</i> , межгенный участок и промотор <i>hlyIIR</i> в <i>Eco</i> RI— <i>Bss</i> SI-фрагменте pUJI, липкие концы застроены фрагментом Кленова, фрагмент затем встраивали по тупым концам в линеаризованную по сайту <i>Sma</i> I pF	Данная работа
pFHR217∆KS	Делеция регуляторной области <i>hlyII</i> в pFHR217, чтобы оценить влияние промотора гена гемолизина II на транскрипцию <i>hlyIIR</i> . pFHR217 была гидролизована по сайтам <i>Kpn</i> I– <i>Spe</i> I и циклизована	Данная работа

в экспериментах *in vivo* использовался штамм *B. cereus* 771, аналогичный *B. cereus* AH820 (NC\_011773.1) и штамм *B. cereus* 4342-N-HlyIIR (аналогичный *B. cereus* ATCC 4342 (NZ\_CM000721.1), нокаутированный по гену *hlyIIR*); для анализа флуоресценции TurboGFP — штамм *B. subtilis* BD170 с плазмидой pPhlyIIR-tGFP, описанный в [12]. Выращивание бактерий *E. coli* проводили в жидких и на агаризованных средах LB. Для культивирования *B. cereus* использовалась 3.7%-ная сердечномозговая среда (BHI) фирмы "Difco".

## Плазмиды

Плазмиды, использованные в работе, перечислены и описаны в табл. 1.

## Выделение белка

Выделение белка HlyIIR-6HIS осуществлялось как описано ранее из клеток *E. coli* M15pRep4 (pHR) [9]. Выделение PHK-полимеразы из *B. cereus* 771 описано в [9]. Выделение PHK-полимеразы из *E. coli* описано в [13].

## Анализ гемолитической активности

Тестирование гемолитической активности проводили на эритроцитах человека с помощью методики, основанной на спектрофотометрической регистрации гемоглобина, высвобождающегося при лизисе эритроцитов [8]. За единицу гемолитической активности (ГЕ) принято количество гемолизина, вызывающее лизис половины клеток 1 мл 0.5%-ной суспензии эритроцитов в ФСБ (74 мМ Na-фосфат, 77 мМ NaCl pH 6.8) за 30 мин при 37°С. Гемолитическую активность в присутствии холестерина измеряли как описано ранее [14].

## Иммунохимическое определение белка

Вестерн-блоттинг проводили по методу, разработанному в лаборатории Харлоу [6] с помощью антител кролика, полученных к очищенному препарату HlyIIR.

## Транскрипция in vitro, $KMnO_4$ -футпринтинг

Эксперименты по транскрипции *in vitro* и  $KMnO_4$ -футпринтингу были выполнены как описано ранее [13]. Очищенные фрагменты ДНК с промоторными областями генов инкубировали с РНК-полимеразами *E. coli* и *B. cereus* (100 нМ) в буфере, содержащем 20 мМ трис-HCl pH 8.0, 100 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.1 мМ EDTA, 1 мМ DTT, 50 мкг БСА, 5% глицерина в объеме 10 мкл, в течение 7 мин при 37°С. При добавлении HlyIIR реакционная смесь инкубировалась дополнительные 10 мин при 37°С. Затем добавляли 5 мкл смеси из четырех рибонуклеотидтрифосфатов (конечная концентра-

ция 50 мкМ UTP и по 0.2 мМ ATP, GTP, CTP каждого), содержащей 0.5 µСі [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-UTP и 20 мкг гепарина, и инкубировали еще в течение 10 мин. Реакцию останавливали добавлением 15 мкл охлажденного стоп-буфера (95%-ный формамид, 0.05%-ный бромфеноловый синий). Полученные PHK-фрагменты анализировали методом электрофореза в 7%-ном ПААГ в денатурирующих условиях с добавлением 8 М мочевины. После электрофореза гель экспонировали с рентгеновской пленкой.

Анализ образования открытого комплекса РНКП с промоторной областью ДНК выполняли с использованием метода KMnO<sub>4</sub> (перманганатного) футпринтинга. Метод позволяет обнаружить тимины, которые становятся чувствительными к КМпО<sub>4</sub> в одноцепочечной ДНК. Фрагменты ДНК с промоторными областями амплифицировали посредством ПЦР. Один из двух используемых праймеров метили [у-<sup>32</sup>P]АТР с помощью полинуклеотидкиназы фага Т4. Реакционную смесь, содержащую ДНК, транскрипционный буфер и 1 мкл (100 нМ) РНК-полимеразы, инкубировали 7 мин при 37°С. После обрабатывали 20 мМ КМпО<sub>4</sub> в течение 10-20 с при 37°С, реакцию останавливали добавлением 1 мкл β-меркаптоэтанола. ДНК переосаждали тремя объемами этанола, после чего обрабатывали пиперидином при 90°С. Образцы ДНК в стоп-буфере инкубировали в течение двух минут при 95°С и анализировали в 7%-ном денатурирующем ПААГ. После электрофореза гель экспонировали с рентгеновской пленкой.

#### Определение ДНК-связывающей активности HlyIIR

ДНК-связывающую активность определяли, используя метод задержки в геле. ДНК-зонды (20 нг ДНК) инкубировали 20 мин при 37°С с различными концентрациями белка в 20 мкл буфера (10 мМ трис-HCl pH 7.5, 10 мМ NaCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub> и 1 мкг БСА и 1 мкг ДНК цыпленка).

#### Определение *β*-галактозидазной активности

β-Галактозидазную активность тестировали как описано ранее [17].

#### Анализ флуоресценции TurboGFP

Клетки *B. subtilis* выращивали в 0.5 мл среды LB в 48-луночных планшетах при 37°С. Уровень флуоресценции измеряли в течение 24 ч каждые 10 мин при значениях A485 нм (возбуждение) и

ГЕНЕТИКА том 57 № 6 2021

A535 нм (эмиссия). Выращивание культуры и все измерения проводили в мультирежимном планшетном ридере (Multi-functional plate reader) Filter Max F5 (Molecular Devices).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

#### HlyIIR накапливается в клетках в процессе роста

Анализ синтеза белка HlyIIR с помощью иммуноблоттинга поликлональными антителами против HlyIIR показал, что его максимальный уровень достигается в начале стационарной фазы роста *В. cereus*. Как можно видеть на рис. 1,*a*, в клетках штамма *B. cereus* 4342-N-HlyIIR, с нокаутом по гену *hlyIIR*, использованного в качестве отрицательного контроля (дорожка 0). поликлональные антитела не выявили присутствия HlyIIR. Для того чтобы исследовать связь между содержанием в клетке белка-регулятора и гемолитической активностью в культуральной среде, измеряли общую и холестерин-независимую гемолитическую активность. Увеличение содержания белка HlyIIR на определенном этапе приводит к снижению как общей, так и холестерин-независимой гемолитической активности в культуральной среде (рис. 1). Данные, представленные на рис. 1, a, демонстрируют, что ген *hlyIIR* экспрессируется конститутивно и участвует в подавлении гемолитической активности.

#### Картирование промотора гена hlyIIR

Тандемное расположение генов *hlvII* и *hlvIIR* и их функциональная связь позволяют предположить, что эти гены могут образовывать оперон и регулироваться совместно. В то же время после гена гемолизина II расположен транскрипционный терминатор, а перед геном *hlyIIR* обнаружена нуклеотидная последовательность, гомологичная консенсусным последовательностям большинства промоторов прокариот. Таким образом, транскрипция гена *hlyIIR* возможна как с промотора гена *hlvII*, так и с собственного промотора и невозможно исключить влияние обоих промоторов на эффективность экспрессии гена hlyIIR. Чтобы прояснить ситуацию, было решено определить способна ли РНК-полимераза *В. cereus* связывать предполагаемый промотор *hlvIIR in vitro*. Для этого фрагменты ДНК, соответствующие предполагаемому промотору и началу гена hlyIIR, были использованы как матрицы для транскрипции. Длина образуемых транскриптов была одинакова в случае использования как РНК-полимеразы *E. coli*, так и РНК-полимеразы *B. cereus*. Обе полимеразы узнают промотор hlyIIR, поэтому было



**Рис. 1.** Изменение содержания белка HlyIIR в клетках и уровня гемолитической активности в культуральной среде в процессе роста штамма *B. cereus* 771. *a* – уровень HlyIIR в клетках *B. cereus*, отобранных в разных точках роста, показанный с помощью иммунноблота;  $\delta$  – общая гемолитическая активность;  $\beta$  – холестерин-независимая гемолитическая активность.

решено в последующих экспериментах использовать РНК-полимеразу из *E. coli*, поскольку в этом случае сигнал намного сильнее (данные не показаны). Для картирования промотора использовали методику перманганатного футпринтинга [13]. Участки одноцепочечной ДНК могут образовываться в результате формирования открытого комплекса ДНК—РНК-полимераза и плавления ДНК в этом месте. Результаты представлены на рис. 2,*a*. На изучаемом участке ДНК обнаружен один открытый комплекс ДНК с РНК-полимеразой *E. coli*. Определена точка начала транскрипции.



**Рис. 2.** Промотор *hlyIIR. а* – картирование промотора hlyIIR. Представлены результаты перманганатного футпринтинга. Дорожка 1 - A + G реакция, дорожка 2 - реакция с КМпО<sub>4</sub>. Стрелками отмечено местоположение открытого промоторного комплекса ДНК–РНК-полимераза;  $\delta$  – влияние белка-регулятора HlyIIR на транскрипцию гена *hlyII;* e – влияние белка-регулятора HlyIIR на транскрипцию собственного гена; e – последовательности участка, расположение открытого перед геном *hlyIIR*, и центральной части оператора *hlyII*;  $\partial$  – связывание HlyIIR с участком, перекрывающимся с промотором *hlyIIR* (рис. 2,e); ж – последовательность ДНК в области промотора *hlyIIR* (GenBank: AY212780).

Участки -10 и -35 промотора гена *hlyIIR* картированы (рис. 2,*a*, *ж*) и определено направление синтеза РНК.

#### *HlyIIR не связывается со своим промоторным* участком в условиях in vitro

Перед геном *hlyIIR* обнаружен участок ДНК (рис. 2, $\epsilon$ , O-HlyIIR), имеющий высокую гомологию с центральной частью операторной области гена *hlyII* (рис. 2, $\epsilon$ , O-HlyII). Так как HlyIIR связывается с оператором гена *hlyII* [9], было решено проверить связывается ли HlyIIR с этим участком гена *hlyIIR* в условиях *in vitro*. Для этого радиоактивно меченные двухцепочечные ДНК, соответствующие последовательностям, показанным на рис. 2, $\epsilon$ , были использованы в экспериментах по изменению подвижности ДНК в гелях. Несмотря на то, что HlyIIR связывается с оператором гена *hlyII* (рис. 2,d), связывания с частично гомологичным участком гена *hlyIIR* не обнаружили (рис. 2,e). Димеры HlyIIR эффективно связываются по флангам оператора гена *hlyII*, но не с его центральной частью [18]. Обнаруженный нами район гомологии участка, расположенного перед *hlyIIR* с центром оператора *hlyII*, не обеспечивает взаимодействия этого участка с HlyIIR.

Транскрипция гена hlyII подавляется в присутствии HlyIIR (рис. 2, $\delta$ ), что соответствует опубликованным ранее данным [9], в то время как транскрипция гена hlyIIR в присутствии белка HlyIIR не подавлялась (рис. 2, $\beta$ ). Следовательно, в условиях *in vitro* транскрипционный регулятор HlyIIR участвует в регуляции экспрессии гена hlyII, но не влияет на экспрессию собственного гена.

#### HlyIIR не регулирует экспрессию своего гена в условиях in vivo

Как следует из рис. 1,*a*, белок HlyIIR накапливается в процессе роста клеток, что может означать,

658	

Плазмидная конструкция	β-Галактозидазная активность (ед./мл)			
	p15KS-	pRH2		
pFHR217 (P <sub>hlyII</sub> , P <sub>hlyIIR</sub> )	373 ± 62	224 ± 56		
pFHR217 $\Delta$ KS (P <sub>hlyIIR</sub> )	$420\pm65$	$234\pm55$		

Таблица 2. Регуляция HlyIIR в системе in vivo

что его экспрессия осуществляется конститутивно, не регулируемо. Для проверки этого предположения были созданы генетические конструкции, в которых репортерный ген β-галактозидазы находится под контролем как P<sub>hlvIIR</sub>, так и участка генома *B. cereus*, содержащего оба промотора P<sub>hlvII</sub> и Р<sub>*hlvIIR*</sub>. Результаты этих экспериментов приведены в табл. 2. Показано, что введение в клетку на совместимых плазмидах гена-репортера под контролем промотора *hlvIIR* и гена самого *hlvIIR* не выявило существенной разницы между экспрессией репортерного гена в присутствии или отсутствии промотора *hlvII*. Можно заключить, что по крайней мере в клетках E. coli ген регулятора экспрессируется только со своего собственного промотора. Гибридизация РНК бактериальных клеток с радиоактивно меченным ДНК-зондом также свидетельствует о том, что мРНК hlyII и hlyIIR синтезируются в клетке независимо друг от друга (рис.  $2, \delta$ , в). Следовательно, HlyIIR в E. coli не может контролировать свою экспрессию через регуляцию синтеза би-цистронной РНК. Конститутивный синтез HlyIIR в клетках B. cereus обеспечивается транскрипцией с собственного промотора, не регулируемого HlyIIR.

Таким образом, транскрипция гена *hlyIIR* происходит только с собственного промотора и не контролируется конечным продуктом.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессия белка прямо или опосредованно может контролироваться несколькими транскрипционными регуляторами. Важнейшей задачей становится получение количественной информации, так как далеко не все процессы, которые мы можем наблюдать в пробирке, могут быть осуществлены в клетке.

Гемолизин II — один из факторов, определяющих приспособление условно-патогенных бацилл к окружающей среде. Продукция гемолизина II одной клеткой может оказаться недостаточной, поэтому необходима согласованная экспрессия этого гена во всей бактериальной популяции. Ранее нами было показано, что HlvIIR, ген которого расположен вслед за геном гемолизина II, является негативным регулятором экспрессии гена гемолизина II [9]. Он связывается с инвертированным повтором в операторном участке гена hlvII[18] и способен уменьшать эффективность инициации РНК синтеза. Экспрессия hlyII зависит от состояния окружающей среды. Чрезмерное накопление гемолизина II может быть потенциально опасным для бактериальной клетки. Эффективность транскрипции этого гена определяется присутствием индуктора, который обнаруживается в плазме крови [19]. В сапрофитном состоянии необходим негативный контроль экспрессии hlyII. Белок регулятора накапливается в процессе роста бактерий и его накопление пропорционально плотности бактериальной культуры и общей гемолитической активности в окружающей среде.

Перед геном *hlyIIR* картирован промотор, содержащий -10 и -35 последовательности, и определена точка инициации транскрипции. Промотор перекрывается с участком, который имеет гомологию с центральной областью оператора hlyII. Постепенное накопление белка регулятора в клетках может указывать на отсутствие автоингибирования. Синтез РНК в условиях in vitro происходит с обнаруженной точки начала транскрипции. Синтез полноразмерного транскрипта с промотора Р<sub>hlvIIR</sub> не ингибировался присутствием HlyIIR. Эксперименты по ко-экспрессии гена *hlvIIR* с репортерным геном β-галактозидазы под контролем  $P_{hlvIIR}$  подтверждают, что ген *hlyIIR* экспрессируется в клетке с собственного промотора и его влияние на транскрипцию не обнаружено. Анализ эффективности транскрипции с P<sub>hlvIIR</sub> в клетках B. subtilis с помощью репортерного гена turbogfp также не выявил зависимости эффективности транскрипции с промотора Р<sub>hlvIIR</sub> от присутствия белка HlyIIR [12]. В ходе настоящей работы описан промотор  $P_{hlyIIR}$  и определена его локализация. Транскрипция гена *hlyIIR* происходит только с собственного промотора и не контролируется конечным продуктом.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-01017.

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. *Patiño-Navarrete R., Sanchis V.* Evolutionary processes and environmental factors underlying the genetic diversity and lifestyles of *Bacillus cereus* group bacteria // Res. Microbiol. 2017. V. 168. № 4. P. 309–318. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.07.002
- Ehling-Schulz M., Lereclus D., Koehler T.M. The Bacillus cereus group: Bacillus species with pathogenic potential // Microbiol. Spectr. 2019. V. 7. № 3. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018
- Chattopadhyay A., Bhatnagar N.B., Bhatnagar R. Bacterial insecticidal toxins // Crit. Rev. Microbiol. 2004.
  V. 30. № 1. P. 33–54. https://doi.org/10.1080/10408410490270712
- Pilo P., Frey J. Pathogenicity, population genetics and dissemination of *Bacillus anthracis* // Infect. Genet. Evol. 2018. V. 64. P. 115–125. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.06.024
- Ceuppens S., Rajkovic A., Heyndrickx M. et al. Regulation of toxin production by Bacillus cereus and its food safety implications // Crit. Rev. Microbiol. 2011. V. 37. № 3. P. 188–213. https://doi.org/10.3109/1040841X.2011.558832
- Miles G., Bayley H., Cheley S. Properties of Bacillus cereus hemolysin II: A heptameric transmembrane pore // Protein Sci. 2002. V. 11. № 7. P. 1813–1824. https://doi.org/10.1110/ps.0204002
- 8. Синев М.А., Бударина Ж.И., Гавриленко И.В. и др. Доказательство существования гемолизина II Bacillus cereus: клонирование генетической детерминанты гемолизина II // Мол. биология. 1993. Т. 27. № 6. С. 1218–1229.
- Budarina Z.I., Nikitin D.V., Zenkin N. et al. A new Bacillus cereus DNA-binding protein, HlyIIR, negatively regulates expression of B. cereus haemolysin II // Mi-

ГЕНЕТИКА том 57 № 6 2021

crobiology (Reading, Engl.). 2004. V. 150. № 11. P. 3691–3701. https://doi.org/10.1099/mic.0.27142-0

- Kovalevskiy O.V., Lebedev A.A., Surin A.K. et al. Crystal structure of Bacillus cereus HlyIIR, a transcriptional regulator of the gene for pore-forming toxin hemolysin II // J. Mol. Biol. 2007. V. 365. № 3. P. 825–834. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.10.074
- 11. Зайцев Е.Н., Зайцева Е.М., Бакланова И.В. и др. Клонирование и секвенирование гена recA из штамма Pseudomonas aeruginosa // Генетика. 1986, Т. 22. № 11. С. 2721–2727.
- Нагель А.С., Андреева-Ковалевская Ж.И., Сиунов А.В., Солонин А.С. Челночная векторная плазмида с turbogfp в качестве репортерного гена для анализа промоторной активности в клетках E. coli и B. subtilis // Технология живых систем. 2020. Т. 17. № 4. С. 18–30.
- Zakharova M., Minakhin L., Solonin A., Severinov K. Regulation of RNA polymerase promoter selectivity by covalent modification of DNA // J. Mol. Biol. 2004. V. 335. № 1. P. 103–111. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.09.081
- Bernheimer A.W., Grushoff P. Extracellular hemolysins of aerobic sporogenic bacilli // J. Bacteriol. 1967. V. 93. № 5. P. 1541–1543.
- Baida G., Budarina Z.I., Kuzmin N.P., Solonin A.S. Complete nucleotide sequence and molecular characterization of hemolysin II gene from *Bacillus cereus* // FEMS Microbiol. Lett. 1999. V. 180. № 1. P. 7–14. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08771.x
- 16. Бударина Ж.И. Ген гемолизина II Bacillus cereus: клонирование, регуляция экспрессии, идентификация продукта: Дис. ... канд. биол. наук. Пущино: Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН, 2005. 141 с.
- Николаев И.В., Епишин С.М., Захарова Е.С. и др. Молекулярное клонирование гена секретируемой бета-галактозидазы мицелиального гриба Penicilliиm canescens // Мол. биология. 1992. Т. 26. С. 869– 875.
- Rodikova E.A., Kovalevskiy O.V., Mayorov S.G. et al. Two HlyIIR dimers bind to a long perfect inverted repeat in the operator of the hemolysin II gene from Bacillus cereus // FEBS Lett. 2007. V. 581. № 6. P. 1190– 1196.

https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.02.035

 Андреева-Ковалевская Ж.И., Сиунов А.В., Бударина Ж.И. и др. Зависимость эффективности транскрипции гена гемолизина II Bacillus cereus от источника плазмы крови // Вестник биотехнологии и физико-хим. биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2017. Т. 13. № 1. С. 5–12.

## Transcription of the *hlyIIR* Gene of *Bacillus cereus*

A. S. Nagel<sup>*a*</sup>, Zh. I. Andreeva-Kovalevskaya<sup>*a*</sup>, A. V. Siunov<sup>*a*</sup>, M. O. Nagornykh<sup>*a*</sup>, M. V. Zakharova<sup>*a*</sup>, and A. S. Solonin<sup>*a*</sup>, \*

<sup>a</sup>Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino Scientific Centre of Biological Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia \*e-mail: solonin.a.s@vandex.ru

The transcription of the *hlyIIR* gene of *Bacillus cereus*, which is a negative transcriptional regulator of the hemolysin II gene (*hlyII*), the pathogenicity factor of *B. cereus*, has been studied. The sequence of the promoter upstream of the *hlyIIR* gene was identified and start point of transcription was determined. The effect of the HlyIIR on the transcription of its own promoter was analyzed *in vitro* and *in vivo*. The constitutive synthesis of the final product was revealed in *B. cereus*. The results obtained indicate the absence of autoregulation of the *hlyIIR* gene and the absence of the participation of the hemolysin II gene promoter in the regulation of *hlyIIR* gene expression

Keywords: *Bacillus cereus*, *hlyIIR*, hemolysin II, transcription regulation, autoregulation, pathogenicity factors.

## ГЕНЕТИКА РАСТЕНИЙ

УДК 575.174.015.3:634.11

# ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ СОРТОВ ЯБЛОНИ НАРОДНОЙ СЕЛЕКЦИИ (*Malus × domestica* Borkh.) ПОВОЛЖЬЯ ИЗ КОЛЛЕКЦИИ ВИР ПО ДАННЫМ NBS-ПРОФАЙЛИНГА

© 2021 г. А. А. Трифонова<sup>1, \*</sup>, А. В. Шлявас<sup>2</sup>, Л. В. Дедова<sup>1</sup>, К. В. Борис<sup>1</sup>, А. М. Кудрявцев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия <sup>2</sup>Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, 190000 Россия

> \*e-mail: aichka89@mail.ru Поступила в редакцию 02.06.2020 г. После доработки 28.07.2020 г. Принята к публикации 25.08.2020 г.

Проведен анализ внутривидового полиморфизма последовательностей семейства NBS-LRR генов устойчивости 112 сортов яблони народной селекции из коллекции Волгоградской опытной станции ВИР и 16 промышленных сортов яблони отечественной и зарубежной селекции с использованием метода NBS-профайлинга. Показана высокая вариабельность NBS-LRR генов устойчивости сортов яблони народной селекции (75.2%,  $H_e = 0.25 \pm 0.009$ ) и выявлена их дифференциация от промышленных сортов. Идентифицированы группы сортообразцов поволжской народной селекции, относящихся к сортотипам Яндыковские, Мамутовские, Боровинки, Бели и Скруты. Показано, что не все образцы одного сортотипа кластеризуются вместе. У образцов сортотипов Яндыковские и Мамутовские выявлены отличные от остальных изученных образцов NBS-паттерны, что может свидетельствовать о наличии у них специфического набора генов устойчивости.

*Ключевые слова:* яблоня, сорта народной селекции, гены устойчивости, генетические ресурсы, генетическое разнообразие.

DOI: 10.31857/S0016675821060114

Центральной составляющей растительного биологического разнообразия являются генетические ресурсы культурных растений и дикорастущих родственных видов, так как они играют важную роль в производстве продовольствия, устойчивом развитии экологически безопасного сельского хозяйства и обеспечении сырьем промышленности. Сокращение генетического разнообразия за счет ограниченного количества промышленно выращиваемых культур и сортов ведет к генетической эрозии и снижает показатели адаптивного потенциала культивируемых растений, их устойчивость к абиотическим и биотическим стрессам [1].

Проблема сокращения генетического разнообразия актуальна и для плодовых культур. В настоящее время в нашей стране основной плодовой культурой является яблоня (*Malus × domestica* Borkh.), выращиваемая на площади около 193 тыс. га [2]. Ведущая роль в сохранении генетических ресурсов яблони в Российской Федерации принадлежит Федеральному исследовательскому центру Всероссийскому институту генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), в шести филиалах которого сохраняется коллекция, насчитывающая более 3800 образцов сортов и видов яблони. Филиалы ВИР расположены в шести регионах страны с различными экологическими и почвенно-климатическими условиями.

В городе Краснослободске в северной возвышенно-равнинной части Волго-Ахтубинской поймы находится Волгоградская опытная станция (ВОС) — филиал ВИР. В коллекционных насаждениях яблони ВОС сохраняется более 800 соортообразцов зарубежной, отечественной современной и народной селекции. Особое значение как для сохранения биологического разнообразия, так и в качестве источников устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам имеют стародавние сорта местной селекции. Они собраны коллекторами ВИР в 60–80-х гг. XX в. в районах Среднего и Нижнего Поволжья и сочетают в себе долговечность, высокую адаптивность и пластичность к условиям данного региона [3].

Известный помолог В.В. Пашкевич считал, что с давних времен Поволжье, несмотря на резко выраженный континентальный климат, "... в своей средней и южной части представляет собой район наиболее самобытного русского плодоводства...", основой которого является яблоня [4]. Здесь сформировались такие сорта яблони, как Бель, Боровинка Акуловская, Мальт, Мамутовское, Скрут, Яндыковское [4, 5]. Следует отметить, что на формирование разнообразия поволжских сортов яблони народной селекции существенное влияние оказала близость древних торговых путей, по которым завозили окультуренные формы яблони из Средней Азии [6].

У сортов народной селекции Поволжья из коллекции ВИР достаточно хорошо изучены морфобиологические особенности, полевая устойчивость к основным вредителям и болезням. Однако данные сорта мало изучены с использованием современных молекулярно-генетических методов, которые в настоящее время широко применяются при исследовании коллекций генбанков для оценки генетического разнообразия, генотипирования образцов коллекций, изучения их происхождения и родословных, а также для поиска источников и доноров ценных хозяйственных признаков для селекции [7].

Особый интерес представляет изучение семейства генов резистентности (Resistance genes (R-genes)), определяющих устойчивость растений ко многим патогенам, в связи с их высокой хозяйственной ценностью. В геноме яблони идентифицировано более 800 генов устойчивости и их аналогов (Resistance Gene Analog, RGA), имеющих NBS (Nucleotide Binding Site) домен [8].

Одним из методов оценки полиморфизма последовательностей семейства генов устойчивости в геноме растений является NBS-профайлинг, основанный на специфической амплификации фрагментов ДНК с помощью двух праймеров, один из которых разработан на основе последовательности одного из консервативных мотивов в домене, кодирующем сайт связывания нуклеотидов (P-петля, киназа 2, GLPL), а другой комплементарен последовательности адаптера, лигированного с фрагментами рестрикции геномной ДНК [9].

Метод NBS-профайлинга ранее был успешно использован для идентификации, картирования и маркирования генов устойчивости к парше и мучнистой росе у яблони [10], а также для оценки вариабельности NBS-LRR генов устойчивости у сортов яблони отечественной и зарубежной селекции, в том числе у образцов сорта яблони народной селекции Антоновка [11].

Целью данной работы было исследование полиморфизма NBS-LRR генов устойчивости сортов яблони народной селекции Поволжья из коллекции Волгоградской опытной станции ВИР.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения исследования были отобраны 128 образцов яблони: в том числе 112 образцов сортов яблони народной селекции из коллекции Волгоградской опытной станции ВИР, а также 16 промышленных сортов яблони зарубежной и отечественной селекции из коллекции ВИР и ФНЦ им. И.В. Мичурина (табл. 1).

ДНК выделяли из свежих молодых листьев с использованием набора ZR Plant/Seed DNA Mini Prep (Zymo Research) согласно инструкции про-изводителя.

NBS-профайлинг проводили по стандартной методике [9], с небольшими модификациями. Для рестрикции геномной ДНК использовали эндонуклеазу *Msel* (NEB). Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием двух праймеров (NBS2 5'-GTWGTYTTICCYRAICCISSCAT-3' и NBS7 5'-ATTGTTGGRATGGGMGGIMTIGG-3') [9] и набора реактивов производства "Диалат-ЛТД", в термоциклере GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Продукты реакции амплификации разделяли электрофорезом в 6%-ном полиакриламидном геле в 1× TBE буфере в камере Sequi-Gen® GT Sequencing Cell (BioRad), с последующим окрашиванием нитратом серебра по методу Н. Benbouza с соавт. [12].

Наличие/отсутствие продуктов амплификации отмечали визуально, учитывали только четко воспроизводимые фрагменты, результаты заносили в бинарную матрицу (1/0) в программе Microsoft Excel. Значения ожидаемой гетерозиготности ( $H_e$ ) рассчитывали с помощью программы GenAlEx6.41 [13]. Расчет коэффициента генетического сходства Дайса (Dice coefficient) между образцами и многомерный анализ по двум главным координатам (РСО – Principal coordinates analysis) были проведены с использованием программы PAST 3.16 [14]. Кластерный анализ был проведен методом Neighbor-Joining (NJ) в программе MEGA7 [15].

Анализ генетической структуры коллекции проводили с помощью байесовской кластеризации в программе Structure v. 2.3.4 [16]. Тестировались от одного до 15 кластеров (*K*), для каждого числа *K* анализ повторялся 5 раз. Расчет числа возможных кластеров проводили с помощью 1000000 генераций Марковских Цепей Монте-Карло, с отбрасыванием первых 300000 генераций (burn-in), с учетом наличия генетического смешения (admixture) и скоррелированности частот встречаемости аллелей (correlated allele frequency). Последующий выбор оптимального количества кластеров осуществляли с помощью сервиса Structure Harvester [17]. Визуализацию результатов проводили с помощью сервиса CLUMPAK [18].

№ п/п	Название образца	Номер каталога ВИР	Происхождение [3]
1	Алое Зимнее	к-35269	Старорусский сорт
2	Анис Алый	к-21629	»
3	Анис Алый Крупноплодный № 1	к-21620	Местный поволжский сорт
4	Анис Белый	к-37804	Старорусский сорт
5	Анис Красный	к-37805	»
6	Анис Летний из Джилги	к-22238	Местный поволжский сорт
7	Анис Московский	к-21615	»
8	Анис Поздний Крупноплодный 5/5а	к-30074	»
9	Анис Полосатый	к-21627	»
10	Анис Полосатый Вольненский	к-21625	»
11	Анис Промежуточный Хвалынский	к-28731	»
12	Анис Розово-Полосатый	к-34254	»
13	Анис Семикаракорский	к-21623	»
14	Анис Серый	к-21630	Старорусский сорт
15	Анис Серый Успенский № 1	к-21621	Местный поволжский сорт
16	Анис Серый Успенский № 2	к-21622	»
17	Анис Шацкий	к-15976	Старорусский сорт
18	Антоновка Красная	к-21652	Местный поволжский сорт
19	Антоновка Плоская	к-31977	Среднерусский сорт
20	Антоновка Поздняя Успенская	к-21645	Местный поволжский сорт
21	Апорт Белый	к-15984	Среднерусский сорт
22	Апорт Солянский	к-25427	Местный поволжский сорт
23	Апорт Успенский	к-21658	Местный поволжский сорт
24	Апортовидное Донское	к-21667	»
25	Арабка из Солянки	к-28732	»
26	Арабка Синяя	к-21672	»
27	Астраханское Белое	к-146	Русский сорт народной селекции, наиболее распространен в европейской части России
28	Астраханское Красное	к-27818	Русский сорт народной селекции, распространенный в окрестностях Астрахани
29	Астраханское Красное из Млиево	к-15993	Русский сорт
30	Белевое Сокрутовское	к-28735	Местный поволжский сорт
31	Бель Алая	к-28736	»
32	Бель Красная	к-28737	»
33	Бель Красноярская	к-25429	»
34	Бель Осенняя	к-38709	»
35	Бель Полосатая из Ленинска	к-21787	»
36	Бель Полосатая из Пологого Займища	к-21788	»
37	Бель Полосатая из Пологого Займища	к-25428	»
38	Бель Полосатая из Солянки	к-25430	»
39	Бель Полосатая Каменская	к-21790	»
40	Бель Рогатинская	к-36139	»
41	Бель Розовая	к-16002	»
42	Бель Сасыкольская	к-25432	»
43	Бель Сахарная	к-27820	Среднерусский сорт
44	Бель Суворинская	к-31981	Местный поволжский сорт

Таблица 1. Образцы яблони, использованные в работе

## Таблица 1. Продолжение

№ п/п	Название образца	Номер каталога ВИР	Происхождение [3]
45	Боровинка Акуловская	к-27821	Местный поволжский сорт
46	Боровинка Акуловская из Акуловки	к-21810	»
47	Боровинка Акуловская из Отрадного	к-21812	»
48	Боровинка Акуловская с молодого	к-21811	»
	дерева		
49	Боровинка Акуловская с х. Поповки	к-21807	»
50	Боровинка Крупноплодная IIIa	к-21808	»
51	Боровинка Родионовская	к-21815	»
52	Варгуль Акуловский	к-21826	»
53	Варгуль Воронежский	к-16037	Среднерусский сорт
54	Варгуль Серафимовический	к-21827	Местный поволжский сорт
55	Волжское Зимнее	к-21837	»
56	Волжское Зимнее	к-36141	»
57	Зимнее Крупное	к-21945	»
58	Коричное Полосатое Палевое	к-28741	»
59	Крупнина	к-22057	»
60	Крупнина	к-25447	»
61	Мальт Багаевский Харабалинский	к-22141	»
62	Мальт Крестовый	к-16149	»
63	Мальт Нижнечирской	к-22139	»
64	Мамутовское Квасное	к-22142	»
65	Мамутовское Квасное Красноярское	к-25461	»
66	Мамутовское Крупное	к-28748	»
67	Мамутовское Сладкое Вольненское	к-25462	»
68	Мамутовское Сладкое из Заволжья	к-27834	»
69	Налив Белый Настоящий	к-16162	Стародавний русский сорт
70	Налив Белый Орловский	к-22173	»
71	Налив Розовый	к-22175	»
72	Налив Ряжский	к-22176	»
73	Нижнечирское Осеннее	к-22179	Местный поволжский сорт
74	Плоское Ребристое от Прокопенко	к-28752	»
75	Ренет Курский Золотой	к-22282	Стародавний русский сорт
76	Розмарин Русский	к-22320	Местный поволжский сорт
77	Розовка	к-22326	»
78	Скороспелка Дубовская	к-36245	»
79	Скрут Алый	к-16254	»
80	Скрут Алый Харабалинский	к-22382	»
81	Скрут Белый	к-16255	»
82	Скрут Золотухинский	к-25492	»
83	Скрут Красный	к-16257	»
84	Скрут Сасыкольский	к-22381	»
85	Хорошавка Алая	к-1736	»
86	Хорошавка Алая Подлесненская	к-36185	»
87	Хорошавка Сенгилеевская	к-16289	»
88	Царский Шип	к-16290	Старорусский сорт

## Таблица 1. Окончание

№ п/п	Название образца	Номер каталога ВИР	Происхождение [3]
89	Черногуз	к-16294	Старорусский сорт
90	Черное Лерево	к 10291 к-22442	»
91	Шаропай	к-37834	»
92	Штрейфлинг Красный Алтуховский	к-27851	Местный поволжский сорт
93	Янлыковское	к-27852	»
94	Янлыковское из Сокрутовки № 1	к-33065	»
95	Яндыковское из Сокрутовки № 2	к-33066	»
96	Яндыковское из Солянки	к-25496	»
97	Яндыковское Колачевское Крупно- плодное	к-22456	»
98	Яндыковское Крупноплодное	к-22458	»
99	Яндыковское Позднее	к-22455	»
100	Яндыковское Порослёвое	к-22459	»
101	Яндыковское форма № 1	к-3036А	»
102	Яндыковское форма № 3	к-3037А	»
103	Яндыковское форма № 4	к-3038А	»
104	Яндыковское форма № 5	к-3040А	»
105	Яндыковское форма № 14	к-3047А	»
106	Яндыковское форма № 16	к-3048А	»
107	Яндыковское форма № 17	к-3049А	»
108	Яндыковское форма № 21а	к-3053А	»
109	Яндыковское форма № 22	к-3056А	»
110	Яндыковское форма № 23а	к-3057А	»
111	Яндыковское форма № 24е	к-3064А	»
112	Яндыковское форма № 24ж	к-3065А	»
	Про	омышленные сор	ота
113	Благовест	—	Прима × Бессемянка Мичуринская (Россия)
114	Былина	—	»
115	Курнаковское	—	814 × ПА-29-1-1-63 (Россия)
116	Рождественское	—	Wealthy × BM41497 (Россия)
117	Свежесть	—	Антоновка Краснобочка × PR12T67 (Россия)
118	Скала	—	Прима × Бессемянка Мичуринская (Россия)
119	Флагман	—	Богатырь × Скала (Россия)
120	Braeburn	_	Сеянец Lady Hamilton от свободного
121	Fireside		McIntosh X Longfield (CIIIA)
121	Florina	r 10691	612 1 X Jonathan (Opauuug)
122	Fuii	k = 40094 k = 40784	Delicious $\times$ Ralls Janet (Япония)
123	Gala	$\kappa = 40707$	Kidd's Orange Red × Golden Delicious
127	Sand	K 40702	(Новая Зеландия)
125	Golden Delicious	к-40769	Происхождение неизвестно (США)
126	Granny Smith	к-43504	Возможно сеянец французского креба
			(Австралия)
127	Spartan	—	McIntosh × Yellow Newtown (Канада)
128	Wealthy	—	Происхождение неизвестно (США)

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе NBS-профайлинга 128 образцов яблони было выявлено 432 фрагмента (188 фрагментов с помощью праймера NBS2 и 244 — с помощью праймера NBS7). Для каждого изучаемого образца яблони был получен уникальный NBS-спектр. Для образца Мамутовское Сладкое из Заволжья выявлен уникальный фрагмент. Три пары сортов с одинаковым названием, собранные в разное время и имеющие разные каталожные номера: Бель Полосатая из Пологого Займища (к-21788 и к-25428), Волжское Зимнее (к-21837 и к-36141) и Крупнина (к-22057 и к-25447), имели разный набор фрагментов по результатам NBS-профайлинга.

Уровень полиморфизма общей выборки составил 75.7%, а показатель ожидаемой гетерозиготности 0.26  $\pm$  0.009. Отдельно был вычислен уровень разнообразия для сортов народной селекции и промышленных сортов яблони (75.2%,  $H_{\rm e} = 0.25 \pm 0.009$  и 57.3%,  $H_{\rm e} = 0.21 \pm 0.010$  соответственно).

Среднее значение индекса генетического сходства Дайса между парами образцов составило 0.84. Наибольшее сходство (0.99) отмечено между образцами Яндыковское форма № 21а и Яндыковское форма № 23а, а также между образцами Яндыковское форма № 17 и Яндыковское форма № 21а. Кроме сортов из группы Яндыковские, наибольшее генетическое сходство выявлено для образцов Бель Полосатая из Пологого Займища (к-21788) и Бель Полосатая из Ленинска. а также Мамутовское Квасное и Мамутовское Квасное Красноярское (0.98). Минимальный уровень сходства наблюдался между образцами Яндыковское Колачевское Крупноплодное и Волжское Зимнее (к-21837) (0.75), а также между образцами Яндыковское форма № 24ж и Коричное Полосатое Палевое (0.76).

Среднее значение индекса Дайса среди промышленных сортов яблони составило 0.87. Наиболее сходны генетически оказались сорта Gala и Golden Delicious (0.92), наименее – Granny Smith и Свежесть (0.82).

Максимальное и минимальное, а также среднее значение индекса генетического сходства между образцами народной селекции совпадают с соответствующими значениями между образцами общей выборки.

Анализ данных NBS-профайлинга был проведен с использованием метода многомерного шкалирования в программе PAST. На графике главных координат большинство изученных образцов образуют обширную общую группу, включающую промышленные сорта яблони, которые располагаются достаточно компактно в левой верхней части графика (рис. 1). Обособленное положение занимают 14 образцов из группы Яндыковские (Яндыковское Колачевское Крупноплодное, Яндыковское Круп-

ноплодное, Яндыковское из Солянки, Яндыковское из Соркутовки № 2, Яндыковское Порослевое, Яндыковское форма № 1, Яндыковское форма № 4, Яндыковское форма № 14, Яндыковское форма № 16, Яндыковское форма № 17, Яндыковское форма № 21а, Яндыковское форма № 22, Яндыковское форма № 23а, Яндыковское форма № 24е), а также три образца из группы Мамутовские (Мамутовское Квасное, Мамутовское Квасное Красноярское и Мамутовское Сладкое Вольненское). Промежуточное положение между обшей группой и сортами из групп Яндыковские и Мамутовские занимают образцы: Анис Розово-Полосатый, Астраханское Красное, Белевое Сокрутовское, Бель Красноярская, Бель Полосатая из Пологого Займища (к-25428) и Бель Сасыкольская.

Анализ полученных данных в программе Structure показал, что оптимальное число кластеров, на которые можно разделить исследуемую выборку, составляет два (рис. 2). Первый кластер формируют 14 образцов из группы Яндыковские, которые были дифференцированы от общей группы на графике главных координат, второй все оставшиеся образцы (рис. 3,a). Также выделяются образцы, включающие компоненты обоих кластеров, в том числе три сорта группы Мамутовские (Мамутовское Квасное, Мамутовское Квасное Красноярское и Мамутовское Сладкое Вольненское) и сорта, которые на графике главных координат занимали промежуточное положение (рис. 3,a).

Значение delta *К* при K = 7 также достаточно велико (рис. 2). При разделении сортов на семь кластеров, кроме 14 образцов сортотипа Яндыковские, отдельные кластеры образуют промышленные сорта яблони, а также некоторые сорта группы Мамутовские и группы Боровинки (рис. 3, $\delta$ ).

На дендрограмме, построенной методом Neighbour-Joining, отдельный кластер формируют промышленные сорта яблони, в этот же кластер попадают и семь сортов народной селекции: Ренет Курский Золотой, Анис Красный, Анис Белый, Анис Поздний Крупноплодный 5/5а, Мамутовское Сладкое из Заволжья, Волжское Зимнее (к-36141) и Яндыковское форма № 3 (рис. 4).

Также на дендрограмме совместно кластеризуются некоторые образцы из групп сортотипов народной селекции Поволжья: Анисы, Бели, Боровинки, Мамутовские, Скруты и Яндыковские. При этом не все образцы одного сортотипа объединяются в один кластер (рис. 4). 14 из 20 сортов группы Яндыковские и три из пяти сортов группы Мамутовские объединяются в отдельный кластер, включающий также шесть образцов из других групп (те же образцы, что занимали обособленное положение на РСО-графике) (рис. 1).



группы Анисы; ▼ – сорта группы Бели; ◆ – сорта группы Боровинки; ■ – сорта группы Мамутовские; \* – сорта группы Скругы; ▲ – сорта группы Яндыковские; О – другие сорта Волгоградской опытной станции ВИР). Номера образцов на графике соответствуют порядковым номерам в табл. 1.



**Рис. 2.** Оценка оптимального числа кластеров (*K*) с помощью метода delta *K*.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенный NBS-профайлинг выявил достаточно высокий уровень полиморфизма NBS-LRR генов устойчивости изученной выборки (75.7%,  $H_e = 0.26 \pm 0.009$ ). Для всех образцов были получены уникальные NBS-спектры, в том числе и для трех пар образцов с одинаковыми названиями, собранных в разное время и имеющих разные каталожные номера: Бель Полосатая из Пологого Займища (к-21788 и к-25428), Волжское Зимнее (к-21837 и к-36141) и Крупнина (к-22057 и к-25447) (табл. 1). Данные пары образцов имеют существенные различия по NBS-спектрам, следовательно можно предположить, что они не относятся к одному сорту и их наименования в коллекции могут быть пересмотрены.

Уровень вариабельности сортов народной селекции оказался выше, чем у отечественных и зарубежных промышленных сортов (75.2%,  $H_{\rm e} =$ = 0.25  $\pm$  0.009 и 57.3%,  $H_{\rm e}$  = 0.21  $\pm$  0.010 соответственно). Анализ полученных результатов с использованием различных статистических подходов позволил выявить генетические различия между промышленными сортами яблони, взятыми в анализ, и сортами народной селекции Поволжья. Так, на графике главных координат промышленные сорта располагаются достаточно компактной группой в левой верхней части графика, а сорта народной селекции распределены по графику (рис. 1), в то время как при анализе генетической структуры изученной выборки при числе кластеров равном двум (K = 2) промышленные сорта формируют общий кластер со стародавними сортами (рис. 3,*a*), а при K = 7 промышленные сорта выделяются в отдельный кластер (рис. 3, б). При

этом по результатам филогенетического анализа промышленные сорта формируют отдельный кластер, в который попадают также семь сортов народной селекции (рис. 4). Следует отметить, что некоторые промышленные сорта, взятые в анализ, такие как Golden Delicious, Wealthy и Granny Smith, были созданы еще в XIX в. [19].

Ранее, при исследовании генетического разнообразия сортов яблони народной селекции Северо-Запада из коллекции НПБ "Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР" методом AFLPанализа была выявлена дифференциация между современными промышленными и старолавними сортами [20]. Подобное разделение было показано и для группы сортов народной селекции Антоновки и 32 отечественных и зарубежных сортов яблони при анализе полиморфизма NBS-LRR генов устойчивости [11]. При оценке генетического разнообразия и популяционной структуры коллекций яблони Франции и Центральной Италии с использованием микросателлитных маркеров также был выявлен высокий уровень полиморфизма местных и стародавних сортов и показана их дифференциация от широко распространенных коммерческих сортов [21, 22].

Полученные результаты свидетельствуют о большом разнообразии и уникальности NBS-LRR генов устойчивости у сортов яблони народной селекции Поволжья и подтверждают возможность их использования в качестве потенциальных источников генов устойчивости для селекции. Следует отметить, что в настоящее время в мировом производстве в основном используют только 10-20 сортов яблони [23]. Преобладание такого небольшого числа сортов на больших площадях существенно увеличивает их уязвимость перед различными неблагоприятными факторами окружающей среды, а также приводит к вытеснению местных и стародавних сортов, хорошо адаптированных к местным условиям, и в результате к существенному сокращению генетического разнообразия. Поэтому задача сохранения и изучения стародавних сортов яблони является особенно актуальной.

Поволжье считается одним из центров зарождения садоводства в России, на формирование которого повлияла близость древних торговых путей, проходивших через данный регион, а также специфические климатические условия, определившие самобытный характер садоводства в этой зоне [6]. В Поволжье сформировались местные сортотипы яблони, такие как Яндыковское, Боровинка Акуловская, Бель, Мамутовское, Мальт, Скрут, Хорошавка.

Данные NBS-профайлинга позволили дифференцировать группы сортов народной селекции Поволжья. Так, все использованные методы ана-



**Рис. 3.** Вероятность отнесения исследованных образцов яблони к одной из групп по результатам анализа в программе STRUCTURE. *a* – с числом кластеров 2; *б* – с числом кластеров 7. Горизонтальная ось – апостериорная вероятность принадлежности образца к определенному кластеру; вертикальная ось – анализируемые образцы. Образцы на графиках расположены в соответствии с порядковыми номерами в табл. 1.



Рис. 4. Дендрограмма, построенная по данным NBS-профайлинга образцов яблони методом Neighbor-Joining (● – промышленные сорта яблони; △ – сорта группы Анисы; ▼ – сорта группы Бели; ◆ – сорта группы Боровинки; ■ – сорта группы Мамутовские; ◇ – сорта группы Скруты; ▲ – сорта группы Яндыковские).

лиза выделяют группу из 14 образцов сортотипа Яндыковские, которые занимают обособленное положение на графике главных координат, образуют отдельный кластер на дендрограмме и по данным анализа генетической структуры изученной выборки являются наиболее генетически отличными от остальных изученных образцов (рис. 1; 3,a; 4), что позволяет предположить наличие у данных образцов специфичного набора генов устойчивости. Кроме того, по результатам анализа можно выделить группы сортов Мамутовские, Мальты, Боровинки, Анисы, Скруты и Бели. При этом не все образцы одной группы сортов кластеризуются вместе (например, пять из семи образцов группы Боровинки), а в некоторых случаях сорта из одной группы формируют несколько кластеров (например, образцы группы Анисы) (рис. 1; 3, 6; 4), что может быть связано с особенностями формирования поволжских групп сортов и методами их отбора в коллекцию.

Сорта народной селекции Поволжья часто возникали в определенном населенном пункте (например, сорт Яндыковское происходит из села Яндыки Лиманского района Астраханской области) и размножались корневой порослью и отводками, а также путем посева семян, поэтому многие из них представляют собой большие сортовые семьи, возникшие от нескольких исходных форм, с разновидностями, характеризующимися значительным фенотипическим разнообразием [5]. При этом высокая фенотипическая изменчивость поволжских сортов отмечена как при территориальной удаленности, так и в пределах одного сада [5, 24], что могло повлиять на отбор образцов в коллекцию и затруднить достоверное отнесение сортообразцов к той или иной группе. Кроме того, при сборе коллекции и составлении каталогов исследователи опирались на оригинальные названия, которыми пользуется местное население при характеристике сорта. Поэтому сорта, относящиеся к одной группе по фенотипическим данным либо по оригинальному названию, по молекулярно-генетическим данным могут существенно различаться.

На формирование сортов яблони Поволжья, включая и разнообразие генов устойчивости, повлияли дикорастущие виды – яблоня Сиверса (*Malus sieversii* (Ledeb.) М. Roem.) и яблоня ранняя (*Malus praecox* (Pall.) Borkh. (=*Malus pumila* Mill.)). При этом главным прародителем поволжских сортов является яблоня Сиверса, завезенная из Средней Азии по торговым путям [24].

Дикорастущие виды яблони считаются наиболее перспективными источниками генов устойчивости к болезням и вредителям для селекции [23, 25]. Но вместе с ценными хозяйственными признаками при скрещивании с дикими видами потомству передаются и нежелательные признаки, что затрудняет работу селекционеров, в то время как сорта народной селекции прошли длительный отбор и имеют меньшее количество негативных признаков, которые проявляются при скрещиваниях и могут стать хорошим дополнением к диким видам в селекционных программах. Стародавние сорта яблони, как например Антоновка, успешно использовались отечественными и зарубежными селекционерами в качестве источников устойчивости к низким температурам, а также болезням и вредителям, в том числе к парше [26, 27]. Ранее, при исследовании полиморфизма генов устойчивости методом NBS-профайлинга у девяти образцов Антоновки были выявлены NBSпаттерны, отличные от остальных изученных 32 отечественных и зарубежных сортов яблони, что

ГЕНЕТИКА том 57 № 6 2021

свидетельствует о специфичности генов устойчивости образцов данного сортотипа [11]. В изученной коллекции ВОС сортообразцы групп Яндыковские и Мамутовские были наиболее дифференцированы от остальных образцов и, возможно, имеют специфичные гены устойчивости, что может быть связано с участием диких видов в формировании данных сортов.

Таким образом, впервые показан высокий уровень вариабельности NBS-LRR генов устойчивости сортов яблони народной селекции Поволжья из коллекции ВОС и их отличие от промышленных сортов яблони. Полученные данные свидетельствуют о специфичности NBS-LRR генов устойчивости сортов народной селекции Поволжья и подтверждают потенциал изученных сортов для селекции на устойчивость к болезням и вредителям.

Выявлена дифференциация образцов, относящихся к одному сортотипу (Яндыковские, Мамутовские, Боровинки, Бели, Скруты, Анисы), по-видимому связанная с особенностями формирования поволжских сортов и методами отбора образцов в коллекцию. Результаты исследования подтверждают эффективность использования современных молекулярно-генетических методов для изучения и управления генетическими ресурсными коллекциями.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 17-29-08020) и тем государственного задания № 0112-2019-0002 и 0662-2019-0004.

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. http://www.fao.org/cgrfa/topics/plants/ru/.
- Итоги Всероссийской сельскохозяйственной переписи 2016 года. Т. 4: Посевные площади сельскохозяйственных культур и площади многолетних насаждений и ягодных культур: кн. 1: Площади сельскохозяйственных культур и многолетних насаждений. Федеральная служба гос. статистики. М.: ИИЦ "Статистика России", 2018. 562 с.
- Шлявас А.В., Сиднин А.С., Багмет Л.В. и др. Каталог мировой коллекции ВИР. Выпуск 890. Яблоня: Сорта народной селекции, сохраняемые на Волгоградской опытной станции ВИР и в гербарии ВИР (WIR). СПб., 2019. С. 7–19. https://doi.org/10.30901/978-5-907145-09-2

- Пашкевич В.В. Плодоводство Астраханской губернии. СПб., 1911. 384 с.
- Малыченко В.В. Изменчивость местных сортов яблони в очагах формообразования // Тр. Волгоградской опытной станции ВИР. 1973. Вып. 7. С. 121– 134.
- 6. *Рылов Г.П., Стеркин И.В.* Путешествие за сортом. М.: Агропромиздат, 1987. 223 с.
- Bramel P., Volk G.M. A Global Strategy for the Conservation and Use of Apple Genetic Resources. Bonn, Germany: Global Crop Diversity Trust, 2019. 50 p. https://doi.org/10.13140/RG.2.2.34072.34562
- 8. *Perazzolli M., Malacarne G., Baldo A. et al.* Characterization of resistance gene analogues (RGAs) in apple (*Malus × domestica* Borkh.) and their evolutionary history of the Rosaceae family // PLoS One. 2014. V. 9. № 2. P. e83844.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083844

- Van der Linden C.G., Wouters D.C., Mihalka V. et al. Efficient targeting of plant disease resistance loci using NBS profiling // Theor. Appl. Genet. 2004. V. 109. № 2. P. 384–393. https://doi.org/10.1007/s00122-004-1642-8
- Calenge F, van der Linden C.G., van de Weg E. et al. Resistance gene analogues identified through the NBS-profiling method map close to major genes and QTL for disease resistance in apple // Theor. Appl. Genet. 2005. V. 110. № 4. P. 660–668. https://doi.org/10.1007/s00122-004-1891-6
- Савельева Е.Н., Борис К.В., Кочиева Е.З., Кудрявцев А.М. Полиморфизм NBS-LRR генов устойчивости сортов яблони (Malus domestica Borkh.) по данным NBS-профайлинга // Генетика. 2016. Т. 52. № 12. С. 1463–1468. https://doi.org/10.7868/S0016675816120110
- 12. Benbouza H., Jacquemin J.M., Baudoin J.P., Mergeai G. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels // BASE. 2006. V. 10. № 2. P. 77–81.
- Peakall R., Smouse P.E. GenALEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research an update // Bioinformatics. 2012. V. 28. № 19. P. 2537–2539. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460
- Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis // Paleontologia Electronica. 2001. V. 4. № 1. P. 1–9.
- 15. *Kumar S., Stecher G., Tamura K.* MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets // Mol. Biol. Evol. 2016. V. 33. № 7. P. 1870–1874.

https://doi.org/10.1093/molbev/msw054

- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data // Genetics. 2000. V. 155. № 2. P. 945–959.
- 17. *Earl D.A., von Holdt B.M.* STRUCTURE HARVEST-ER: a website and program for visualizing STRUCTURE

output and implementing the Evanno method // Conserv. Genet. Res. 2012. V. 4. № 2. P. 359–361. https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7

- Kopelman N.M., Mayzel J., Jakobsson M. et al. Clumpak: A program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K // Mol. Ecol. Res. 2015. V. 15. № 5. P. 1179–1191. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12387
- 19. Помология: в 5-ти томах. Т. 1. Яблоня / Под ред. Седова Е.Н.. Орел: ВНИИСПК, 2005. 576 с.
- 20. Шлявас А.В., Трифонова А.А., Дедова Л.В. и др. Генетическое разнообразие местных и стародавних сортов яблони (*Malus* × *domestica* Borkh.) из коллекции ВИР по данным AFLP-анализа // Генетика. 2019. Т. 55. № 11. С. 88–97. https://doi.org/10.1134/S0016675819110146
- Lassois L., Denance C., Ravon E. et al. Genetic diversity, population structure, parentage analysis, and construction of core collections in the French apple germplasm based on SSR markers // Plant Mol. Biol. Rep. 2016. V. 34. P. 827–844. https://doi.org/10.1007/s11105-015-0966-7
- Marconi G., Ferradini N., Russi L. et al. Genetic characterization of the apple germplasm collection in Central Italy: the value of local varieties // Frontiers in Plant Sci. 2018. V. 9. P. 1460. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01460
- 23. Volk G.M., Chao C.T., Norelli J. et al. The vulnerability of US apple (*Malus*) genetic resources // Genet. Resour. Crop Evol. 2015. V. 62. № 5. P. 765–794. https://doi.org/10.1007/s10722-014-0194-2
- Пономаренко В.В., Пономаренко К.В. Генофонд сортов яблони народной селекции национальное достояние России // Научн. тр. ГНУ СКЗНИИСиВ. 2013. Т. 1. С. 53–57.
- Pereira-Lorenzo S., Fischer M., Ramos-Cabrer A.M., Castro I. Apple (Malus spp.) breeding: present and future // Advances in Plant Breeding Strategies: Fruits. 2018. V. 3. P. 3–29. https://doi.org/10.1007/978-3-319-91944-7 1
- 26. Bus V.G.M., van de Weg W.E., Peil A. et al. The role of Schmidt's 'Antonovka' in apple scab resistance breeding // Tree Genet Genom. 2012. V. 8. № 4. P. 627–642. https://doi.org/10.1007/s11295-012-0470-2
- Pikunova A., Madduri M., Sedov E. et al. "Schmidt's Antonovka" is identical to "Common Antonovka", an apple cultivar widely used in Russia in breeding for biotic and abiotic stresses // Tree Genet Genom. 2014. V. 10. № 2. P. 261–271. https://doi.org/10.1007/s11295-013-0679-8

# Genetic Diversity of Old and Local Apple (*Malus* × *domestica* Borkh.) Cultivars of Volga Region from VIR Collection Inferred from NBS-Profiling

A. A. Trifonova<sup>a, \*</sup>, A. V. Shlyavas<sup>b</sup>, L. V. Dedova<sup>a</sup>, K. V. Boris<sup>a</sup>, and A. M. Kudryavtsev<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia <sup>b</sup>Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, Saint-Petersburg, 190000 Russia \*e-mail: aichka89@mail.ru

Intraspecific polymorphism of the NBS-LRR resistance genes sequences of 112 old and local apple cultivars of Volga region from the collection of the Volgograd experiment station of VIR and 16 commercial Russian and foreign apple cultivars using the NBS-profiling method was analyzed. The high NBS-LRR resistance genes variability of old and local apple cultivars from Volga region was shown (75.2%,  $H_e = 0.25 \pm 0.009$ ) and their differentiation from commercial cultivars was revealed. Groups of accessions of old and local cultivars of Volga region Yandykovskoe, Mamutovskoe, Borovinka, Bel' and Skrut were identified. It was shown that not all accessions from the same group of cultivars cluster together. Yandykovskoe and Mamutovskoe accessions were found to have NBS patterns that were different from the rest of the studied accessions, which may indicate that they have a specific set of resistance genes.

Keywords: apple, landraces, resistance genes, genetic resources, genetic diversity.

## ГЕНЕТИКА ЖИВОТНЫХ

УДК 576.316.32:599.323.4

# ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПОПУЛЯЦИЙ МЫШЕЙ Apodemus peninsulae СЕВЕРНОГО И ЮЖНОГО ПРИБАЙКАЛЬЯ ПО ДОБАВОЧНЫМ ХРОМОСОМАМ

© 2021 г. Ю. М. Борисов<sup>1</sup>, А. А. Калинин<sup>1</sup>, З. З. Борисова<sup>1</sup>, И. В. Крищук<sup>2</sup>, Б. И. Шефтель<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, 119071 Россия <sup>2</sup>Научно-производственный центр по биоресурсам, Национальная академия наук Беларуси, Минск, 220072 Беларусь \*e-mail: borissheftel@vahoo.com

Поступила в редакцию 15.05.2020 г. После доработки 25.12.2020 г. Принята к публикации 12.01.2021 г.

Проведено исследование кариологической изменчивости мышей *Apodemus peninsulae* в ряде новых пунктов Иркутской обл. и в Бурятии. Выявлены различия по вариантам систем макро- и микро-В-хромосом между мышами данного вида с территории Иркутской обл. и из Бурятии. Это позволило отнести их к разным популяциям со своей историей происхождения. Результаты работы подтверждают, что при цитогенетической дифференциации популяций *A. peninsulae* определяющее значение имеют вариации по числу микро-В-хромосом.

*Ключевые слова:* кариотип, добавочные хромосомы, *Apodemus peninsulae*, Республика Бурятия, Иркутская обл.

DOI: 10.31857/S0016675821060035

Первые сведения о добавочных хромосомах появились в начале XX в. В 1906 г. Е. Уильсоном [1] было открыто наличие в кариотипах насекомых "экстра хромосом". Позднее в исследовании на кукурузе был предложен термин "В-хромосомы" [2], чтобы отличить их от А-хромосом. В-хромосомы особенно хорошо и полно изучены у насекомых и растений.

В ранних обзорах зарубежных авторов даются подробные сведения о видовом разнообразии растений и животных (главным образом, беспозвоночных), несущих в кариотипах В-хромосомы [3–5]. С продолжением цитогенетических изучений число видов, имеющих дополнительные структуры, постоянно пополняется. К настоящему времени В-хромосомы описаны в большинстве таксонов эукариот.

У млекопитающих они отмечены у 85 видов. Одиннадцать видов из них показывают различия в размере и морфологии В-хромосом [6, 7]. В хромосомных наборах многих видов встречаются точечные (или микро) В-хромосомы с неясной морфологической структурой, поскольку они столь малы, что невозможно различить положение центромеры. Например они выявлены в кариотипах мышей *А. peninsulae* [8–10], лисиц *Vulpes vulpes* [11], крыс рода *Thomomys* [12]. У млекопитающих чаще всего отмечены мелкие и средние добавочные хромосомы. В зависимости от положения центромеры, по морфологии различают: мета-, субметацентрические и акроцентрические В-хромосомы.

У Perognatus baileyi выявлен сложный внутри-и межпопуляционный хромосомный полиморфизм [13]. В пяти исследованных популяциях этого вида диплоидное число хромосом изменялось в пределах 46-48, 46-49, 48-50, 49-54, 49-55 за счет непостоянного числа (1-10) мелких акро- и метацентрических В-хромосом и 1-2 средних субметацентрических В-хромосом. Межпопуляционный полиморфизм по В-хромосомам описан у американских хомячков Reithrodontomys megalotis [14, 15]. Число мелких В-хромосом у них варьирует от ноля до семи, и диплоидные числа соответственно изменяются от 42 до 49. Наименьшее число добавочных хромосом найдено в популяциях на юго-западе США, наибольшее – в Юте и прибрежных районах Калифорнии.

Большая часть видов млекопитающих с добавочными хромосомами принадлежит к отряду грызунов (Rodentia) — 55 видов. Например из 20-ти видов мышей рода *Ароdетиs* дополнительные В-хромосомы выявлены у шести видов [6, 7]. Одним из них является восточно-азиатская мышь *А. peninsulae*. Этот вид распространен на Алтае, в Сибири, Прибайкалье и Забайкалье, в Хабаровском крае, в Приморье, на о-вах Сахалин и Хоккайдо, на северо-востоке Казахстана, в Северной Монголии, в Корее, в Северо-Восточном и Центральном Китае до Цинхай-Тибетского плато на западе и провинции Юньнань на юге [16, 17].

В индивидуальных кариотипах большинства особей этого вида отмечены добавочные хромосомы, исключения редки [10]. Они имеют разные формы и количество: их число может доходить до 30 [10]. В настоящее время известно, что только у восточноазиатских мышей. обитающих на Сахалине и на о-ве Стенина (залив Петра Великого, Приморский край) в кариотипе нет В-хромосом [9], однако на о. Хоккайдо (Япония) В-хромосомы у восточно-азиатских мышей есть [8]. Наибольшее число В-хромосом (до 30) выявлено у зверьков этого вида, обитающих в Сибири [9, 10]. У этого вида найдено три типа изменчивости по В-хромосомам: межпопуляционной, межиндивидуальной и внутрииндивидуальной (мозаицизм). Эти положения обусловливают перспективность использования восточноазиатских мышей в качестве модельного объекта при исследовании феномена В-хромосом в кариотипах млекопитающих. Это может внести ясность в понимание природы, роли и происхождения этих загадочных элементов геномов эукариот [10, 18, 19].

Регион Байкала представляет собой уникальный научный полигон для исследований разнообразия, а также стабильности и изменчивости систем В-хромосом *Apodemus peninsulae* в различных эколого-географических провинциях Прибайкалья [20]. Ранее нами была изучена изменчивость макро- и микро-В-хромосом на южном побережье оз. Байкал и в Северной Монголии [20], но северная часть региона оставалась практически не изученной, особенно окрестности г. Северо-Байкальска (бассейн Верхней Ангары). Здесь наблюдаются значительные эколого-климатические отличия от южного побережья Байкала с его умеренным и влажным климатом [21].

Цель настоящей работы — анализ кариотипических особенностей и в первую очередь системы добавочных В-хромосом восточноазиатских мышей, обитающих в окрестностях оз. Байкал.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В 2016–2017 гг. были отловлены 68 восточноазиатских мышей в девяти пунктах Иркутской обл. и Республики Буртия. Номера пунктов указаны на карте (рис. 1). Отловы в основном проводились в 2017 г., а в окрестностях дер. Сарма (пункт 4) – в 2016 г. Семь пунктов отлова находятся на берегу оз. Байкал, а два пункта – в Иркутской обл., в долине р. Ангара, были удалены от него. Пункт №1 – окрестности пос. Илир Братского р-на Иркутской обл. (с.ш. 55°09'18", в.д. 100°35'34")

ГЕНЕТИКА том 57 № 6 2021

был расположен в 480 км от побережья Байкала, пункт №2 – окрестности пос. Барда, Эхирит-Булагатский р-н, Иркутская обл. (с.ш. 52°49'51' в.д. 104°24'33") находился в 90 км от Байкала. Три пункта были расположены на северном и северо-западном берегах Байкала: пункт №3 – окрестности пос. Душкачан, побережье Ангарского Сора, Северо-Байкальский р-н, Иркутская обл. (с.ш. 55°51'06", в.д. 109°40′58″); пункт №4 – дер. Сарма, Ольхонский р-н, Иркутская обл. (с.ш. 53°06'02", в.д. 106°50'09"); пункт №5 – пос. Голоустное (с.ш. 52°02'23", в.д. 105°24'37") и пос. Нижний Кочергат (с.ш. 52°08'15", в.д. 105°16'26") Иркутского р-на Иркутской обл. Четыре пункта были расположены на Южном Берегу Байкала: пункт №6 окрестности г. Байкальск, Иркутская обл. (с.ш. 51°31′02″, в.д. 104°09′22″), пункт №7 – Байкальск, Иркутская обл. окрестности пос. Танхой, Кабанский р-н, Республика Бурятия (с.ш. 51°33'16", в.д. 105°06'54"); пункт №8 – окрестности г. Бабушкин, Кабанский р-н, Республика Бурятия (с.ш. 51°43', в.д 105°52'); пункт №9 – окрестности пос. Истомино Кабанский р-н, Республика Бурятия (с.ш. 52°07'57", в.д. 106°17'45"). Количество экземпляров восточноазиатских мышей, отловленных в каждом пункте, приведено в табл. 1.

Хромосомные препараты готовили прямым методом из клеток костного мозга мышей с предварительным введением внутрибрюшинно 0.5 мл 0.04%-ного раствора колхицина [22]. Препараты делали также из клеток селезенки с применением технических приемов, предложенных Е.Ю. Крысановым с коллегами [23]. Для характеристики кариотипа каждого животного использовали анализ не менее, чем 20 метафазных пластинок. Работа с препаратами осуществлялась с помощью микроскопа "Leica D-500". Подсчет хромосом выполняли в программе LAS V3.8. При обработке материала собственных и литературных данных мы учитывали только вариант с модальным числом Вхромосом мышей, отловленных в различных пунктах Байкальского региона (табл. 1). В таблице приведены формулы вариантов системы В-хромосом (Bs) кариотипов изученных мышей Apode*mus peninsulae* Байкальского региона.

В настоящей работе нами использована система классификации В-хромосом и формула цифрового кодирования [10]. Для сопоставления индивидуальных характеристик набора В-хромосом мышей их разделяли по размерно-морфологическим классам и записывали для каждой особи в виде формулы цифрового кодирования (табл. 1). Таким образом было выделено пять классов В-хромосом по их размерам и морфологическим характеристикам. Согласно данной формуле: I класс – двуплечие крупные В-хромосомы, равные по размерам 1–8 парам А-хромосом; II класс – двуплечие В-хромосомы средних размеров, равные 9–16 парам А-хромосом; III класс – мелкие дву-



**Рис. 1.** Пункты отлова *Apodemus peninsulae* в Байкальском регионе. 1 – окрестности с. Илир, Братский р-н, Иркутская обл.; 2 – дер. Барда, Эхирит-Булагатский р-н, Иркутская обл.; 3 – окр. пос. Душкачан, Северо-Байкальский р-н, Бурятия; 4 – пос. Сарма, Ольхонский р-н, Иркутская обл.; 5 – окр. пос. Б. Голоустное и пос. Нижний Кочергат, Иркутская обл.; 6 – окр. г. Байкальск, Иркутская обл.; 7 – окр. пос. Танхой-Выдрино, Кабанский р-н, Бурятия; 8 – окр. г. Бабушкин, Кабанский р-н, Бурятия; 9 – окр. пос. Истомино, Кабанский р-н, Бурятия.

плечие В-хромосомы, равные 17–23 парам А-хромосом; IV класс – мелкие акроцентрические В-хромосомы, равные 17–23 парам А-хромосом; V класс – точечные (или микро) В-хромосомы с неясным положением центромеры, в несколько раз мельче самых мелких А-хромосом набора. В-хромосомы I–IV классов мы объединяли в группу макрохромосом, а В-хромосомы V класса вошли в группу микрохромосом.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У всех 68 особей *А. peninsulae* был определен основной стабильный набор А-хромосом данного

вида. Он представлен 23 парами акроцентрических аутосом и двумя половыми хромосомами: крупной акроцентрической Х-хромосомой и мелкой акроцентрической Y-хромосомой (рис. 2). Вариабельная часть кариотипа у этих мышей представлена 1-12 дополнительными В-хромосомами, среди них: 1-4 макрохромосом и 1-11 микрохромосом (табл. 1, рис. 2-4). Таким образом, кариотипы исследованных восточноазиатских мышей имеют от 55 до 62 хромосом. Кариотипы мышей, отловленных в двух пунктах, удаленных от оз. Байкал, объединяет отсутствие микрохромосом (класс V) и наличие отдельных особей с тремя большими

## ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПОПУЛЯЦИЙ МЫШЕЙ

	1	I (	/ 1 1	L	
№ пункта	№ особи	Пол	2 <i>n</i>	Bs	Формула Bs
1	1	ę	51	3	3.0.0.0.0
	2	ð	51	3	2.0.0.1.0
2	3	ð	51	3	3.0.2.1.0
	4	ę	51	3	0.0.1.2.0
	5	Ŷ	51	3	0.0.1.2.0
	6	Ŷ	54	6	0.0.2.1.0
	7	Ŷ	51	3	0.0.3.0.0
3	8	ð	50	2	0.0.2.0.0
	9	ð	49	1	1.0.0.0.0
	10	Ŷ	51	3	1.0.1.1.0
	11	ð	51	3	0.1.1.1.0
4	12	ð	50	2	2.0.0.0.0
	13	ð	49	1	1.0.0.0.0
	14	Ŷ	50	2	1.0.0.1.0
	15	Ŷ	50	2	1.0.0.1.0
	16	Ŷ	51	3	0.0.1.2.0
	17	Ŷ	51	3	0.0.1.2.0
5	18	ð	51	3	0.0.3.0.0
	19	ð	49	1	0.0.0.1.0
	20	ð	49	2	1.0.0.1.0
	21	Ŷ	50	2	0.0.0.2.0
	22	Ŷ	50	2	0.0.0.2.0
	23	ð	50	2	0.0.1.1.0
	24	Ŷ	50	2	0.0.0.2.0
6	25	Ŷ	53	5	0.2.0.0.3
	26	ð	54	6	0.1.0.0.5
	27	Ŷ	54	6	0.1.2.0.3
	28	Ŷ	54	6	0.2.0.0.4
	29	Ŷ	55	7	0.2.0.0.5
	30	Ŷ	56	8	0.1.0.0.7
	31	Ŷ	59	11	0.0.1.0.10
	32	ර	61	13	0.1.0.0.10
	33	Ŷ	60	12	0.0.0.0.12
	34	ð	60	12	0.1.1.0.10
	35	ð	60	12	0.2.1.0.9
	36	ð	61	13	0.1.1.0.11
	37	ð	55	7	0.2.0.0.5
	38	ð	57	9	0.0.2.0.7
	39	ð	58	10	0.1.1.0.8
	40	б 1	58	10	0.2.0.0.8
	41	ð	58	10	0.2.0.0.8
	42	ð	59	11	0.0.3.0.8
	43	¥ ,	59	11	0.0.3.0.8
	44	б С	59		0.1.2.0.8
	45	Ŷ	54	10	0.2.3.0.1
	40	Y Y	00	12	0.2.0.0.10

## Таблица 1. Формулы вариантов системы В-хромосом (Bs) Apodemus peninsulae Байкальского региона

№ пункта	№ особи	Пол	2 <i>n</i>	Bs	Формула Bs
7	47	ð	52	4	0.2.0.0.2
	48	ę	52	4	0.3.0.0.1
	49	Ŷ	57	9	0.2.0.0.7
	50	ð	58	10	0.2.0.0.8
	51	ð	54	6	0.0.1.0.5
	52	ð	57	9	0.0.1.0.8
	53	ð	58	10	0.0.1.0.9
	54	ð	58	10	1.0.1.1.7
	55	ę	59	11	0.0.2.0.9
8	56	Ŷ	53	5	0.1.1.0.3
	57	ę	54	6	0.2.0.0.4
	58	ð	55	7	0.0.1.0.6
	59	ð	57	9	0.2.1.0.6
	60	ę	59	11	0.0.0.11
	61	ę	59	11	0.0.1.0.10
	62	ę	59	11	0.1.0.0.10
	63	ę	60	12	0.1.0.0.11
	64	ę	60	12	0.2.0.0.10
9	65	ð	59	11	0.1.1.0.9
	66	ð	60	12	0.2.1.0.9
	67	ð	59	11	0.2.1.0.8
	68	б	54	6	0.0.1.0.5

#### Таблица 1. Окончание

Примечание. Локализацию мест сбора см. на рис. 1.

двуплечими В-хромосомами (класс I), такие особи не были встречены в пунктах, расположенных на берегу Байкала. В кариотипах зверьков, отловленных в пунктах, расположенных на северном и северо-западном берегах Байкала (№ 3–5), также не найдены микрохромосом (класс V), но у всех особей выявлено от одной до трех макрохромосом (I–IV классов). Таким образом, в кариотипах 24-х восточноазиатских мышей, отловленных к северу от Байкала, микро-В-хромосомы не встречены.

Напротив, в кариотипах всех 44-х особей, отловленных в четырех пунктах (№ 6–9) на южном берегу Байкала, отмечено от одной до двенадцати микрохромосом (V класс). Причем у подавляющего большинства (36 особей) найдено пять и больше таких В-хромосом (табл. 1). Кроме того, у всех этих особей, кроме одной, выявлены от одной до трех макро-В-хромосом всех классов.

Ранее нами [20] уже были описаны кариотипы 30 особей *А. peninsulae* из трех пунктов Южного Прибайкалья, из окрестностей г. Байкальск (1984, 1988 гг.), г. Танхой (2002, 2003 гг.) и г. Бабушкин (1984 г.). То есть исследования проводились в тех же самых пунктах, что и теперь (рис. 1, пункты 6–8). Все эти особи имели от 1–2 макрои до 10 микро-В-хромосом [20]. То есть, формула В-хромосом в одних и тех же пунктах, не смотря на значительный временной интервал между исследованиями принципиально не менялась. Это дает нам основание предполагать, что формула В-хромосом — это устойчивый признак, характеризующий географические популяции.

В настоящей работе мы выявили значительные отличия по вариантам системы В-хромосом у мышей A. peninsulae северного Прибайкалья и бассейна Ангары от мышей южного Забайкалья. Это позволяет отнести их к разным популяциям со своей историей происхождения. Популяция Южного Прибайкалья A. peninsulae сходна по своей структуре макро- и микро-В-хромосом с еще более южной популяцией бассейна Селенги (окрестности монастыря Амар-Хийд, Северная Монголия) [20]. А популяции Прибайкалья и бассейна Ангары, в которых выявлены только макро-В-хромосомы, сходны с популяцией A. peninsulae из окрестностей пос. Новоангарск на самом севере ее ареала, в 40 км от устья реки Ангары. Там также были выявлены от пяти до девяти двуплечих макро-Вхромосом, и среди 15 изученных мышей не было мышей с микро-В-хромосомами [10].

Ранее при изучении кариотипов восточноазиатских мышей из разных областей Сибири было обнаружено, что они отличаются по наборам



**Рис. 2.** Кариотип особи  $\mathbb{N}$  9 из пункта 3: a - 48 акроцентрических хромосом основного набора,  $\delta$  – крупная метацентрическая В-хромосома I класса.



**Рис. 3.** Кариотип особи  $\mathbb{N}$  8 из пункта 3: a - 48 акроцентрических хромосом основного набора,  $\delta - две мелкие мета$ центрические В-хромосомы III класса.

В-хромосом, это позволило высказать предположение, что системы макро и микро-В-хромосом могут являться интегрирующим и дифференцирующим признаком популяций мышей Сибири [10, 20]. Результаты данного исследования подтверждают, что В-хромосомы могут быть использованы как маркеры различных популяций восточноазиатской мыши. Определяющее значение имеет соотношение микро и макро-В-хромосом.

Авторы благодарны М.Ю. Борисову, Е.С. Гайдученко, Т.А. Мышлявкиной за помощь в отлове мышей *А. peninsulae* на южном побережье оз. Байкал. Благодарим А.Ю. Александрову за помощь в приготовлении хромосомных препаратов восточноазиатских мышей в ряде пунктов исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 16-08-1185.

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.



**Рис. 4.** Кариотип особи № 65 из пункта 9: a - 48 акроцентрических хромосом основного набора,  $\delta -$  одна средняя, одна мелкая метацентрические В-хромосомы III класса и девять микро-В-хромосом.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Wilson E.B.* Note on the chromosome-groups of metapodius and banasa // Biol. Bull. 1907. V. 12. № 5. P. 303–313.
- Randolph L.A. Types of supernumerary chromosomes in maize // Anatomical Record. 1928. V. 41. P. 102.
- Battaglia E. Cytogenetics of B-chromosomes // Caryologia. 1964. V. 17. № 1. P. 245–299.
- 4. Jones R.N., Rees H. B Chromosomes. L., N.Y., Paris: Acad Press, 1982. 266 p.
- 5. *Beukeboom L.W.* Bewildering Bs: An impression of the 1 B-chromosome conference // Heredity. 1994. V. 73. № 3. P. 328–335.
- Vujosevic M., Blagojević J. B-chromosomes in populations of mammals // Cytogenet. and Genome Res. 2004. V. 106. № 2–4. P. 247–256. https://doi.org/10.1159/000079253
- Vujošević M., Rajičić M., Blagojević J. B Chromosomes in populations of mammals revisited // Genes. 2018.
   V. 9. № 10. P. 487. https://doi.org/10.3390/genes9100487
- Hayata J. Chromosomal polymorphism caused by supernumerary chromosomes in field mouse, *Apodemus giliacus* // Chromosoma. 1973. V. 42. № 4. P. 403–414.
- Kartavtseva I.V., Roslik G.V. A complex B chromosome system in the Korean field mouse Apodemus peninsulae // Cytogenetic and Genome Res. 2004. V. 106. № 2–4. P. 271–278. https://doi.org/10.1159/000079298
- 10. *Borisov Y.M., Zhigarev I.A.* B Chromosome system in the korean field mouse *Apodemus peninsulae* Thomas 1907 (Rodentia, Muridae) // Genes. 2018. V. 9. № 10. P. 472.

https://doi.org/10.3390/genes9100472

- 11. Беляев Д.К., Волобуев В.Т., Раджабли С.И., Трут Л.Н. Полиморфизм и мозаицизм по добавочным хромосомам у серебристо-черных лисиц // Генетика. 1974. Т. 10. № 2. С. 58–67.
- 12. Patton J.L., Sherwood S.W. Genome evolution in pocket gophers (genus *Thomomys*). I. Heterochromatin vari-

ation and speciation potential // Chromosoma. 1982. V. 85. P. 149–162.

- Patton J.L. A complex system of chromosomal variation in the pocket mouse, *Perognathus baileyi* Merriam // Chromosoma. 1972. V. 36. № 3. P. 241–255.
- Shellhammer H.S. Chromosome polymorphism in California populations of harvest mice // J. Mammal. 1968. V. 49. № 4. P. 726–731.
- 15. Shellhammer H.S. Supernumerary chromosomes of the harvest mouse, *Reithrodontomys megalotis* // Chromosoma. 1969. V. 27. № 1. P. 102–108.
- Борисов Ю.М., Жигарев И.А., Шефтель Б.И. В-хромосомы восточноазиатских мышей (Apodemus peninsulae Thomas, 1907 (Rodentia, Muridae)) на восточных склонах Цинхай-Тибетского плато (КНР) // Генетика. 2020. Т. 56. № 10. С. 1184–1188. https://doi.org/10.31857/S0016675820090039
- Громов И.М., Ербаева М.А. Млекопитающие фауны России и сопредельных территорий. Зайцеобразные и грызуны. СПб: ЗИН РАН, 1995. 522 с.
- Trifonov V.A., Perelman P.L., Kawada S.I. et al. Complex structure of B-chromosomes in two mammalian species: Apodemus peninsulae (Rodentia) and Nyctereutes procyonoides (Carnivora) // Chromosome Res. 2002. V. 10. № 2. P. 109–116.
- Rubtsov N.B., Borisov Y.M. Sequence composition and evolution of mammalian B chromosomes // Genes. 2018. V. 9. № 10. P. 490–496. https://doi.org/doi:10.3390/genes9100490
- Борисов Ю.М., Шефтель Б.И., Сафронова Л.Д., Александров Д.Ю. Устойчивость популяционных систем В-хромосом восточноазиатской мыши Ароdemus peninsulae Прибайкалья и Северной Монголии // Генетика. 2012. Т. 48. № 10. С. 1190–1199.
- Климат и растительность Южного Прибайкалья // Сб. науч. трудов / Ред. Ладейщиков Н.П., Моложников В.Н. Новосибирск: Наука, сиб. отд., 1989. 151 с.
- Орлов В.Н. Кариосистематика млекопитающих. Цитогенетические методы в систематике млекопитающих. М.: Наука, 1974. 208 с.

23. Крысанов Е.Ю., Демидова Т.Б., Шефтель Б.И. Простой метод приготовления препаратов хромосом

мелких млекопитающих // Зоол. журн. 2009. Т. 88. № 2. С. 234–238.

# Kariological Differentiation of Mice *Apodemus peninsulae* North and South Pribaikal by Additional Chromosomes

## Yu. M. Borisov<sup>a</sup>, A. A. Kalinin<sup>a</sup>, Z. Z. Borisova<sup>a</sup>, I. V. Krischuk<sup>b</sup>, and B. I. Sheftel<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup>Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia <sup>b</sup>Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus on Bioresources, Minsk, 220072 Belarus \*e-mail: boriss-spb@yandex.ru

A study of the karyological variability of *Apodemus peninsulae* mice in populations of the Baikal region was carried out for the first time. Significant differences were revealed in the macro and micro additional chromosomes of the mice of *A. peninsulae* in the northern and southern Baikal regions according to the variants of the B-chromosome system. What this allowed to refer them to different populations with their own history of origin. The results of the work confirm that, of decisive importance.

Keywords: karyotype, accessory chromosomes, Apodemus peninsulae, Baikal region.

## ГЕНЕТИКА ЖИВОТНЫХ

УДК 575.17:597.553.1

# ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ТИХООКЕАНСКОЙ СЕЛЬДИ Clupea pallasii Vallenciennes, 1847 НА МАКРОГЕОГРАФИЧЕСКОЙ ШКАЛЕ

© 2021 г. А. В. Семенова<sup>1, 2, \*</sup>, А. Н. Строганов<sup>1</sup>, Г. А. Рубцова<sup>2</sup>, М. О. Рыбаков<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия <sup>2</sup>Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия <sup>3</sup>Полярный филиал Всероссийского научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии им. Н.М. Книповича, Мурманск, 183038 Россия

> \*e-mail: seman2000@yandex.ru Поступила в редакцию 27.06.2020 г. После доработки 11.08.2020 г. Принята к публикации 10.09.2020 г.

С использованием десяти микросателлитных локусов проведен анализ генетической изменчивости и дифференциации тихоокеанской сельди *Clupea pallasii* на широком ареале в Охотском, Беринговом, Чукотском, Карском, Баренцевом и Белом морях. Показан сходный уровень генетической изменчивости сельди, принадлежащей к трем географическим подвидам. Генетическая структура на макрогеографической шкале наиболее выражена между тремя географическими подвидами сельди, при этом уровень генетической дифференциации в пределах каждого из подвидов различается. Сельдь тихоокеанского ареала дифференцирована только на уровне крупных бассейнов – Охотского и Берингова морей, что свидетельствует о значительном обмене генами, так же как и в юго-восточной части Баренцева моря и в Карском море. В то же время поток генов у сельди Белого моря ограничен на очень небольшой пространственной шкале.

*Ключевые слова:* внутривидовая структура, генетическая изменчивость, тихоокеанская сельдь, *Clupea pallasii*, Охотское море, Берингово море, Белое море.

DOI: 10.31857/S0016675821060096

Тихоокеанская сельдь Clupea pallasii Valenciennes, 1847 — пелагическая морская рыба прибрежных вод и окраинных морей Северной Пацифики и Арктики имеет прерывистый ареал. Номинативный подвид C. p. pallasii широко распространен в бореальных акваториях азиатского и американского побережий Тихого океана, два других подвида населяют воды Европейского Севера вдоль Арктического побережья Северного Ледовитого океана: С. p. marisalbi обитает во внутренних районах Белого моря, а *С. р. suworowi* – во внешних районах Белого моря и далее на восток вдоль побережья в Чешско-Печорском районе Баренцева моря и Карском море. Небольшие популяции сельди отмечены также в море Лаптевых и Восточно-Сибирском [1, 2].

На ареале сельдь формирует популяции, различающиеся биологическими, морфологическими и экологическими особенностями, районами нереста, нагула и зимовки, продолжительностью миграций [3–5]. В Тихом океане выделяют три экологические формы сельди – морскую, прибрежную и озерно-лагунную [4]. По мнению некоторых авторов наиболее обосновано выделение двух форм, основными различиями между которыми являются места и условия зимовки: морской и прибрежной, при этом к прибрежной относят популяции лагунной (озерной) сельди [6]. Сельдь Арктического побережья можно отнести к прибрежной экологической форме, она дифференцирована на локальные стада, приуроченные к отдельным заливам [3, 7–9]. Нерест сельди происходит во время гидрологической весны, его календарные сроки изменяются с февраля на южных окраинах ареала до июня—июля в северных районах и вплоть до августа—сентября в морях Арктики. Кроме того, только в Белом море обитают группировки летненерестующей сельди [1, 3, 5].

Генетические исследования показали единство происхождения сельди азиатского побережья Тихого океана и Европейского Севера, которые относятся к одной митохондриальной гаплогруппе [10, 11]. Дивергенция тихоокеанского и европейских подвидов произошла сравнительно недавно в геологической шкале исчисления — после окончания ледниковой эпохи (не ранее 12 тыс. лет назад) [10, 12, 13]. У европейских популяций сельди показана сильная редукция генетической из-
менчивости по локусам мтДНК, которая отражает эффект основателя во время постледниковой колонизации [10]. Исследование популяционно-генетической структуры сельди по ядерным маркерам проводилось на отдельных участках ее ареала в морях Европейского Севера [14–16], в Японском, Охотском и Беринговом морях [17–20].

Цель данной работы — сравнительный анализ генетической изменчивости и дифференциации сельди на широком ареале, включающем популяции сельди из Белого, юго-восточной части Баренцева, Карского, Чукотского, Берингова и Охотского морей. Учитывая относительно небольшое эволюционное время с начала послеледниковой колонизации сельди ее современных местообитаний, использование микросателлитных маркеров (SSR) может быть наиболее эффективным по сравнению с другими типами молекулярных маркеров для анализа современных механизмов возникновения и поддержания наблюдаемой популяционно-генетической структуры сельди на различной пространственной шкале [21, 22].

# МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для анализа послужили более 40 выборок сельди (1327 экз.), которые были собраны в 2000–2019 гг. на европейской части Арктики – в Белом (C. p. marisalbi), юго-восточной части Баренцева (Чешско-Печорский район) и Карском морях (С. р. suworowi), а также в районах северовостока России - северной части Охотского, западной части Берингова и юго-западной части Чукотского морей (*C. p. pallasii*). Большинство выборок в Белом, Баренцевом и Охотском морях собраны во время нереста сельди, сборы в Карском, Чукотском и Беринговом морях представляют собой нагульные скопления. Информация о выборках 2000-2018 гг. была опубликована нами ранее, в этих работах приведены методы исследования и данные изменчивости SSR-локусов [15-18, 23]. Дополнительно использованы результаты изучения выборок, собранных в 2019 г. в Чукотском море, двух локальностях Карского и Берингова морей. Для статистического анализа выборки сельди разных лет сбора из одного района, а также соседних локальностей были объединены, если генетические различия между ними недостоверны, в итоге в анализ были включены 20 объединенных выборок (табл. 1, рис. 1).

Стандартные оценки генетического разнообразия и дифференциации ( $F_{ST}$  ( $\theta$ ) и  $R_{ST}$ ) были получены с использованием программ GDA, FSTAT, GENEPOP [24–26]. Гипотеза об отсутствии вклада пошагового мутационного процесса (SMM) в формирование генетической дифференциации сельди, т.е.  $F_{ST} = R_{ST}$ , была проверена в программе SPAGeDi [27]. Уровень статистиче-

ГЕНЕТИКА том 57 № 6 2021

ской значимости для множественных вероятностных тестов корректировали с помощью процедуры Бонферрони [28]. Значимость корреляции генетических  $F_{ST}/(1 - F_{ST})$  и географических дистанций между группировками проверяли с помощью теста Мантела в программе IBD [29]. Анализ популяционной структуры проводился методом Байеса в программе STRUCTURE [30]. Для определения наиболее вероятного числа кластеров был применен метод  $\Delta K$  [31] с использованием Интернет-ресурса STRUCTURE HARVESTER [32], а также рассчитаны оценки MedMeaK, MaxMeaK, Med-MedK и MaxMedK [33] в программе STRUCTURE SELECTOR [34].

Иерархический анализ молекулярных варианс (AMOVA) в программе ARLEQUIN [35] был проведен для оценки количества генетической изменчивости на следующих уровнях иерархии: 1) между морскими бассейнами (Белое море, Чешско-Печорский район Баренцева моря, Карское, Чукотское, Берингово и Охотское моря), между выборками в каждом из морей и внутри выборок; 2) между тремя подвидами сельди, между выборками в пределах каждого подвида и внутри выборок; 3) между кластерами, определенными в STRUCTURE, между выборками в пределах каждого кластера и внутри выборок.

Для выявления прохождения популяциями фазы низкой численности ("горлышка бутылки") использовали тест Уилкоксона для трех различных моделей: бесконечного числа аллелей (IAM), пошаговой мутационной (SMM) и двухфазной (TPM) в программе BOTTLENECK [36]. Также был рассчитан индекс *M* [37], выборки со средним значением *M* менее 0.68 полагали прошедшими этап редукции численности. Оценки современного эффективного размера популяций (*N*е) вычислены в программе LDNE [38].

# РЕЗУЛЬТАТЫ

#### Генетическое разнообразие в выборках сельди

Среднее число аллелей (A) в выборках сельди изменялось от 5.4 до 10.5 (табл. 1). Приватных аллелей, частота которых превышала бы пороговое значение p = 0.05, не обнаружено ни в выборках, ни у каждого из трех подвидов. Однофакторный дисперсионный анализ не выявил достоверных различий между выборками ни по  $H_{\rm E}$ , ни по  $A_{\rm R}$ . Среди подвидов наименьшие значения генетического разнообразия обнаружены у сельди *С. р. suworowi* (табл. 1), однако эти различия статистически недостоверны (p > 0.05).

	Код выборки	Район сбора	Локальности	Годы сбора	Ν	V	$A_{ m R}$	$H_{\mathrm{E}}$	$H_{\rm O}$
		Clupea pal	lasii marisalbi		625	11	5.95	0.547	0.556
	WKku	Белое море, Кандалакшский залив	г. Колвица, г. Жемчужная	2002	42	6.1	5.1	0.504	0.655
	WKgs	Белое море, Кандалакшский залив	г. Ругозерская	2000-2017	158	9.0	5.9	0.523	0.502
	WKch	Белое море, Кандалакшский залив	г. Чупа	2001-2013	188	9.6	6.3	0.556	0.559
	WOso	Белое море, Онежский залив	г. Сорокская	2000-2001	60	7.7	5.9	0.521	0.500
	WOku	Белое море, Онежский залив	г. Нюхча, о. Кий, г. Онега	2001-2006	68	8.4	6.9	0.580	0.611
	WOsl	Белое море, Онежский залив	Соловецкие острова	2007	58	9.9	5.5	0.519	0.501
	WDya	Белое море, Двинской залив	г. Яндовая	2002	51	5.4	4.6	0.518	0.610
		Clupea pal	llasii suworowi		211	8.85	5.27	0.482	0.497
	BChe	Баренцево море	г. Чешская	2002	73	7.0	4.9	0.482	0.559
	BPec	Печорское море	г. Горносталья, г. Печорская, о. Вайгач	2002, 2008	61	8.0	5.5	0.491	0.503
	KArs	Карское море	г. Карская, Центральная часть, г. Байдарацкая	2008, 2019	77	7.3	5.3	0.470	0.438
		Clupea pa	illasii pallasii		491	11.5	6.09	0.569	0.568
	CHko	Чукотское море	Юго-западная часть (69°03' N, 170°37' W)	2019	55	8.6	6.4	0.563	0.541
	BZb1	Берингово море	Западно-беринговоморская пром. подзона (ЗБПП) (59°42' N, 170°20' E)	2013	48	9.0	6.5	0.561	0.544
гец	BZb2	Берингово море	ЗБПП (61°09′ N, 179°29′ W)	2014	23	5.7	4.9	0.495	0.588
гти	BZb3	Берингово море	ЗБПП (62°15′ N, 179°12′ W)	2014	34	6.2	5.0	0.527	0.629
КЛ	BZb4	Берингово море	ЗБПП (61°47' N, 179°02' E)	2019	50	7.8	6.0	0.542	0.539
то	BOlu	Берингово море	Олюторский залив	2013	48	8.3	6.4	0.557	0.538
M 57	BKar	Берингово море	Карагинский залив	2019	48	8.7	6.3	0.559	0.530
N	OHct	Охотское море	Центральная часть (57°00' N, 150°17' E)	2014	50	9.0	6.3	0.561	0.516
No 6	OHgz	Охотское море	г. Гижигинская	2011	24	7.6	9.9	0.586	0.607
20	OHtt	Охотское море	г. Тауйская, бухта Тунгусская	2009, 2011	111	10.5	6.8	0.600	0.629
21	Примечан Н <sub>О</sub> – набл	ие. г. – губа. <i>N</i> – объем выборки; <i>А</i> – числ юдаемая гетерозиготность.	10 аллелей; А <sub>R</sub> – аллельное разнообразие, скорректиров	анное на размеј	р выборк	лı; H <sub>E</sub> – о	жидаемая	і гетерози	OTHOCTE;

684

Таблица 1. Характеристики исследованного материала

# СЕМЕНОВА и др.



Рис. 1. Карта сбора выборок, обозначения как в табл. 1. *а* – Арктический ареал, *б* – Тихоокеанский ареал.



Рис. 2. Кластерный анализ сельди в программе STRUCTURE, K = 6.

# Анализ прохождения популяциями фазы редукции численности

Тестирование в программе ВОТТLENECK не выявило редукции численности в демографической истории сельди в недавнем прошлом ни по одной из мутационных моделей (0.148 < P < 1.000). Оценки показателя M в выборках варьируют от 0.662 до 0.833. Для трех выборок: WOsl, WDya и KArs значения показателя M были менее 0.68, что свидетельствует о прохождении популяциями этапа "горлышка бутылки".

## Генетическая дифференциация сельди на ареале

Общая оценка генетической дифференциации была достоверна  $F_{\rm ST} = 0.041$  с 95%-ным доверительным бутстреп-интервалом [0.031–0.056]. Индивидуальные локус-специфичные оценки изменялись от 0.027 (*Cha1059*, *Cha1020*) до 0.079 (*Her71*) и были достоверны для каждого локуса. Глобальная дифференциация на основании  $R_{\rm ST} = 0.047$  [0.016–0.057] также была достоверна, как и оценки для каждого локуса. Достоверно значимых различий  $F_{\rm ST}$  и  $R_{\rm ST}$  при анализе всей совокупности выборок не выявлено ( $R_{\rm ST} > F_{\rm ST}$ , p = 0.113). В связи с этим в дальнейшем для оценки дифференциации были использованы только F-статистики.

В пределах каждого из подвидов генетическая дифференциация была статистически значима и составила у *C. p. marisalbi*  $F_{\rm ST} = 0.022$  [0.013-0.037], *C. p. suworowi*  $F_{\rm ST} = 0.006$  [0.0007-0.013] и *C. p. pallasii*  $F_{\rm ST} = 0.011$  [0.007-0.016].

Попарные оценки  $F_{ST}$  были достоверны в 157 случаях из 190 сравнений, с мультилокусными показателями от 0.00 до 0.115 (табл. 2). Все различия между выборками разных подвидов статистически значимы. Отсутствие дифференциации показано у сельди Чешско-Печорского района и Карского моря, у сельди Охотского моря, между большинством выборок в Чукотском и Беринговом морях, за исключением двух проб (BZb2 и BZb3), а также в пяти случаях из 21 в Белом море.

Результаты кластеризации в программе STRUCTURE показывают наиболее вероятное число кластеров K = 6 по оценкам MedMeaK,

МахМеаК, MedMedK и MaxMedK, а также LnP(K) (рис. 2). Большинство индивидуальных генотипов демонстрируют смешение между кластерами, но в целом шесть выявленных кластеров сформированы выборками: 1) WKch; 2) WKgs, WOsl, WOso; 3) WKku, WOku, WDya; 4) BChe, BPec, KArs; 5) CHko, BZb1–4, BKar; 6) BOlu, OHct, OHgz, OHtt. При этом максимальное значение  $\Delta K$  выявлено при кластеризации только на две группы: тихоокеанской *С. р. pallasii* и европейской *С. р. marisalbi* и *С. р. suworowi* сельди.

Иерархический анализ АМОVА показал сходные тренды в изменении значений F<sub>ST</sub> и их компонентов на разных уровнях иерархии при выделении разного числа групп (табл. 3). Основная доля генетического разнообразия сельди заключена внутри выборок (94.69-95.64%). В зависимости от варианта анализа значения F<sub>ST</sub> варьируют от 0.045 до 0.053, наибольшее значение показано при анализе подразделенности сельди на три подвида. Среди трех вариантов наиболее предпочтительным оказывается вариант, предполагающий выделение шести кластеров, поскольку на различия между выборками внутри кластеров приходится минимальная доля генетической изменчивости. Результаты двух других анализов, предполагающих дифференциацию в соответствии с географической локализацией или кластеризацией, очень сходны между собой. Все полученные значения *F*-статистик достоверны (p = 0.000).

Анализ на наличие изоляции, связанной с расстоянием, показал, что корреляция между географическими расстояниями и генетической дифференциацией сельди достоверна для всей совокупности выборок (*p* < 0.001). Однако бо́льшая часть этой корреляции обусловлена различиями между региональными группами - тихоокеанской и европейской, поскольку как в пределах тихоокеанского ареала, так и в пределах европейского ареала генетические различия между популяциями не связаны с расстояниями между ними. Не проявляется изоляция дистанцией и при анализе на меньшей географической шкале – в пределах каждого из морей. Проведение лог-трансформации генетических и/или географических дистанций не изменяет полученных результатов.

Ta6	блица 2.	. Оцен	ки поп	арной 1	нитенетич	еской д	иффере	нциаци	и $F_{\rm ST}$											
ГЕНЕ	N	/Kku	WKgs	WKch	WOso	WOku	WOsl	WDya	BChe	BPec	KArs	CHko	BZb1	BZb2	BZb3	BZb4	BOlu	BKar	OHct	OHgz
Š гика	kgs 0.	.033	I																	
Ň	Kch 0	.010	0.017	I																
× 57	Oso 0.	.040	0.005	0.021	Ι															
SW ₩	Dku 0	.013	0.019	0.005	0.014	I														
Э м 6 2	Osl 0.	.068	0.017	0.044	0.014	0.039	I													
IM 2021	Dya 0	.018	0.041	0.029	0.055	0.022	0.073	I												
BC	the <b>0</b> .	.075	0.059	0.039	0.065	0.046	0.087	0.084	I											
BP	ec 0.	.061	0.048	0.031	0.046	0.031	0.071	0.074	0.007	I										
KA	urs 0.	.072	0.062	0.039	0.059	0.042	0.085	0.086	0.009	0.003	I									
CH	Iko 0.	.053	0.066	0.033	0.071	0.031	0.097	0.067	0.048	0.041	0.041	Ι								
ΒZ	b1 0.	.049	0.057	0.026	0.065	0.026	0.091	0.056	0.047	0.039	0.040	0.000	I							
ΒZ	b2 0.	.046	0.062	0.038	0.066	0.033	0.089	0.059	0.083	0.061	0.067	0.013	0.018	Ι						
ΒZ	b3 0.	.057	0.065	0.044	0.076	0.039	0.092	0.060	0.072	0.071	0.071	0.014	0.016	0.019	Ι					
ΒZ	b4 <b>0</b> .	.072	0.077	0.043	0.081	0.041	0.108	0.087	0.050	0.043	0.042	0.000	0.001	0.020	0.022	I				
BO	olu 0.	.072	0.082	0.043	0.087	0.044	0.115	0.086	0.061	0.051	0.049	0.002	0.003	0.027	0.025	0.002	I			
BK	ar 0.	.060	0.074	0.037	0.079	0.036	0.107	0.072	0.046	0.038	0.041	0.000	0.001	0.019	0.019	0.000	0.002	I		
OF	Ict 0.	.046	0.049	0.027	0.059	0.026	0.078	0.051	0.044	0.044	0.052	0.005	0.007	0.015	0.006	0.010	0.014	0.006	Ι	
OF	Igz 0.	.039	0.030	0.013	0.035	0.011	0.057	0.054	0.040	0.024	0.048	0.016	0.015	0.029	0.032	0.024	0.029	0.019	0.005	Ι
OF	Itt 0.	.066	0.058	0.035	0.062	0.034	0.079	0.076	0.046	0.046	0.055	0.012	0.014	0.038	0.023	0.014	0.013	0.015	0.004	0.012
Πn	лмечани	те Поп		purin m	TOM BELT	יב וחשתפו	винельг	ודסגודפדי		TITAMETE	после пт	пепеми	eddoy Br	- India Eo	nonnehn					

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ТИХООКЕАНСКОЙ СЕЛЬДИ Clupea pallasii Vallenciennes

Уровень иерархии	Вероятность	Доля дисперсии, %	F <sub>ST</sub>
Выборки сгруппированы сог	ласно принадлежнос	ги к морским бассейн	ам
Между группами	3.39	0.000	0.034
Между популяциями внутри групп	1.48	0.000	0.015
В пределах популяций	95.12	0.000	0.048
Выборки сгруппированы в соотве	тствии с таксономиче	ским статусом (по по,	двидам)
Между группами	3.76	0.000	0.037
Между популяциями внутри групп	1.53	0.000	0.016
В пределах популяций	94.69	0.000	0.053
Выборки сгруппированы в с	оответствии с анализо	ом STRUCTURE ( $K =$	6)
Между группами	3.52	0.000	0.035
Между популяциями внутри групп	0.92	0.000	0.009
В пределах популяций	95.64	0.000	0.045

**Таблица 3.** Иерархический анализ молекулярных варианс (AMOVA) в выборках тихоокеанской сельди *Clupea pallasii* 

UPGMA-дендрограмма, построенная на основании генетических дистанций Нея, отражает региональную генетическую дифференциацию с четкими границами между сельдью трех географических подвидов (рис. 3). Наиболее обособлена клада сельди Белого моря, при этом в ее пределах кластеризация выборок не соответствует их географическому положению. Расположение выборок тихоокеанской клады в целом следует географическому принципу, несколько обособленное положение занимают две выборки западноберинговоморской промысловой подзоны (BZb2 и BZb3), однако уровень бутстреп-поддержки такой дифференциации невелик и составляет 50%.

### Оценка эффективного размера популяций

Оценки современной эффективной численности были не очень точные, поскольку в большинстве случаев, за исключением двух выборок, верхняя граница 95%-ного доверительного интервала, СІ, была определена как бесконечность, и многие оценки *Ne* имели отрицательные значения, что можно интерпретировать как бесконечно большую эффективную численность [38]. В целом можно отметить, что все выборки тихоокеанского ареала имели отрицательные оценки Ne, т.е. эффективная численность популяций сельди приближается к бесконечно большим значениям. тогда как Ne y C. p. suworowi колебалась от 125 до 1073. Среди беломорской сельди наименьшие значения показаны для выборок Соловецких островов (Ne = 60, 95% CI (32.8 - 167.2)), кута Онежского залива (Ne = 108, 95% CI (64.4-255.5)) и кута Кандалакшского залива (Ne = 139), все остальные беломорские выборки имели очень большую эффективную численность.

# ОБСУЖДЕНИЕ

# Генетическое разнообразие в популяциях сельди и "горлышко бутылки"

Целый ряд исследований молекулярной изменчивости демонстрируют значительное влияние послеледниковой колонизации на уровень генетического разнообразия современных популяций рыб [39, 40]. В процессе освоения новых местообитаний эффективная численность популяции часто снижается, что в результате "горлышка бутылки" и эффекта основателя приводит к значительной потере генетического разнообразия. В дальнейшем исторически обусловленные паттерны модифицируются в результате индивидуальных адаптаций видов под действием условий окружающей среды, формируя наблюдаемые уровни генетического разнообразия и дифференциации [41–44].

Полагают, что современные популяции сельди Северо-Западной Пацифики распространились в Голоцене из небольшой рефугиальной популяции из южной части Охотского и Японского морей, о чем свидетельствует их принадлежность к единой линии мтДНК, а также невысокий уровень генетической изменчивости по аллозимным и SSR локусам [10, 11, 45, 46]. После открытия Берингова пролива сельди азиатской части Тихого океана проникли в моря Европейского Севера вдоль побережья Арктики, лишь небольшое число индивидуумов (0.05–1% от исходной популяции) достигли Белого моря и даже фиордов Северной Норвегии, что подтверждается распределением гаплотипов и значительным снижением генетической изменчивости мтДНК у европейских популяций C. pallasii [10, 12, 13, 47].

Проведенное нами тестирование на прохождение популяциями "горлышка бутылки" в про-



**Рис. 3.** UPGMA-дендрограмма, построенная на основании генетических дистанций Нея. В узлах ветвления указаны индексы бутстреп-поддержки более 60%, 100 итераций.

грамме BOTTLENECK не показало возможности такого события ни в одной из выборок сельди, а по индексу *M* снижение эффективной численности выявлено в трех популяциях из Белого и Карского морей. Следует отметить, что микросателлиты менее "чувствительны" к событиям редукции численности, поскольку популяции теряют значительно больше генетической изменчивости по митохондриальным генам по сравнению с ядерными [48]. Кроме того, тесты в программе BOTTLENECK позволяют выявить уменьшение размеров популяции в недавнем прошлом, от нескольких десятков поколений, в то время как *M*-индекс может отслеживать эффект редукции численности и спустя 500 поколений [37, 49, 50].

ГЕНЕТИКА том 57 № 6 2021

Предполагая длину поколения сельди в среднем 3–4 года, очевидно, что выявленное снижение численности в отдельных популяциях сельди могло произойти около 1500–2000 лет назад, что значительно позже предполагаемых колонизационных событий. По-видимому, это снижение численности является отражением периодических похолоданий, происходящих в Северной Атлантике с периодичностью 1470 ± 500 лет, так называемых циклов Бонда [51].

Результаты нашего исследования подтверждают, что современные факторы могут сильно изменять исторически обусловленную пространственную структуру генетического разнообразия видов. В настоящее время только популяции *С. р. suworowi* демонстрируют некоторое снижение генетической изменчивости, в то время как беломорские *С. р. marisalbi* практически не отличаются по оценкам  $A_{\rm R}$  и  $H_{\rm E}$  от тихоокеанской сельди *С. р. pallasii* на основном ареале (табл. 1).

Более низкие оценки генетического разнообразия у чешско-печорской сельди по сравнению с тихоокеанской представляются закономерными даже без учета демографической истории, поскольку популяции С. р. suworowi характеризуются низкой эффективной численностью, вероятно вследствие пространственной ограниченности и периферийного положения их ареала. Сочетание этих факторов в суровых и нестабильных климатических условиях, которые существуют в настоящее время в морях Арктического побережья, может приводить к периодическим колебаниям популяционной численности, потере генетического разнообразия вследствие стохастических процессов [46, 52, 53]. Было установлено, например, что С. p. pallasii северо-восточной части Тихого океана, распространенные южнее, характеризуются более высокими оценками генетического разнообразия по сравнению с более северными. Также сельди Северо-Западной Пацифики имеют более низкие показатели изменчивости, как по SSR-локусам, так и по мтДНК, по сравнению с сельдью Северо-Восточной Пацифики, что объясняют большим диапазоном климатических колебаний [46, 54].

Относительно небольшую численность имеют сельди Белого моря, по сравнению с многомиллионными популяциями в Тихом океане [4], однако оценки генетического разнообразия на беломорском ареале сравнимы с таковыми на тихоокеанском (табл. 1). Одной из причин формирования значительной генетической изменчивости беломорской сельди может быть пространственное разнообразие условий окружающей среды в Белом море, наличие полуизолированных заливов и открытых участков моря, значительно различающихся по физическим и климатическим свойствам, системам течений, солености и др. [55].

Известно, что разнообразие биотопов способствует поддержанию высокого уровня генетического разнообразия видов [56]. Кроме того, отмечена гибридизация сельди С. р. marisalbi Европейского Севера с атлантической сельдью, C. harengus, многочисленной в морях Атлантического океана [57-59]. Интрогрессивная гибридизация является существенным фактором увеличения генотипической и фенотипической изменчивости таксонов и потенциальным источником адаптивной эволюции [60, 61]. По аллозимным, SSR и мтДНК маркерам был установлен неравный уровень интрогрессии генов атлантической сельди в популяции C. p. marisalbi и C. p. suworowi, как в историческом прошлом, так и в настоящее время. По мтДНК следов исторической гибридизации у Чешско-Печорской сельди не выявлено, но по аллозимным и SSR-локусам показана интрогрессия у сельди Чешско-Печорского района (но не у сельди Карского моря) и в настоящее время. Однако наибольший уровень гибридизации отмечен у летненерестующей сельди Белого моря [57-59].

## Популяционная структура сельди на ареале

Анализ изменчивости SSR-локусов демонстрирует иерархическую генетическую структурированность сельди на ареале, наиболее выраженную между тремя подвидами (табл. 3, рис. 3). F<sub>ST</sub>-дифференциация между С. p. marisalbi и С. p. suworowi coставляет 0.041 [0.008-0.076], между С. р. marisalbi и С. р. pallasii 0.040 [0.025-0.062] и между С. р. suworowi и C. p. pallasii 0.039 [0.018-0.060]. Генетическая лифференциация на уровне подвидов показана и по мтДНК [10]. В пределах беломорского и тихоокеанского подвидов сельди генетически неоднородны, при этом показатели дифференциации *С. р. marisalbi* почти в 2 раза превышают таковые у С. р. pallasii (табл. 2). По данным байесовской статистики все исследованные популяции сельди на ареале группируются как минимум в шесть кластеров, три из которых выделяются в Белом море и два в бассейне Тихого океана. В пределах некоторых из выделенных кластеров поток генов между популяциями ограничен, о чем свидетельствуют достоверные генетические различия между выборками из одного кластера (табл. 2).

Генетическая дифференциация сельди на макрогеографической шкале соответствует изоляции расстоянием. Однако уже в пределах областей обитания подвидов такая корреляция не наблюдается. Скорее всего, изоляция дистанцией на всем ареале не отражает равновесие миграций и дрейфа [62, 63], а связана с ограниченным потоком генов между изолированными популяциями арктического побережья и Тихого океана [64–66]. Для *С. р. pallasii* отсутствие изоляции расстоянием не значит полного отсутствия географической структурированности, поскольку два кластера STRUCTURE в значительной мере сформированы сельдью Охотского моря, с одной стороны, и Берингова и Чукотского моря, с другой, что также показано и по результатам UPGMA-кластеризации (рис. 2, 3). В то же время для беломорской сельди четких географических паттернов генетической структурированности не прослеживается.

Полученные нами оценки дифференциации сельди на крупномасштабной шкале в целом согласуются с данными мтДНК, свидетельствующими о более сильной региональной структурированности европейских популяций сельди, в сочетании с однородностью как тихоокеанской, так и атлантической сельди на их основных ареалах [10, 11, 46].

### Дифференциация сельди С. р. pallasii северо-восточной части России

Генетические различия C. p. pallasii из Охотского, Берингова и Чукотского морей достоверны, однако невелики по значению  $F_{\rm ST} = 0.011$ [0.007-0.016], попарные оценки  $F_{\rm ST}$  варьируют от 0 до 0.038 (табл. 2). По данным STRUCTURE показана дифференциация только на крупномасштабной шкале, все выборки сельди кластеризуются в две группы: первая включает сельдь Чукотского и Берингова морей, вторая — сельдь Охотского моря и Олюторского залива Берингова моря. Данные байесовской кластеризации подтверждаются и расчетами с использованием *F*-статистик. Различия между выборками сельди Охотского и Берингова морей выявлены в 14 случаях из 18 сравнений  $F_{ST}$ , при этом все недостоверные значения показаны между нагульной выборкой сельди из центральной части Охотского моря и выборками Берингова моря (табл. 2).

Следует отметить, что выделенные STRUCTURE кластеры не являются генетически гомогенными. Так, все выборки Охотского моря достоверно отличаются от выборки Олюторского залива Берингова моря. Принадлежность сельди Олюторского залива к кластеру Охотского моря поддерживается лишь 56.3%-ной вероятностью и, поскольку сборы в этом районе представляют собой нагульное стадо, вероятнее всего обусловлена случайными причинами. При UPGMA-кластеризации (рис. 3) выборка Олюторского залива расположена ближе к Берингову морю, чем к Охотскому. При исключении Олюторского залива генетическая дифференциация в пределах кластера Охотского моря является недостоверной,  $F_{\rm ST} = 0.006$  [-0.0006; 0.012].

В кластере Берингова моря пробы BZb2 и BZb3 в большинстве случаев достоверно отличаются от остальных. Поскольку все выборки Берингова моря собраны во время нагульных миграций сельди, во время которых в Беринговом море происходит смешение популяций корфо-карагинской, анадырской и даже восточно-беринговоморской сельди [4, 67], мы не можем говорить о точной пространственной локализации генетически обособленных группировок.

Общая генетическая дифференциация в пределах и Охотского и Берингова морей сходна:  $F_{\rm ST} = 0.006 \ [-0.0006; \ 0.012]$  и  $F_{\rm ST} = 0.006 \ [0.001; \ 0.012]$  соответственно.

Сельдь Чукотского моря очень близка по генетическим характеристикам к сельди Берингова моря и кластеризуется вместе с беринговоморской сельдью (табл. 2; рис. 2, 3). Существует мощное поступление беринговоморских вод через Берингов пролив в Чукотское море, особенно выраженное в летний период, с которым переносится много живых организмов, включая гидробионтов и промысловых рыб [68-70]. Предполагается, что в Чукотском море обитает самостоятельная популяция сельди, по некоторым меристическим показателям более сходная с сельдью бассейна Северного Ледовитого океана, чем с собственно тихоокеанской сельдью [4]. Однако поскольку выборка в Чукотском море собрана в августе в открытой части моря, нельзя сказать, представлена ли она рыбами местной локальной популяции или это сельди, являющиеся частью нагульного стада из Берингова моря.

В целом полученные нами оценки генетической дифференциации около 1% между Охотским и Беринговым морями и 0.6% в пределах каждого из морей свидетельствуют о значительном уровне генетического обмена между популяциями морской сельди на северо-востоке России. Очевидно, что миграции, которые для некоторых популяций морской сельди могут составлять многие сотни километров [4], являются фактором, в значительной мере определяющим современную популяционную структуру сельди на тихоокеанском ареале [71]. Оценки по SSR-локусам согласуются с данными, показавшими практически полную генетическую однородность сельди по мтДНК [11, 46]. В то же время наличие статистически достоверных различий между сельдью Охотского и Берингова морей свидетельствует о частичной репродуктивной изолированности сельди на региональной шкале. Достоверные различия по ядерным маркерам между сельдью Берингова моря, с одной стороны, и Японского и Охотского морей, с другой, были показаны и другими исследователями [20].

Кроме того, существует информация о различиях между охотской и гижигинско-камчатской популяциями сельди северо-восточной и северо-западной частей Охотского моря [19]. Надо отметить, что по нашим оценкам дифференциация между этими популяциями сельди (выборки OHgz и OHtt) также достоверна (p = 0.022) без применения кор-

ГЕНЕТИКА том 57 № 6 2021

рекции уровня значимости. По нашему мнению, эти различия биологически обоснованы и отражают наличие репродуктивной обособленности популяций сельди в северной части Охотского моря. Известно, что для морских рыб даже очень небольшие достоверные оценки дифференциации могут быть "биологически значимыми" и выявлять отдельные популяции [72]. Для атлантической сельди было показано [73] (и впоследствии нашло подтверждение и для других видов рыб [74–76]), что число генетически дискретных групп определяется числом географически стабильных "областей удержания личинок". Каждый отдельный генный пул включает в себя все нерестовые группы, чьи личиночные и пост-личиночные стадии распределены в одной области. Такая модель подразумевает, что естественный отбор будет благоприятствовать особям, которые хорошо адаптированы, чтобы оставаться в популяционно-специфических областях обитания особей ранних стадий и возвращаться в свои родные места для нереста; а также для того, чтобы потомство имело доступ к этим же самым областям развития молоди, и все это несмотря на то, что обширные кормовые миграции могут распространяться далеко от мест нереста. Предполагается, что такой процесс приводит к развитию репродуктивной изоляции и возникновению генетической структурированности в популяции сельди [77]. Нерестовые ареалы сельди охотского и гижигинско-камчатского стад практически изолированы, их перекрывание в районе Тауйской губы отмечено только в годы очень высокой численности гижигинско-камчатского стада [4, 78], что вероятно может способствовать формированию репродуктивной изоляции, которая, однако, в значительной мере может нивелироваться потоком генов. При этом для выявления популяционной структурированности видов с очень большой эффективной численностью нужны выборки адекватного объема [79], а в нашем исследовании выборка гижигинско-камчатской сельди составляет только 24 экз., поэтому можно предполагать, что только масштабные исследования сельди в северной части Охотского моря смогут прояснить репродуктивные взаимоотношения ее популяций.

## Дифференциация сельди С. р. marisalbi и С. р. suworowi европейской части России

Генетические различия между подвидами сельди европейской части ареала, практически сходные с различиями с тихоокеанской сельдью, свидетельствуют об ограничении обмена генами между *С. р. marisalbi* и *С. р. suworowi*. По мтДНК различия между подвидами также обнаружены [10]. Известно, что гидрографический режим Горла Белого моря, узкого и неглубокого пролива, с сильными течениями и высокой турбулентностью вод, является основным фактором, препятствующим обмену фауной между Белым и Баренцевым морями [13, 80, 81]. Недостоверные различия оценок дифференциации  $F_{\rm ST}$  и  $R_{\rm ST}$  свидетельствуют о недавней дивергенции подвидов сельди [16, 82], а исследования особенностей распределения гаплотипов мтДНК показывают, что колонизация Чешско-Печорского района и Белого моря была результатом одной и той же инвазии из Северо-Западной Пацифики, после чего сложная популяционная структура сельди на ареале формировалась под действием постледниковых колебаний климатических факторов [10]. Генетические взаимоотношения C. p. marisalbi, C. p. suworowi не могут быть объяснены их географической локализацией и не соответствуют модели изоляции расстоянием. Среди сельди Чешско-Печорского района и Карского моря генетических различий не обнаружено, что свидетельствует о единстве популяции сельди в этом районе.

Напротив, поток генов у сельди Белого моря ограничен на очень небольшой пространственной шкале, что было продемонстрировано с помощью различных статистических методов анализа. Анализ STRUCTURE определил три кластера у сельди Белого моря: 1) г. Чупа, 2) сельдь из кутовых частей Кандалакшского, Онежского и Двинского заливов и 3) сельдь из Кандалакшского (г. Ругозерская) и Онежского заливов (Соловецкие острова и г. Сорокская). При этом и во втором, и в третьем кластере в ряде случаев отмечены достоверные внутрикластерные различия.

Как было показано в предыдущих работах, формирование иерархической внутривидовой генетической структуры сельди Белого моря определяется комплексом климатических, гидрологических и биологических факторов, значительная роль среди которых принадлежит различиям в сроках нереста группировок, и интрогрессией генов атлантической сельди [15, 16, 57, 58]. Наибольшие, стабильные во времени, генетические различия по аллозимным и микросателлитным маркерам показаны между двумя экологическими расами сельди, различающимися по времени нереста – летненерестующими и весенненерестующими [14–16]. Эти различия обусловлены в большой мере неравным уровнем интрогрессивной гибридизации с атлантической сельдью C. harengus и значительным преобладанием гибридизационных событий у летненерестующей сельди [57-59]. Полиморфизм по Робертсоновским транслокациям, а также дифференциация по SSR-локусам свидетельствуют о наличиии у весенненерестующей формы частично репродуктивно обособленных стад в Кандалакшском, Онежском и Двинском заливах, отражающих, вероятно, локальные адаптации группировок сельди к специфическим условиям обитания [9, 15, 16, 83]. Помимо различий в сроках нереста, поддержанию репродуктивной

обособленности способствуют специфические гидрологические характеристики Белого моря, ограничивающие распределение личинок и мальков от мест нереста, полтверждающие гипотезу о важной роли "ареалов удержания личинок" в формировании репродуктивной изоляции [15, 16, 73, 84, 85]. Полной генетической изоляции между расами и локальными стадами, очевидно, не существует вследствие миграций особей [9, 59, 86]. Поскольку уровень гибридизации непостоянен во времени и зависит от большого числа факторов, наблюдаемая картина дифференциации сельди динамична и может несколько изменяться [59]. Так, например, три кластера сельди Белого моря отражают различия между весенненерестующей сельдью (кластеры 1 и 3) и летненерестующей (кластер 2). При этом с летненерестующей сельдью (выборки WSgz, WSsl) кластеризуется выборка весенненерестующей сельди г. Сорокской (WSso), в составе которой отмечен высокий процент гибридных особей [58].

Таким образом, показан сходный уровень генетической изменчивости по SSR-локусам у сельди, приналлежашей к трем географическим полвилам. который является как отражением исторических процессов послеледникового расселения вида, так и результатом действия современных демографических и климатических факторов. Генетическая структура на макрогеографической шкале наиболее выражена между тремя подвидами сельди, при этом уровень генетической дифференциации в пределах каждого из подвидов неодинаков. Сельдь тихоокеанского ареала дифференцирована только на уровне крупных бассейнов – Охотского и Берингова морей, что свидетельствует о значительном уровне обмена генами, так же как и в юго-восточной части Баренцева моря и в Карском море. В то же время временная изоляция и ограничение распространения ранних стадий развития сельди от мест нереста, а также интрогрессия генов атлантической сельди являются основными факторами, которые определяют популяционную структуру сельди в Белом море.

Работа выполнена в рамках гостемы ГЗ 0112-2019-0002 (подтема "Эколого-генетическая структура вида"), а также при финансовой поддержке РФФИ (грант № 19-04-00244-а). Выделение популяционных группировок, в том числе статистическими методами, поддержано грантом РФФИ 18-016-00033.

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. Световидов А.Н. Фауна СССР. Рыбы. Сельдевые (Clupeidae). М.; Л.: Наука, 1952. Т. 2. Вып. 1. 331 с.
- Парин Н.В., Евсеенко С.А., Васильева Е.Д. Рыбы морей России: аннотированный каталог. М.: Т-во науч. изд. КМК, 2014. 733 с.
- Алтухов К.А., Михайловская А.А., Мухомедиаров Ф.Б. Рыбы Белого моря. Петрозаводск: Госиздат Карел. АССР, 1958. 162 с.
- Науменко Н.И. Биология и промысел морских сельдей Дальнего Востока. Петропавловск-Камчатский: Камч. печ. двор, 2001. 330 с.
- Hay D.E. Reproductive biology of Pacific herring (*Clupea harengus pallasi*) // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1985. V. 42 (S1). P. s111–s126. https://doi.org/10.1139/f85-267
- *Трофимов И.К.* Озерная форма сельди: ее происхождение и распространение // Изв. ТИНРО. 2005. Т. 142. С. 64–81.
- Пономарева Л.А. О взаимоотношениях сельдей рода *Clupea* // Уч. зап. Горьковского гос. ун-та. 1951. Вып. 10. С. 175–193.
- Hay D.E., Toresen R., Stephenson R. et al. Taking stock: an inventory and review of world herring stocks in 2000 // Herring: Expectations for a New Millennium. Ancorage: Univ. Alaska Sea Grant College Program, 2001. P. 381–454.
- 9. *Lajus D.L.* Long-term discussion on the stocks of the White Sea herring: historical perspective and present state // ICES Mar. Sci. Symp. 2002. V. 215. P. 315–322.
- Laakkonen H.M., Lajus D.L., Strelkov P., Väinölä R. Phylogeography of amphi-boreal fish: Tracing the history of the Pacific herring *Clupea pallasii* in North-East European seas // BMC Evol. Biol. 2013. V. 13. P. 67. https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-67
- Liu J.X., Tatarenkov A., Beacham T.D. et al. Effects of Pleistocene climatic fluctuations on the phylogeographic and demographic histories of Pacific herring (*Clupea pallasii*) // Mol. Ecol. 2011. V. 20. P. 3879– 3893.
  - https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05213.x
- Андрияшев А.П. Очерк зоогеографии и происхождения фауны рыб Берингова моря и сопредельных вод. Л.: ЛГУ, 1939. 187 с.
- 13. *Дерюгин К.М.* Фауна Белого моря и условия ее существования. Л.: Гос. гидрологич. ин-т, 1928. 511 с.
- Семенова А.В., Андреева А.П., Карпов А.К., Новиков Г.Г. Анализ аллозимной изменчивости у сельдей *Clupea pallasii* Белого и Баренцева морей // Вопр. ихт. 2009. Т. 49. № 3. С. 354–371.
- 15. Семенова А.В., Андреева А.П., Карпов А.К. и др. Анализ изменчивости микросателлитных локусов у сельдей *Clupea pallasii marisalbi* Белого моря // Генетика. 2013. Т. 49. № 6. С. 751–766.
- 16. Semenova A.V., Stroganov A.N., Afanasiev K.I., Rubtsova G.A. Population structure and variability of Pacific herring (*Clupea pallasii*) in the White Sea, Barents and Kara seas revealed by microsatellite DNA analyses //

Polar Biol. 2015. V. 38. № 7. P. 951–965. https://doi.org/10.1007/s00300-015-1653-8

- 17. Семенова А.В., Строганов А.Н., Смирнов А.А. и др. Генетическая изменчивость сельдей Clupea pallasii Охотского моря по микросателлитным маркерам // Генетика. 2014. Т. 50. № 2. С. 197–202.
- Семенова А.В., Строганов А.Н., Афанасьев К.И. и др. Микросателлитная изменчивость тихоокеанской сельди *Clupea pallasii* Valenciennes 1847 Охотского и Берингова морей // Генетика. 2018. Т. 54. № 3. С. 349–360.
- Курносов Д.С., Орлова С.Ю., Смирнова М.А. Генетическая изменчивость тихоокеанской сельди (*Clupea pallasii* Val.) Охотского моря и озера Айнского по микросателлитным локусам // Изв. ТИНРО. 2016. Т. 187. С. 116–121.
- 20. Orlova S.Y., Kurnosov D.S., Chikurova E.A., Shchepetov D.M. Genetic relationship between lake and marine forms of pacific herring Clupea pallasii // J. Ichthyol. 2019. V. 59. № 6. P. 843–852. https://doi.org/10.1134/S0032945219060080
- Brunner P.C., Douglas M.R., Bernatchez L. Microsatellite and mitochondrial DNA assessment of population structure and stocking effects in Arctic charr Salvelinus alpinus (Teleostei: Salmonidae) from central Alpine lakes // Mol. Ecol. 1998. V. 7. P. 209–223. https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00341.x
- Wilson A.J., Hutchings J.A., Ferguson M.M. Dispersal in a stream dwelling salmonid: Inferences from tagging and microsatellite studies // Conserv. Genet. 2004. V. 5. P. 25–37.
  - https://doi.org/10.1023/B:COGE.0000014053.97782.79
- 23. Семенова А.В., Карпов А.К., Андреева А.П. Темпоральная стабильность популяционно-генетической структуры беломорской сельди Clupea pallasii marisalbi // Генетика. 2016. Т. 52. № 12. С. 1428–1436.
- 24. *Lewis P.O., Zaykin D.* Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d 16c). 2001. Free program distributed by the authors over the internet from http://lewis.eeb.unconn.edu/lewishome/software.html.
- 25. *Goudet J.* FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). 2001. http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm.
- Rousset F. Genepop'007: A complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux // Mol. Ecol. Resour. 2008. V. 8. P. 103–106.
- Hardy O.J., Vekemans X. SPAGEDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels // Mol. Ecol. Notes. 2002. V. 2. P. 618–620. https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00305.x
- 28. *Rice W.R.* Analyzing tables of statistical tests // Evolution. 1989. V. 43. P. 223–225.
- 29. Jensen J.L., Bohonak A.J., Kelley S.T. Isolation by distance, web service// BMC Genetics. 2005. V. 6. № 13. https://doi.org/10.1186/1471-2156-6-13

- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data // Genetics. 2000. V. 155. P. 945–959.
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUC-TURE: A simulation study // Mol. Ecol. 2005. V. 14. P. 2611–2620.

https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x

- Earl D.A., vonHoldt B.M. STRUCTURE HARVEST-ER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method // Conserv. Genet. Resour. 2012. V. 4. P. 359–361. https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7
- 33. *Puechmaille S.J.* The program structure does not reliably recover the correct population structure when sampling is uneven: Subsampling and new estimators alleviate the problem // Mol. Ecol. Resour. 2016. V. 16. P. 608–627.

https://doi.org/10.1111/1755-0998.12512

- 34. Li Y.L., Liu J.X. Structure Selector: A web based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods // Mol. Ecol. Resour. 2018. V. 18. P. 176–177. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12719
- Excoffier L., Lischer H.E. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // Mol. Ecol. Resour. 2010. V. 10. P. 564–567. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x
- 36. *Piry S., Luikart G., Cornuet J.M.* Computer note. BOT-TLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data // J. Heredity. 1999. V. 90. № 4. P. 502–503.
- Garza J.C., Williamson E.G. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci // Mol. Ecol. 2001. V. 10. P. 305–318. https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01190.x
- Waples R.S., Do C. LDNE: A program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium // Mol. Ecol. Resour. 2008. V. 8. P. 753–756. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2007.02061.x
- Merilä J., Björklund M., Baker A.J. Genetic population structure and the gradual northward decline of genetic variability in the greenfinch (*Carduelis chloris*) // Evolution. 1996. V. 50. P. 2548–2557.
- Bernatchez L., Wilson C.C. Comparative phylogeography of Nearctic and Palearctic fishes // Mol. Ecol. 1998. V. 7. P. 431–452. https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00319.x
- 41. *Nei M., Maruyama T., Chakraborty R.* The bottleneck effect and genetic variation in populations // Evolution. 1975. V. 29. P. 1–10.
- Stamford M.D., Taylor E.B. Phylogeographical lineages of Arctic grayling (*Thymallus arcticus*) in North America: divergence, origins and affinities with Eurasian Thymallus // Mol. Ecol. 2004. V. 13. P. 1533–1549. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02174.x
- 43. Lugon-Moulin N., Brünner H., Balloux F. et al. Do riverine barriers, history or introgression shape the genetic

structuring of a common shrew (*Sorex araneus*) population? // Heredity. 1999. V. 83. P. 155–161.

- 44. Costello A.B., Down T.E., Pollard S.M. et al. The influence of history and contemporary stream hydrology on the evolution of genetic diversity within species: An examination of microsatellite DNA variation in bull trout, *Salvelinus confluentus* (Pisces: Salmonidae) // Evolution. 2003. V. 57. P. 328–344. https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2003.tb00267.x
- 45. *Grant W.S., Utter F.M.* Biochemical population genetics of Pacific herring (*Clupea pallasi*) / Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1984. V. 41. P. 856–864.
- 46. *Liu M., Lin L., Gao T. et al.* What maintains the central North Pacific genetic discontinuity in Pacific herring? // PLoS One. 2012. V. 7. № 12. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050340
- Jørstad K.E., Dahle G., Paulsen O.I. Genetic comparison between Pacific herring (*Clupea pallasi*) and a Norwegian fjord stock of Atlantic herring (*Clupea harengus*) // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1994. V. 51 (S1). P. 233–239.
- 48. *Avise J.C.* Molecular Markers, Natural History and Evolution. N.Y.: Chapman and Hall, 1994. 511 p.
- Luikart G., Cornuet J.M. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data // Conserv. Biol. 1998. V. 12. P. 228–237.
- Williamson-Natesan E.G. Comparison of methods for detecting bottlenecks from microsatellite loci // Conserv. Genet. 2005. V. 6. P. 551–562. https://doi.org/10.1007/s10592-005-9009-5
- Bond G., Showers W., Cheseby M. et al. A pervasive millennial-scale cycle in North Atlantic Holocene and glacial climates // Science. 1997. V. 278. P. 1257–1266.
- Lesica P., Allendorf F.W. When are peripheral populations valuable for conservation? // Conserv. Biol. 1995. V. 9. P. 753–760.
- Johannesson K., Andre C. INVITED REVIEW: life on the margin: genetic isolation and diversity loss in a peripheral marine ecosystem, the Baltic Sea // Mol. Ecol. 2006. V. 15. P. 2013–2029. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02919.x
- Hay D.E., Rose K.A., Schweigert J., Megrey B.A. Geographic variation in North Pacific herring populations: Pan-Pacific comparisons and implications for climate change impacts // Prog. Oceanogr. 2008. V. 77. P. 233–240.
- 55. *Pantyulin A.N.* Hydrological system of the White Sea // Oceanology. 2003. V. 43. P. 1–14.
- Hedrick P.W. Genetic polymorphism in heterogeneous environments: A decade later // Ann. Rev. Ecol. Syst.1986. V. 17. P. 535–566.
- 57. Laakkonen H.M., Strelkov P., Lajus D.L., Väinölä R. Introgressive hybridization between the Atlantic and Pacific herrings (*Clupea harengus* and *C. pallasii*) in the north of Europe // Mar. Biol. 2015. V. 162. P. 39–54. https://doi.org/10.1007/s00227-014-2564-x
- 58. Semenova A.V., Stroganov A.N. Introgressive hybridization between the Atlantic and Pacific herring (*Clupea harengus* and *Clupea pallasii*) in the White Sea, Barents and Kara Seas evidenced by microsatellites // Conser.

Genet. 2018. V. 19. P. 143–153. https://doi.org/10.1007/s10592-017-1036-5

59. Семенова А.В. Интрогрессивная гибридизация в зоне вторичного контакта атлантической Clupea harengus и тихоокенской C. pallasii сельди (Clupeidae): экологические основы, географическая структура и временная изменчивость гибридной зоны // Вопр. ихтиологии. 2020. Т. 60. № 4. С. 460– 477.

https://doi.org/10.31857/S0042875220030212

- 60. *Harrison R.G.* Hybrid Zones and the Evolutionary Process. Oxford: Oxford Univ. Press, 1993. P. 3–12.
- 61. *Arnold M.L.* Natural Hybridization and Evolution. Oxford: Oxford Univ. Press, 1997. 213 p.
- Wright S. Isolation by distance // Genetics. 1943. V. 28. P. 114–138.
- 63. *Slatkin M.* Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations // Evolution. 1993. V. 47. P. 264–279.

https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1993.tb01215.x

- Hutchinson D.W., Templeton A.R. Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability // Evolution. 1999. V. 53. P. 1898–1914. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1999.tb04571.x
- Jørgensen H.B., Hansen M.M., Bekkevold D. et al. Marine landscapes and population genetic structure of herring (*Clupea harengus* L.) in the Baltic Sea // Mol. Ecol. 2005.V. 14. P. 3219–3234. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02658.x

66. Koizumi I., Yamamoto S., Maekawa K. Decomposed

bit Kolzum T., Tamamolo S., Maekawa K. Decomposed pairwise regression analysis of genetic and geographic distances reveals a metapopulation structure of streamdwelling Dolly Varden charr // Mol. Ecol. 2006. V. 15. P. 3175–3189.

https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03019.x

- Лобода С.В., Жигалин А.Ю. Результаты исследований тихоокеанской сельди в северо-западной части Берингова моря в 2010–2015 гг. // Изв. ТИНРО. 2017. Т. 188. С. 125–139.
- Datsky A.V. Fish fauna of the Chukchi Sea and perspectives of its commercial use // J. Ichthyol. 2015. V. 55. № 2. P. 185–209. https://doi.org/10.1134/S0032945215020022
- Глебов И.И., Надточий В.А., Савин А.Б. и др. Результаты комплексных биологических исследований в море Лаптевых в августе–сентябре 2015 г. // Изв. ТИНРО. 2016. Т. 187. С. 72–88.
- Хен Г.В., Басюк Е.О., Кивва К.К. Водные массы и рыбные сообщества в северо-западной части Берингова и западной части Чукотского морей летом 2003–2010 гг. // Тр. ВНИРО. 2018. Т. 173. С. 137– 156.
- Горбачев В.В. Миграции как причина генетической однородности тихоокеанской сельди (*Clupea pallasii*) Охотского моря // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2012. Т. 16. № 4/2. С. 914–921.
- 72. Knutsen H., Olsen E.M., Jorde P.E. et al. Are low but statistically significant levels of genetic differentiation in

marine fishes 'biologically meaningful'? A case study of coastal Atlantic cod // Mol. Ecol. 2011. V. 20. P. 768–783.

https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04979.x

- *Iles T.D., Sinclair M.* Atlantic herring: Stock discreteness and abundance // Science. 1982. V. 215. P. 627–633.
- 74. Bernatchez L., Martin S. Mitochondrial DNA diversity in anadromous rainbow smelt, Osmerus mordax Mitchill: A genetic assessment of the member-vagrant hypothesis // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1996. V. 53. P. 424–433.

https://doi.org/10.1139/f95-180

75. Stepien C.A. Phylogeographical structure of the Dover sole Microstomus pacificus: The larval retention hypothesis and genetic divergence along the deep continental slope of the northeastern Pacific Ocean // Mol. Ecol. 1999. V. 8. P. 923–939.

https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1999.00643.x

76. Swearer S.E., Shima J.S. Regional variation in larval retention and dispersal drives recruitment patterns in a temperate reef fish // Mar. Ecol. Prog. Ser. 2010. V. 417. P. 229–236.

https://doi.org/10.3354/meps08801

- Sinclair A.R.E. Population regulation in animals // Ecological Concepts / Ed. Cherrett J.M. Oxford, UK: Blackwell Sci., 1989. P. 197–241.
- 78. Правоторова Е.П. Некоторые данные по биологии гижигинско-камчатской сельди в связи с колебаниями ее численности и изменением ареала нагула // Изв. ТИНРО. 1965. Т. 59. С. 102–128.
- Wildes S.L., Vollenweider J.J., Nguyen H.T., Guyon J.R. Genetic variation between outer-coastal and fjord populations of Pacific herring (*Clupea pallasii*) in the eastern Gulf of Alaska // Fish. Bull. 2011. V. 109. P. 382– 393.
- Наумов А.Д. Двустворчатые моллюски Белого моря. Дис. ... докт. биол. наук. СПб.: ЗИН РАН, 2004. 186 с.
- Strelkov P., Nikula R., Väinölä R. Macoma balthica in the White and Barents Seas: Properties of a widespread marine hybrid swarm (Mollusca: Bivalvia) // Mol. Ecol. 2007. V. 16. P. 4110–4127. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03463.x
- Hardy O.J., Charbonnel N., Freville H., Heuertz M. Microsatellite allele sizes: A simple test to assess their significance on genetic differentiation // Genetics. 2003. V. 163. P. 1467–1482.
- Lajus D.L. White Sea herring (*Clupea pallasi marisalbi*, Berg) population structure: Interpopulation variation in frequency of chromosomal rearrangement // Cybium. 1996. V. 20. P. 279–294.
- 84. Евсеенко С.А., Мишин А.В. О распределении личинок и локализации нерестовых стад беломорской сельди Clupea pallasii marisalbi // Вопр. ихтиологии. 2011. Т. 51. № 6. С. 809–821.
- 85. Кобылянский С.Г., Дриц А.В., Евсеенко С.А. и др. Пространственно-временная изменчивость обилия и размерного состава личинок беломорской сельди Clupea pallasii marisalbi в Онежском и Кан-

далакшском заливах Белого моря // Вопр. ихтиологии. 2018. Т. 58. № 1. С. 107–116. https://doi.org/10.7868/S0042875218010125  Лайус Д.Л. Популяционная структура беломорской сельди, данные кариологического анализа // Тр. Зоол. ин-та АН СССР. 1990. Т. 227. С. 4–15.

# Genetic Structure of the Pacific Herring *Clupea pallasii* Valenciennes 1847, on a Macrogeographic Scale

A. V. Semenova<sup>a, b, \*</sup>, A. N. Stroganov<sup>a</sup>, G. A. Rubtsova<sup>b</sup>, and M. O. Rybakov<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia <sup>b</sup>Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia <sup>c</sup>Polar Branch of the Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography, Murmansk, 183038 Russia \*e-mail: seman2000@yandex.ru

Using ten microsatellite loci, the analysis of genetic variability and differentiation of the Pacific herring *Clupea pallasii* over a wide range in the Okhotsk, Bering, Chukchi, Kara, Barents and White seas was performed. A similar level of genetic variability of herring belonging to three geographical subspecies is shown. The genetic structure at the large scale is most pronounced between the three geographical subspecies of herring, with the different level of genetic differentiation within each of the subspecies. Herring of the Pacific range is differentiated only at the level of large basins-the Okhotsk and Bering seas, which indicates a significant level of gene exchange, as well as in the South-Eastern part of the Barents and Kara seas. At the same time, the gene flow in White Sea herring is restricted on a very small spatial scale.

Keywords: intraspecific structure, genetic diversity, Pacific herring, *Clupea pallasii*, Sea of Okhotsk, Bering Sea, White Sea.

# ГЕНЕТИКА ЖИВОТНЫХ

УДК 631.523.5:638.123

# ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОТНОШЕНИЯ ПОДВИДОВ ПЧЕЛ Apis mellifera caucasia И Apis mellifera carpathica ПО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА

© 2021 г. Р. А. Ильясов<sup>1, 2, \*</sup>, Г. Ю. Хан<sup>2</sup>, М. Л. Ли<sup>2</sup>, К. В. Ким<sup>2</sup>, Д. Х. Парк<sup>2, 3</sup>, Д. И. Такахаши<sup>4</sup>, Х. В. Квон<sup>2, \*\*</sup>, А. Г. Николенко<sup>1</sup>

 <sup>1</sup>Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия
 <sup>2</sup>Отделение наук о жизни и Исследовательский центр насекомых переносчиков болезней, Инчхонский национальный университет, Инчхон, 22012 Корея
 <sup>3</sup>Биоинформатическая компания 3BIGS CO. LTD, Хвасон-си, 18454 Корея
 <sup>4</sup>Факультет естественных наук, Университет Киото Сангё, Киото, 603-8555 Япония
 \*e-mail: apismell@hotmail.com
 \*\*e-mail: hwkwon@inu.ac.kr
 Поступила в редакцию 13.07.2020 г. После доработки 04.09.2020 г.
 Принята к публикации 18.10.2020 г.

Последовательности полного митохондриального генома медоносной пчелы Apis mellifera L. подвидов Apis mellifera caucasia Pollmann, 1889 (AP018404, 16341 пн) и Apis mellifera carpathica Foti et al., 1965 (АР018403, 16336 пн) были впервые секвенированы. Митохондриальные ДНК (мтДНК) обоих подвидов содержат 13 кодирующих белок генов, 22 гена тРНК, два гена рРНК и АТ-обогащенную регуляторную область. Отношение транзиций к трансверсиям полной мтДНК между A. m. caucasia и A. m. carpathica было 2.05, что характеризует формирование адаптаций к сменяющимся условиям среды обитания. Гены с наибольшим содержанием GC – COX1 (24%), COX2 (19.6%), CYTB (19.1%), COX3 (17.2%) и ND1 (17.2%) могут быть высокополиморфны и использованы в филогенетических и популяционных исследованиях пчел. Большинство генов мтДНК обоих подвидов расположены на тяжелой цепи (девять кодирующих белок генов и 14 генов тРНК), и меньшее число генов (четыре кодирующих белок гена, два гена рРНК и восемь генов тРНК) расположено на легкой цепи. Кластерный анализ последовательности полной мтДНК и оценка структуры межгенной области tRNA-Leu(UUR)-COX2 с единственным элементом Q размером 192 пн показали, что оба подвида являются представителями линии С с гаплотипами С2 и С2 соответственно. Подвиды медоносной пчелы A. m. caucasia и A. m. carpathica могут быть дифференцированы друг от друга по 34 уникальным SNP в 11 генах мтДНК и маркеру рестрикции XbaI в гене ND5. Эти генетические маркеры могут способствовать сохранению чистопородных генофондов пчел подвидов A. m. caucasia и A. m. carpathica в пределах их естественного ареала.

*Ключевые слова: Apis mellifera*, подвиды пчел, *А. т. caucasia*, *А. т. carpathica*, митохондриальный геном, мтДНК, гаплотипы, консервативная генетика. **DOI:** 10.31857/S0016675821060047

Медоносная пчела используется человеком для производства специфических продуктов пчеловодства и опыления сельскохозяйственных растений [1–3]. В результате эволюции сформировалось около 30 подвидов медоносной пчелы, распространенных в широком спектре климатических условий Старого Света [4, 5]. Способность пчел хорошо приспосабливаться позволила человеку распространить их практически во всех странах мира [6–8].

Несмотря на широкую экологическую пластичность, большую численность и широкое распространение, численность популяций пчел ежегодно сокращается во всем мире [9, 10]. Сокращение популяции пчел происходит по разным причинам: применение пестицидов и инсектицидов в сельском хозяйстве, неконтролируемые массовые транспортировки пчел, внутривидовая гибридизация, распространение новых болезней, глобальные климатические изменения [11–17]. Показано, что сокращение численности популяций медоносной пчелы будет вести к сокращению генетического разнообразия и адаптивности популяции, а также к снижению биоразнообразия экосистем [18–23]. Подвиды медоносной пчелы подразделяются как минимум на пять эволюционных линий: линия А во всей Африке, линия М в Западной Европе, линия С в Восточной Европе, линия О в Западной Азии и линия Y в Северо-Восточной Африке и Юго-Западной Азии. Подвиды пчел разных линий различаются существеннее подвидов из одной линии. Гибридизация подвидов пчел разных линий может иметь такие последствия, как снижение численности популяции, приспособленности и адаптивности, а также потеря хозяйственно полезных признаков [9, 10, 24].

Географически ареалы подвидов разных эволюционных линий имеют смежные границы и часто перекрываются, что привело к формированию гибридных зон на границах ареалов. Деятельность человека усилила формирование гибридных популяций пчел [9, 10, 24]. В мировом коммерческом пчеловодстве наиболее востребованными являются пчелы подвидов эволюционной линии С -A. m. ligustica Spinola, 1806 [25], A. m. carnica Pollmann, 1889 [26], A. m. caucasia Pollmann, 1889 [26], A. m. carpathica Foti et al., 1965 [27]. Повсеместное использование пчел этих подвидов в пределах естественного распространения локальных подвидов привело к разрушению аборигенных генофондов многих подвидов Европы и Западной Азии. В России серая горная кавказская А. т. саиcasia и карпатская A. m. carpathica пчелы являются наиболее распространенными в пчеловодстве после темной лесной пчелы A. m. mellifera [18-24].

Естественный ареал кавказской пчелы А. т. саиcasia охватывает хребты и долины Кавказских гор и Восточную Анатолию [28]. Естественный ареал карпатской пчелы А. т. carpathica охватывает хребты и долины Карпатских гор и Западную Трансильванию [29]. Эти пчелы идеально приспособлены к жаркому лету и умеренной зиме и являются незаменимыми компонентами природных экосистем Кавказских и Карпатских гор [30-33]. В результате массовых транспортировок эти подвиды были распространены на территориях Армении, Австрии, Азербайджана, Белоруссии, Болгарии, Чехии, Грузии, Венгрии, Польши, Румынии, Словакии, юга России, Турции, Украины и Узбекистана [28]. Следствием такого широкого искусственного распространения подвидов A. m. caucasia и A. m. carpathica стала массовая гибридизация и интрогрессия с локальными для каждой местности подвидами, а также друг с другом [29, 34, 35].

Кавказская A. m. caucasia и карпатская A. m. carpathica пчелы — наименее изученные с научной точки зрения подвиды, несмотря на востребованность и активное использование их в пчеловодстве. Часто подвиды A. m. carpathica и A. m. caucasia упускаются и не упоминаются в списках подвидов [18, 36–39].

Подвид A. m. carpathica долгое время считался экотипом подвида A. m. carnica в Западной Румынии или *А. т. таседопіса* в Восточной Румынии [29, 37]. Другие работы, на основе морфометрии [27, 40–43] и мтДНК [24, 29, 44–47], признают таксономическую самостоятельность подвида *А. т. carpathica*. Существует неоднозначность в определении принадлежности подвида *А. т. caucasia* к эволюционной линии, который на основе морфометрии [39, 48–50] и аллозимов [28] был отнесен к линии О, а на основе мтДНК [18, 19, 23, 38, 45, 51–54] – к линии С.

Идентификация подвида и выявление уровня интрогрессии являются основой для сохранения генофонда популяций пчел [29, 35]. Нами определены нуклеотидные последовательности полной мтДНК пчел подвидов *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica* с целью уточнения их таксономического статуса и определения их филогенетических отношений. На основе анализа мтДНК мы показали, что подвиды пчел *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica* относятся к эволюционной линии С и взаимодействуют между собой как два самостоятельных подвида.

# МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Взрослые особи рабочих пчел *А. т. caucasia* были отобраны на пасеке в Сочинском районе Краснодарского края, Россия (43°45' с.ш., 39°95' в.д), взрослые особи *А. т. carpathica* — на пасеке в Майкопском районе Республики Адыгея, Россия (44°61' с.ш., 40°07' в.д.). Принадлежность семей пчел к подвидам *А. т. caucasia* и *А. т. carpathica* была предварительно подтверждена морфометрическим методом [55]. Тотальную ДНК экстрагировали из грудной мышечной ткани с использованием набора Wizard Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA, Madison, WI, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Образцы ДНК хранили при –20°С до дальнейшего использования.

Секвенирование мтДНК было проведено с помощью набора NextSeq 500/550 High Output Kit v. 2 (75 циклов) (ILLUMINA, США) на основе парных циклов считывания (2 × 150 пн) с использованием секвенатора Illumina Next Seq 500 (ILLUMINA, США) в Университете Киото Сангё (Куото, Япония), следуя инструкции производителя. Геномные библиотеки были приготовлены с помощью набора для подготовки ДНК-библиотеки Nextera (ILLUMINA, США) в соответствии с инструкциями производителя. Сборка геномов A. m. caucasia и A. m. carpathica проводилась на основе 1662186 и 1541213 прочтений соответственно, с средним покрытием 75 с помощью Geneious R9 (BIO-MATTERS, Новая Зеландия). Аннотация геномов выполнена с использованием MITOS (Universität Leipzig, Германия) [56], Geneious R9 (BIOMATTERS, Новая Зеландия), Unipro UGENE 1.28 (UNIPRO, Россия), CLC Genomics Workbench 11 (CLCbio, Denmark) и tRNAscan-SE (CA, США) [57].

Нуклеотидные последовательности полной мтДНК были депонированы в базы данных Генбанка GenBank/DDBJ под номерами AP018404 для *A. m. caucasia* (16341 пн) и AP018403 для *A. m. carpathica* (16336 пн). Сравнительный анализ полной мтДНК был проведен в MEGA7 [58] с использованием последовательностей из Генбанка: NC\_001566 (*A. m. ligustica*, Maryland, CША) [59], KX908209 (*A. m. ligustica*, Gwangju, Kopeя) [60], KP163643 (*A. m. syriaca* Skorikov, 1929 [61], Baqa, Иордания) [62], KY926882 (*A. m. syriaca*, Yunnan, Китай) [63], *A. m. ligustica* NC\_001566 (16324 пн) (Bethesda, США) (референсная последовательность), *A. c. cerana* F. GQ162109 (Yunnan, Китай) (15895 пн) [64] (внешняя группа).

Выравнивание последовательностей межгенной области tRNA-Leu(UUR)-COX2A. m. caucasia и A. m. carpathica проводилось с образцами нуклеотидных последовательностей из Генбанка: A. m. carnica (FJ037782) гаплотип C19, A. m. ligustica (JF934709) гаплотип C33, A. m. carnica (JF934704) гаплотип C2, A. m. carnica (FJ037776) гаплотип C11, А. т. ligustica (FJ037780) гаплотип С17, А. т. carnica (FJ037781) гаплотип C18, A. m. ligustica (FJ037778) гаплотип C14, A. m. carnica (GQ433623) гаплотип C2j, А. т. ligustica (FJ037777) гаплотип C12, А. т. syriaca (AY618918) гаплотип О, A. m. syriaca (AY618917) гаплотип О, A. m. syriaca (FJ477993) гаплотип О1b, А. т. svriaca (FJ037787) гаплотип O11, А. т. svriaca (FJ477992) гаплотип O1a, A. m. syriaca (AY618916) гаплотип O, A. m. lamarckii Cockerell, 1906 (FJ477994) [65] гаплотип O1c, A. m. syriaca (FJ477997) гаплотип ОЗ.

Дивергенция нуклеотидных последовательностей и генетические дистанции Jukes–Cantor [66] были рассчитаны с использованием UNIPRO UGENE 1.28 (Россия) и CLC Genomics Workbench 11 (CLCbio, Дания). Филогенетический анализ на основе последовательностей ДНК был проведен с использованием MEGA7 [58] и Statistica 8.0 (Stat-Soft, Inc., Tulsa, OK, CША), JMP14 (SAS Institute Inc., North Carolina, США). Филогенетические деревья были построены с использованием метода ближайшего соседа [67] на основе дистанций Jukes–Cantor с 1000 бутстреп-репликациями. Физическая карта полного митохондриального генома была построена с использованием CLC Genomics Workbench 11 (CLCbio, Дания) и Artemis 17.0.1 (The Sanger Institute, Hinxton, Cambridge, Великобритания).

# РЕЗУЛЬТАТЫ

Размеры полной последовательности мтДНК *А. т. caucasia* (AP018404) 16341 пн и *А. т. carpathica* (AP018403) 16336 пн были немного длиннее последовательности мтДНК *Drosophila yakuba* (NC\_001322) 16019 пн (рис. 1). Были рассчитаны соотношения нуклеотидов A, T, G и C и наиболее

ГЕНЕТИКА том 57 № 6 2021

Таблица 1. Характеристика нуклеотидного состава полной мтДНК *А. т. caucasia* и *А. т. carpathica* 

Нуклеотили	A. m. caucasia/A	A. m. carpathica
Пуклеотиды	число	содержание, %
Аденин (А)	7067/7066	43.2/43.3
Цитозин (С)	1560/1562	9.5/9.6
Гуанин (G)	908/906	5.6/5.5
Тимин (Т)	6806/6800	41.6/41.6
GC	2468/2468	15.1/15.1
AT	13873/13866	84.9/84.9
		1

важных пар АТ и GC полной мтДНК *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica* (табл. 1). Среднее содержание нуклеотидов АТ – 84.9% и GC – 15.1% сходно с содержанием у *Drosophila melanogaster* (U37541) и подвидов пчел *A. m. ligustica* и *A. m. syriaca*. Это может быть результатом частых замен пар CG на АТ в ходе эволюции [59].

Аналогично референсной последовательности *A. m. ligustica* (NC\_001566) последовательности мтДНК *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica* содержали 13 белок-кодирующих генов (ND2, COX1, COX2, *ATP8*, *ATP6*, COX3, ND3, ND5, ND4, ND4L, ND6, *CYTB*, ND1), 22 гена тРНК (tRNA-Glu, tRNA-Ser(AGN), tRNA-Met, tRNA-Gln, tRNA-Ala, tRNA-Ile, tRNA-Cys, tRNA-Tyr, tRNA-Trp, tRNA-Leu(UUR), tRNA-Asp, tRNA-Lys, tRNA-Gly, tRNA-Arg, tRNA-Asn, tRNA-Phe, tRNA-His, tRNA-Thr, tRNA-Pro, tRNA-Ser(UCN), tRNA-Leu(CUN), tRNA-Val), два гена pPHK (16S rRNA, 12S rRNA) и AT-богатую регуляторную область (табл. 2).

Тяжелая цепь мтДНК А. т. caucasia и А. т. carpathica содержит девять белок-кодирующих генов (ND2, COX1, COX2, ATP8, ATP6, COX3, ND3, ND6 и CYTB) и 14 генов тРНК (tRNA-Glu, tRNA-Ser(AGN), tRNA-Met, tRNA-Gln, tRNA-Ala, tRNA-Ile, tRNA-Trp, tRNA-Leu(UUR), tRNA-Asp, tRNA-Lys, tRNA-Gly, tRNA-Asn, tRNA-Thr и tRNA-Ser(UCN)), а легкая цепь мтДНК содержит четыре белок-кодирующих гена (ND1, ND4, ND4L и ND5), восемь генов тРНК (tRNA-Cys, tRNA-Tyr, tRNA-Arg, tRNA-Phe, tRNA-His, tRNA-Pro, tRNA-Leu(CUN) и tRNA-Val) и два гена рРНК (16S rRNA, 12S rRNA) (рис. 2).

Известно, что значение генетического разнообразия и вариабельности зависит от содержания GC – чем выше содержание GC, тем выше вариабельность генов [68]. Было рассчитано содержание GC во всех генах мтДНК. Возможно, что наиболее вариабельные белок-кодирующие гены – *COX1*, *COX2*, *CYTB*, *COX3*, *ND1*, а наименее вариабельные белок-кодирующие гены – *ND4*, *ND3*, *ND2*, *ND6*, *ATP8*. Поскольку содержание GC в мтДНК менее 40% считается низким [69], вероятно, что



Рис. 1. Кольцевая физическая карга полной мтДНК А. т. caucasia и А. т. carpathica. Сайты распознавания рестрикционных ферментов выделены фоном, а уникаль-ный сайт рестрикции, характерный только для А. т. caucasia, подчеркнут.

большинство генов мтДНК высококонсервативны (табл. 2).

Была построена физическая карта полной мтДНК пчел *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica*. Не было обнаружено различий в синтении полной мтДНК *A. m. caucasia*, *A. m. carpathica* с референсной последовательностью *A. m. ligustica*. Четыре пары генов *ND2* и *tRNA-Cys*, *ATP6* и *ATP8*, *COX1* и *tRNA-Leu*(UUR), *COX2* и *tRNA-Asp* имели небольшие перекрывающиеся участки у обоих подвидов пчел (рис. 1).

Белок-кодирующие гены мтДНК *А. т. caucasia* и *А. т. carpathica*, аналогично референсной последовательности *А. т. ligustica*, имеют один тип стоп-кодона ТАА и четыре типа стартовых кодонов: кодон АТG – гены *АТР6*, *COX3*, *CYTB*; кодон АТА – гены *COX1*, *ND3*, *ND4*; кодон АТТ – гены *COX2*, *ATP8*, *ND1*, *ND4L*, *ND5*, *ND6*; кодон АТС – ген *ND2*.

В мтДНК A. m. caucasia, A. m. carpathica и референсной последовательности А. т. ligustica имеются по два гена изоакцепторных тРНК для аминокислот серин (Ser) и лейцин (Leu). Первая tRNA-Ser(AGN) распознает кодон AGN по антикодону TCT, расположенному на тяжелой цепи в положении 138-140, а вторая tRNA-Ser(UCN) распознает кодон UCN по антикодону TGA, расположенному на тяжелой цепи в положении 12230-12232 относительно референсной последовательности A. m. ligustica. Первая tRNA-Leu(UUR) распознает кодон UUR по антикодону TAA, расположенному на тяжелой цепи в положении 3388-3390, а вторая tRNA-Leu(CUN) распознает кодон CUN по антикодону ТАС, расположенному на легкой цепи в положении 13267-13269 относительно референсной последовательности A. m. ligustica. Очевидно, что присутствие этих двух изоакцепторных генов тРНК в одной мтДНК является результатом адаптивной эволюции медоносных пчел, которая обеспечивает гарантированную бесперебойную трансляцию наиболее важных белков и пептидов.

15 сайтов рестрикции — общие для полной мтДНК *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica*, тогда как сайт рестрикции *XbaI* (T↓CTAGA) в гене *ND5* мтДНК в положении 7825—7830 относительно референсной последовательности *A. m. ligustica* был характерен только для *A. m. caucasia*, но не для *A. m. carpathica*. Данный сайт рестрикции мтДНК появился у *A. m. caucasia* благодаря SNP 7830C>A, которая изменила последовательность TCTAGC в TCTAGA — сайт распознавания *XbaI*.

В мтДНК медоносной пчелы подвидов A. caucasia и A. carpathica имеются 24 межгенных спейсера с общим размером 813 пн. Самый большой межгенный спейсер длиной 192 пн расположен между генами tRNA-Leu(UUR) и COX2. Размер этого межгенного спейсера вариабелен среди подвидов медоносной пчелы A. mellifera из разных Таблица 2. Характеристика генов полной мтДНК пчел *А. т. caucasia* и *А. т. carpathica* 

-	1		
Типы генов	Ген	Размер, пн	Содержание GC, %
	ND2	1002	13.4
	COX1	1566	24
	COX2	678	19.6
	ATP8	159	11.3
	ATP6	681	15.3
	COX3	780	17.2
Белок-	ND3	354	13.6
кодирующие	ND5*	1665	14.2
	<i>ND4</i> *	1311	13.7
	ND4L*	264	14
	ND6	504	12.5
	СҮТВ	1152	19.1
	ND1*	918	17.2
	tRNA-Glu	66	4.5
	<i>tRNA-Ser</i> (AGN)	61	19.7
	tRNA-Met	66	21.2
	tRNA-Gln	55	12.7
	tRNA-Ala	70	10.0
	tRNA-Ile	69	13.0
	tRNA-Cys*	69	13.0
	tRNA-Tyr*	68	11.8
	tRNA-Trp	72	8.3
	<i>tRNA-Leu</i> (UUR)	70	18.6
	tRNA-Asp	69	10.1
трнк	tRNA-Lys	69	20.3
	tRNA-Gly	66	7.6
	tRNA-Arg*	67	13.4
	tRNA-Asn	69	14.5
	tRNA-Phe*	69	11.6
	tRNA-His*	68	14.7
	tRNA-Thr	59	8.5
	tRNA-Pro*	69	14.5
	tRNA-Ser(UCN)	67	13.4
	tRNA-Leu(CUN)*	71	12.7
	tRNA-Val*	70	11.4
DUIV	16S rRNA*	1362	15.6
ргнк	12S rRNA*	818	3.4

\* Гены, расположенные на легкой цепи мтДНК.

701



# ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОТНОШЕНИЯ ПОДВИДОВ ПЧЕЛ

Таблица 3. Генетические различия и дистанции (выше диагонали) и число замен нуклеотидов (ниже диагонали) между последовательностями полной мтДНК образцов *A. m. caucasia*, *A. m. carpathica*, *A. m. ligustica* и *A. m. syriaca* и внешней группы *A. cerana* 

Образцы		NC001566 A. m. ligustica (C)	KX908209 A. m. ligustica (C)	AP018404 A. m. caucasia (C)	AP018403 A. m. carpathica (C)	KP163643 A. m. syriaca (O)	KY926882 A. m. syriaca (O)	GQ162109 Apis cerana
			(	генети (генетически)	ческие разли е дистанции .	чия, % Jukes–Cantor	)	
NC 001566 A. m. ligustica (C)		***	0.7 (0.001)	0.8 (0.005)	0.8 (0.005)	2.7 (0.014)	1.4 (0.012)	19.9 (0.164)
KX908209 A. m. ligustica (C)		137	***	1.3 (0.005)	1.3 (0.005)	3.4 (0.015)	2.1 (0.012)	20.6 (0.164)
AP018404 <i>A. m. caucasia</i> (C)	Ρ, Ν	89	216	***	0.8 (0.005)	2.8 (0.015)	1.6 (0.012)	19.9 (0.164)
AP018403 A. m. carpathica (C)	IO SN	104	221	127	***	3.0 (0.014)	1.8 (0.012)	20 (0.164)
KP163643 A. m. syriaca (O)	Числ	454	565	477	503	***	2.1 (0.006)	19.3 (0.162)
KY926882 A. m. syriaca (O)		218	331	247	279	322	***	19.8 (0.160)
GQ162109 Apis cerana		3342	3459	3336	3357	3245	3300	***

линий: подвиды линии С имеют наименьший размер 191–192 пн, а подвиды линии О имеет больший размер 258–264 пн (рис. 2). Для сравнения, мтДНК *А. cerana* имеет 22 межгенных спейсера с общим размером 705 пн, где наиболее длинный межгенный спейсер размером 231 пн расположен между генами *tRNA-Met* и *tRNA-Gln* [64].

Сравнительный анализ выровненных последовательностей полной мтДНК А. т. caucasia и A. m. carpathica показал 17 инделов, 54 SNP, из которых 36 транзиций, 18 трансверсий. Кодирующие белок гены полной мтДНК A. m. caucasia и A. m. carpathica отличались друг от друга одним инделом, 33 SNP, из которых 27 транзиций (шесть приводили к аминокислотным заменам), шесть трансверсий (пять приводили к аминокислотным заменам). Была отмечена одна трансверсия в гене СОХ1, две трансверсии в гене СОХ2, одна трансверсия в СОХЗ, две трансверсии в гене СУТВ, четыре транзиции и одна трансверсия в гене ND1, три трансверсии в гене ND2, одна трансверсия в ND3, семь транзиций и одна трансверсия в гене *ND4*, две транзиции и две трансверсии в гене *ND5*, четыре транзиции и одна трансверсия в гене ND6. Гены pPHK A. m. caucasia и A. m. carpathica различались 17 инделами и одной транзицией. Гены тРНК A. m. caucasia и A. m. carpathica различались 10 инделами, двумя транзициями и одной трансверсией. Все межгенные некодирующие области *А. т. caucasia* и *А. т. carpathica* различались 27 инделами, шестью транзициями и 11 трансверсиями.

Для сравнения A. m. caucasia и A. m. carpathica с представителями A. m. ligustica (линия C) и A. m. syriаса (линия О) были рассчитаны % генетических различий, генетические дистанции Jukes-Cantor и число однонуклеотидных замен (SNP) полной последовательности мтДНК (табл. 3). Наибольшие различия A. m. caucasia и A. m. carpathica наблюдались с представителями внешней группы — *А. cerana* (20.3% генетических различий и 3346 SNP) и линии O - A. m. syriaca (2.3% генетических различий и 376 SNP). Наименьшие различия A. m. caucasia и A. m. carpathica наблюдались с представителями линии С – A. m. ligustica (1.1% генетических различий и 157 SNP). Пчелы А. т. caucasia и А. т. carpathica различались 127 SNP и содержали 0.8% генетических различий.

На основе попарных генетических дистанций Jukes—Cantor между последовательностями полной мтДНК была построена дендрограмма, отражающая филогенетические взаимоотношения представителей *A. m. caucasia, A. m. carpathica, A. m. ligustica* (линия C), *A. m. syriaca* (линия O) и внешней груп-



**Рис. 3.** Филогенетические отношения представителей *A. m. caucasia, A. m. carpathica, A. m. ligustica* и *A. m. syriaca* и внешней группы *A. cerana* на основе кластерного анализа полной мтДНК методом ближайшего соседа и генетических дистанций Jukes–Cantor. Цифрами обозначены значения бутстреп-анализа.

пы *A. cerana* (рис. 3). На дендрограмме представители подвидов линий С и О четко группируются раздельно, а *A. cerana* располагается во внешней группе.

# ОБСУЖДЕНИЕ

Генофонд популяции складывается из совокупности геномов всех особей, состояние которого оценивается с использованием маркеров ядерной и митохондриальной ДНК [29, 35]. Нуклеотидные последовательности полной мтДНК могут быть использованы для идентификации подвидов и филогенетических реконструкций [18, 19, 37, 54, 59, 70]. Сейчас полные последовательности мтДНК доступны в базе данных Генбанка для пяти видов пчел рода *Apis: A. mellifera, A. cerana, A. dorsata, A. florea* и *A. koschevnikovi* [24, 37, 64, 71, 72]. Сравнительный анализ полной мтДНК уже стал эффективным средством таксономической идентификации и может быть использован в сохранении генофонда локальных подвидов пчел [10, 24, 72].

Митохондриальные геномы *А. т. caucasia* и *А. т. carpathica*, сходно с мтДНК других перепончатокрылых, содержат 43% нуклеотида A, 41% – T, 6% – G, 10% – C, обогащены нуклеотидами AT на

85%, содержат наиболее высокие частоты динуклеотидов АА (19%), АТ (18%), ТТ (18%) и ТА (16%) и наиболее низкие частоты динуклеотидов GG (1%), GC (1%), CG (1%) и CC (2%) [24, 59, 64, 72, 73]. Среднее содержание GC в мтДНК А. т. саисаsia и A. m. carpathica составляет 15%. Значение генетического разнообразия и вариабельности зависит прямо пропорционально от содержания GC – чем выше содержание GC, тем выше генетическое разнообразие и вариабельность генов. Содержание GC в мтДНК менее 40% считается низким [69]. В мтДНК А. т. caucasia и А. т. carpathica нет ни одного кодирующего белок гена с содержанием GC более 40%. Гены с наибольшим содержанием GC – COX1 (24%), COX2 (19.6%), *СҮТВ* (19.1%), *СОХЗ* (17.2%) и *ND1* (17.2%) – могут стать информативными маркерами в филогенетических и популяционных исследованиях пчел (табл. 1).

Отношение транзиций к трансверсиям tr/tv является важнейшей характеристикой мутационного процесса. В мтДНК большинства животных транзиции происходят чаще трансверсий [68, 74]. Для большинства известных эукариот в норме отношение tr/tv > 1, в то время как tr/tv < 1 указывает на высокую частоту однонуклеотидных мутаций и

инделов или низкую эффективность процесса репарации ДНК. Изменчивость отношения tr/tv в геноме может указывать в пользу локальной смены мутационного механизма в ходе адаптации к сменяющимся условиям среды обитания [75-77].

Отношение tr/tv полной мтДНК было 2.05 между A. m. caucasia и A. m. carpathica, что сходно с соотношением tr/tv мтДНК 2.06 между Drosophila melanogaster и D. yakuba [78, 79]. Следовательно, мтДНК подвидов пчел A. m. caucasia и A. m. carpathica отражает процесс непрерывной адаптации к сменяющимся условиям среды обитания.

АТ-обогащенная (содержание АТ 96%) некодирующая область между генами 12S rRNA и tRNA-Ser мтДНК у A. m. caucasia и A. m. carpathica имеет размер 832 и 849 пн соответственно, что немного больше, чем у референсной последовательности А. т. ligustica размером 826 пн. Благодаря присутствию ТАТА, Poly-T и [TA(A)], -подобных мотивов АТ-обогащенная некодирующая область выполняет регуляторную функцию и участвует в инициации транскрипции и репликации генов мтДНК у медоносной пчелы [64].

Большинство эукариот имеют повторяющиеся мотивы в своих геномах, которые могут повторяться сотни раз и участвовать в регуляции в транскрипционной и посттранскрипционной регуляции экспрессии генов через микроРНК. В полной мтДНК A. m. caucasia и A. m. carpathica были обнаружены два повторяющихся 8-нуклеотидных мотива: мотив ААТТААТТ, повторяющийся 23 раза, и мотив ААТАААТТ, повторяющийся 50 раз, который может выполнять функцию транскрипционной и посттранскрипционной регуляции экспрессии генов. Эти два повторяющихся мотива отличаются друг от друга только одной трансверсией T > А в четвертой позиции.

Другая большая некодирующая область, расположенная между генами tRNA-Leu(UUR) и СОХ2, состоит из двух типов нуклеотидных последовательностей, названных Р (51-69 пн) и Q (194-196 пн) элементами, где Р-элемент может находиться в нескольких вариантах – Р (52–54 пн), Р0 (62-69 пн) и Р1 (50-51 пн) (рис. 2). Межгенная область tRNA-Leu(UUR)-COX2 пчел эволюционных линий А, М и О включает Р-элемент в сочетании с различным числом копий Q-элемента, что приводит к полиморфизму длины этого региона мтДНК. Подвиды пчел линии А содержат варианты Р0 или Р1 и 1-4 Q-элемента (размер 244-853 пн); подвиды пчел линии М содержат вариант Р и 1–4 Q-элемента (размер 246-838 пн); подвиды пчел линии О содержат вариант Р и 1-4 Q-элемента (размер 256-853 пн); подвиды пчел линии С не содержат Р-элемента, а содержат только одну копию Q-элемента (размер 194-196 пн) [52]. Последовательности межгенной области tRNA-Leu(UUR)-COX2A. m. caucasia и A. m. carpathica не содержали

Р-элемента и имели размер 192 пн, аналогично девяти представителям подвидов пчел A. m. carnica и А. т. ligustica линии С. Межгенные области tRNA-Leu(UUR)-COX2 восьми представителей пчел подвидов A. m. syriaca, A. m. lamarckii линии O содержали Р-элемент и имели больший размер – 258-264 пн (рис. 2).

Выравнивание последовательностей межгенной области tRNA-Leu(UUR)-COX2 A. m. caucasia и A. m. carpathica с образцами из Генбанка показало, что A. m. carpathica сходен с образцом A. m. carnica (GQ433623) гаплотип C2j, a A. m. caucasica сходен с образцом А. т. carnica (JF934704) гаплотип С2. Таким образом подвиды пчел A. m. caucasia и A. m. carpathica являются представителями линии С, гаплотипы С2 и С2 соответственно (рис. 2).

Несмотря на большое сходство полной мтДНК *А. т. caucasia* и *А. т. carpathica*, они различались по 34 SNP в 11 генах: ND2 (752T>C, 936G>A, 1134T>C), *COX1* (1933A>G), *COX2* (3632C>T, 3767T>C), *COX3* (5495A>T, 6040C>T), *ND3* (6488G>A), *ND5* (7408A>G, 7444T>C, 7587T>A, 7830A>C), ND4 (8660A>T, 8875A>G, 9394T>C, 9772T>C, 9789T>C, 9906C>T, 9919C>T, 9956C>T), ND6 (10539T>C, 10563T>A, 10596T>C, 10825C>T, 10902A>G), CYTB (11832T>C, 11999T>C). ND1 (12505G>A, 12620G>A, 12674C>T, 12971T>A, 13181С>Т) и 12S rRNA (14996С>Т). Позиции SNP были пронумерованы относительно референсной последовательности А. т. ligustica. Более того, сайт рестрикции XbaI, обнаруженный в гене ND5 в положении 7825-7830 относительно референсной последовательности, встречался только у подвида пчел A. m. caucasia и отсутствует у подвида пчел А. m. carpathica. Эти перечисленные маркеры мтДНК могут быть очень полезными при различении двух подвидов пчел A. m. caucasia и A. m. carpathica.

Подвиды пчел A. m. caucasia, A. m. carpathica, А. т. ligustica и А. т. syriaca между собой имеют 0.80% генетических различий и генетическую дистанцию Jukes-Cantor 0.005 (табл. 3). Было показано, что межлу подвидами насекомых диапазон генетических различий 0.80-8.00%, а генетических дистанций Jukes-Cantor 0.005-0.100 [24, 63, 64, 72, 80]. Сравниваемые образцы пчел между собой имеют генетические дистанции и различия, соответствующие различиям между подвидами насекомых. Следовательно, A. m. caucasia, A. m. carpathica, А. т. ligustica и А. т. syriaca — это действительно отдельные подвиды пчел, а не экотипы.

Матрица генетических дистанций Jukes–Cantor по полной последовательности мтДНК была использована в кластерном анализе для построения дендрограммы филогенетических отношений (табл. 3). Представитель внешней группы пчел *А. cerana* расположен на дендрограмме отдельно, как и предполагалось. На дендрограмме наблюдаются два крупных кластера. Первый кластер объ-

705

единил представителей *А. т. syriaca* (КР163643, КҮ926882), относящихся к линии О. Второй кластер объединил представителей *А. т. ligustica* (NC\_001566, КХ908209), относящихся к линии С. Таким образом, дендрограмма на основе полной мтДНК позволяет четко дифференцировать пчел подвидов линий С и О. Объединение пчел *А. т. caucasia* и *А. т. carpathica* вместе с представителями *А. т. ligustica* в одну группу доказывает их принадлежность к линии С, как и предполагалось ранее некоторыми исследователями [29, 45–47, 70] (рис. 3).

Таким образом, нами были определены нуклеотидные последовательности полной мтДНК пчел подвидов *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica* размерами 16341 и 16336 пн соответственно. МтДНК обоих подвидов содержат 13 кодирующих белок генов, 22 гена тРНК, два гена рРНК и АТ-обогащенную регуляторную область. Митохондриальные геномы *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica* содержат 43% нуклеотида А, 41% – Т, 6% – G, 10% – С нуклеотидов, обогащены АТ на 85%. Отношение tr/tv полной мтДНК было 2.05 между *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica*, что отражает процесс непрерывной адаптации к сменяющимся условиям среды обитания.

Большинство генов мтДНК (*ND2*, *COX1*, *COX2*, *ATP8*, *ATP6*, *COX3*, *ND3*, *ND6*, *CYTB* и 14 генов тРНК) расположены на тяжелой цепи, а меньшее число генов (*ND1*, *ND4*, *ND4L*, *ND5*, *SrRNA*, *LrRNA* и восемь генов тРНК) расположено на легкой цепи. Гены с наибольшим содержанием GC – *COX1* (24%), *COX2* (19.6%), *CYTB* (19.1%), *COX3* (17.2%) и *ND1* (17.2%) могут быть наиболее полиморфными и успешно использованы в филогенетических и популяционных исследованиях пчел.

По структуре межгенной области *tRNA-Leu*(UUR)—*COX2* (отсутствие элемента P) подвиды пчел A. m. caucasia и A. m. carpathica могут быть отнесены к эволюционной линии C с гаплотипами C2 и C2j соответственно. Подвиды пчел A. m. caucasia и A. m. carpathica мтДНК могут быть дифференцированы друг от друга по 34 уникальным SNP в 11 генах мтДНК и маркеру рестрикции XbaI в гене ND5.

Пчелы A. m. caucasia и A. m. carpathica различаются между собой, а также от пчел A. m. ligustica и A. m. syriaca по полной мтДНК на 0.8% и имеют генетическую дистанцию Jukes—Cantor 0.005. Данные значения генетических дистанций Jukes—Cantor вписываются в пределы внутривидовых различий между подвидами насекомых. Следовательно, A. m. caucasia, A. m. carpathica — это действительно отдельные подвиды пчел, а не экотипы.

Несмотря на проведенные исследования, популяции *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica* остаются недостаточно изученными как в России, так и странах Европы. Авторы надеются продолжить исследования пчел подвидов *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica* в пределах их естественного ареала с целью определения структуры и генетического разнообразия популяций, предотвращения внутривидовой гибридизации и сохранения уникальности их ло-кальных генофондов.

Авторы благодарны доктору Hisashi Okuyama за помощь в секвенировании.

Работа выполнена при поддержке государственного задания (регистрационный номер АААА-А21-121011990120-7) – И.Р., грантов Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) (грант № 19-54-70002 е-Asia\_t) Н.А. и программ постдокторских исследований в Инчхонском Национальном университете за 2017— 2019 годы – И.Р.

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. *Delaplane K.S., Mayer D.F.* Crop Pollination by Bees. CABI Publ., 2000. 344 p.
- Klein A.M., Vaissière B.E., Cane J.H. et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops // Proc. Royal Society B: Biol. Sciences. 2007. V. 274. № 1608. P. 303–313. https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721
- Ollerton J., Erenler H., Edwards M., Crockett R. Extinctions of aculeate pollinators in Britain and the role of large-scale agricultural changes // Science. 2014. V. 346. № 6215. P. 1360–1362. https://doi.org/10.1126/science.1257259
- Papachristoforou A., Rortais A., Bouga M. et al. Genetic characterization of the cyprian honey bee (*Apis mellifera cypria*) based on microsatellites and mitochondrial DNA polymorphisms // J. Apicultural Sci. 2013. V. 57. № 2. P. 127–134. https://doi.org/10.2478/jas-2013-0023
- 5. *Tennant E., Chadwick F.* The Bee Book. London: Dorling Kindersley Limited, 2016. 221 p.
- Ma W., Li X., Shen J. et al. Transcriptomic analysis reveals *Apis mellifera* adaptations to high temperature and high humidity // Ecotoxicol. Environm. Safety. 2019. V. 184. P. 109599. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109599
- Zhang G., St. Clair A.L., Dolezal A. et al. Honey bee (Hymenoptera: Apidea) pollen forage in a highly cultivated agroecosystem: Limited diet diversity and its relationship to virus resistance // J. Econ. Entomol. 2020. V. 113. № 3. P. 1062–1072. https://doi.org/10.1093/jee/toaa055
- 8. *Scott-Brown A., Koch H.* New directions in pollinator research: diversity, conflict and response to global change //

Emerg. Top. Life Sci. 2020. V. 4. № 1. P. 1–6. https://doi.org/10.1042/etls20200123

9. Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Петухов А.В., Николенко А.Г. Генетическая дифференциация локальных популяций темной лесной пчелы Apis mellifera mellifera L. на Урале // Генетика. 2015 Т. 51. № 7. С. 792–798.

https://doi.org/10.7868/s0016675815070048

- Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Петухов А.В., Николенко А.Г. Молекулярно-генетический анализ пяти сохранившихся резерватов темной лесной пчелы Apis mellifera mellifera Урала и Поволжья // Генетика. 2016. Т. 52. № 8. С. 931–942. https://doi.org/10.7868/s0016675816060059
- 11. *Iwasa T., Motoyama N., Ambrose J.T., Roe R.M.* Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera* // Crop Protection. 2004. V. 23. № 5. P. 371–378. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2003.08.018
- Decourtye A., Devillers J., Cluzeau S. et al. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions // Ecotoxicol. Environm. Safety. 2004. V. 57. № 3. P. 410-419.

https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2003.08.001

- 13. *Aubert M., Ball B., Fries I.* Virology and the Honey Bee. Northern Bee Books, 2008. 458 p. ISBN: 9279005863
- Genersch E., Evans J.D., Fries I. Honey bee disease overview // J. Invertebrate Pathol. 2010. V. 103. Suppl. 1. P. 2–4. https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.015
- Cornman R.S., Tarpy D.R., Chen Y. et al. Pathogen webs in collapsing honey bee colonies // PLoS One. 2012. V. 7. № 8. P. e43562. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043562
- 16. van der Zee R., Pisa L., Andonov S. et al. Managed honey bee colony losses in Canada, China, Europe, Israel and Turkey, for the winters of 2008–9 and 2009–10 // J. Apicultural Res. 2012. V. 51. № 1. P. 100–114. https://doi.org/10.3896/IBRA.1.51.1.12
- Haddad N.J., Batainh A., Saini D. et al. Evaluation of Apis mellifera syriaca Levant region honeybee conservation using comparative genome hybridization // Genetica. 2016. V. 144. № 3. P. 279–287. https://doi.org/10.1007/s10709-016-9897-y
- Franck P., Garnery L., Celebrano G. et al. Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*) // Mol. Ecol. 2000. V. 9. № 7. P. 907–921. https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2000.00945.x
- Palmer M.R., Smith D.R., Kaftanoğlu O. Turkish honeybees: Genetic variation and evidence for a fourth lineage of Apis mellifera mtDNA // J. Heredity. 2000. V. 91. № 1. P. 42–46.

https://doi.org/10.1093/jhered/91.1.42

20. Uzunov A., Kiprijanovska H., Andonov S. et al. Morphological diversity and racial determination of the honey bee (Apis mellifera L.) population in the Republic of Macedonia // J. Apicultural Res. 2009. V. 48. № 3. P. 196–203. https://doi.org/10.3896/IBRA.1.48.3.08

- Potts S.G., Biesmeijer J.C., Kremen C. et al. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers // Trends in Ecol. Evol. 2010. V. 25. № 6. P. 345–353. https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007
- 22. Oleksa A., Chybicki I., Tofilski A., Burczyk J. Nuclear and mitochondrial patterns of introgression into native dark bees (*Apis mellifera mellifera*) in Poland // J. Apicultural Res. 2011. V. 50. № 2. P. 116–129. https://doi.org/10.3896/IBRA.1.50.2.03
- Özdil F., Aytekin I., Ilhan F., Boztepe S. Genetic variation in turkish honeybees Apis mellifera anatoliaca, A. m. caucasica, A. m. meda (Hymenoptera: Apidae) inferred from RFLP analysis of three mtDNA regions (16S rDNA-COI-ND5) // Eur. J. Entomol. 2012. V. 109. № 2. P. 161–167. https://doi.org/10.14411/eje.2012.021
- 24. *Ilyasov R., Nikolenko A., Tuktarov V. et al.* Comparative analysis of mitochondrial genomes of the honey bee subspecies *A. m. caucasica* and *A. m. carpathica* and refinement of their evolutionary lineages // J. Apicultural Res. 2019. V. 58. № 4. P. 567–579. https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1622320
- 25. *Spinola S.M.* Insectorum Liguriae. Genoa, Italy: P. Cajetani, 1806. 160 p.
- 26. *Pollmann A*. Werth der verschiedenen Bienenracen und deren Varietaten, bestimmt durch Urtheile namhafter Bienenzuchter. Leipzig, Germany: Voigt, 1889. 100 p.
- 27. Foti N., Lungu M., Pelimon P. et al. Studies on the morphological characteristics and biological traits of the bee populations in Romania // The 20th Intern. Beekeeping Jubilee Congress Apimondia. Bucharest, Romania: Apimondia, 1965. V. 20. P. 182–188.
- Ivanova E.N., Bienkowska M., Petrov P.P. Allozyme polymorphism and phylogenetic relationships in Apis mellifera subspecies selectively reared in Poland and Bulgaria // Folia Biologica. 2011. V. 59. № 3–4. P. 121–126. https://doi.org/10.3409/fb59 3-4.121-126
- 29. Bouga M., Alaux C., Bienkowska M. et al. A review of methods for discrimination of honey bee populations as applied to European beekeeping // J. Apicultural Res. 2011. V. 50. № 1. P. 51–84. https://doi.org/10.3896/IBRA.1.50.1.06
- Aizen M.A., Morales C.L., Vázquez D.P. et al. When mutualism goes bad: Density-dependent impacts of introduced bees on plant reproduction // New Phytologist. 2014. V. 204. № 2. P. 322–328. https://doi.org/10.1111/nph.12924
- Ollerton J., Winfree R., Tarrant S. How many flowering plants are pollinated by animals? // Oikos. 2011. V. 120. № 3. P. 321–326. https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2010.18644.x
- 32. *Tandon V., Kumar A., Rana C.* Pollination its type, threats and role in environment conservation // Intern. J. Current Res. 2016. V. 8. № 8. P. 35744–35751.

https://www.journalcra.com/article/pollination-its-type-threats-and-role-environment-conservation.

- 33. Natsopoulou M.E., McMahon D.P., Doublet V. et al. The virulent, emerging genotype B of Deformed wing virus is closely linked to overwinter honeybee worker loss // Sci. Reports. 2017. V. 7. № 1. P. 5242. https://doi.org/10.1038/s41598-017-05596-3
- Péntek-Zakar E., Oleksa A., Borowik T., Kusza S. Population structure of honey bees in the Carpathian Basin (Hungary) confirms introgression from surrounding subspecies // Ecol. Evol. 2015. V. 5. № 23. P. 5456–5467.
  - https://doi.org/10.1002/ece3.1781
- Kukrer M., Kence M., Kence A. Genetic evidences for the impact of anthropogenic factors on honey bee diversity // bioRxiv. 2017. P. 154195. https://doi.org/10.1101/154195
- Maa T.C. An inquiry into the systematics of the tribus Apidini or honeybees (Hym.) // Treubia. 1953. V. 21. P. 525–640.
- Arias M.C., Sheppard W.S. Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (Apis mellifera L.) inferred from mitochondrial DNA sequence // Mol. Phylogenet. Evol. 1996. V. 5. № 3. P. 557–566. https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0050
- Smith D.R., Slaymaker A., Palmer M., Kaftanoğlu O. Turkish honey bees belong to the east Mediterranean mitochondrial lineage // Apidologie. 1997. V. 28. № 5. P. 269–274.

https://doi.org/10.1051/apido:19970503

- Kandemir I., Özkan A., Fuchs S. Reevaluation of honeybee (Apis mellifera) microtaxonomy: a geometric morphometric approach // Apidologie. 2011. V. 42. № 5. P. 618–627. https://doi.org/10.1007/s13592-011-0063-3
- 40. *Engel M.S.* The taxonomy of recent and fossil honey bees (Hymenoptera: Apidae; Apis) // J. Hymenoptera Res. 1999. V. 8. № 2. P. 165–196. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7\_18
- 41. *Cauia E., Usurelu D., Magdalena L.M. et al.* Preliminary researches regarding the genetic and morphometric characterization of honeybees (*A. mellifera* L.) from Romania // Lucrări Științifice Zootehnie Și Biotehnologii. 2008. V. 41. № 2. P. 278–286.
- Mărghitaş L.A., Teleky O., Dezmirean D. et al. Morphometric differences between honey bees Apis mellifera carpatica populations from Transylvanian area // Lucrări Ştiinţifice Zootehnie Şi Biotehnologii. 2008. V. 41. P. 309–315.
- Teleky O.R., Bojan C., Moise A. et al. Ecotypes differentiation within honeybee (Apis mellifera carpatica) from Transylvania // Bul. Univ. Agricultural Sci. and Veterinary Med. Cluj-Napoca Animal Sci. and Biotechnol. 2007. V. 64. № 1–2. P. 195–200. https://doi.org/10.15835/buasvmcn-asb:64:1-2:2256
- Mărghitaş L.A., Dezmirean D., Teleky O. et al. Biodiversity testing of Transylvanian honeybee populations using mtDNA markers // Bul. Univ. Agricultural Sci. and

Veterinary Med. Cluj-Napoca – Animal Sci. and Biotechnol. 2009. V. 66. P. 402–406. https://doi.org/10.15835/buasymcn-asb:66:1-2:3391

- 45. *Mărghitaş L.A., Coroian C., Dezmirean D. et al.* Genetic diversity of honeybees from Moldova (Romania) based on mtDNA analysis // Bul. Univ. Agricultural Sci. and Veterinary Med. Cluj-Napoca Animal Sci. and Biotechnol. 2010. V. 67. № 1–2. P. 396–402. https://doi.org/10.15835/buasvmcn-asb:67:1-2:5330
- 46. *Coroian C.O., Muñoz I., Schlüns E.A. et al.* Climate rather than geography separates two European honeybee subspecies // Mol. Ecol. 2014. V. 23. № 9. P. 2353–2361.

https://doi.org/10.1111/mec.12731

- 47. Syromyatnikov M.Y., Borodachev A.V., Kokina A.V., Popov V.N. A molecular method for the identification of honey bee subspecies used by beekeepers in Russia // Insects. 2018. V. 9. № 1. P. 10. https://doi.org/10.3390/insects9010010
- Ruttner F. Biogeography and Taxonomy of Honeybees. Berlin, Heidelberg: Springer, 1988. 288 p. ISBN: 978-3-642-72651-4
- 49. Adl M., Gençer H.V., Firatli Ç., Bahreini R. Morphometric characterization of Iranian (Apis mellifera meda), Central Anatolian (Apis mellifera anatoliaca) and Caucasian (Apis mellifera caucasica) honey bee populations // J. Apicultural Res. 2007. V. 46. № 4. P. 225– 231.

https://doi.org/10.3896/IBRA.1.46.4.03

- 50. Meixner M.D., Worobik M., Wilde J. et al. Apis mellifera mellifera in eastern Europe – morphometric variation and determination of its range limits // Apidologie. 2007. V. 38. № 2. P. 191–197. https://doi.org/10.1051/apido:2006068
- Cornuet J.M., Garnery L. Mitochondrial DNA variability in honeybees and its phylogeographic implications // Apidologie. 1991. V. 22. № 6. P. 627–642. https://doi.org/10.1051/apido:19910606
- Garnery L., Cornuet J.M., Solignac M. Evolutionary history of the honey bee Apis mellifera inferred from mitochondrial DNA analysis // Mol. Ecol. 1992. V. 1. № 3. P. 145–154. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1992.tb00170.x
- 53. *Koulianos S., Crozier R.H.* Mitochondrial sequence characterisation of Australian commercial and feral honeybee strains, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), in the context of the species worldwide // Austr. J. Entomol. 1997. V. 36. № 4. P. 359–364. https://doi.org/10.1111/j.1440-6055.1997.tb01486.x
- 54. *Smith D.R., Harris A., Johnson J. et al.* Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria // Proc. Natl Acad. Sci. 2002. V. 99. № 9. P. 6434–6439.
- 55. Алпатов В.В. Породы медоносной пчелы и их использование в сельском хозяйстве. МОИП, 1948. 183 с.

- 56. Bernt M., Donath A., Jühling F. et al. MITOS: Improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation // Mol. Phylogenet. Evol. 2013. V. 69. № 2. P. 313–319. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.08.023
- 57. Lowe T.M., Eddy S.R. TRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence // Nucl. Acids Res. 1996. V. 25. № 5. P. 955– 964.

https://doi.org/10.1093/nar/25.5.0955

 Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets // Mol. Biol. Evol. 2016. V. 33. № 7. P. 1870– 1874.

https://doi.org/10.1093/molbev/msw054

59. *Crozier R.H., Crozier Y.C.* The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: Complete sequence and genome organization // Genetics. 1993. V. 133. № 1. P. 97–117.

https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.1993.tb00131.x

- Kim J.S., Kim M.J., Kim I. The complete mitochondrial genome of Italian honey bees *Apis mellifera ligustica* (Hymenoptera: Apidae) // GenBank: KX908209. 2016. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KX908209.
- Skorikov A.S. Beitrage zur Kenntnis der Kenntnis der kaukasischen Honigbienenrassen // Reports of Applied Entomol. 1929. V. 4. P. 1–59.
- 62. *Haddad N.J.* Mitochondrial genome of the levant region honeybee, *Apis mellifera syriaca* (Hymenoptera: Apidae) // Mitochondrial DNA Part A: DNA Mapping, Sequencing, and Analysis. 2016. V. 27. № 6. P. 4067–4068.

https://doi.org/10.3109/19401736.2014.1003846

63. *Eimanifar A., Kimball R.T., Braun E.L. et al.* The complete mitochondrial genome of the Egyptian honey bee, *Apis mellifera lamarckii* (Insecta: Hymenoptera: Apidae) // Mitochondrial DNA Part B. 2017. V. 2. № 1. P. 270–272.

https://doi.org/10.1080/23802359.2017.1325343

- 64. Tan H.W., Liu G.H., Dong X. et al. The complete mitochondrial genome of the asiatic cavity-nesting honeybee Apis cerana (Hymenoptera: Apidae) // PLoS One. 2011. V. 6. № 8. P. e23008. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023008
- 65. *Cockerell T.D.A.* A fossil honey-bee // Entomologist. 1906. V. 40. P. 221–229.
- Jukes T.H., Cantor C.R. Evolution of protein molecules // Mammalian Protein Metabolism / Ed. Munro H.N. N.Y., USA: Acad. Press, 1969. P. 21–132.
- Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. 1987. V. 4. P. 406–425. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454
- 68. Clary D.O., Wolstenholme D.R. The mitochondrial DNA molecule of Drosophila yakuba: Nucleotide sequence, gene organization, and genetic code // J. Mol. Evol. 1985. V. 22. № 3. P. 252–271. https://doi.org/10.1007/BF02099755
- 69. Kent C.F., Minaei S., Harpur B.A., Zayed A. Recombination is associated with the evolution of genome struc-

ГЕНЕТИКА том 57 № 6 2021

ture and worker behavior in honey bees // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. № 44. P. 18012–18017. https://doi.org/10.1073/pnas.1208094109

- 70. *Özdil F, Yildiz M.A.* Molecular characterization of Turkish honey bee populations (*Apis mellifera*) inferred from mitochondrial DNA RFLP and sequence results // Apidologie. 2009. V. 40. № 5. P. 570–576. https://doi.org/10.1051/apido/2009032
- *Rand D.M., Kann L.M.* Mutation and selection at silent and replacement sites in the evolution of animal mitochondrial DNA // Genetica. 1998. V. 102–103. P. 393–407.

https://doi.org/10.1007/978-94-011-5210-5\_32

- Ilyasov R.A., Park J., Takahashi J., Kwon H.W. Phylogenetic uniqueness of honeybee apis cerana from the Korean peninsula inferred from the mitochondrial, nuclear, and morphological data // J. Apicultural Sci. 2018. V. 62. № 2. P. 189–214. https://doi.org/10.2478/JAS-2018-0018
- 73. Okuyama H., Tingek S., Takahashi J.I. The complete mitochondrial genome of the cavity-nesting honeybee, *Apis cerana* (Insecta: Hymenoptera: Apidae) from Borneo // Mitochondrial DNA Part B: Resources. 2017. V. 2. № 2. P. 475–476.
  - https://doi.org/10.1080/23802359.2017.1361344
- 74. DeSalle R., Freedman T., Prager E.M., Wilson A.C. Tempo and mode of sequence evolution in mitochondrial DNA of Hawaiian Drosophila // J. Mol. Evol. 1987. V. 26. № 1–2. P. 157–164. https://doi.org/10.1007/BF02111289
- 75. *Tian D., Wang Q., Zhang P. et al.* Single-nucleotide mutation rate increases close to insertions/deletions in eukaryotes // Nature. 2008. V. 455. № 7209. P. 105–108. https://doi.org/10.1038/nature07175
- 76. McDonald M.J., Wang W.C., Huang H.D., Leu J.Y. Clusters of nucleotide substitutions and insertion/deletion mutations are associated with repeat sequences // PLoS Biology. 2011. V. 9. № 6. P. e1000622. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000622
- 77. Koren A., Polak P., Nemesh J. et al. Differential relationship of DNA replication timing to different forms of human mutation and variation // Am. J. Hum. Genet. 2012. V. 91. № 6. P. 1033–1040. https://doi.org/10.1016/i.aihg.2012.10.018
- Keightley P.D., Trivedi U., Thomson M. et al. Analysis of the genome sequences of three Drosophila melanogaster spontaneous mutation accumulation lines // Genome Res. 2009. V. 19. № 7. P. 1195–1201. https://doi.org/10.1101/gr.091231.109
- 79. Seplyarskiy V.B., Kharchenko P., Kondrashov A.S., Bazykin G.A. Heterogeneity of the transition/transversion ratio in drosophila and hominidae genomes // Mol. Biol. Evol. 2012. V. 29. № 8. P. 1943–1955. https://doi.org/10.1093/molbev/mss071
- Han T., Lee W., Lee S. et al. Reassessment of species diversity of the subfamily Denticollinae (Coleoptera: Elateridae) through DNA barcoding // PLoS One. 2016. V. 11. № 2. P. e0148602. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148602

# Phylogenetic Relationships among Honey Bee Subspecies *Apis mellifera caucasia* and *Apis mellifera carpathica* according to the Sequences of the Mitochondrial Genome

R. A. Ilyasov<sup>a, b, \*</sup>, G. Y. Han<sup>b</sup>, M. L. Lee<sup>b</sup>, K. W. Kim<sup>b</sup>,

J. H. Park<sup>b, c</sup>, J. I. Takahashi<sup>d</sup>, H. W. Kwon<sup>b, \*\*</sup>, and A. G. Nikolenko<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ufa Federal Research Center, Institute of Biochemistry and Genetics, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia <sup>b</sup>Division of Life Sciences, Major of Biological Sciences, Incheon National University, Convergence Research Center

for Insect Vectors, Incheon National University, Incheon, 22012 Korea

<sup>c</sup>Bioinformatics Company 3BIGS CO.LTD, Hwaseong-si, 18454 Korea

<sup>d</sup>Faculty of Life Sciences, Kyoto Sangyo University, Kyoto, 603-8555 Japan

\*e-mail: apismell@hotmail.com

\*\*e-mail: hwkwon@inu.ac.kr

The sequences of the complete mitochondrial genome of the honey bee *Apis mellifera* L. subspecies *Apis mellifera caucasia* Pollmann, 1889 (AP018404, 16341 bp) and *Apis mellifera carpathica* Foti et al., 1965 (AP018403, 16336 bp) were first sequenced. Mitochondrial DNA (mtDNA) of both subspecies contains 13 protein-coding genes, 22 tRNA genes, 2 rRNA genes and 1 AT-rich regulatory region. The ratio of transitions to transversions tr/tv in complete mtDNA between *A. m. caucasia* and *A. m. carpathica* was 2.05, which characterizes the formation of adaptations to changing environmental conditions. Genes with the highest GC content – *COX1* (24%), *COX2* (19.6%), *CYTB* (19.1%), *COX3* (17.2%) and *ND1* (17.2%) can be highly polymorphic and used in phylogenetic and population studies of bees. Most of mtDNA genes for both subspecies are located on the heavy chain (9 protein coding genes and 14 tRNA genes) and fewer genes (4 protein coding genes, 2 rRNA genes) are located on the light chain. Cluster analysis of the complete mtDNA sequence and assessment of the structure of the *tRNA-Leu*(UUR)–*COX2* intergenic region with a single Q element of 192 bp showed that both subspecies *A. m. caucasia* and *A. m. carpathica* are representatives of the line C with haplotypes C2 and C2j, respectively. Subspecies of the honey bee *A. m. caucasia* and *A. m. carpathica* can be differentiated from each other by 34 unique SNPs in 11 mtDNA genes and the *XbaI* restriction marker in the *ND5* gene. These genetic markers can contribute to the preservation of purebred gene pools of honey bee subspecies *A. m. caucasia* and *A. m. caucasia*

**Keywords:** *Apis mellifera*, honeybee subspecies, *A. m. caucasia*, *A. m. carpathica*, mitochondrial genome, mtDNA, haplotypes, conservation genetics.

# ГЕНЕТИКА ЖИВОТНЫХ

УДК 599.322.2:575.174(479)

# ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПОПУЛЯЦИЙ ГОРНОГО СУСЛИКА (Spermophilus musicus Menetries, 1832; Sciuridae, Rodentia) – ОСНОВНОГО НОСИТЕЛЯ ЧУМЫ НА ТЕРРИТОРИИ ЦЕНТРАЛЬНО-КАВКАЗСКОГО ВЫСОКОГОРНОГО ПРИРОДНОГО ОЧАГА

© 2021 г. Е. С. Котенев<sup>1,</sup> \*, Е. А. Котенева<sup>1</sup>, Л. А. Кот<sup>1</sup>, А. Ю. Жильцова<sup>1</sup>, Д. В. Сердюкова<sup>1</sup>, В. В. Сердюков<sup>1</sup>, Н. Х. Пшихачев<sup>2</sup>, К. Д. Гергоков<sup>2</sup>, А. Н. Куличенко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт, Ставрополь, 355035 Россия <sup>2</sup>Кабардино-Балкарская противочумная станция, Нальчик, 360017 Россия \*e-mail: egor\_kotenev@mail.ru

Поступила в редакцию 10.08.2020 г. После доработки 16.10.2020 г. Принята к публикации 30.10.2020 г.

Ареал горного суслика *Spermophilus musicus* простирается в Приэльбрусье и ограничен бассейнами рек Кубань и Черек-Безенгийский, захватывая территорию Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы. Изучение генетического разнообразия, выполненное по результатам исследования 64 образцов, позволило выявить 14 гаплотипов, сгруппированных в две гаплогруппы. Анализ контрольного региона митохондриальной ДНК позволил установить генетическую дифференциацию между различными поселениями суслика, разделив их на "высокогорные" и "горностепные". Наличие значительного генетического разнообразия вероятно связано с длительным межэпизоотическим периодом, наблюдаемым в очаге.

*Ключевые слова:* горный суслик, мтДНК, С-регион, генетический полиморфизм популяций, природные очаги чумы.

DOI: 10.31857/S0016675821060059

Ареал горного суслика Spermophilus musicus (Menetries, 1832) простирается от верховья р. Кубань до р. Черек-Безенгийский. При картографировании, проведенном в 1973–1976 гг., выявлено 234 поселения обшей плошалью около 97.5 тыс. га. Площадь ареала суслика по крайним поселениям составляет более 331.1 тыс. га, в пределах высот 1150-3200 м н.у.м. [1]. Вид повсеместно представлен отдельными поселениями, разобщенными массивами хвойных и лиственных лесов, реками, участками скал, осыпей и ледниками. Распределение поселений по отдельным участкам не равномерно. Наибольшая плошаль их отмечена в центральной части ареала и на западе (плато Бечасын, верховье р. Кубань). В восточной части ареала, в долинах рек Чегем и Черек, поселения в большинстве случаев небольшие [2].

Существенное значение в понимании популяционного разнообразия имеет восстановление истории расселения и обособления отдельных популяций сусликов. Сочетание возможности существования нескольких волн заселения Приэльбрусья сусликами с равнин и длительной изоляции отдельных участков ареала определяет сложный полиморфизм на популяционном уровне [3].

Ареал горного суслика в Приэльбрусье определяет границы Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы. Периодически или постоянно текущие среди сусликов эпизоотии составляют весьма жесткий фактор естественного отбора. Величина давления этого фактора определяется признаком инфекционной чувствительности к чуме, различающимся у разных популяций. Эти различия детерминированы рядом особенностей, которые обусловливают конституциональные, врожденные механизмы защиты организма [4].

Для установления генетических детерминант необходимо изучить генетическую структуру популяций горного суслика в пределах Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы. Одним из наиболее часто используемых методов является типирование по фрагменту митохондриальной ДНК (мтДНК).

Таким образом, цель нашей работы — изучение генетической дифференциации популяций (поселений) горного суслика в пределах Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы. Для достижения этой цели основной задачей было картографирование поселений животных и определение генетической структуры популяций (поселений) изучаемого вида.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В настоящей работе исследованы 64 образца (селезенки) горного суслика, собранных на территории Кабардино-Балкарской Республики и Карачаево-Черкесской Республики в 2017—2018 гг. Образцы были собраны из 29 поселений (локальных популяций), которые представляют собой стационарные точки сбора материала при плановом ежегодном обследовании территории Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы.

Места сбора образцов, коллекционные номера указаны в табл. 1 и на рис. 1.

Выделение ДНК проводили с применением набора PureLink Genomic DNA mini Kit, Thermo Fisher Scientific, согласно инструкции производителя.

Для анализа был выбран фрагмент С области мтДНК размером 407 пн, расположенный за геном тРНК-Pro. Амплификацию анализируемого фрагмента осуществляли с использованием праймеров MDL1 5'-TCCACCTTCAACTCCCAAAGC-3' и MDL2R 5'-GGTAGGGGGATAGTCATTTGG-3', указанных в работе [5]. Для приготовления реакционной смеси применялся набор ScreenMix-HS (Евроген), согласно инструкции производителя. Объем реакционной смеси составлял 25 мкл. Амплификацию проводили при следующих условиях: предварительная денатурация 95°C – 5 мин, в последующем 35 циклов 95°С – 30 с, 60°С – 30 с, 72°С – 40 с, заключительная элонгация 72°С – 7 мин. Визуализацию полученного фрагмента осуществляли в 2.5%-ном агарозном геле. Очистку ПЦР-продукта из реакционной смеси выполняли с использованием набора Cleanup Standard (Евроген). Реакцию секвенирования проводили набором BigDye Terminator Kit v.3.1 (Applied Biosystems) и праймерами для амплификации. Очистку продукта секвенирования проводили набором Centri-Sep (Princeton Separations). Анализ продукта осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI 3500 (Applied Biosystems).

Выравнивание полученных нуклеотидных последовательностей, построение филогенетических деревьев и анализ уровня генетического родства осуществляли в программе Mega 7.0. Топологию филогенетических деревьев подтверждали с использованием метода максимального правдоподобия (Maximum likelihood), по алгоритму Kimura-2. Дифференциацию гаплотипов, расчет генетической дистанции между популяциями (поселениями) и внутри популяций выполняли в программе Arlequin v 3.5.

Анализ молекулярной эволюции осуществляли с использованием методов Байесовой филогении в программном обеспечении BEAST 2.0. Реконструкцию процесса пространственно-временного распространения проводили на основании анализа дискретной филогеографии. Выбор эволюшионной модели нуклеотидных замен, наиболее подходящей для анализируемого набора нуклеотилных последовательностей. проводили с использованием программы jModeltest v 2.1.10. Расчет проводился с использованием следующих параметров: модель нуклеотидных замен HKY (-lnL = 619.99BIC = 2021.13), модель молекулярных часов Strick Clock, демографическая модель популяции Coalescent Constant Population, вычисления проводили для 300000000 генераций с шагом 10000. Значения ESS, рассчитанные в Tracer v 1.6 (параметр burn-in 10%), для каждого параметра превышали 800. Построение и аннотацию MCC дерева выполняли в программе Tree Annotator 2.0 (параметр burn-in 10%), для визуализации дерева использовали Fig Tree v 1.4.3.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Из 64 проанализированных последовательностей фрагмента С-региона мтДНК размером 407 пн, выделено 14 гаплотипов (h1-h14) (табл. 2). Всего выявлено 13 SNP. Все выявленные нуклеотидные замены относятся к транзициям (С $\leftrightarrow$ T – 10 SNP; A $\leftrightarrow$ G – 3 SNP).

При построении дендрограммы в программе Mega 7.0 (рис. 2) с использованием метода максимального правдоподобия (Maximum likelihood) выявленные гаплотипы разделились на две гаплогруппы. Дендрограмма отражает тенденцию дифференциации гаплогрупп, связанную с географической (пространственной) структурированностью вида. Прикорневое деление на две основные ветви, соответствующее двум гаплогруппам, обусловлено наличием SNP (C↔T) в позиции 132. В гаплогруппу 1 (SNP - T) вошли гаплотипы h1, h3, h4, h13 и h14. Гаплотипы h13 и h14 отличаются от исходных h1 и h3 вариабельностью нуклеотида в позиции 230 (для h13) и 284 (для h14), поэтому на филогенетическом дереве они входят в состав ветвей, формирующихся за счет гаплотипов h1 и h3.

Гаплогруппа 2 (SNP – C) сформирована следующими гаплотипами: h2, h5, h6, h7, h8, h9, h10, h11, h12. Гаплогруппа 1 менее разнообразна по числу входящих в нее гаплотипов, деление на которые происходит за счет трех SNP (в позициях 303, 313, 316) и двух возможных SNP (позиции 230, 284), которые в дальнейшем вероятно сформируют самостоятельные гаплотипы h13 и h14. Гаплогруппа 2 более структурирована по тополо-

	the state of the s			, ,	· I · · · · ·	
№	Поселение	Широта	Долгота	п	Образцы	Гаплотипы
1	Нижний Калакол	43.47	43.06	2	SU_2017_4.1B, SU_2017_4.2B	h1
2	Калакол	43.47	43.06	2	SU_2017_6.1B, SU_2017_6.2B	hl
3	Верхний Калакол	43.46	43.06	2	SU_2017_7.2B, SU_2017_7.3B	h1
4	Старый Былым	43.45	43.05	8	SU_2017_14.1B, SU_2017_14.2B, SU_2017_14.3B, SU_2018_5.1B, SU_2018_5.2B, SU_2018_5.3B, SU_2018_5.4B, SU_2018_5.5B	hl
5	Былым	43.45	43.03	1	SU_2017_15.1B	h13
6	Ущелье 3	43.43	43.03	1	SU_2018_1.1B	h1
7	Нижний Мыстыкам	43.45	43.02	2	SU_2017_5.1B, SU_2017_5.2B	h1
8	Былым-огороды	43.45	43.01	2	SU_2017_11.1B, SU_2017_11.2B	h1
9	Аммональный склад	43.44	43.01	2	SU_2017_13.3B, SU_2017_13.4B	h1
10	Пёрк	43.43	42.97	4	SU_2017_2.2B, SU_2018_6.1B, SU_2018_6.3B, SU_2018_6.4B	h1/h3
11	Тырныауз ФЗО	43.41	42.92	2	SU_2017_8.1B, SU_2017_8.3B	h3
12	Тырныауз ЖБИ	43.40	42.92	4	SU_2017_12.1B, SU_2017_12.2B, SU_2017_12.3B, SU_2018_4.4B	h3/h14
13	Комсомольское озеро	43.32	42.79	3	SU_2018_3.1B, SU_2018_3.2B, SU_2018_3.4B	h2
14	Кюллюм	43.47	43.05	2	SU_2017_9.1B, SU_2017_9.2B	h4
15	Верхний Алмалы	43.47	43.01	2	SU_2017_3.1B, SU_2017_3.2B	h4
16	Нижний Алмалы	43.45	43.01	1	SU_2017_1.2B	h1
17	Кырбаши	43.45	42.98	2	SU_2017_17.2B, SU_2017_17.3B	h4
18	Гижгит-2, 10 км	43.46	42.98	2	SU_2017_10.1B, SU_2017_10.2B	h4
19	Гижгит-2, 5 км	43.47	42.99	2	SU_2018_2.3B, SU_2018_2.5B	h4

Таблица 1. Характеристика поселений горного суслика и исследованного материала

N⁰	Поселение	Широта	Долгота	п	Образцы	Гаплотипы
20	Гижгит-1	43.47	42.96	3	SU_2018_7.2B, SU_2018_7.3B, SU_2018_7.6B	h4
21	Джаурген	43.42	42.84	1	SU_2017_8.3E	h6
22	Канжол	43.53	42.70	1	SU_2017_18.1B	h10
23	Кыртык	43.36	42.68	3	SU_2017_16.2B, SU_2017_16.3B, SU_2017_16.4B	h11/h12
24	Шауком	43.42	42.67	1	SU_2017_2.3E	h6
25	Гитче-Талыкол	43.46	42.56	1	SU_2017_3.3E	h7
26	Кызылкол	43.46	42.53	1	SU_2017_6.1E	h8
27	Арбакол	43.71	42.51	3	SU_2017_5.1X, SU_2017_5.2X, SU_2017_5.3X	h9
28	Арбакол	43.70	42.49	2	SU_2017_1.1X, SU_2017_1.2X	h5
29	Урусбикол	43.70	42.50	2	SU_2017_7.2X, SU_2017_7.3X	h9

Таблица 1. Окончание

Примечание. *п* – число исследованных образцов из поселения.

Гондотин							SNP						
таплотип	132	206	209	230	280	284	287	303	313	315	316	317	318
h6	С	Т	Т	С	Α	Т	Т	Т	G	Т	Α	С	С
h4	Т	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
h1	Т	_	—	—	—	_	_	_	_	_	G	_	—
h13	Т	_	_	Y	—	_	_	_	_	_	G	_	—
h3	Т	_	_	_	_	_	_	С	Α	_	_	_	_
h14	Т	_	_	—	—	Y	_	С	Α	_	_	_	—
h7	_	_	_	Т	—	_	_	_	_	_	_	_	—
h9	_	_	_	Т	G	_	_	_	_	_	_	_	_
h5	_	_	_	Т	G	_	_	_	_	_	_	_	Т
h8	_	_	_	Т	G	_	_	_	_	_	_	Т	—
h12	_	_	_	Т	_	_	_	_	_	_	_	Т	_
h11	_	_	_	Т	—	_	С	_	_	_	_	Т	—
h10	_	C	—	Т	—	—	—	—	—	C	—	—	—
h2	—	—	C	—	—	—	—	—	—	—	—	Т	—

Таблица 2. Характеристика гаплотипов, выявленных при исследовании фрагмента С-региона мтДНК горного суслика

гии входящих в ее состав ветвей и большему количеству гаплотипов.

Гаплотипы h1, h3, h4, h13 и h14, входящие в гаплогруппу 1, располагаются компактно, в пре-

делах высот 1100—1700 м н.у.м., относящихся к ландшафтному поясу — горная степь. Пространственное распределение гаплотипов h1 и h4 обусловлено наличием фактора природной изоляции







Рис. 2. Филогенетическое дерево по фрагменту С-региона мтДНК (407 пн), построенное методом максимального правдоподобия (Maximum likelihood), алгоритм Kimura-2. Маркерами отмечены гаплогруппа 1 (синий) и гаплогруппа 2 (красный).

между частями ареала (р. Баксан). Данные гаплотипы составляют основу гаплогруппы 1. На левом берегу реки распространен гаплотип h4, в пределах высот 1200-1700 м н.у.м., на правобережье распространен гаплотип h1, в пределах высот 1100-1200 м н.у.м. Наличие водной преграды не обеспечивает полной изоляции между данными гаплотипами, отмечается частичное проникновение особей с гаплотипом h1 на левый берег реки, ввиду наличия моста возле населенного пункта Былым. Гаплотипы h1 и h4 близки между собой и отличаются друг от друга только по SNP ( $A \leftrightarrow G$ ) в позиции 316. Гаплотип h13 расположен в боковой части поселения горного суслика, с гаплотипом h1. Отмечается наличие неоднородности в данном локальном поселении. проявляющееся в вариабельности нуклеотида (Y) в позиции 230. Гаплотип h3 распространен вдоль русла, по обеим сторонам р. Баксан, но выше по течению. Этот гаплотип отличается от гаплотипов h1 и h4 наличием однонуклеотидных замен в позициях 303 ( $T\leftrightarrow C$ ) и 313  $(G \leftrightarrow A)$  и на дендрограмме (рис. 3) образует отдельную ветвь с примыкающим к ней гаплотипом h14.

На правом берегу располагается гаплотип h14, для которого также отмечена неоднородность (Y) в позиции 284, с гаплотипом h3.

Гаплотипы h2, h5, h6, h7, h8, h9, h10, h11, h12, входящие в гаплогруппу 2, занимают более обширный ареал, располагаясь в субальпийской и альпийской ландшафтных зонах, в пределах высот 1700–2800 м н.у.м. Следует отметить, что образцы с гаплотипом h6 встречаются в точках, расположенных на значительном удалении друг от друга.

Для выяснения связи генетической структуры популяции горного суслика, представленной отдельными поселениями, с географическим распространением особей было проведено попарное сравнение поселений на основе критерия F<sub>ST</sub>. Как показывает матрица значений F<sub>ST</sub>, поселения 1–9 практически не различаются между собой и имеют одинаковый гаплотип hl. Таким образом, можно сказать, что эти поселения являются частью одной популяции, занимающей участок горной степи по правому берегу р. Баксан. Сюда же согласно данным генетического анализа, подтвержденного матрицей сравнения  $F_{ST}$ , относится поселение № 16 (Нижний Алмалы). Аналогично достаточно однородную группу образуют поселения № 14-20 (за исключением поселения № 16), которые занимают левый берег р. Баксан. Между остальными поселениями различия в генетической структуре значительно выше, что подтверждается матрицей значений F<sub>ST</sub>. Наиболее различающимися по своей генетической структуре являются поселения № 21–29, которые располагаются изолированно и на больших расстояниях друг от друга в

ГЕНЕТИКА том 57 № 6 2021

альпийском и субальпийском поясах Центрально-Кавказского высокогорного очага чумы.

Нами было подсчитано число различий внутри и между поселениями (рис. 4). В двух поселениях — 10 и 23 выявлены достоверные различия между особями внутри одного поселения, что может указывать на неполную изоляцию данных поселений, в связи с чем в них наблюдается приток/обмен генетическим материалом.

Таким образом, на основании исследований изолированности поселений и генетической структуры входящих в них особей, в соответствии с выявленными гаплотипами, нами выделены 14 популяций горного суслика.

# ОБСУЖДЕНИЕ

Рассматривая чуму как фактор естественного отбора, при анализе распространения и представленности гаплотипов, следует иметь в виду неравноценность и неоднородность в эпизоотическом отношении территории горных очагов чумы. Так, на высокогорных участках природных очагов (в субальпийском и альпийском высотных поясах) индекс эпизоотичности, свидетельствующий о частоте заболевания чумой животных, значительно выше, чем на участках, относящихся к горной степи [4].

Ранее точки сбора материала характеризовались высокой частотой эпизоотий, что позволило нам ожидать относительно небольшого уровня генетического разнообразия, так как под селективным действием эпизоотий в популяциях (отдельных поселениях) преимущество в размножении получат резистентные к чуме особи. Возможно, большое число выявленных нами гаплотипов является результатом длительного межэпизоотического периода.

Характерной особенностью высокогорных природных очагов чумы является прерывистость поселений носителей, связанная с неоднородностью и мозаичностью ландшафта. Эта прерывистость находит свое отражение в генетической структуре популяции горного суслика в разных частях Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы, в зависимости от высотной поясности. В пределах части горной степи, где наблюдаются более благоприятные условия для жизнедеятельности по сравнению с высокогорной частью (субальпийская и альпийская зона). генетическая структура поселений более однородна. Различия между гаплотипами, образующими гаплогруппу 1, минимальны и не превышают двух нуклеотидов. В высокогорной части очага природно-климатические условия более суровы, изоляция между поселениями обеспечивается наличием непреодолимых физических преград, поэтому



ГЕНЕТИКА


Рис. 4. Среднее число парных различий внутри и между поселениями горного суслика.

"высокогорная" гаплогруппа 2 более разнообразна по своему составу.

При анализе филогенетических взаимоотношений методом Байесовой филогении (рис. 3) видно, что разделение популяции на две обособленные ветви, впоследствии оформившиеся в гаплогруппы 1 (Т) и 2 (С), произошло в начале XIX в. и в течение длительного периода (почти 100 лет) каждая из этих ветвей существовала в виде мономорфной генетической группы. Деление на более мелкие ветви, соответствующие современным гаплотипам, началось в каждой группе в разные сроки, с интервалом 10–20 лет в начале XX в. В гаплогруппе 2 (С) – "высокогорной" формирование современных гаплотипов началось несколько

ГЕНЕТИКА том 57 № 6 2021

раньше, в конце XIX в., и продолжалось достаточно интенсивно на протяжении всего ХХ в. В то же время гаплогруппа 1 (T), разделившись в начале ХХ в. на две большие подгруппы, впоследствии давшие начало гаплотипам h1, h3, h4, существовала в стабильном состоянии до 60-70 гг. XX в., когда началось бурное разделение достаточно однородной в генетическом отношении популяции на отдельные гаплотипы. Совершенно очевидно, что на гаплогруппу 1 (Т) – "горностепную" в значительно большей степени оказывал влияние антропогенный фактор, чем на "высокогорную" гаплогруппу 2 (С). В то же время именно в "высокогорной" части очага были отмечены наиболее масштабные и длительные эпизоотии чумы, которая выступила в качестве селективного фактора естественного отбора. Влияние антропогенного фактора на высокогорную популяцию суслика значительно менее выражено. Возможно, это связано с активным проведением в 70—80 гг. противоэпидемических мероприятий, направленных на оздоровление Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы, а не с хозяйственной деятельностью человека.

Полученные нами результаты изучения фрагмента С-региона мтДНК свидетельствуют о влиянии фактора изоляции (пространственной и высотной) отдельных поселений на генетическую структуру популяции горного суслика в целом в данном ареале.

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. Григорьев М.П. Анализ популяционной структуры носителей в Центрально-Кавказском природном очаге чумы: Дис. ... канд. биол. наук. Ставрополь: Ставропольский н.-и. противочумный институт, 1998. 124 с.
- Голубев П.Д., Варшавский С.Н., Акиев А.К., Шилов М.Н. Некоторые вопросы истории ареала и возраста поселений горного суслика // Экология, методы изучения и организация охраны млекопитающих горных областей. Свердловск, 1977. С. 30–31.
- Гниловская Ю.Г. Об истории формирования ареала горного суслика в Приэльбрусье // Особо опасные инфекции на Кавказе. Ставрополь, 1987. С. 288– 290.
- 4. Дятлов А.И. Эволюционные аспекты природной очаговости чумы. Ставропольское кн. изд-во, 1989. 197 с.
- 5. Ермаков О.А., Симонов Е.П., Сурин В.Л., Титов С.В. Внутривидовой полиморфизм контрольного региона митохондриальной ДНК и филогеография малого суслика (Spermophilus pygmaeus, Sciuridae, Rodentia) // Генетика. 2018. Т. 54. № 11. С. 1316–1326. https://doi.org/10.1134/S0016675818110048

# Genetic Diversity of Populations of Mountain Ground Squirrel (*Spermophilus musicus* Menetries, Sciuridae, Rodentia), the Main Carrier of the Plague, in the Territory of the Central Caucasian High-Mountain Natural Focus

E. S. Kotenev<sup>*a*</sup>, \*, E. A. Koteneva<sup>*a*</sup>, L. A. Kot<sup>*a*</sup>, A. Yu. Zhiltsova<sup>*a*</sup>, D. V. Serdyukova<sup>*a*</sup>, V. V. Serdyukov<sup>*a*</sup>, N. Kh. Pshikhachev<sup>*b*</sup>, K. D. Gergokov<sup>*b*</sup>, <sup>†</sup>, and A. N. Kulichenko<sup>*a*</sup>

<sup>a</sup> Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, 355035 Russia <sup>b</sup> Kabardino-Balkarian Anti-Plague Station, Nalchik, 360017 Russia \*e-mail: egor kotenev@mail.ru

The range of the mountain ground squirrel *Spermophilus musicus* extends in the Elbrus region and is limited by the basins of the Kuban and Cherek-Bezengi rivers, capturing the territory of the Central Caucasian high-mountain natural plague focus. The study of genetic diversity, carried out according to the results of the study of 64 samples, made it possible to identify 14 haplotypes, grouped into two haplogroups. Analysis of the control region of mitochondrial DNA made it possible to establish genetic differentiation between its various settlements, dividing them into "high-mountainous" and "mountain-steppe" ones. The presence of significant genetic diversity is probably associated with the long interepizootic period observed in the outbreak.

**Keywords:** mountain ground squirrel, mtDNA, C-region, genetic polymorphism of populations, natural foci of plague.

## ГЕНЕТИКА ЧЕЛОВЕКА

УДК 616-006.66

# ВАЖНОСТЬ НАКОПЛЕНИЯ ДАННЫХ ЭКЗОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ РОССИЙСКИХ БОЛЬНЫХ ПРИ ПОИСКЕ ПРИЧИНЫ НАСЛЕДСТВЕННОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ В СЕМЬЕ НА ПРИМЕРЕ АДЕНОМАТОЗНОГО ПОЛИПОЗА

© 2021 г. А. С. Цуканов<sup>1,</sup> \*, А. А. Баринов<sup>1</sup>, В. П. Шубин<sup>1</sup>, А. Н. Логинова<sup>1</sup>, Т. А. Савельева<sup>1</sup>, Д. Ю. Пикунов<sup>1</sup>, А. М. Кузьминов<sup>1</sup>, В. Н. Кашников<sup>1</sup>, А. В. Поляков<sup>2</sup>, Ю. А. Шелыгин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национальный медицинский исследовательский центр колопроктологии им. А.Н. Рыжих, Москва, 123423 Россия <sup>2</sup>Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова, Москва, 115522 Россия

> \*e-mail: Tsukanov81@rambler.ru Поступила в редакцию 11.08.2020 г. После доработки 14.09.2020 г. Принята к публикации 01.10.2020 г.

Исследовали образцы ДНК шести членов одной семьи (три пациента с аденоматозным полипозом толстой кишки, двое здоровых и один человек с невыясненным статусом заболевания) методом полноэкзомного секвенирования. Предварительно у одной пациентки проводилась ДНК-диагностика генов АРС/МиtYH методом секвенирования по Сэнгеру, при которой герминальных мутаций найдено не было. В результате биоинформатического анализа данных у четырех кровных родственников (трое больных и один человек с неизвестным статусом болезни) была выявлена мутация в гене NSUN7, который ранее не описывался как ассоциированный с развитием аденоматозного полипоза толстой кишки. Однако в дальнейшем выяснилось, что популяционная частота этого варианта в данном гене именно в России существенно выше, чем встречаемость самого заболевания. При повторном биоинформатическом анализе только у трех больных выявлена ранее не описанная гетерозиготная делеция, включающая экзоны 2-16 гена APC, а также участки генов SRP19 и REEP5, которая впоследствии подтверждена методом мультиплексной проба-зависимой лигазной реакции с последующей амплификацией (MLPA, Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification). Проведенное молекулярно-генетическое исследование продемонстрировало необходимость создания и постоянного пополнения отечественной базы данных вариантами, найденными при высокопроизводительном секвенировании. Также установлена целесообразность выполнения поиска больших делеций в гене APC у российских пациентов с аденоматозным полипозом толстой кишки.

*Ключевые слова:* аденоматозный полипоз, полноэкзомное секвенирование, ген *NSUN7*, ген *APC*, большая делеция.

DOI: 10.31857/S0016675821060126

Аденоматозные полипозные синдромы представляют собой целую группу наследственных заболеваний, проявляющихся развитием десятков, сотен, а иногда и тысяч полипов в толстой кишке пациента, вероятность злокачественной трансформации которых может достигать 100% в случае несвоевременного выполнения хирургического вмешательства. Наиболее частой причиной семейного аденоматоза толстой кишки являются гетерозиготные герминальные мутации в гене АРС [1, 2]. Данный ген локализуется в регионе 5022.2 и включает 16 экзонов, 15 из которых кодируют белок. Основную роль продукт гена АРС выполняет в сигнальном WNT-пути [3]. Мутации в гене АРС выявляются примерно у 70-80% пациентов, у которых к возрасту 40-45 лет в толстой кишке

развивается более 100 аденоматозных полипов, что является классической формой семейного аденоматоза толстой кишки (FAP) [4, 5]. Как правило мутации у такого рода больных локализуются на участке 157—1595 кодонов (за исключением экзона 9) [6]. Если количество полипов у больного менее 100, то у пациента диагностируется ослабленная форма заболевания (AFAP), при которой мутации в гене *APC* целесообразно искать в области до 157-го кодона или после 1595-го кодона, а также в экзоне 9, однако вероятность их обнаружения составляет только 20% [7, 8].

В 2002 г. поиск других генов привел к открытию гена *MutYH*, который располагается в участке 1р34.1 и включает 16 кодирующих экзонов. Продукт этого гена принимает участие в эксцизион-

ной репарации. К развитию полипоза приводят биаллельные мутации этого гена [9]. При этом клиническая картина *MutYH*-ассоциированного полипоза, как правило, сходна с ослабленной формой аденоматозного полипоза [10, 11]. Наиболее часто мутации у больных аденоматозным полипозом выявляются в генах *APC* и *MutYH*, однако описаны случаи обнаружения наследственных мутаций и в других генах.

В 2015 г. у семи родственников, пораженных аденоматозным полипозом, из трех различных семей были также выявлены биаллельные мутации в гене *NTHL1*, участвующем в эксцизионной репарации ДНК [12]. Данный ген локализован в регионе 16р13.3 и включает шесть кодирующих экзонов. В настоящий момент в мире описано около 20 семей с *NTHL1*-ассоциированным полипозом. Как правило, у пациентов с биаллельными мутациями в гене *NTHL1* в толстой кишке выявляется до 100 аденоматозных полипов [13].

В 2013 г. С. Palles с соавт. описали наследственные гетерозиготные мутации в генах *POLE* и *POLD1* у пациентов с полипами и случаями колоректального рака [14]. Гены *POLE* и *POLD1* располагаются в участках 12q24.33 и 19q13.33 и включают 49 и 27 экзонов соответственно. Их продукты являются участниками системы репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (mismatch repair, MMR). Однако в настоящее время накоплено недостаточно данных для того, чтобы можно было определенно говорить о преимущественном количестве полипов при PP-ассоциированном полипозе (Polymerase proofreading-associated polyposis) [15].

Необходимо отметить, что мутации в указанных генах не объясняют всех случаев аденоматозного полипоза у пациентов, поэтому нет сомнений, что с развитием и внедрением в клиническую практику технологии полноэкзомного (полногеномного) секвенирования в ближайшее время будут открыты и другие гены. В настоящей статье описывается поиск герминальных мутаций в экзонных областях генома человека.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### Члены семьи О.

В марте 2019 г. были собраны образцы крови 6 членов семьи О., в которой имелось большое количество родственников, пораженных семейным аденоматозом толстой кишки и колоректальным раком (рис. 1). У трех родственников диагностировано заболевание, у одного из которых нами ранее была проведена ДНК-диагностика генов *АРС* и *МиYH* методом секвенирования по Сэнгеру (мутаций не выявлено) [5]; два члена семьи были здоровы; у одного родственника статус заболевания известен не был, поскольку он еще не выполнял эндоскопического обследования толстой кишки. От всех членов семьи, вовлеченных в данную работу, было получено информированное согласие.

#### Выделение ДНК

ДНК из лейкоцитов венозной крови выделяли с помощью набора QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Германия) из 200 мкл цельной крови согласно протоколу производителя, оценку количества ДНК проводили с помощью прибора DeNovix QFX (Denovix, США) и наборов для измерения ДНК Qubit dsDNA BR Assay Kit (ThermoFisher, США).

#### Массовое параллельное секвенирование

Для приготовления парно-концевых библиотек использовали 100 нг тотальной геномной ДНК. Проведены этапы пробоподготовки с первоначальной фрагментацией на приборе Covaris ME220 (Covaris, США) для получения целевого фрагмента 150 нктд с последующим обогащением экзомных регионов по комбинированному протоколу Illumina Truseq Exome совместно с зондами IDT xGen Exome v1 и секвенированием на платформе NextSeq550 с длиной прочтения 2\*75 нктд (Illumina, США). Всего получено прочтений, прошедших фильтр (PF), в среднем 81556239 ± 5780081, среднее покрытие составило 97.4 ± 6.5, 50-кратное покрытие достигалось для 89.6% ± 3.7 нктд панели для исследуемых образцов.

Полученные прочтения были картированы на референсный геном GRCh37(hg19) с использованием BWA (v0.7.7) [16], SAMtools (v0.1.19) [17], варианты получены с помощью пакета программ GATK (v1.6) [18], аннотирование по базам данных (dpSNP v151, GnomAD v2.1, ExAC v0.3.1, 1000 Genomes Phase3 v5a, HGMD v2020.2), фильтрация и сегрегационный анализ проводили в облачном программном обеспечении BaseSpace Variant Interpreter (annotation engine v3.6.2.0). Анализ CNV-событий выполняли с помощью пакета CODEX [19] и визуализацией в IGV [20]. Полученные варианты оценивались по их встречаемости в популяции, влиянию на аминокислотную последовательность, нахождению в функциональном домене, оценке данных программ предсказателей патогенности (Sift, PolyPhen, DANN, MutationTaster, FAHMM-MKL) и других критериев согласно руководству по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования [21]. Оценку патогенности CNV проводили согласно опубликованным критериям "Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical



Рис. 1. Родословная семьи О.

Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen)" [22].

#### Секвенирование по Сэнгеру

Найденную мутацию в гене NSUN7 подтверждали методом секвенирования по Сэнгеру. Подбор праймеров осуществляли с помощью программы PRIMER3. ПЦР проводили при следующих условиях: 95°С – 5 мин; 35 циклов (95°С – 10 с, 60°С – 10 с, 72°С – 10 с). Буфер для ПЦР: 2.5 мМ MgCl<sub>2</sub> (ThermoFisher, CША), 0.25 мMdNTP (ThermoFisher, США) (0.4 пМ F-праймер: ТСААGATTGTTCTGCCTCCA, 0.4 пМ R-праймер: AGGGAGGAAGGTGTGTCATCT). Секвенирование выполняли с применением набора терминаторов BigDye 3.1 на генетическом анализаторе 3500 ABI PRISM (Applied Biosystems, США) согласно протоколу производителя. Полученные данные анализировали в программном обеспечении UGENE [23].

ГЕНЕТИКА том 57 № 6 2021

## Метод мультиплексной проба-зависимой лигазной реакции с последующей амплификацией

Детекцию больших делеций в гене *APC* проводили методом мультиплексной проба-зависимой лигазной реакции с последующей амплификацией (MLPA) с использованием набора реактивов SALSA MLPA P043-APC, версия D1 (MRC-Holland, Нидерланды) по протоколу производителя. Фрагментный анализ осуществляли на генетическом анализаторе 3500 ABI PRISM (Applied Biosystems, США). При автоматической программной интерпретации результатов с помощью программы Coffalyser.Net (MRC-Holland, Нидерланды), данные картируются на референсный геном: hg18/mapview build 36.

Для преобразования координат генома и файлов аннотаций генома между сборками использовали ресурс открытого доступа: https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgLiftOver.



**Рис. 2.** Сиквенс участка гена NSUN7: a – участок гена *NSUN7* у здорового члена семьи О. (мутации нет),  $\delta$  – участок гена *NSUN7* у больного члена семьи О. (мутация с.2031 2032delinsAA указана стрелками).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Так как ранее у одной пациентки (0.01) с помощью секвенирования по методу Сэнгера в генах *APC* и *MutYH* наследственных мутаций выявлено не было, у нее и всех членов ее семьи провели полноэкзомное секвенирование.

В результате у всех трех больных (0.01, 0.03, О.06), страдающих полипозом, а также у сына пациентки (0.04), чей статус заболевания не был известен, была найдена наследственная мутация с.2031 2032delinsAA (p.Cys677Ter) в гене NSUN7, которая была подтверждена с помощью секвенирования по методу Сэнгера (рис. 2). Ген NSUN7 (NOP2/Sun RNA methyltransferase family member 7; ОМІМ 617185) находится на хромосоме 4 и включает 12 экзонов, 11 из которых кодируют белок. В базе данных HGMD имеется описание только одной патогенной мутации в гене NSUN7. Мутация p.Thr141LeufsX17 (c.421delA) была обнаружена в 2015 г. иранскими исследователями N. Khosronezhad и соавт. среди пациентов с астеноспермией [24]. Однако исследование данного гена, проведенное H. Ren и соавт. на бо́льшей выборке китайских пациентов, не выявило его связи с астеноспермией [25]. Стоит отметить, что астеноспермия является довольно частым заболеванием у мужчин, однако за последующие годы ни в одном

исследовании у такого рода больных из других стран мутаций в гене *NSUN7* найдено не было.

В найденном нами регионе гена NSUN7 ранее была выявлена мутация p.Cys677Ter (rs1338709562), которая в базе данных GnomAD описана с частотой 2 на 156850 человек, при этом данных по ее клинической значимости не имеется. Также была обнаружена миссенс-мутация p.Arg678Ser (rs778600079) с частотами 3/21796 и 6/125568 человек в базах ЕхАС и ТОРМЕД соответственно. Однако о ее клинической значимости также нет ланных. Еще олной базой, в которой было решено проверить встречаемость данного наследственного варианта, прежде чем делать выводы об открытии нового гена, обусловливающего развитие полипоза, была база данных "NGS-DATA" ФГБНУ "МГНЦ". Согласно данным этого, ресурса частота встречаемости варианта с.2031 2032delinsAA в гене NSUN7 в российской популяции составила 2/1223 человек, что существенно выше, чем частота самого заболевания (1/10000 человек). Таким образом, стало очевидно, что мутация в гене NSUN7 не может являться причиной развития аденоматозного полипоза в данной семье.

В связи с этим поиск наследственной причины заболевания в данной семье продолжился, поскольку у нас имелись все генетические данные по каж-



**Рис. 3.** Определение большой делеции в гене АРС: *а* – схема делеции (указана красным цветом) участка 5 хромосомы, *б* – обнаружение делеции в гене *АРС* методом MLPA.

дому родственнику, был проведен повторный анализ результатов с помощью программы СОDEX, позволяющей обнаруживать наличие больших вставок или делеций при проведении полноэкзомного секвенирования. В результате повторного биоинформатического анализа CNV у трех пораженных родственников была выявлена гетерозиготная делеция сегмента хромосомы 5 с захватом интервала 112090569–112258195 пн, включающего экзоны 2–16 гена *АPC*, а также участки генов *SRP19* и *REEP5* (рис. 3,*a*). Из трех данных генов с развитием семейного аденоматоза толстой кишки ассоциирован только ген *APC*[1]. Наличие большой делеции в гене *APC* было подтверждено также с помощью метода MLPA (рис. 3,*б*).

У сына пациентки, чей статус заболевания не был известен, мутации нет. Найденная у больных мутация ранее описана не была. Таким образом, в настоящей работе выявили, что частота герминальных мутаций в гене *APC* у российских больных аденоматозным полипозом выше, чем определенная нами ранее [5]. Это обусловлено тем, что на момент получения предыдущих результатов поиск больших делеций у пациентов не проводился. Необходимо уточнить, что встречаемость больших делеций в гене *APC* у пациентов из

ГЕНЕТИКА том 57 № 6 2021

разных популяций варьирует от 0 в Словакии и Греции до 14% в Бельгии и Китае [26–29].

В заключение стоит отметить, что проведенный нами поиск молекулярно-генетической причины развития полипоза в обследованной семье, хотя и не позволил открыть новый ген, тем не менее привел к нескольким очень важным выводам. Прежде всего показана крайне высокая необходимость разработки и постоянного пополнения базы данных результатов высокопроизводительного секвенирования российских пациентов. Во-вторых, продемонстрирована возможность применения программ поиска больших вставок/делеций при анализе результатов полноэкзомного секвенирования. В-третьих, проведенное исследование позволило установить причину развития заболевания в конкретной семье и указало на более высокую частоту герминальных мутаций в гене АРС у российских больных аденоматозным полипозом, чем предполагалось ранее. Наконец необходимо отметить, что в данной работе использование полноэкзомного секвенирования привело к обнаружению патогенной мутации в анализируемой семье; однако в тех случаях, когда наследственную причину с его помощью установить не удается, целесообразно применять метод полногеномного се-квенирования.

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

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Groden J., Thliveris A., Samowitze W. et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene // Cell. 1991. V. 66. № 3. P. 589– 600.

https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90021-0

- Цуканов А.С., Шелыгин Ю.А., Фролов С.А., Кузьминов А.М. Семейный аденоматоз толстой кишки // Хирург. 2017. № 3. С. 14–24.
- 3. *Näthke I.S.* The adenomatous polyposis coli protein: The Achilles heel of the gut epithelium // Ann. Rev. Cell Dev. Biol. 2004. V. 20. № 1. P. 337–366. https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.012103.094541
- Rivera B., González S., Sánchez-Tomé E. et al. Clinical and genetic characterization of classical forms of familial adenomatous polyposis: A Spanish population study // Ann. Oncol. 2011. V. 22. № 4. P. 903–909. https://doi.org/10.1093/annonc/mdq465
- 5. Цуканов А.С., Поспехова Н.И., Шубин В.П. и др. Мутации в гене АРС у российских пациентов с классической формой семейного аденоматоза толстой кишки // Генетика. 2017. Т. 53 № 3. С. 356–363.
- 6. *Nieuwenhuis M.H., Vasen H.F.A.* Correlations between mutation site in *APC* and phenotype of familial adenomatous polyposis (FAP): A review of the literature // Crit. Rev. Oncol. Hematol. 2007. V. 61. № 2. P. 153–161.

https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2006.07.004

- Knudsen A.L., Bisgaard M.L., Bulow S. Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP): A review of the literature // Fam. Cancer 2003. № 2(1). P. 43–55. https://doi.org/10.1023/a:1023286520725
- 8. *Kastrinos F., Syngal S.* Inherited colorectal cancer syndromes // Cancer J. 2011. V. 17. № 6. P. 405–415. https://doi.org/10.1097/ppo.0b013e318237e408
- 9. *Al-Tassan N., Chmiel N.H., Maynarde J. et al.* Inherited variants of *MYH* associated with somatic G:C−T:A mutations in colorectal tumors // Nat. Genet. 2002. V. 30. No 2. P. 227–232.

https://doi.org/10.1038/ng828

 Цуканов А.С., Пикунов Д.Ю., Тобоева М.Х. и др. Трудности диагностики МUTYH-ассоциированного полипоза толстой кишки // Колопроктология. 2020. Т. 19. № 1 (71). С. 107–116. https://doi.org/10.33878/2073-7556-2020-19-1-107-116

- Lubbe S.J., Di Bernardo M.C., Chandler I.P., Houlston R.S. Clinical implications of the colorectal cancer risk associated with MUTYH mutation // J. Clin. Oncol. 2009. V. 27. № 24. P. 3975–3980. https://doi.org/10.1200/JCO.2008.21.6853
- Weren R.D.A., Ligtenberg M.J.L., Kets C.M. et al. A germline homozygous mutation in the base-excision repair gene NTHL1 causes adenomatous polyposis and colorectal cancer // Nat. Genet. 2015. V. 47. № 6. P. 668–671. https://doi.org/10.1038/ng.3287
- 13. *Altaraihi M., Gerdes A.-M., Wadt K.* A new family with a homozygous nonsense variant in NTHL1 further delineated the clinical phenotype of NTHL1-associated polyposis // Hum. Genome Var. 2019. V. 6:46 (open access).

https://doi.org/10.1038/s41439-019-0077-3

14. Palles C., Cazier J.-B., Howarth K.M. et al. Germline mutations affecting the proofreading domains of POLE and POLD1 predispose to colorectal adenomas and carcinomas // Nat. Genet. 2012. V. 45. № 2. P. 136–144.

https://doi.org/10.1038/ng.2503

- Talseth-Palmer B.A. The genetic basis of colonic adenomatous polyposis syndromes // Hered. Cancer Clin. Pract. 2017. V. 15. № 1. P. 5–12. https://doi.org/10.1186/s13053-017-0065-x
- Li H., Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler Transform // Bioinformatics. 2009. V. 25. P. 1754–1760. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324
- 17. Li H., Handsaker B., Wysoker A. et al. The sequence alignment/map format and SAMtools // Bioinformatics. 2009. V. 25. № 16. P. 2078–2079. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352
- Van der Auwera G.A., Carneiro M.O., Hartl C. et al. From fastQ data to high-confidence variant calls: The genome analysis toolkit best practices pipeline // Curr. Protoc. Bioinformatics. 2013. V. 43. P. 1–33. https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1110s43
- 19. Jiang Y., Oldridge D.A., Diskin S.J., Zhang N.R. CODEX: A normalization and copy number variation detection method for whole exome sequencing // Nucleic Ac. Res. 2015. V. 43. № 6. P. e39. https://doi.org/10.1093/nar/gku1363
- Robinson J.T., Thorvaldsdóttir H., Winckler W. et al. Integrative Genome Viewer // Nat. Biotechnol. 2011. V. 29. № 1. P. 24–6. https://doi.org/10.1038/nbt.1754.Integrative
- Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б. и др. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (Мрѕ) (Редакция 2018, Версия 2) // Мед. генетика. 2019. Т. 18. № 2. С. 3–23. https://doi.org/10.25557/2073-7998.2019.02.3-23
- 22. Brandt T., Sack L., Arjona D. et al. Adapting ACMG/AMP sequence variant classification guidelines for single-gene copy number variants // Genet. Med. 2020. V. 22. P. 336–344. https://doi.org/10.1038/s41436-019-0655-2

ГЕНЕТИКА том 57 № 6 2021

- Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., Unipro U. GENE: A unified bioinformatics toolkit // Bioinformatics. 2012. V. 28. № 8. P. 1166–1167. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091
- Khosronezhad N., Colagar A.H., Mortazavi S.M. The Nsun7 (A11337)-deletion mutation causes reduction of its protein rate and associated with sperm motility defect in infertile men // J. Assist. Reprod. Genet. 2015. V. 32. № 5. P. 807–815. https://doi.org/10.1007/s10815-015-0443-0
- 25. Ren H.Y., Zhong R., Ding X.P. et al. Investigation of polymorphisms in exon7 of the NSUN7 gene among Chinese Han men with asthenospermia // Genet. Mol. Res. 2015. V. 14. № 3. P. 9261–9268. https://doi.org/10.4238/2015.august.10.6
- Sheng J.-Q., Wei-Jia Cui, Lei Fu et al. APC gene mutations in Chinese familial adenomatous polyposis patients // World J. Gastroenterol. 2010. V. 16. № 12.

P. 1522–1526. https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i12.1522

27. *Stekrova J., Sulova M., Kebrdlova V. et al.* Novel *APC* mutations in Czech and Slovak FAP families: Clinical and genetic aspects // BMC Med. Genet. 2007. V. 8. P. 16.

https://doi.org/10.1186/1471-2350-8-16

- Fostira F., Thodi G., Sandaltzopoulos R. et al. Mutational spectrum of APC and genotype-phenotype correlations in Greek FAP patients // BMC Cancer. 2010. V. 10. P. 389–398. https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-389
- 29. *Michils G., Tejpar S., Thoelen R. et al.* Large deletions of the *APC* gene in 15% of mutation-negative patients with classical polyposis (FAP): A Belgian study // Hum. Mutat. 2005. V. 25. P. 125–134. https://doi.org/10.1002/humu.20122

# Finding the Cause of Hereditary Disease in a Family with Adenomatous Polyposis: Why It Is Important to Accumulate Whole Exome Sequencing Data in Russian Population

## A. S. Tsukanov<sup>*a*</sup>, \*, A. A. Barinov<sup>*a*</sup>, V. P. Shubin<sup>*a*</sup>, A. N. Loginova<sup>*a*</sup>, T. A. Savelieva<sup>*a*</sup>,

D. Yu. Pikunov<sup>a</sup>, A. M. Kuzminov<sup>a</sup>, V. N. Kashnikov<sup>a</sup>, A. V. Polyakov<sup>b</sup>, and Yu. A. Shelygin<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ryzhikh National Medical Research Center of Coloproctology, Moscow, 123423 Russia <sup>b</sup>Research Center for Medical Genetics, Moscow, 115522 Russia \*e-mail: Tsukanov81@rambler.ru

With the aim to find the genetic reason of adenomatous polyposis DNA samples from 6 members of the same family (3 affected and 2 healthy individuals, and 1 person with unknown disease status) were examined by wholeexome sequencing and segregation analysis. Previously, no *APC/MutYH* mutations have been found in one patient by Sanger sequencing despite all the symptoms of adenomatous polyposis syndrome. Among the studied by whole-exome sequencing cases, 4 blood relatives (3 affected patients and 1 person with unknown disease status) were found to have a mutation in the *NSUN7* gene, which was not previously described as associated with the development of adenomatous polyposis. However, later it turned out that the population frequency of this gene's variant in Russia had been significantly higher than the incidence of adenomatous polyposis. Additional bioinformatic analysis of copy number variation (CNV) revealed a previously undescribed large heterozygous mutation in 3 patients, including exons 2–16 of the *APC* gene, as well as exons of the *SRP19* and *REEP5* genes, and that was subsequently confirmed by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA). The conducted molecular genetic investigation demonstrated the need to create and constantly update the national database of high-throughput sequencing. The necessity of searching for large deletions in the *APC* gene in Russian patients with adenomatous polyposis has also been established.

Keywords: adenomatous polyposis, whole exome sequencing, NSUN7 gene, APC gene, large deletion.

## КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 575.17:582.892

# ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ *Kalopanax septemlobus* (Thunb.) Koidz. НА СЕВЕРНОЙ ГРАНИЦЕ АРЕАЛА ПО ДАННЫМ СЕКВЕНИРОВАНИЯ РЕГИОНОВ ХЛОРОПЛАСТНОЙ ДНК

## © 2021 г. Е. А. Васюткина<sup>1, \*</sup>, И. Ю. Адрианова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, 690022 Россия

> \**e-mail: levina@biosoil.ru* Поступила в редакцию 30.07.2020 г. После доработки 04.09.2020 г. Принята к публикации 23.09.2020 г.

Проведен анализ нуклеотидного полиморфизма межгенных спейсеров *psbA*-*trnH*, *rpl32*-*trnL* и *trnS*-*trnfM* хлоропластной ДНК у представителей умеренно-теплолюбивого вида *Kalopanax septemlobus* на северной границе ареала. Нуклеотидные замены и индельные вариации выявили три гаплотипа (H1–H3), из них гаплотип H3 обнаружен только на о. Сахалин. В Приморском крае широко распространен гаплотип H1, частота встречаемости которого составила 92.4%. Генетическое разнообразие суммарной выборки Приморского края оказалось очень низким – гаплотипическое (*h*) 0.142, нуклеотидное ( $\pi$ ) 0.0001, а суммарной выборки о. Сахалин – средним (*h* = 0.600,  $\pi$  = 0.0018). Анализ молекулярной дисперсии показал, что около 86% всей генетической изменчивости приходится на различия между двумя регионами ( $\Phi_{ST} = 0.857$ , *P* < 0.0001). Наблюдаемая изменчивость *K. septemlobus* на российском Дальнем Востоке отражает его биогеографическую историю.

*Ключевые слова: Kalopanax septemlobus, Kalopanax pictus,* генетическое разнообразие, межгенные спейсеры, хлоропластная ДНК.

DOI: 10.31857/S0016675821060138

Kalopanax septemlobus (Thunb.) Koidz., калопанакс семилопастной, или диморфант (синоним Kalopanax pictus) – листопадное, умеренно-теплолюбивое дерево, представитель монотипного реликтового рода Kalopanax Miq. семейства Araliaceae Juss. [1, 2]. Распространен в Северо-Восточной Азии, куда входят Центральный и Восточный Китай, п-ов Корея, острова Японского архипелага и южная часть российского Дальнего Востока (РДВ) [3-5]. Юг РДВ является северной границей распространения K. septemlobus; вид встречается на юге Приморского края, в юго-западной части о-ва Сахалин и на южных о-вах (Кунашир, Итуруп, Шикотан) Курильского архипелага [3, 6]. Вид занесен в федеральную и региональные Красные книги [6, 7], статус 3 (R) – редкий вид, представленный небольшими популяциями, которые в настоящее время не находятся под угрозой исчезновения и не являются уязвимыми, но рискуют оказаться таковыми. К. septemlobus является ценным медоносом и имеет декоративный внешний вид [8], содержит множество биологически активных веществ, что делает его потенциальным источником пищевых и лекарственных соединений [3, 9]. В настоящее время многие местообитания *K. septemlobus* на РДВ уничтожаются или деградируют из-за строительства, высокой рекреационной нагрузки и пожаров [10].

В целях сохранения этого уникального вида становится актуальным его искусственное разведение, но при культивировании растений, как правило, происходит обеднение генофонда. Так, популяционно-генетические исследования с использованием разных методов анализа (аллозимный, RAPD, ISSR, nrSSRs) выявили относительно высокий уровень генетического разнообразия в природных популяциях K. septemlobus Южной Кореи и Японии [11–13] и сравнительно низкий у культивируемых форм [14]. Огромный интерес представляет собой комплексное исследование образцов K. septemlobus из Центрального, Восточного и Западного Китая, Корейского п-ова и Японского архипелага с использованием SSRмаркеров ядерной ДНК, межгенных спейсеров psbA-trnH, rpl32-trnL и trnS-trnfM хлоропластной ДНК (хпДНК) и моделирования палеораспределения для восстановления биогеографической истории этого вида [15]. Полученные результаты являются доказательством существования множества ледниковых рефугиумов в Китае, Южной

Место сбора (количество образцов)	Гаплотип	Разнообразие (стандартное отклонение)	
		гаплотипическое	нуклеотидное
Приморский край			
Окр. г. Владивосток, 11 км (8)	H1	0.000 (0.000)	0.0000 (0.0000)
Окр. г. Владивосток, Океанский хребет (4)	H1	—	—
О. Русский, зал. Петра Великого Японского моря (10)	H1	0.000 (0.000)	0.0000 (0.0000)
О. Стенина, зал. Петра Великого Японского моря (3)	H1	—	—
О. Фуругельма, зал. Петра Великого Японского моря (1)	H1	—	—
П-ов Гамова, окр. бух. Теляковского (1)	H1	—	—
Окр. пос. Каменушка, правобережье р. Волхушка (2)	H1	—	—
Окр. с. Васильковка (2)	H1	—	—
Окр. пос. Реттиховка (1)	H1	—	—
Заповедник Кедровая падь (2)	H1	—	—
137 км автодороги 05Н-100, перевал Еловый (1)	H1	—	—
Мыс Пещурова, зал. Восток (1)	H1	—	—
П-ов Гамова, окр. бух. Витязь (17)	H1, H2	0.382 (0.113)	0.0002 (0.0002)
Общая выборка Приморского края (53)	H1, H2	0.142 (0.062)	0.0001 (0.0001)
Сахалин			
Перевал Невельский (5)	H1, H3	0.400 (0.237)	0.0012 (0.0009)
Бассейн р. Китосия (1)	H2	—	—
Общая выборка о. Сахалин (6)	H1, H2, H3	0.600 (0.215)	0.0018 (0.0012)

Таблица 1. Места сбора *Kalopanax septemlobus* на РДВ, гаплотипы и параметры генетического разнообразия по данным хпДНК

Японии и самой южной части Корейского п-ва; самые северные популяции *К. septemlobus* на о-ве Хоккайдо и на севере Корейского п-ва имеют постледниковое происхождение; общая генетическая структура широкоареального *К. septemlobus* в Восточной Азии сформировалась под воздействием колебаний четвертичного климата в условиях неоднородного ландшафта [15]. Популяционно-генетические исследования *К. septemlobus* на территории РДВ ранее не проводились.

Цель настоящей работы — изучение генетического разнообразия и структуры краевых популяций умеренно-теплолюбивого вида *K. septemlobus* на северной границе его распространения (юг РДВ), а также выявление генетических связей с представителями из основного ареала вида по данным полиморфизма хпДНК.

Индивидуальные препараты тотальной ДНК выделены СТАВ-методом [16] с небольшими модификациями из листовой ткани 59 образцов *K. septemlobus*, собранных из 15 природных мест произрастания в Приморском крае и на о. Сахалин (табл. 1). Амплификацию некодирующих регионов *psbA-trnH*, *rpl32-trnL* и *trnS-trnfM* хпДНК проводили с использованием универсальных праймеров и реакционных условий, рекомендованных

ГЕНЕТИКА том 57 № 6 2021

для этих участков с использованием "медленной и холодной" ПЦР-программы [17, 18]. Нуклеотидные последовательности цепей регионов хпДНК определяли на генетическом анализаторе ABI 3500 (Applied Biosystems, USA), затем редактировали в Chromas 2.4.4 (http://technelysium.com.au/wp/chromas), выравнивали и объединяли в одну матрицу, используя пакет программ MEGA ver. X [19]. Число гаплотипов, нуклеотидное ( $\pi$ ) и гаплотипическое (*h*) разнообразие (для популяций с числом образцов пять и более), распределение генетической изменчивости внутри и между популяциями ( $\Phi_{\rm ST}$ , анализ молекулярной дисперсии, AMOVA) рассчитывали с помошью программы Arlequin v. 3.5 [20]. Генеалогические связи гаплотипов анализировали методом медианного связывания (Median-Joining, MJ) в программе Network 10.1 [21].

Для 59 растений *К. septemlobus* определены нуклеотидные последовательности трех межгенных спейсеров хпДНК. Длина региона *psbA*—*trnH* у всех образцов составила 448 пн, нуклеотидных замен нет. Спейсер *rpl32*—*trnL* у всех растений имел длину 840 пн и одну замену С $\rightarrow$ А в позиции 321 в пяти образцах. У *trnS*—*trnfM* выявлено два варианта длины — 726 и 720 пн, — вследствие присутствия вставки/делеции (индель), замен нет. У всех образ-



**Рис. 1.** Медианные сети гаплотипов хпДНК *Kalopanax septemlobus: а* – российский Дальний Восток. Размер окружностей отражает примерную частоту встречаемости гаплотипов, черная пересекающая линия – точечная мутация, белый пересекающий блок – делеция нуклеотидов; *б* – Восточная Азия по [15].

цов из Приморского края спейсер trnS-trnfM длиной 726 пн, а образцы с о. Сахалин имели оба варианта. Длина объединенных последовательностей трех регионов хпДНК составила 2014 пн, из них 2007 — мономорфные сайты, один сайт вариабельный и информативный согласно методу максимальной экономии, индель длиной 6 пн. Нуклеотидные замены и индельные вариации позволили выявить три гаплотипа v K. septemlobus на юге РДВ (табл. 1). Последовательности регионов psbA-trnH, rpl32-trnL и trnS-trnfM хпДНК каждого гаплотипа депонированы в ENA/EMBL-EBI (номера для H1 – LR860506, LR860509 и LR860512; H2 – LR860508, LR860510 и LR860513; H3 – LR860507, LR860511 и LR860514 соответственно). Гаплотипы Н1 и Н2 обнаружены в Приморском крае и на о. Сахалин, а гаплотип Н3 – только на о. Сахалин. В Приморском крае широко распространен гаплотип Н1, частота встречаемости которого составила 92.4%, и только в популяции из бухты Витязь четыре образца имели гаплотип Н2. На о. Сахалин в выборке с перевала Невельский у пяти деревьев обнаружен гаплотип Н3, а у одного – гаплотип H1; у образца из бассейна р. Китосия, расположенного в 40 км южнее, обнаружен гаплотип Н2. На рис. 1,а приведена медианная сеть генеалогических связей гаплотипов K. septemlobus РДВ. Одна нуклеотидная замена разделяет гаплотипы Н1 и Н2, индель разделяет гаплотипы Н1 и Н3.

Из 13 выборок *К. septemlobus* в Приморском крае только три выборки были с числом образцов пять и более (табл. 1), для которых и были рассчитаны показатели генетического разнообразия. Популяции из окрестностей Владивостока и о. Русский оказались мономорфными, а популяция из окрестностей бухты Витязь характеризовалась низким

уровнем как гаплотипического (h = 0.382), так и нуклеотидного разнообразия ( $\pi = 0.0002$ ). Параметры генетического разнообразия общей выборки, включающей все исследуемые образцы из Приморского края, оказались еще более низкими (табл. 1).

Сахалинская популяция K. septemlobus с перевала Невельский имела практически такой же уровень гаплотипического (h = 0.400), но более высокий уровень нуклеотидного ( $\pi = 0.0012$ ) разнообразия по сравнению с выборкой из бухты Витязь Приморского края. Общая выборка с о. Сахалин характеризовалась средними параметрами ( $h = 0.600, \pi = 0.0018$ ) генетического разнообразия (табл. 1). Полученные данные о нуклеотидном разнообразии в суммарных выборках Приморского края и о. Сахалин (0.0001 и 0.0018 соответственно) согласуются с таковыми для основного ареала. Так, для группы популяций Юго-Западного Китая нуклеотидное разнообразие составило 0.00064, для группы Северо-Западный Китай-Окинава -0.00019, для группы Восточный Китай-п-ов Корея-Японский архипелаг - 0.00021 [15]. Низкое генетическое разнообразие или отсутствие такового у хлоропластного генома в популяциях Приморского края может указывать на относительно недавнее происхождение от малого числа основателей.

По результатам AMOVA генетическая дифференциация между общими выборками из двух географических регионов РДВ составила 86% ( $\Phi_{ST} = 0.857$ , P < 0.0001) и является следствием экстремально низкого потока генов между ними, что обусловлено изоляцией расстоянием. Такая же высокая генетическая дифференциация была выявлена между тремя географическими группа-

ми популяций *K. septemlobus* из основного ареала  $(F_{CT} = 0.84)$  [15].

Нуклеотидные последовательности гаплотипов H1–H3 у K. septemlobus, произрастающего на территории Приморского края и о. Сахалин, оказались идентичны последовательностям гаплотипов Н1-Н3 основного ареала вида [15]. Генеалогические связи гаплотипов K. septemlobus в Восточной Азии представлены на рис. 1.6. Гаплотип Н1 является анцестральным и широко распространенным как на основном ареале (fig. 3b по [15]), так и на его северной границе (рис. 1). Гаплотип Н2, обнаруженный в популяции бухты Витязь Приморского края, распространен также на японских о-вах Хоккайдо и Хонсю и на горе Цзыцзинь (Нанкин) в Восточном Китае [15]. На территории между материковыми популяциями бухты Витязь и горы Цзыцзинь, расположенных друг от друга на расстоянии около 1600 км, выявлен только гаплотип Н1. Мы предполагаем, что возможны несколько вариантов возникновения гаплотипа H2 в популяции бухты Витязь: во-первых, деревья с гаплотипом Н2 в ближайших популяциях-донорах могли исчезнуть под воздействием природных или антропогенных факторов; во-вторых, гаплотип мог возникнуть в результате случайной мутации при расселении особей с гаплотипом H1: в-третьих, нельзя исключить возможность заноса семян с гаплотипом Н2 птицами с северных японских островов [22, 23]. Гаплотип Н3, выявленный на о. Сахалин, также присутствует на о-вах Хоккайдо и Хонсю [15].

Известно, что на юге Приморского края представители K. septemlobus произрастали еще в нижнем миоцене [24], когда шло формирование Японского моря и дифференциация о. Сахалин и Японских овов от континента [25]. Климатические флуктуации, особенно в последний плейстоценовый ледниковый период, способствовали смещению северной границы ареала *K. septemlobus* к югу, в то время как большинство популяций в Центральном Китае и на южных островах Японского архипелага, вероятно, сохранили свою локализацию [15]. Таким образом, выявленная нами низкая вариабельность хлоропластного генома K. septemlobus обусловлена реколонизацией территории Приморского края более южными популяциями. Более высокая генетическая изменчивость *K. septemlobus* на о. Сахалин, чем в Приморском крае, связана с его распространением в послеледниковый период из нескольких рефугиумов, существовавших на Японских островах, через мосты суши [15, 25]. Полученные молекулярно-генетические данные могут быть использованы для разработки программ по сохранению этого редкого и ценного вида дальневосточной флоры, а также для разработки мероприятий по рациональному природопользованию.

Исследование выполнено при финансовой поддержке программы Президиума РАН "Дальний Восток" (проекты № 18-4-011).

Авторы выражают благодарность В.Ю. Баркалову, А.С. Майоровой (ННЦМБ ДВО РАН), Е.М. Булах, Т.Ю. Горпенченко за помощь в сборе материала.

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

- Ohashi H. Nomenclature of Kalopanax septemlobus (Thunb. ex Murray) Koidzumi and classification of its infraspecific taxa (Araliaceae) // J. Jap. Bot. 1994. V. 69. P. 28–31.
- Chang C.S., Kim H., Kang H.S., Lee D.K. A morphometric analysis of the eastern Asian Kalopanax septemlobus (Thunb.) Koidz. (Araliaceae) // Bot. Bull. Acad. Sinica. 2003. V. 44. P. 337–344.
- 3. *Журавлев Ю.Н., Коляда А.С.* Araliaceae: женьшень и другие. Владивосток: Дальнаука, 1996. 280 с.
- 4. *Lee D.K., Kang H.-S.* Distribution of *Kalopanax septemlobus* and its growth in Northeast Asia // Eurasian J. For. Res. 2002. V. 2. № 5. P. 85–94.
- Sakaguchi S., Sakurai S., Yamasaki M., Isagi Y. How did the exposed seafloor function in postglacial northward range expansion of *Kalopanax septemlobus*? Evidence from ecological niche modelling // Ecol. Res. 2010. V. 25. P. 1183–1195.
- Красная книга Сахалинской области: Растения / Отв. ред. Еремин В.М. Южно-Сахалинск: Сахалинское книж. изд-во, 2005. 348 с.
- Красная книга Российской Федерации (растения и грибы). М.: Т-во науч. изд. КМК, 2008. 855 с.
- Недолужко В.А. Диморфант семилопастный Kalopanax septemlobus (Thunb.) Коіdz. // Биол. редких сосудистых раст. совет. Дальнего Востока. Владивосток: ДВО АН СССР, 1990. С. 132–138.
- 9. *Hyun T.K., Kim J.-S.* The pharmacology and clinical properties of *Kalopanax pictus* // J. of Med. Plants Res. 2009. V. 3. № 9. P. 613–620.
- 10. Гладкова Г.А., Сибирина Л.А., Бутовец Г.Н. Редкие растительные сообщества с калопанаксом семилопастным на острове Русский (Южное Приморье) // Вестник ДВО РАН. 2015. № 1. С. 34–44.
- Huh M.K., Jung S.D., Moon H.K. et al. Comparison of genetic diversity and population structure of Kalopanax pictus (Araliaceae) and its thornless variant using RAPD // Korean J. Med. Crop Sci. 2005. V. 13. № 2. P. 69–74.
- Huh M.K. Comparison of genetic diversity and relationships of genus *Kalopanax* using ISSR markers // J. Life Sci. 2006. V. 16. № 5. P. 740–745.

ГЕНЕТИКА том 57 № 6 2021

- 13. Sakaguchi S., Takeuchi Y., Yamasaki M. et al. Lineage admixture during postglacial range expansion is responsible for the increased gene diversity of *Kalopanax septemlobus* in a recently colonised territory // Heredity. 2011. V. 107. P. 338–348.
- 14. Jung S.D., Huh H.W., Hong J.H. et al. Genetic diversity and population structure of *Kalopanax pictus* (Araliaceae) // J. Plant Biol. 2003. V. 46. № 4. P. 255–262.
- Sakaguchi S., Qiu Y.-X., Liu Y.-H. et al. Climate oscillation during the Quaternary associated with landscape heterogeneity promoted allopatric lineage divergence of a temperate tree *Kalopanax septemlobus* (Araliaceae) in East Asia // Mol. Ecol. 2012. V. 21. P. 3823–3838. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05652.x
- Isabel N., Tremblay L., Michaud M. et al. RAPDs as an aid to evaluate the genetic integrity of somatic embryogenesis derived populations of *Picea mariana* (Mill.) B.S.P. // Theor. Appl. Genet. 1993. V. 86. P. 81–87.
- Shaw J., Lickey E.B., Beck J.T. et al. The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis // Am. J. Bot. 2005. V. 92. P. 142–166. https://doi.org/10.3732/ajb.92.1.142
- 18. Shaw J., Lickey E.B., Schilling E.E., Small R.L. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in

angiosperms: The tortoise and the hare III // Am. J. Bot. 2007. V. 94. P. 275–288.

- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGAX: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. P. 1547–1549.
- Excoffier L., Lischer H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // Mol. Ecol. Resources. 2010. V. 10. P. 564–567.
- 21. Bandelt H.-J., Forster P., Rohl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Biol. Evol. 1999. V. 16. № 1. P. 37–48.
- 22. *Нечаев В.А., Гамова Т.В.* Птицы Дальнего Востока России (аннотированный каталог). Владивосток: Дальнаука, 2009. 564 с.
- Нечаев В.А., Нечаев А.А. Семейство Аралиевые и птицы-карпофаги на юге Дальнего Востока // Вестник ДВО РАН. 2015. № 1. С. 63–71.
- Павлюткин Б.И., Чекрыжов И.Ю., Петренко Т.И. Геология и флора нижнего миоцена юга Приморья. Владивосток: Дальнаука, 2012. 194 с.
- Крестов П.В., Баркалов В.Ю., Омелько А.М. и др. Реликтовые комплексы растительности современных рефугиумов Северо-Восточной Азии // Комаровские чтения. 2009. Вып. 56. С. 5–63.

## Genetic Diversity of *Kalopanax septemlobus* (Thunb.) Koidz. at the Northern Range Edge according to Chloroplast DNA Sequencing Data

## E. A. Vasyutkina<sup>*a*, \*</sup> and I. Yu. Adrianova<sup>*a*</sup>

<sup>a</sup> Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia \*e-mail: levina@biosoil.ru

The analysis of nucleotide polymorphism of intergenic spacers psbA-trnH, rpl32-trnL and trnS-trnfM of chloroplast DNA in accessions of *Kalopanax septemlobus* at the northern range edge (Russian Far East) was carried out. The genetic diversity of the total sample from the south of Primorsky krai was very low ( $h = 0.142, \pi = 0.0001$ ), and of the total sample of Sakhalin Island was medium ( $h = 0.600, \pi = 0.0018$ ). Analysis of molecular variance showed that about 86% of all genetic variability is accounted for by differences between the two geographic regions ( $\Phi_{ST} = 0.857, P < 0.0001$ ). Nucleotide substitutions and variations of indels revealed three haplotypes (H1–H3), of which the H3 haplotype was found only on Sakhalin Island. The haplotype H1 is widespread in Primorsky krai which frequency was 92.4%. The observed variability of *K. septemlobus* in the Russian Far East reflects by history of its biogeography.

**Keywords:** *Kalopanax septemlobus, Kalopanax pictus*, castor aralia, genetic diversity, intergenic spacers, chloroplast DNA.