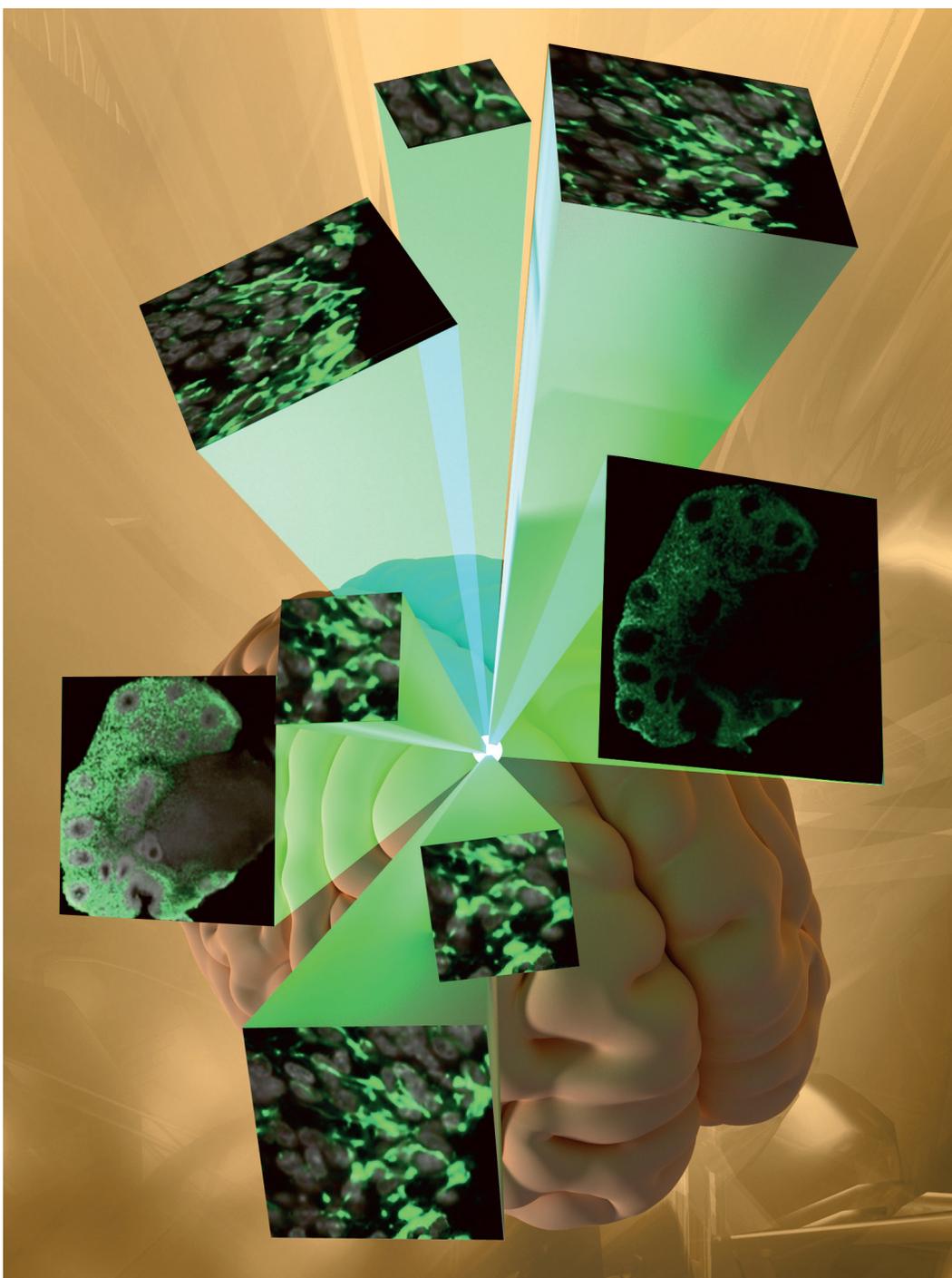


ВАВИЛОВСКИЙ

ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

2021 • 25 • 8



Генетика и селекция растений / Генетика животных / Генетика человека / Медицинская генетика /
Генетические коллекции / Актуальные технологии

vavilov.ejpub.ru/
bioenet.nsc.ru/vogjis
vavilov_journal@bioenet.nsc.ru
Индекс издания 42153



Научный рецензируемый журнал

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.

Периодичность 8 выпусков в год

DOI 10.18699/VJ21.091

Учредители

Сибирское отделение Российской академии наук

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Межрегиональная общественная организация Вавиловское общество генетиков и селекционеров

Главный редактор

А.В. Кочетов – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)

Заместители главного редактора

Н.А. Колчанов – академик РАН, д-р биол. наук, профессор (Россия)

И.Н. Леонова – д-р биол. наук (Россия)

Н.Б. Рубцов – д-р биол. наук, профессор (Россия)

В.К. Шумный – академик РАН, д-р биол. наук, профессор (Россия)

Ответственный секретарь

Г.В. Орлова – канд. биол. наук (Россия)

Редакционная коллегия

Е.Е. Андронов – канд. биол. наук (Россия)

Ю.С. Аульченко – д-р биол. наук (Россия)

О.С. Афанасенко – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

Д.А. Афонников – канд. биол. наук, доцент (Россия)

Л.И. Афтанас – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)

Л.А. Беспалова – академик РАН, д-р с.-х. наук (Россия)

А. Бёрнер – д-р наук (Германия)

Н.П. Бондарь – канд. биол. наук (Россия)

С.А. Боринская – д-р биол. наук (Россия)

П.М. Бородин – д-р биол. наук, проф. (Россия)

А.В. Васильев – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)

М.И. Воевода – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)

Т.А. Гавриленко – д-р биол. наук (Россия)

И. Гроссе – д-р наук, проф. (Германия)

Н.Е. Грунтенко – д-р биол. наук (Россия)

С.А. Демаков – д-р биол. наук (Россия)

И.К. Захаров – д-р биол. наук, проф. (Россия)

И.А. Захаров-Гезехус – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)

С.Г. Инге-Вечтомов – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

А.В. Кильчевский – чл.-кор. НАНБ, д-р биол. наук (Беларусь)

С.В. Костров – чл.-кор. РАН, д-р хим. наук (Россия)

А.М. Кудрявцев – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)

И.Н. Лаврик – д-р биол. наук (Германия)

Д.М. Ларкин – канд. биол. наук (Великобритания)

Ж. Ле Гуи – д-р наук (Франция)

И.Н. Лебедев – д-р биол. наук, проф. (Россия)

Л.А. Лутова – д-р биол. наук, проф. (Россия)

Б. Люгтенберг – д-р наук, проф. (Нидерланды)

В.Ю. Макеев – чл.-кор. РАН, д-р физ.-мат. наук (Россия)

В.И. Молодин – академик РАН, д-р ист. наук (Россия)

М.П. Мошкин – д-р биол. наук, проф. (Россия)

С.Р. Мурсалимов – канд. биол. наук (Россия)

Л.Ю. Новикова – д-р с.-х. наук (Россия)

Е.К. Потокина – д-р биол. наук (Россия)

В.П. Пузырев – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)

Д.В. Пышный – чл.-кор. РАН, д-р хим. наук (Россия)

И.Б. Розозин – канд. биол. наук (США)

А.О. Рувинский – д-р биол. наук, проф. (Австралия)

Е.Ю. Рыкова – д-р биол. наук (Россия)

Е.А. Салина – д-р биол. наук, проф. (Россия)

В.А. Степанов – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)

И.А. Тихонович – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

Е.К. Хлесткина – д-р биол. наук, проф. РАН (Россия)

Э.К. Хуснутдинова – д-р биол. наук, проф. (Россия)

М. Чен – д-р биол. наук (Китайская Народная Республика)

Ю.Н. Шавруков – д-р биол. наук (Австралия)

Р.И. Шейко – чл.-кор. НАНБ, д-р с.-х. наук (Беларусь)

С.В. Шестаков – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

Н.К. Янковский – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

Scientific Peer Reviewed Journal

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

VAVILOVSKII ZHURNAL GENETIKI I SELEKTSII

*Founded in 1997**Published 8 times annually*

DOI 10.18699/VJ21.091

Founders

Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

The Vavilov Society of Geneticists and Breeders

Editor-in-Chief*A.V. Kochetov*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia**Deputy Editor-in-Chief***N.A. Kolchanov*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia*I.N. Leonova*, Dr. Sci. (Biology), Russia*N.B. Rubtsov*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*V.K. Shumny*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia**Executive Secretary***G.V. Orlova*, Cand. Sci. (Biology), Russia**Editorial board***O.S. Afanasenko*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*D.A. Afonnikov*, Associate Professor, Cand. Sci. (Biology), Russia*L.I. Aftanas*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia*E.E. Andronov*, Cand. Sci. (Biology), Russia*Yu.S. Aulchenko*, Dr. Sci. (Biology), Russia*L.A. Bespalova*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Agricul.), Russia*N.P. Bondar*, Cand. Sci. (Biology), Russia*S.A. Borinskaya*, Dr. Sci. (Biology), Russia*P.M. Borodin*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*A. Börner*, Dr. Sci., Germany*M. Chen*, Dr. Sci. (Biology), People's Republic of China*S.A. Demakov*, Dr. Sci. (Biology), Russia*T.A. Gavrilenko*, Dr. Sci. (Biology), Russia*I. Grosse*, Professor, Dr. Sci., Germany*N.E. Gruntenko*, Dr. Sci. (Biology), Russia*S.G. Inge-Vechtomov*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*E.K. Khlestkina*, Professor of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*E.K. Khusnutdinova*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*A.V. Kilchevsky*, Corr. Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Biology), Belarus*S.V. Kostrov*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry), Russia*A.M. Kudryavtsev*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*D.M. Larkin*, Cand. Sci. (Biology), Great Britain*I.N. Lavrik*, Dr. Sci. (Biology), Germany*J. Le Gouis*, Dr. Sci., France*I.N. Lebedev*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*B. Lugtenberg*, Professor, Dr. Sci., Netherlands*L.A. Lutova*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*V.Yu. Makeev*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Physics and Mathem.), Russia*V.I. Molodin*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (History), Russia*M.P. Moshkin*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*S.R. Mursalimov*, Cand. Sci. (Biology), Russia*L.Yu. Novikova*, Dr. Sci. (Agricul.), Russia*E.K. Potokina*, Dr. Sci. (Biology), Russia*V.P. Puzyrev*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia*D.V. Pyshnyi*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry), Russia*I.B. Rogozin*, Cand. Sci. (Biology), United States*A.O. Ruvinsky*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Australia*E.Y. Rykova*, Dr. Sci. (Biology), Russia*E.A. Salina*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*Y.N. Shavrukov*, Dr. Sci. (Biology), Australia*R.I. Sheiko*, Corr. Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Agricul.), Belarus*S.V. Shestakov*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*V.A. Stepanov*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*I.A. Tikhonovich*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*A.V. Vasiliev*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*M.I. Voevoda*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia*N.K. Yankovsky*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*I.K. Zakharov*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*I.A. Zakharov-Gezekhus*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

Генетика и селекция растений

- 797 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Генетический полиморфизм аборигенных абхазских сортов винограда. *Е.Т. Ильницкая, М.В. Макаркина, И.В. Степанов, И.И. Супрун, С.В. Токмаков, В.Ш. Айба, М.А. Авидзба, В.К. Котляра*
- 805 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Взаимосвязь между генетическим статусом локуса *Vrn-1* и размерами корневой системы у мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). *О.Г. Смирнова, Т.А. Пшеничникова*
- 812 **ОБЗОР**
Биотехнологии гаплоидов как инструмент создания селекционного материала сахарной свеклы. *Е.О. Колесникова, Е.И. Донских, Р.В. Бердников*

Генетика животных

- 822 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Генетическое разнообразие популяции центральноевропейского кабана (*Sus scrofa scrofa*) и пород домашних свиней (*Sus scrofa domestica*) на основе микросателлитных локусов ДНК. *Э.А. Снегин, В.М. Макеева, А.П. Каледин, А.М. Остапчук, И.Д. Алазнели, А.В. Смутов*
- 831 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Оценка генетического разнообразия и филогенетических отношений черно-пестрого скота Новосибирской области с использованием микросателлитных маркеров. *Р.Б. Айтназаров, Т.М. Мишакова, Н.С. Юдин*

Генетика человека

- 839 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Вовлеченность генов *KIBRA* и *APOE* в формирование особенностей пространственного мышления человека. *А.В. Казанцева, Р.Ф. Еникеева, Ю.Д. Давыдова, Р.Н. Мустафин, З.Р. Тахирова, С.Б. Малых, М.М. Лобаскова, Т.Н. Тихомирова, Э.К. Хуснутдинова*
- 847 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Распространенность полиморфных вариантов генов *H-фиколина (FCN3)* и маннозосвязывающей лектин-ассоциированной сериновой протеазы-2 (*MASP2*) у коренных популяций российских Арктических территорий. *М.В. Смольникова, С.Ю. Терещенко*

Медицинская генетика

- 855 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Регуляторный потенциал SNP-маркеров генов, ассоциированных с бронхиальной астмой, артериальной гипертензией и их коморбидным фенотипом. *И.А. Гончарова, Е.Ю. Брагина, И.Ж. Жалсанова, М.Б. Фрейдин, М.С. Назаренко*
- 864 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Таксономический состав и биоразнообразие кишечного микробиома пациентов с синдромом раздраженного кишечника, язвенным колитом и бронхиальной астмой. *А.Ю. Тикунов, А.Н. Швалов, В.В. Морозов, И.В. Бабкин, Г.В. Селедцова, И.О. Волошина, И.П. Иванова, А.В. Бардашева, В.В. Морозова, В.В. Власов, Н.В. Тикунова*

Генетические коллекции

- 874 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Выявление разнообразия микромицетов рода *Fusarium* в агроэкосистемах равнинной части Северного Кавказа для пополнения Государственной коллекции фитопатогенных микроорганизмов ФГБНУ ВНИИФ. *Н.С. Жемчужина, М.И. Киселева, Т.М. Коломиец, И.Б. Аблова, А.П. Глинушкин, С.А. Елизарова*

Актуальные технологии

- 882 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Получение рекомбинантного штамма *Komagataella phaffii* – продуцента протеиназы К из *Tritirachium album*. *А.Б. Беклемышев, М.Б. Пыхтина, Я.М. Куликов, Т.Н. Горячковская, Д.В. Бочков, С.В. Сергеева, А.Р. Васильева, В.П. Романов, Д.С. Новикова, С.Е. Пельтек*
- 889 **МЕТОДЫ И ПРОТОКОЛЫ**
CLARITY и Light-Sheet микроскопия применительно к органоидам головного мозга человека. *Т.А. Шнайдер, И.Е. Пристяжнюк*
- 896
Алфавитный указатель авторов статей, опубликованных в журнале в 2021 г.

Plant genetics and breeding

- 797 **ORIGINAL ARTICLE**
Genetic polymorphism of local Abkhazian grape cultivars. *E.T. Ilnitskaya, M.V. Makarkina, I.V. Stepanov, I.I. Suprun, S.V. Tokmakov, V.Ch. Aiba, M.A. Avidzba, V.K. Kotlyar*
- 805 **ORIGINAL ARTICLE**
The relationship between the genetic status of the *Vrn-1* locus and the size of the root system in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *O.G. Smirnova, T.A. Pshenichnikova*
- 812 **REVIEW**
Haploid biotechnology as a tool for creating a selection material for sugar beets. *E.O. Kolesnikova, E.I. Donskikh, R.V. Berdnikov*

Animal genetics

- 822 **ORIGINAL ARTICLE**
Genetic diversity of the Central European wild boar (*Sus scrofa scrofa*) population and domestic pig (*Sus scrofa domesticus*) breeds based on a microsatellite DNA locus. *E.A. Snegin, V.M. Makeeva, A.P. Kaledin, A.M. Ostapchuk, I.D. Alazneli, A.V. Smurov*
- 831 **ORIGINAL ARTICLE**
Assessment of genetic diversity and phylogenetic relationships in Black Pied cattle in the Novosibirsk Region using microsatellite markers. *R.B. Aitnazarov, T.M. Mishakova, N.S. Yudin*

Human genetics

- 839 **ORIGINAL ARTICLE**
The role of the *KIBRA* and *APOE* genes in developing spatial abilities in humans. *A.V. Kazantseva, R.F. Enikeeva, Yu.D. Davydova, R.N. Mustafin, Z.R. Takhirova, S.B. Malykh, M.M. Lobaskova, T.N. Tikhomirova, E.K. Khusnutdinova*
- 847 **ORIGINAL ARTICLE**
Prevalence of the polymorphic H-ficolin (*FCN3*) genes and mannose-binding lectin-associated serine protease-2 (*MASP2*) in indigenous populations from the Russian Arctic regions. *M.V. Smolnikova, S.Yu. Tereshchenko*

Medical genetics

- 855 **ORIGINAL ARTICLE**
Putative regulatory functions of SNPs associated with bronchial asthma, arterial hypertension and their comorbid phenotype. *I.A. Goncharova, E.Yu. Bragina, I.Zh. Zhalsanova, M.B. Freidin, M.S. Nazarenko*
- 864 **ORIGINAL ARTICLE**
Taxonomic composition and biodiversity of the gut microbiome from patients with irritable bowel syndrome, ulcerative colitis, and asthma. *A.Y. Tikunov, A.N. Shvalov, V.V. Morozov, I.V. Babkin, G.V. Seledtsova, I.O. Voloshina, I.P. Ivanova, A.V. Bardasheva, V.V. Morozova, V.V. Vlasov, N.V. Tikunova*

Genetic collections

- 874 **ORIGINAL ARTICLE**
Revealing the diversity of *Fusarium* micromycetes in agroecosystems of the North Caucasus plains for replenishing the State Collection of Phytopathogenic Microorganisms of the All-Russian Scientific Research Institute of a Phytopathology. *N.S. Zhemchuzhina, M.I. Kiseleva, T.M. Kolomiets, I.B. Ablova, A.P. Glinushkin, S.A. Elizarova*

Mainstream technologies

- 882 **ORIGINAL ARTICLE**
Creation of a recombinant *Komagataella phaffii* strain, a producer of proteinase K from *Tritirachium album*. *A.B. Beklemishev, M.B. Pykhtina, Ya.M. Kulikov, T.N. Goryachkovskaya, D.V. Bochkov, S.V. Sergeeva, A.R. Vasileva, V.P. Romanov, D.S. Novikova, S.E. Peltek*
- 889 **METHODS AND PROTOCOLS**
CLARITY and Light-Sheet microscopy sample preparation in application to human cerebral organoids. *T.A. Shnaider, I.E. Pristyzhnyuk*
- 896
Alphabetical author index for the list of papers published in the journal in 2021

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Генетический полиморфизм аборигенных абхазских сортов винограда

Е.Т. Ильницкая¹✉, М.В. Макаркина¹, И.В. Степанов¹, И.И. Супрун¹, С.В. Токмаков¹, В.Ш. Айба², М.А. Авидзба², В.К. Котляр¹

¹ Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия, Краснодар, Россия

² Институт сельского хозяйства Академии наук Абхазии, Сухум, Абхазия

✉ Ilnitskaya79@mail.ru

Аннотация. Аборигенные сорта винограда различных стран мира – важная часть генофонда культуры. Особый интерес вызывают генотипы наиболее древних регионов виноградарства. Территории субтропической зоны Грузии и центральной части Абхазии относят к одному из центров возникновения культурной виноградной лозы. Целью работы было генотипирование аборигенных абхазских сортов винограда, изучение их генетического разнообразия на основе данных ДНК-профилеирования и сравнение с генотипами местных сортов других регионов виноградарства. Образцы растений были отобраны на территории Республики Абхазия в частных подворьях и в коллекции агрофирмы «Вина и воды Абхазии». Генотипирование абхазских сортов Авасирхва, Агбиж, Ажпашь, Ажизхквква, Ажикваца, Атвиж, Атыркуажь, Ачкыкаж, Качич выполнено с помощью 14 ДНК-маркеров, девять из которых являются стандартными микросателлитными маркерами, рекомендованными для паспортизации сортов винограда. Для уточнения размеров идентифицированных аллелей в работе использовали ДНК сортов винограда с известным аллельным составом по анализируемым локусам. Статистический анализ данных показал, что фактическая гетерозиготность по анализируемым локусам превысила ожидаемую, что говорит о генетическом полиморфизме исследуемой выборки сортов. Оценка генетического сходства внутри анализируемой группы по результатам генотипирования по 14 локусам показала отличие сортов Качич и Ажпашь от остальных абхазских сортов. Полученные ДНК-профили абхазских сортов были проверены на предмет соответствия ДНК-паспортам сортов винограда, представленных в международной базе данных. Грузинские сорта Ажизхквква и Цицка оказались синонимами по паспортам ДНК; у двух сортов из базы данных (итальянский *Albana bianca* и грузинский *Оджалеш*) обнаружены отличия в ДНК-паспортах от сортов Атыркуажь и Ажикваца соответственно только по одному аллелю. При сравнении идентифицированных абхазских генотипов винограда показано их отличие от выборки дагестанских, донских, греческих, турецких, итальянских, испанских и французских сортов и генетическое сходство с генотипами винограда Грузии.

Ключевые слова: *Vitis vinifera* L.; местные сорта винограда; генетическое разнообразие; SSR-локусы.

Для цитирования: Ильницкая Е.Т., Макаркина М.В., Степанов И.В., Супрун И.И., Токмаков С.В., Айба В.Ш., Авидзба М.А., Котляр В.К. Генетический полиморфизм аборигенных абхазских сортов винограда. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(8):797-804. DOI 10.18699/VJ21.092

Genetic polymorphism of local Abkhazian grape cultivars

Е.Т. Ilnitskaya¹✉, M.V. Makarkina¹, I.V. Stepanov¹, I.I. Suprun¹, S.V. Tokmakov¹, V.Ch. Aiba², M.A. Avidzba², V.K. Kotlyar¹

¹ North-Caucasian Federal Scientific Center of Horticulture, Viticulture, Winemaking, Krasnodar, Russia

² Institute of Agriculture of the Academy of Sciences of Abkhazia, Sukhum, Abkhazia

✉ Ilnitskaya79@mail.ru

Abstract. Local grape cultivars from different countries of the world are an important part of the gene pool of this culture. Of particular interest are the genotypes of the most ancient regions of viticulture. The territories of the subtropical zone of Georgia and the central part of Abkhazia belong to one of the centers of origin of the cultural grapevine. The purpose of the work was to genotype native Abkhazian grape cultivars, to study their genetic diversity based on DNA profiling data and to compare them with the genotypes of local varieties of other viticultural regions. Samples of plants were taken on the territory of the Republic of Abkhazia in private farmsteads and in the collection of the agricultural firm "Vina i Vody Abkhazii" ("Wines and Waters of Abkhazia"). The genotyping of the Abkhazian cultivars Avasirhva, Agbizh, Azhapsh, Azhizhkvakva, Azhikvaca, Atvizh, Atyркуazh, Achkykazh, Kachich was carried out using 14 DNA markers, 9 of which are standard microsatellite markers recommended for the identification of grape varieties. To improve our knowledge about the sizes of the identified alleles, we used the DNA of grape cultivars with a known allelic composition at the analyzed loci. Statistical analysis of the data showed that the observed heterozygosity for the analyzed loci exceeded expected values, which indicates a genetic polymorphism of the studied sample of varieties. Evaluation of genetic similarity within the analyzed group based on the results of genotyping at 14 loci showed that the cultivars Kachich and Azhapsh differed from the other Abkhazian varieties. The obtained DNA profiles of the Abkhazian cultivars were checked for compliance with DNA-fingerprints of grape varieties in the *Vitis* International Variety Catalogue. The Georgian varieties Azhizhkvakva and Tsitska turned out to be synonyms according to DNA profiles, two varieties from

the Database (Italian Albana bianca and Georgian Ojaleshi) have differences in DNA-fingerprints from the varieties Atyrkuazh and Azhikvatsa only in one allele, respectively. When comparing the identified Abkhazian grape genotypes, their difference from the sample of Dagestan, Don, Greek, Turkish, Italian, Spanish, and French varieties and genetic similarity with the genotypes of Georgian grapes were shown.

Key words: *Vitis vinifera* L.; local grape varieties; genetic diversity; SSR-loci.

For citation: Ilnitskaya E.T., Makarkina M.V., Stepanov I.V., Suprun I.I., Tokmakov S.V., Aiba V.Ch., Avidzba M.A., Kotlyar V.K. Genetic polymorphism of local Abkhazian grape cultivars. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(8):797-804. DOI 10.18699/VJ21.092

Введение

Виноград *Vitis vinifera* L. возделывается человеком уже около 5000 лет и в настоящее время является наиболее экономически значимой плодово-ягодной культурой. Аборигенные сорта различных регионов мира – важная часть генофонда культуры. Повышенный интерес вызывают генотипы древнейших регионов виноградарства. Западное Закавказье и, особенно, субтропическая зона Грузии и центральная часть Абхазии признаны одним из центров возникновения культурной виноградной лозы. В этих регионах существует множество древних аборигенных сортов и встречаются дикие лозы винограда.

Для оценки разнообразия генофонда культурных растений, в том числе винограда, широко применяют молекулярно-генетические методы. Наиболее часто для этих целей используют микросателлитные (SSR) маркеры. Для ДНК-паспортизации генотипов винограда разработан стандартный набор из девяти микросателлитных локусов (Bowers et al., 1999; This et al., 2004; VIVC, 2021). Использование ДНК-маркеров при идентификации сортов винограда и изучении их полиморфизма позволило прояснить многие вопросы в отношении одноименных сортов-омонимов, а также выявить одинаковые генотипы с разными наименованиями-синонимами, определить наиболее генетически близкие и отдаленные формы (Crespan, Milani, 2001; Fossati et al., 2001; Vokurka et al., 2003; Santiago et al., 2005; Moreno-Sanz et al., 2008; Cipriani et al., 2010; Гориславец и др., 2015; Raimondi et al., 2015; Mandić et al., 2019; Papapetrou et al., 2020; Pastore et al., 2020). Например, при помощи генетического анализа 35 автохтонных сортов Боснии и Герцеговины по девяти стандартным микросателлитным локусам было обнаружено несколько синонимов и омонимов. Сравнение генотипов из Боснии и Герцеговины с сортами винограда Хорватии также выявило синонимы и омонимы среди этих двух групп (Mandić et al., 2019).

При проведении ПЦР-анализа крымских аборигенных сортов было обнаружено, что сорта Шабаш, Манжил ал и Шабаш крупноягодный имеют идентичные ДНК-профили. Сорт Шабаш крупноягодный является клоном сорта Шабаш, а сорт Манжил ал – это синоним сорта Шабаш (Гориславец и др., 2015).

Сто семьдесят восемь сортов винограда, от широко культивируемых до почти исчезнувших, собранных в Эмилии-Романье (Северная Италия), были проанализированы по 10 микросателлитным маркерам (Pastore et al., 2020). Полученные данные показали, что в регионе встречаются сорта, которые культивируются в других районах Италии и в других странах, но под иными, местными наименованиями. Также были выявлены и уникальные генотипы; 62 из 122 идентифицированных уникальных генотипов

не описаны в литературе, за исключением упоминаний в исторических документах. Вероятно, они принадлежат к местному генофонду и, возможно, являются автохтонами этого региона.

Коллекция из 1005 образцов винограда была генотипирована по 34 микросателлитным локусам (SSR) с целью анализа генетического разнообразия и изучения происхождения (Cipriani et al., 2010). Сравнение молекулярных профилей выявило 200 групп синонимии. Коррекция списка с учетом полных синонимов сократила базу данных до 745 уникальных генотипов.

Виноградарство и виноделие имеют особое значение для народа Абхазии. О древности виноградарства и виноделия этого края свидетельствует множество археологических и палеоботанических находок (Чамагуа, 1968). Здесь даже существует местный тип ведения культуры винограда – маглари (возделывание лиан на деревьях). Автохтонным сортам Абхазии характерны поздний период созревания и способность к длительному сохранению урожая на кустах. Славу абхазских вин в основном связывают с сортами Ауасырхуа (Авасирхва), Качич (Качичи), Амлаху.

В истории виноградарства Абхазии были периоды, обусловленные политическими и экономическими причинами, когда данная отрасль то усиленно развивалась, то приходила в упадок. Наибольший урон был нанесен при появлении в регионе филлоксеры: насаждения местных сортов активно уничтожались, значительные площади были засажены устойчивым американским сортом Изабелла. Многие сорта были утеряны и сохраняются в частных подворьях единичными кустами. Однако в последнее время интерес к аборигенным сортам растет, и молекулярно-генетические исследования могут быть использованы для ДНК-профилирования (паспортизации) местных сортов, оценки полиморфизма генотипов, уточнения происхождения неизвестных форм.

Целью исследования были генотипирование абхазских сортов винограда и оценка генетического разнообразия изученной выборки на основе полиморфизма микросателлитных локусов.

Материалы и методы

В работу были взяты растения, соответствующие ампелографическим описаниям абхазских сортов, приведенным в ампелографии (Ампелография СССР..., 1953, 1954, 1963, 1970). Некоторые образцы сортов, включенных в исследование, собраны в нескольких географических точках Абхазии (Качич, Авасирхва, Агбиж), другие взяты из коллекции агрофирмы ООО «Вина и воды Абхазии» (Атыркуаж, Ажикваца, Ативжь, Ажиккваква, Ачкыкажь, Ажапшь) (табл. 1).

Таблица 1. Список сортов винограда, использованных в исследовании

№ п/п	Сорт	Страна происхождения	№ п/п	Сорт	Страна происхождения
1	Наринс	Турция	34	Сибирьковский	Дон (Россия)
2	Василико		35	Цимлянский черный	
3	Бойязкере		36	Варюшкин	
4	Япынджак		37	Красностоп золотовский	
5	Папазкарасы		38	Брусковатенький	
6	Хасандеде		39	Шиловостый	
7	Хороз Караси		40	Каберне Совиньон	Франция
8	Ачлади	Греция	41	Шардоне	
9	Котсифали		42	Мерло	
10	Мандилария		43	Совиньон Блан	
11	Акики		44	Алиготе	
12	Дафни		45	Пино нуар	
13	Фокиано		46	Монтепульчано	Италия
14	Какотругис		47	Санджовезе	
15	Мцване кахури	Грузия	48	Неббиоло	
16	Ркацители		49	Лакрима	
17	Тавквери		50	Верментино	
18	Цоликоури		51	Гарганега	
19	Александраули		52	Темпранильо	Испания
20	Чинури		53	Парельяда	
21	Оджалеш		54	Скьява грасса	
22	Саперави		55	Гарнача	
23	Месхури мцване		56	Альбилло	
24	Алый Терский	Дагестан (Россия)	57	Залема	
25	Асыл Кара		58	Качич	Абхазия
26	Риш баба		59	Атыркуажь	
27	Сарах		60	Авасирхва	
28	Шавраны		61	Атвижь	
29	Баят Капы		62	Ажикжвак	
30	Агадаи		63	Ачкыкажь	
31	Гок ала		64	Ажапшь	
32	Тавлинский поздний		65	Агбиж	
33	Кукановский	Дон (Россия)	66	Ажикваца	

ДНК выделяли из листьев коронки однолетних побегов трех-пяти типичных растений сорта методом на основе ЦТАБ-буфера (Rogers, Bendich, 1985). Для ДНК-паспортизации использовали стандартный набор из девяти микросателлитных (SSR) маркеров, рекомендованный для идентификации генотипов винограда (Bowers et al., 1999; This et al., 2004; VIVC, 2021). Для более полной оценки полиморфизма изучаемой выборки дополнительно включили в работу пять SSR-маркеров (UDV737, GF09-46, ScORGF15-02, GF15-42, CenGen6) (Di Gaspero et al., 2012; Schwander et al., 2012; van Heerden et al., 2014; Zender et al., 2017). ДНК-фингерпринтинг сортов Ажикжвак,

Качич и Авасирхва по девяти стандартным микросателлитным локусам был выполнен нами ранее (Ильницкая и др., 2019–2021).

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 50 нг геномной ДНК, 1.5 единицы Taq-полимеразы, 1× буфер для Taq-полимеразы с сульфатом аммония и магнием, 2 mM MgCl₂, по 0.2 mM каждого dNTP (дезоксинуклеотидтрифосфаты) («СибЭнзим-М», Москва) и 200 мкМ каждого из праймеров (ООО «Синтол», Москва), с использованием прибора BioRad (США), придерживаясь следующего протокола: начальная денатурация – 10 с при

+95 °C; далее 34 цикла синтеза: денатурация – 10 с при +95 °C, отжиг праймеров – 30 с при +55 °C для маркеров VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, UDV737, CenGen6, при +58 °C для VrZAG62, VrZAG79, ScORGF15-02, GF15-42, при +60 °C для VVMD25, VVMD28, VVMD32, GF09-46, элонгация – 30 с при +72 °C; завершающий цикл (финальная элонгация) – 3 мин при +72 °C.

Разделение и анализ длин продуктов ПЦР осуществляли методом капиллярного электрофореза с помощью генетического анализатора ABI Prism 3130. Амплифицированные фрагменты выравнивали относительно контрольных (референсных) генотипов, включенных нами в работу, с известным аллельным составом по анализируемым локусам: Пино нуар (для маркеров VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD32, VrZAG62, VrZAG79), Саперави северный (GF09-46), Seyve Vilar 12-375 (UDV737), Регент (ScORGF15-02, GF15-42, CenGen6).

Статистическую обработку данных полиморфизма локусов в исследованной выборке сортов проводили в программе GenAlEx 6.5 (Peakall, Smouse, 2012). Оценка генетических взаимосвязей была выполнена в программе PAST 2.17c с помощью метода попарного внутригруппового невзвешенного среднего (UPGMA) и метода главных координат (PCoA) (Hammer et al., 2001).

Для изучения генетического сходства автохтонных сортов Абхазии с местным генофондом винограда других зон виноградарства в работу включили выборку сортов, которые относятся к аборигенным формам Грузии, Греции, Дагестана, Дона (Ростовская область РФ), Испании, Италии, Франции, Турции (см. табл. 1). Указанные регионы вино-

градарства также имеют древнюю историю возделывания культуры *V. vinifera* L., географическую близость или исторические связи с Абхазией. ДНК-профили генотипов местных сортов по девяти SSR-локусам, стандартным для генотипирования *V. vinifera*, взяты нами из международной базы данных *Vitis* International Variety Catalogue (VIVC). Байесовский анализ проведен в программе Structure 2.3.4 с использованием 66 генотипов (см. табл. 1), оптимальное число кластеров установлено методом Evanno, расчет выполнен в онлайн-программе Structure Harvester (Evanno et al., 2005; Earl, vonHoldt, 2012).

Результаты и обсуждение

Результаты генотипирования девяти абхазских сортов винограда (Качич, Атыркуажь, Авасирхва, Атвижь, Ажижквква, Ачкыкажь, Ажапшь, Агбиж, Ажикваца) по 14 микросателлитным локусам представлены в табл. 2. Идентифицированные профили каждого сорта по девяти SSR-локусам (VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD32, VrZAG62, VrZAG79) были проверены в международной базе данных ДНК-паспортов сортов винограда *Vitis* International Variety Catalogue (VIVC, 2021). Выявлено, что аллельный состав ДНК-профиля сорта винограда Ажижквква по девяти микросателлитным локусам полностью соответствует ДНК-профилю грузинского аборигенного сорта винограда Цицка, представленному в базе данных (Ильницкая и др., 2021). Указанные сорта схожи по фенотипическим признакам и, возможно, являются сортами-синонимами или клоновыми вариациями. ДНК-профиль сорта винограда Ажикваца тоже показал близкое соответствие ДНК-профилю грузин-

Таблица 2. ДНК-профили абхазских сортов винограда

Сорт	Длина фрагмента, п. н.													
	VVS2	VVMD5	VVMD7	VVMD25	VVMD27	VVMD28	VVMD32	VrZAG62	VrZAG79	UDV737	GF09-46	ScORGF15-02	GF15-42	CenGen6
Качич	153	234	239	239	186	234	262	194	237	291	395	240	179	271
	155	240	249	267	193	248	272	196	255	291	425	240	185	285
Атыркуажь	133	228	247	241	180	234	250	194	237	295	425	195	177	263
	143	234	249	255	190	236	272	200	251	295	425	240	177	277
Авасирхва	141	234	239	239	184	234	248	200	251	285	395	240	193	273
	145	242	249	249	190	248	262	204	257	285	413	240	199	299
Атвижь	137	228	239	239	184	236	258	188	251	285	413	240	193	263
	145	234	239	249	193	236	262	188	255	295	425	240	199	301
Ажижквква	143	228	239	239	186	236	262	194	251	285	423	240	193	273
	145	236	253	255	188	258	272	196	251	289	425	240	197	277
Ачкыкажь	143	228	239	239	186	236	262	200	251	285	395	240	179	277
	145	228	249	255	193	251	262	204	255	295	413	240	185	303
Ажапшь	123	234	239	240	184	226	262	196	247	285	395	240	179	275
	155	234	249	267	193	248	272	204	255	291	423	240	179	289
Агбиж	143	234	233	239	180	234	248	188	237	285	395	195	193	263
	153	240	239	267	190	236	262	204	239	285	425	240	193	301
Ажикваца	141	234	241	239	180	228	262	194	237	285	395	240	177	277
	153	242	247	255	184	236	262	208	251	289	395	240	179	283

ского аборигенного сорта винограда Оджалеш: отличие найдено только по одному аллелю в локусе VrZAG79 (VIVC, 2021).

Грузия является географически наиболее близким соседом и страной с древней культурой виноградарства, поэтому генетическое сходство аборигенных сортов этих регионов вполне ожидаемо. Однако мы обнаружили также сходство сорта Атыркуажь с автохтонным итальянским сортом винограда *Albana bianca*: ДНК-профили идентичны, за исключением одного аллеля в локусе VrZAG79 (VIVC, 2021). *Albana bianca* достаточно распространенный сорт и под другими названиями встречается в разных странах (VIVC, 2021). Изучение ампелографических характеристик стародавнего итальянского сорта *Albana bianca*, представленных в литературе, показывает определенное фенотипическое сходство с сортом Атыркуажь. Из-за отсутствия у нас образцов ДНК сорта *Albana bianca* сравнить генотипы по большому количеству SSR-локусов и уточнить уровень их генетического сходства не было возможности.

В целом генотипы аборигенных сортов показали достаточно высокий полиморфизм. Среднее значение фактической гетерозиготности ($H_o = 0.810$) превысило значение ожидаемой ($H_e = 0.712$) в исследованной выборке из девяти абхазских сортов винограда по 14 микросателлитным локусам (табл. 3). Наименее полиморфным оказался локус ScORGF15-02: выявлено только 2 аллеля. По наиболее полиморфному локусу CenGen6 было идентифицировано 11 аллелей. Отметим, что в ДНК-профиле сорта винограда Ажапшь в локусе VVMD25 идентифицирован очень редкий аллель размером 240 п. н., который ранее описан только у одного сорта из представленных в базе данных VIVC.

Для оценки генетического сходства изученных абхазских сортов был проведен кластерный анализ на основе данных генотипирования SSR-маркерами. Анализируемые сорта разделились на два кластера, один из которых содержит семь из девяти изучаемых сортов и внутри которого Агбиж, Атыркуажь, Ажикваца сгруппировались в отдельный подкластер, а Авасирхва, Атвижь, Ачкыкажь, Ажикваква – в другой (рис. 1). Важно отметить, что генотипы сортов Ажапшь и Качич выделились в отдельный кластер. Локализация девяти абхазских сортов в пространстве главных координат показала, что сорта Ажапшь и Качич группируются вместе и располагаются более отдаленно от других семи сортов (рис. 2).

Для более широкого понимания генетической структуры популяции сортов винограда Абхазии и взаимосвязей с мировым генофондом мы сравнили их с генотипами аборигенных сортов других регионов виноградарства (Грузия, Греция, Дагестан, Дон (Ростовская область РФ), Испания, Италия, Франция, Турция). ДНК-профили сортов по девяти стандартным SSR-локусам взяты из международной базы данных VIVC. Байесовский анализ показал наибольшую степень сходства сортов Абхазии с сортами винограда Грузии (рис. 3). Причем три генотипа среди грузинских сортов показали сходство с другими группами сортов (Тавквери, Саперави, Месхури мцване), группа же абхазских сортов более однородна.

Таблица 3. Характеристика микросателлитных локусов в исследованной выборке абхазских сортов винограда

Локус	Na	Ne	Ho	He
VVS2	8.000	6.231	1.000	0.840
VVMD5	5.000	3.306	0.778	0.698
VVMD7	6.000	3.375	0.889	0.704
VVMD25	6.000	4.050	1.000	0.753
VVMD27	6.000	5.400	1.000	0.815
VVMD28	7.000	4.154	0.889	0.759
VVMD32	5.000	2.656	0.778	0.623
VrZAG62	6.000	5.400	0.889	0.815
VrZAG79	6.000	3.857	0.889	0.741
UDV737	4.000	2.945	0.556	0.660
GF09-46	4.000	3.306	0.778	0.698
ScORGF15-02	2.000	1.246	0.222	0.198
GF15-42	6.000	4.765	0.667	0.790
CenGen6	11.000	8.100	1.000	0.877
Среднее	5.857	4.199	0.810	0.712

Примечание. Na – общее число выявленных аллелей; Ne – эффективное число аллелей; Ho и He – фактическая и ожидаемая гетерозиготность соответственно.

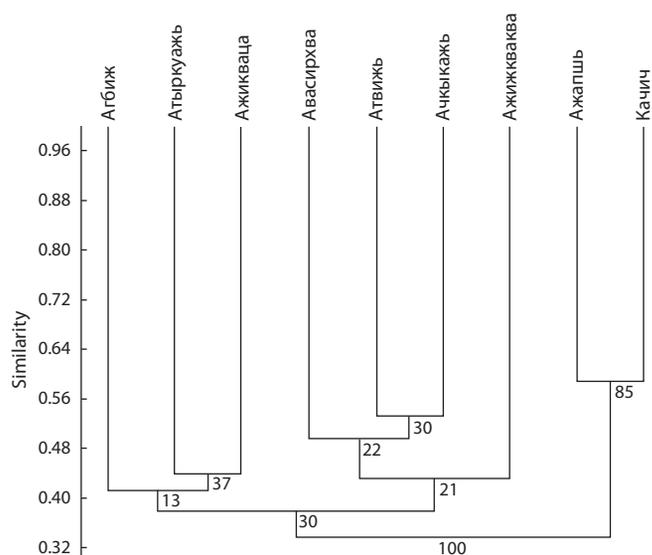


Рис. 1. Дендрограмма генетического сходства абхазских аборигенных сортов винограда по данным ДНК-профилирования.

В узлах ветвления указаны значения бутстреп-поддержки (в %), рассчитанные на основе 50 000 случайных выборок.

Выделяется своей однородностью и отличием от других также группа французских сортов, взятых нами в исследование. В группе итальянских сортов наиболее близок к абхазским генотип сорта Неббиоло, который имеет немало синонимов и характеризуется поздним сроком созревания. Среди греческих сортов можно отметить генотип

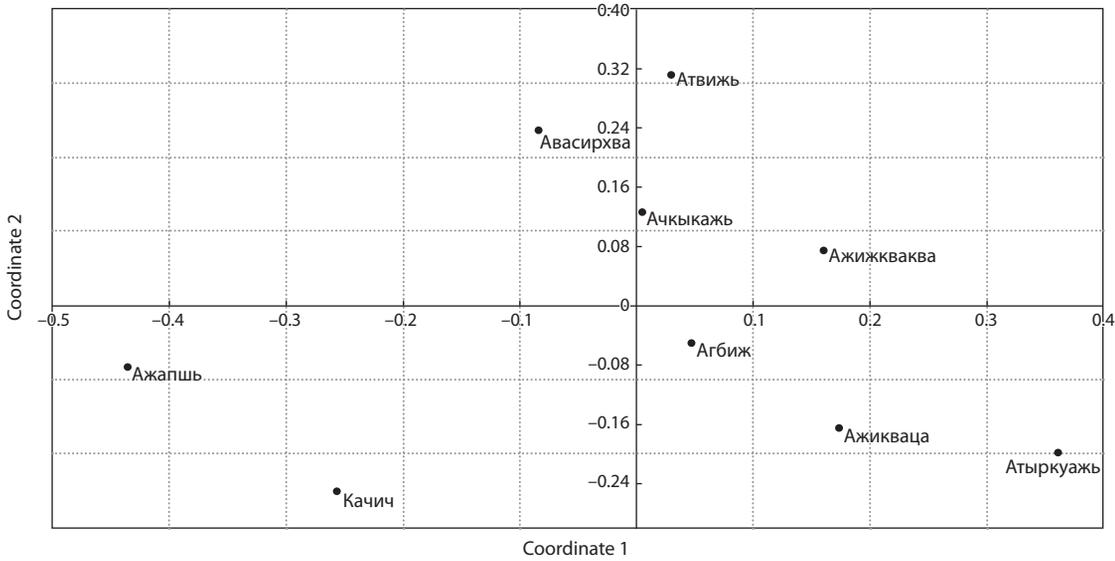


Рис. 2. Распределение абхазских сортов винограда в пространстве главных координат по данным ДНК-профилерования.

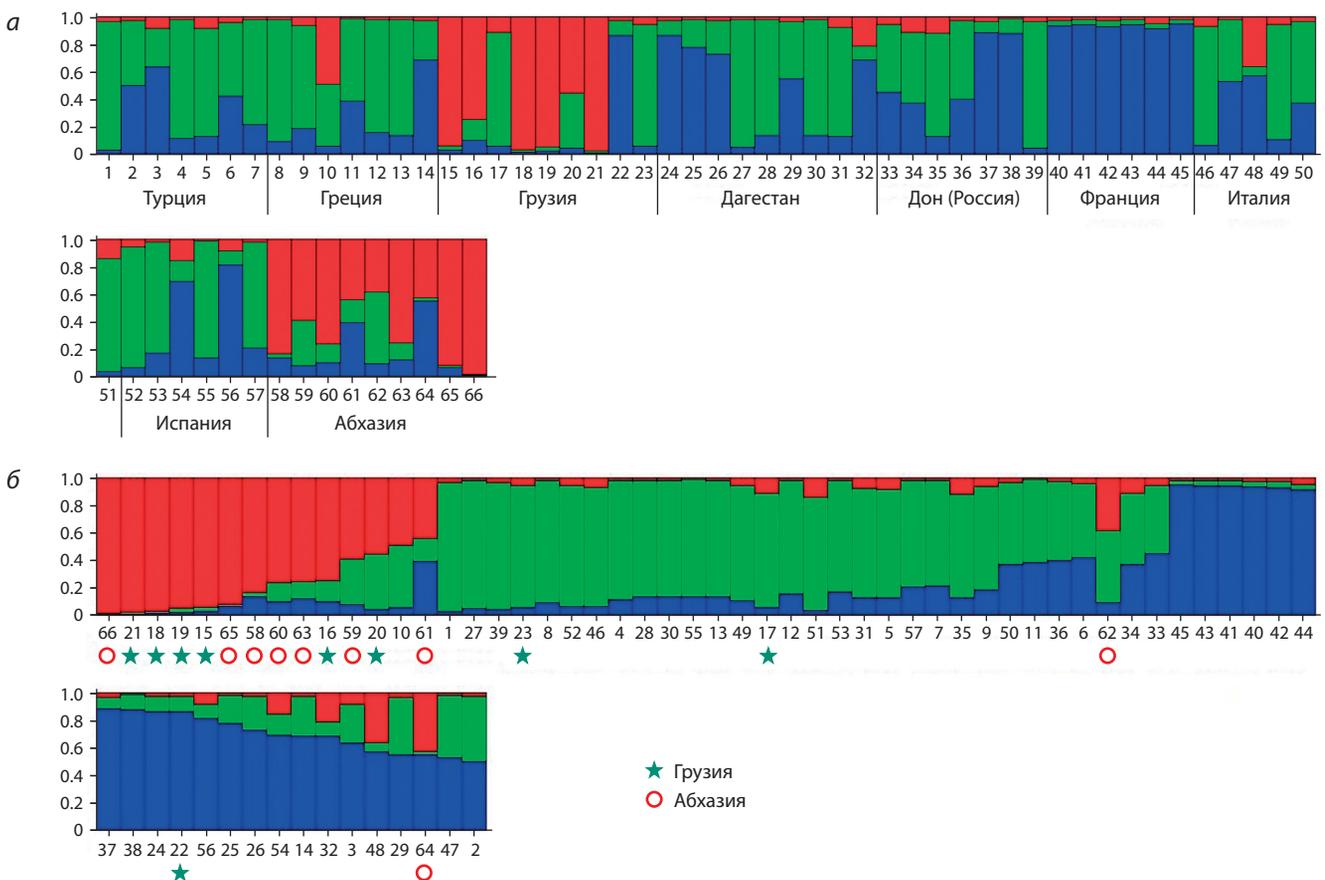


Рис. 3. Популяционная структура 66 сортов винограда, полученная на основании генотипирования с помощью девяти SSR-маркеров: а – группировка сортов по происхождению; б – кластеризация по генетическому сходству. Вертикальная ось обозначает вероятность отнесения каждого генотипа к предполагаемому кластеру, обозначенным разными цветами.

1 – Наринс, 2 – Василико, 3 – Бойязкере, 4 – Япынджак, 5 – Папазкарасы, 6 – Хасандеде, 7 – Хороз Караси, 8 – Ачлади, 9 – Котсифали, 10 – Мандилария, 11 – Акики, 12 – Дафни, 13 – Фокиано, 14 – Какотругис, 15 – Мцване кахури, 16 – Ркацители, 17 – Тавквери, 18 – Цоликоури, 19 – Александраули, 20 – Чинури, 21 – Оджалеши, 22 – Саперави, 23 – Месхури мцване, 24 – Альий Терский, 25 – Асыл Кара, 26 – Риш баба, 27 – Сарах, 28 – Шавраны, 29 – Баят Капы, 30 – Агадаи, 31 – Гок ала, 32 – Тавлинский поздний, 33 – Кукановский, 34 – Сибирьковский, 35 – Цимлянский черный, 36 – Варюшкин, 37 – Красностоп золотовский, 38 – Брусковатенький, 39 – Шилохвостый, 40 – Каберне Совиньон, 41 – Шардоне, 42 – Мерло, 43 – Совиньон Блан, 44 – Алиготе, 45 – Пино нуар, 46 – Монтепульчано, 47 – Санджовезе, 48 – Неббиоло, 49 – Лакрима, 50 – Верментино, 51 – Гарганега, 52 – Темпранильо, 53 – Парельяда, 54 – Скъява гросса, 55 – Гарнача, 56 – Альбилло, 57 – Залема, 58 – Качич, 59 – Атыркуажь, 60 – Авасирхва, 61 – Атвижь, 62 – Ажиккваква, 63 – Ачкыкажь, 64 – Ажашь, 65 – Агбиж, 66 – Ажикваца.

сорта Мандилария, который отличается от остальных в этой группе и схож по структуре с сортами Абхазии. Это может свидетельствовать о генетических взаимосвязях генофонда винограда Греции и Абхазии. Известно, что во времена Древней Греции в определенный период территория Абхазии находилась под властью Греции. Тогда, возможно, и мог происходить обмен генофондом винограда.

Большинство сортов Грузии и Абхазии формируют единую группу и отличаются от других генотипов (см. рис. 3, б). Два сорта, Ажижквква и Ажапшь, находятся вне этой группы, однако в структуре этих генотипов виден значимый вклад гипотетической популяции (обозначена красным цветом), который превалирует в группе грузинских и абхазских сортов.

Заключение

Проведено генотипирование аборигенных абхазских сортов винограда Авасирхва, Агбиж, Ажапшь, Ажижквква, Ажикваца, Атвижь, Атыркуажь, Ачкыкажь, Качич с использованием 14 ДНК-маркеров, в том числе 9 маркеров, общепринятых для ДНК-паспортизации сортов винограда. При сравнении выявленных ДНК-профилей с ДНК-профилями в международной базе данных показано совпадение аллельного состава по микросателлитным локусам VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD32, VrZAG62, VrZAG79 сорта Ажижквква с грузинским аборигенным сортом Цицка, сорт Ажикваца отличается на один аллель от грузинского сорта Оджалеша. Сорт Атыркуажь также имеет отличие по одному аллелю из девяти изученных от итальянского сорта винограда Albana bianca.

Оценка генетической структуры популяции сортов винограда Абхазии и ее взаимосвязи с аборигенным генофондом других регионов виноградарства показала сходство абхазских сортов с грузинскими и отличие от остальных групп сортов ближних соседних регионов (дагестанских, донских, турецких) и более отдаленных регионов древнего виноградарства (греческих, итальянских, испанских и французских). Полученные результаты позволяют предполагать автохтонное происхождение местных сортов из популяций дикорастущего генофонда винограда.

Список литературы / References

Ампелография СССР. Стандартные и перспективные сорта винограда. Т. 2. (под ред. А.М. Фролова-Багрева). М.: Пищепромиздат, 1953.

[Frolov-Bagrev A.M. (Ed.) Ampelography of the USSR. Standard and promising grape varieties. Vol. 2. Moscow: Pishchepromizdat Publ., 1953. (in Russian)]

Ампелография СССР. Стандартные и перспективные сорта винограда. Т. 3. (под ред. А.М. Фролова-Багрева). М.: Пищепромиздат, 1954.

[Frolov-Bagrev A.M. (Ed.) Ampelography of the USSR. Standard and promising grape varieties. Vol. 3. Moscow: Pishchepromizdat Publ., 1954. (in Russian)]

Ампелография СССР. Малораспространенные сорта винограда. Т. 1. (под ред. А.М. Негруля и др.). М.: Пищепромиздат, 1963.

[Negrul A.M. et al. (Eds.) Ampelography of the USSR. Less common grape varieties. Vol. 1. Moscow: Pishchepromizdat Publ., 1963. (in Russian)]

Ампелография СССР. Справочный том (под ред. А.М. Негруля). М.: Пищ. пром-сть, 1970.

[Negrul A.M. et al. (Eds.) Ampelography of the USSR. Reference volume. Moscow: Pishchevaya Promyshlennost' Publ., 1970. (in Russian)]

Гориславец С.М., Меметова Э.Ш., Рисованная В.И. ДНК-профилирование сортов винограда Манжил ал, Шабаш и Шабаш крупноядный и уточнение их генетических взаимосвязей на основе анализа микросателлитных локусов. *Магарач. Виноградарство и виноделие*. 2015;3:17-18.

[Goryslavets S.M., Memetova E.Sh., Risovannaya V.I. DNA profiling of grape varieties Mangil al, Shabash and Shabash krupnoyadnyi and clarification of their genetic relationships using microsatellite loci. *Magarach. Vinogradarstvo i Vinodelie = Magarach. Viticulture and Winemaking*. 2015;3:17-18. (in Russian)]

Ильницкая Е.Т., Айба В.Ш., Макаркина М.В., Токмаков С.В., Авидзба М.А. ДНК-профилирование аборигенного абхазского сорта винограда «Качич». *Садоводство и виноградарство*. 2019;6:9-13. DOI 10.31676/0235-2591-2019-6-9-13.

[Ilitskaya E.T., Ayba V.Sh., Makarkina M.V., Tokmakov S.V., Avidzba M.A. DNA-fingerprinting of local Abkhazian grape variety Kachich. *Sadovodstvo i Vinogradarstvo = Horticulture and Viticulture*. 2019;6:9-13. DOI 10.31676/0235-2591-2019-6-9-13. (in Russian)]

Ильницкая Е.Т., Макаркина М.В., Токмаков С.В., Красильников А.А., Айба В.Ш., Авидзба М.А. Генотипирование растений винограда сорта «Качич» из разных мест произрастания. *Плодоводство и виноградарство Юга России*. 2020;61(1):33-43. DOI 10.30679/2219-5335-2020-1-61-33-43.

[Ilitskaya E.T., Makarkina M.V., Tokmakov S.V., Krasilnikov A.A., Aiba V.Ch., Avidzba M.A. Genotyping of grape plants of "Kachich" variety from different places of growing. *Plodovodstvo i Vinogradarstvo Yuga Rossii = Fruit Growing and Viticulture of South Russia*. 2020;61(1):33-43. DOI 10.30679/2219-5335-2020-1-61-33-43. (in Russian)]

Ильницкая Е.Т., Макаркина М.В., Токмаков С.В., Айба В.Ш. Идентификация генотипа аборигенного абхазского сорта винограда Ажшквуакуа (Ажижквква). *Плодоводство и виноградарство Юга России*. 2021;67(1):91-101. DOI 10.30679/2219-5335-2021-1-67-91-101.

[Ilitskaya E.T., Makarkina M.V., Tokmakov S.V., Aiba V.Ch. Identification of the genotype of local Abkhazian grape cultivar Azhshkuakua (Azhizhkvakva). *Plodovodstvo i Vinogradarstvo Yuga Rossii = Fruit Growing and Viticulture of South Russia*. 2021;67(1):91-101. DOI 10.30679/2219-5335-2021-1-67-91-101. (in Russian)]

Чамарга Е.И. Виноград Абхазии. Сухуми: Алашара, 1968.

[Chamagua E.I. Grapes of Abkhazia. Sukhumi: Alashara Publ., 1968. (in Russian)]

Bowers J., Dangel G., Meredith C.P. Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. *Am. J. Enol. Vitic.* 1999;50:243-246.

Cipriani G., Spadotto A., Jurman I., Di Gaspero G., Crespan M., Meneghetti S., Frare E., Vignani R., Cresti M., Morgante M., Pezzotti M., Pe E., Policriti A., Testolin R. The SSR-based molecular profile of 1005 grapevine (*Vitis vinifera* L.) accessions uncovers new synonymy and parentages, and reveals a large admixture amongst varieties of different geographic origin. *Theor. Appl. Genet.* 2010; 121:1569-1585. DOI 10.1007/s00122-010-1411-9.

Crespan M., Milani N. The Muscats: a molecular analysis of synonyms, homonyms and genetic relationships within a large family of grapevine cultivars. *Vitis*. 2001;40(1):23-30. DOI 10.5073/vitis.2001.40.23-30.

Di Gaspero G., Copetti D., Coleman C., Castellarin S.D., Eibach R., Kozma P., Lacombe T., Gambetta G., Zvyagin A., Cindrić P., Kovács L., Morgante M., Testolin R. Selective sweep at the *Rpv3* locus during grapevine breeding for downy mildew resistance. *Theor. Appl. Genet.* 2012;124:227-286. DOI 10.1007/s00122-011-1703-8.

Earl D.A., vonHoldt B.M. Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno

- method. *Conserv. Genet. Resour.* 2012;4(2):359-361. DOI 10.1007/s12686-011-9548-7.
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol. Ecol.* 2005;14(8):2611-2620. DOI 10.1111/j.1365-294x.2005.02553.x.
- Fossati T., Labra M., Castiglione S., Failla O., Scienza A., Sala F. The use of AFLP and SSR molecular markers to decipher homonyms and synonyms in grapevine cultivars: the case of the varietal group known as "Schiave". *Theor. Appl. Genet.* 2001;102:200-205. DOI 10.1007/s001220051636.
- Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: PAleontological STatistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electronica.* 2001;4(1):1-9.
- Mandić A., Žulj Mihaljević M., Leko M., Primorac J., Beljo J. Synonyms and homonyms in Herzegovinian and Dalmatian grapevine cultivars. *Acta Hort.* 2019;1248:15-20. DOI 10.17660/ActaHortic.2019.1248.3.
- Moreno-Sanz P., Suárez B., Loureiro M.D. Identification of synonyms and homonyms in grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) from Asturias (Spain). *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 2008;83(6):683-688. DOI 10.1080/14620316.2008.11512444.
- Papapetrou M., Loukovitis D., Papadopoulos O., Kazlari Z., Peristeraki A., Arsenova S., Bardarova D., Doncheva D., Theocharis S., Karagiannidis C., Koundouras S., Giannakoula A., Aggelopoulos S., Chatziplis D. Genetic diversity of local Greek and Bulgarian grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties. *Diversity.* 2020;12(7):273. DOI 10.3390/d12070273.
- Pastore C., Fontana M., Raimondi S., Ruffa P., Filippetti I., Schneider A. Genetic characterization of grapevine varieties from Emilia-Romagna (northern Italy) discloses unexplored genetic resources. *Am. J. Enol. Vitic.* 2020;71(4):334-343. DOI 10.5344/ajev.2020.19076.
- Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics.* 2012;28:2537-2539. DOI 10.1093/bioinformatics/bts460.
- Raimondi S., Ruffa P., De Lorenzis G., Imazio S., Fiori S., Failla O., Schneider A. Detection of grapevine synonyms in Lombardy and Piedmont regions (northern Italy). *Vitis.* 2015;54:31-36. DOI 10.5073/vitis.2015.54.special-issue.31-36.
- Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.* 1985;19(1):69-76. DOI 10.1007/BF00020088.
- Santiago J.-L., Boso S., Vilanova M., Martínez M.-C. Characterisation of cv. Albarin Blanco (*Vitis vinifera* L.). Synonyms, homonyms and errors of identification associated with this cultivar. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* 2005;39(2):57-65. DOI 10.20870/oeno-one.2005.39.2.901.
- Schwander F., Eibach R., Fechter I., Hausmann L., Zyprian E., Töpfer R. *Rpv10*: a new locus from the Asian *Vitis* gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine. *Theor. Appl. Genet.* 2012;124(1):163-176. DOI 10.1007/s00122-011-1695-4.
- This P., Jung A., Boccacci P., Borrego J., Botta R., Costantini L., Crespan M., Dangl G.S., Eisenheld C., Ferreira-Monteiro F., Grando S., Ibáñez J., Lacombe T., Laucou V., Magalhães R., Meredith C.P., Milani N., Peterlunger E., Regner F., Zulini L., Maul E. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 2004;109:1048-1058. DOI 10.1007/s00122-004-1760-3.
- van Heerden C.J., Burger P., Vermeulen A., Prins R. Detection of downy and powdery mildew resistance QTL in a 'Regent' × 'RedGlobe' population. *Euphytica.* 2014;200:281-295. DOI 10.1007/s10681-014-1167-4.
- VIVC. *Vitis* International Variety Catalogue. Last modified: 2021-03-14. Julius Kühn-Institut, 2021. Available at: <https://www.vivc.de/index.php?r=site%2Findex>.
- Vokurka A., Maletic E., Benjak A., Karoglan-Kontic J., Pejic I. Application of molecular markers for analysis of presumed synonyms and homonyms within Croatian grapevine cultivars. *Acta Hort.* 2003;603:581-584. DOI 10.17660/ActaHortic.2003.603.77.
- Zendler D., Schneider P., Toepfer R., Zyprian E. Fine mapping of *Ren3* reveals two loci mediating hypersensitive response against *Erysiphe necator* in grapevine. *Euphytica.* 2017;213(3):68. DOI 10.1007/s10681-017-1857-9.

ORCID ID

E.T. Il'nitskaya orcid.org/0000-0002-2446-0971
M.V. Makarkina orcid.org/0000-0002-3397-0666
I.V. Stepanov orcid.org/0000-0002-6251-300X
I.I. Suprun orcid.org/0000-0003-0355-8395
S.V. Tokmakov orcid.org/0000-0002-2092-7757
V.K. Kotlyar orcid.org/0000-0002-4865-0323

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Академии наук Абхазии в рамках научного проекта № 19-516-40001 Абх_а.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 15.03.2021. После доработки 22.07.2021. Принята к публикации 22.07.2021.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Взаимосвязь между генетическим статусом локуса *Vrn-1* и размерами корневой системы у мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.)

О.Г. Смирнова, Т.А. Пшеничникова

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
wheatpsh@bionet.nsc.ru

Аннотация. Одним из главных способов тонкой настройки адапционного потенциала сортов пшеницы является регулирование сроков цветения с использованием генов локуса *Vrn-1*, определяющего тип и скорость развития. Исследования, связывающие сроки цветения с формированием корневой системы в нормальных и засушливых условиях, единичны. Недавно с использованием интрогрессированных и изогенных линий пшеницы было показано, что локус *Vrn-1* участвует в генетическом контроле длины и массы корней и угла наклона корней в почве как на поливе, так и на засухе. Из трех гомеоаллельных генов – *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1* – ген *Vrn-A1* наиболее сильно уменьшал размеры корневой системы у озимого генотипа. Целью нашей работы было определить, влияет ли аллельный состав генов локуса *Vrn-1* на развитие корневой системы у различающихся по срокам цветения семи яровых сортов и двух линий мягкой пшеницы в условиях нормального полива и засухи. Исследования проведены в условиях гидропонной теплицы, засуха создавалась на стадии кущения. Мы показали, что раннецветущие сорта пшеницы с доминантным аллелем *Vrn-A1a* в нормальных условиях полива имеют корни меньшей массы и длины по сравнению с поздноцветущими носителями доминантных гомеоаллелей *Vrn-B1* и *Vrn-D1*. На засухе длина корней уменьшалась незначительно, а вот масса корней достоверно снижалась у всех генотипов, за исключением сорта Диамант 2. Мы предположили, что уровень транскрипционного фактора VRN-1 на момент наступления засухи может оказывать влияние на размер корневой системы. Большой размах изменчивости по массе корней может свидетельствовать об участии, помимо локуса *Vrn-1*, других генных сетей в формировании этого признака. Селекционерам, работающим над созданием скороспелых сортов, следует учитывать возможность уменьшения размеров корневой системы, особенно в засушливых условиях. Значительное увеличение массы корней у линии 821 с интрогрессиями в хромосомы 2A, 2B и 5A от вида *T. timopheevii* указывает на возможность использования сородичей в качестве источника увеличения размера корней у пшеницы. Ключевые слова: мягкая пшеница; корневая система; засуха; *Vrn-1*; сроки цветения.

Для цитирования: Смирнова О.Г., Пшеничникова Т.А. Взаимосвязь между генетическим статусом локуса *Vrn-1* и размерами корневой системы у мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2021;25(8):805-811. DOI 10.18699/VJ21.093

The relationship between the genetic status of the *Vrn-1* locus and the size of the root system in bread wheat (*Triticum aestivum* L.)

O.G. Smirnova, T.A. Pshenichnikova

Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
wheatpsh@bionet.nsc.ru

Abstract. One of the main ways to fine-tune the adaptive potential of wheat cultivars is to regulate the timing of flowering using the genes of the *Vrn-1* locus, which determines the type and rate of development. Recently, with the use of introgression and isogenic lines of bread wheat, it was shown that this locus is involved in the genetic control of root length and weight both under irrigation and drought conditions. It turned out that the *VrnA1* gene is associated with a significant decrease in the size of the root system in a winter genotype. The *Vrn-A1* gene had the strongest effect on the reduction of the root system in comparison with the homoeoallelic genes *Vrn-B1* and *Vrn-D1*. The aim of this work was to determine whether the allelic composition of the genes at the *Vrn-1* locus affects the root size in seven spring cultivars and in two lines of bread wheat differing in flowering time under conditions of normal watering and drought. The research was carried out in a hydroponic greenhouse; drought was created at the tillering stage. In this work, we have shown that early flowering wheat cultivars with the dominant *Vrn-A1a* allele have more lightweight and shorter roots under normal watering conditions compared to the late flowering carriers of the dominant homoeoalleles *Vrn-B1* and *Vrn-D1*. In drought conditions, the root length decreased insignificantly, but the weight of the roots significantly decreased in all genotypes, with the exception of Diamant 2. It has been hypothesized that the level of the transcription factor VRN-1 at the onset of drought may affect the size of the root system. The large variability in root weight may indicate the participation, in addition to the *Vrn-1* locus, of other gene networks in the formation of this trait. Breeders

working to develop early maturing varieties should consider the possibility of reducing the root size, especially in arid conditions. A significant increase in the root size of line 821 with introgressions into chromosomes 2A, 2B, and 5A from *T. timopheevii* indicates the possibility of using congeners as a source of increasing the trait in wheat.

Key words: bread wheat; root system; drought; *Vrn-1*; flowering dates.

For citation: Smirnova O.G., Pshenichnikova T.A. The relationship between the genetic status of the *Vrn-1* locus and the size of the root system in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(8):805-811. DOI 10.18699/VJ21.093

Введение

Корни – неотъемлемая часть растительного организма, развитие которой начинается на первых этапах онтогенеза. Архитектура корневой системы определяет прочное укоренение растений, эффективное поглощение питательных веществ и воды из почвы и взаимодействие с биомом почвы. Хорошо развитая неглубокая корневая система способна усваивать влагу даже от небольших дождей, а более длинная корневая система получает доступ к влаге, накопленной в глубоких слоях почвы. Эти свойства корневой системы особенно важны в условиях засух, которые в настоящее время представляют собой наиболее серьезную климатическую угрозу во всем мире (Ahmad et al., 2017; IPCC, 2018). Было показано, что морфологические и функциональные особенности корневой системы связаны с сохранением урожая в условиях засухи (Comas et al., 2013). Накопление и практическое применение генетических знаний о формировании корневой системы сельскохозяйственных культур может привести ко второй Зеленой революции (Den Herder et al., 2010).

У риса и кукурузы идентифицированы и клонированы гены, ответственные за формирование корневой системы (Uga et al., 2013; Kitomi et al., 2018). Исследования по генетическому контролю корневой системы у мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) значительно отстают от работ, проводимых на рисе и кукурузе. В настоящее время у мягкой пшеницы с использованием двуродительских картирующих популяций и сортовых панелей ассоциативного картирования локализованы QTL на хромосомах практически всех гомеологических групп, что говорит о сложном генетическом контроле данного признака у пшеницы (Ehdaie et al., 2016; Lui et al., 2019). Усилия исследователей направлены также на поиск генетического разнообразия по размерам корневой системы у родственников мягкой пшеницы (Feng et al., 2018). Показано, что присутствие интрогрессий ржи в генотипах пшеницы приводит к значительному увеличению биомассы корней и повышению урожайности растений в нормальных и засушливых условиях (Ehdaie et al., 2003). Аналогичный эффект обнаружен у линии пшеницы сорта Ravon 76 с интрогрессией от *Agropyron elongatum* в хромосому 7DL (Placido et al., 2013).

Недавно было установлено, что в генетическом контроле длины корней, массы корней и угла наклона корней в почве у пшеницы и ячменя участвует locus *Vrn-1* (Voss-Fels et al., 2018). Доминантные аллели генов *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1*, расположенные в хромосомах 5A, 5B и 5D, определяют яровой тип развития пшеницы (McIntosh et al., 2013). Нами впервые выявлена связь между сроками цветения и размерами корневой системы пшеницы в условиях засухи (Pshenichnikova et al., 2020). С использованием моносомных линий сорта Саратовская 29 по

хромосомам 5A, 5B и 5D мы показали, что ген *Vrn-A1* наиболее сильно влияет на уменьшение корневой системы по сравнению с другими доминантными генами локуса *Vrn-1*. В настоящей работе была поставлена задача определить, влияет ли аллельный состав генов локуса *Vrn-1* на развитие корневой системы у разных сортов и линий мягкой пшеницы, различающихся по срокам цветения в условиях нормального полива и засухи.

Материалы и методы

Исследования были проведены на образцах мягкой пшеницы, не связанных происхождением и различающихся по аллельному составу генов *Vrn-1*. Набор включал яровые сорта Саратовская 29 (С29), Новосибирская 67 (Н67), Янецкис Пробат (ЯП), Диамант 2 (Дм2), Мильтурум 553 (М553), Дуванка, китайский сорт Чайниз Спринг (ЧС), линию 821 с интрогрессиями от *T. timopheevii* Tausch. в хромосомы 2A, 2B и 5A сорта С29 (Leonova et al., 2001) и озимую синтетическую гексаплоидную линию пшеницы Синтетик 6х (Син6х) (AABBDD), полученную от скрещивания видов *T. dicoccoides* и *Ae. tauschii* и несущую интрогрессию в хромосоме 5D.

Для выравнивания вегетативного периода в наборе генотипов озимый Син6х яровизировали 60 дней, а позднеспелый сорт ЧС – 30 дней при температуре +2 °С и 12-часовом световом режиме. Растения выращивали в гидропонной теплице Института цитологии и генетики СО РАН (ЦКП «Лаборатория искусственного выращивания растений») при 12–14-часовом искусственном освещении 45 000–50 000 лк, ночной температуре 18–20 °С и дневной температуре 24–26 °С. В качестве искусственного грунта использовали керамзит с размером частиц от 5 до 15 мм. Питательным раствором служил раствор Кнопа. Растения размещали в двух одинаковых ваннах размером 500 × 100 × 35 см и объемом около 2 м³. Расстояние между растениями составляло 12 см.

Каждый генотип выращивали при двух режимах полива на протяжении трех вегетационных сезонов. До стадии кущения все растения поливали одинаково, по два раза в день. После начала кущения создавались два режима полива. В контрольном варианте сохранялся прежний режим полива до конца сезона. В опытном варианте полив прекращался. Уровень влажности измерялся в обеих ваннах раз в неделю с помощью влагомера. Влажность в контрольном эксперименте составляла 28–30 % на протяжении всего сезона. В условиях засухи влажность постепенно снижалась и в течение месяца устанавливалась на уровне 10–12 %. Эти экспериментальные условия моделируют изменения влажности почвы в полевых условиях при яровом посеве в условиях резко континентального климата Сибири. Для каждого растения фиксировали

дату цветения. Стадия восковой спелости зерна считалась окончанием эксперимента, после чего полив в контрольном варианте прекращали. После высыхания грунта растения с корнями извлекали, надземную часть удаляли. После измерения длины корней их оставляли на воздухе до полного высыхания и взвешивали.

Молекулярный анализ аллельного состояния генов локуса *Vrn-1* у изученных генотипов выполнен А.Б. Щербанем по ранее описанной методике (Shcherban et al., 2012).

Фенотипические данные, полученные в течение трех вегетационных сезонов, объединяли и анализировали однофакторным дисперсионным анализом отдельно для каждого признака и каждого режима полива. Сравнительный анализ между группами генотипов и режимами полива проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента. Индекс устойчивости к засухе измеряли в процентах и рассчитывали как отношение среднего значения признака на засухе к среднему значению признака на поливе, умноженному на 100. Для изучения взаимосвязи между тремя признаками (дни до цветения, длина корней и вес корней) был проведен корреляционный анализ по Пирсону. Анализ выполнен с помощью статистического пакета STATISTICA 6.

Результаты

Молекулярный анализ аллельного состава локуса *Vrn-1* у девяти генотипов пшеницы показал присутствие доминантного аллеля *a* в локусе *Vrn-A1* у сортов С29, ЯП, Н67, Дм2 и линии 821 с интрогрессиями от *T. timopheevii*, созданной на основе сорта С29 (табл. 1). Рецессивный аллель *vrn-A1* был обнаружен у сортов М553, Дуванка, ЧС и Синбх. Образцы различались и по аллельному состоянию локуса *Vrn-B1*. Доминантный аллель *Vrn-B1c* был выявлен у сортов С29, ЯП и линии 821, доминантный аллель

Vrn-B1a – у сортов Н67, Дм2, М553 и Дуванка, рецессивный аллель *vrn-B1* – у ЧС и Синбх. Все изученные образцы пшеницы, за исключением ЧС, имели рецессивный аллель *vrn-D1*. У сорта ЧС присутствовал доминантный аллель *Vrn-D1a* (см. табл. 1).

В результате анализа аллельного состояния генов *Vrn-1* изученные образцы были разбиты на две группы. В первую группу вошли четыре сорта (С29, Н67, Дм2 и ЯП) и линия 821 – носители доминантного аллеля гена *Vrn-A1a*. Ко второй группе отнесены четыре сорта (М553, Дуванка, ЧС, Синбх) – носители рецессивного аллеля *vrn-A1*. Анализ сроков цветения показал, что растения первой группы цвели на 6 дней раньше на поливе и на 7 дней раньше на засухе, чем растения второй группы ($t = 3.50$; $p < 0.001$). Среди носителей аллеля *Vrn-A1a* при обоих условиях полива раньше зацветали сорта С29 и Н67 (см. табл. 1). Среди носителей рецессивного аллеля *vrn-A1* на поливе наиболее ранним был сорт ЧС, а на засухе – яровизированный Синбх. Среднее значение числа дней до цветения достоверно увеличивалось в условиях засухи у всех изученных генотипов (см. табл. 1). Индекс устойчивости этого признака не обнаружил большого размаха у изученных генотипов, за исключением линии 821 и сорта ЧС, у которых задержка кущения на засухе была наиболее значительной (табл. 2).

У всех образцов был проведен анализ корневой системы, сформированной в условиях нормального полива и засухи. Размах изменчивости по длине корней составил 15 % на поливе и 50 % на засухе, а по массе корней – 400 % на поливе и 500 % на засухе (см. табл. 1).

Самые длинные корни на поливе имели линия 821 (32 см), Синбх (30.2 см) и сорт Дуванка (29.7 см) (см. табл. 1). На несколько сантиметров короче были корни у сортов ЯП, Н67 и ЧС. Самые короткие корни формирова-

Таблица 1. Средние значения числа дней до цветения, длины и массы корней у генотипов мягкой пшеницы, различающихся по аллельному составу локуса *Vrn-1*, в условиях полива и засухи

Генотип	Аллельный состав локуса <i>Vrn-1</i>	Число дней до цветения		Длина, см		Масса, г	
		Полив	Засуха	Полив	Засуха	Полив	Засуха
Носители доминантного аллеля <i>Vrn-A1a</i>							
С29	<i>Vrn-A1a, Vrn-B1c, vrn-D1</i>	39.7 ^{a#}	44.0 ^a	22.1 ^a	20.2 ^a	0.32 ^a	0.17 ^a
ЯП	<i>Vrn-A1a, Vrn-B1c, vrn-D1</i>	43.7 ^b	45.5 ^a	25.8 ^b	24.7 ^b	0.40 ^a	0.26 ^a
Н67	<i>Vrn-A1a, Vrn-B1a, vrn-D1</i>	41.3 ^a	43.6 ^a	25.8 ^b	23.2 ^a	0.30 ^a	0.24 ^a
Дм2	<i>Vrn-A1a, Vrn-B1a, vrn-D1</i>	42.6 ^b	46.6 ^b	21.8 ^a	24.3 ^b	0.23 ^a	0.31 ^b
Линия 821	<i>Vrn-A1a, Vrn-B1c, vrn-D1</i>	42.5 ^b	51.7 ^b	32.0 ^b	30.6 ^b	0.76 ^b	0.24 ^a
Среднее		41.9	46.3 ^{***}	25.5	24.6	0.40	0.27 ^{***}
Носители рецессивного аллеля <i>vrn-A1</i>							
М553	<i>vrn-A1, Vrn-B1a, vrn-D1</i>	47.0 ^b	50.6 ^b	28.6 ^b	30.8 ^b	1.18 ^b	0.23 ^a
Дуванка	<i>vrn-A1, Vrn-B1a, vrn-D1</i>	50.8 ^c	51.4 ^b	29.7 ^b	29.5 ^b	0.80 ^b	0.30 ^b
ЧС	<i>vrn-A1, vrn-B1, Vrn-D1a</i>	45.5 ^b	55.8 ^c	27.2 ^b	24.9 ^b	1.09 ^b	0.68 ^b
Синбх	<i>vrn-A1, vrn-B1, vrn-D1</i>	47.4 ^b	48.9 ^b	30.2 ^b	24.4 ^b	0.83 ^b	0.72 ^b
Среднее		47.7 ^{***}	51.7 ^{***}	28.9 ^{**}	27.4 ^{**}	1.00 ^{***}	0.48 ^{***}

Средние значения, за которыми следуют разные буквы в столбце, достоверно различаются в соответствии с НСР при $p = 0.05$ в пределах всего набора генотипов.

Различия между средними значениями признаков в группах носителей разных аллелей гена *Vrn-A1* достоверны при ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Таблица 2. Индексы устойчивости к засухе у генотипов пшеницы с различным аллельным состоянием генов локуса *Vrn1*

Генотип	Индекс устойчивости к засухе, %		
	Число дней до цветения	Длина корней	Масса корней
<i>Vrn-A1a</i>			
C29	111	91	53
ЯП	104	95	63
Н67	106	90	79
Дм2	109	111	135
Линия 821	122	96	32
<i>vrn-A1</i>			
M553	108	108	19
Дуванка	101	99	37
ЧС	123	92	62
Синбх	103	81	87

лись у C29 и Дм2 (около 22 см). Достоверное уменьшение длины корней во время засухи отмечено для Н67 и Синбх, возрастание – у сорта Дм2. У остальных образцов засуха не оказывала существенного влияния на этот признак. Следует отметить, что сорта второй группы (носители рецессивного аллеля *vrn-A1*) имели достоверно более длинные корни как на поливе, так и на засухе по сравнению с сортами-носителями аллеля *Vrn-A1a*. В среднем по всем генотипам длина корней во время засухи незначительно уменьшалась. Индекс устойчивости этого признака не обнаружил большого размаха (см. табл. 2).

Гораздо большая изменчивость наблюдалась для массы корней как в абсолютных значениях, так и по индексу устойчивости к засухе. Средняя масса корней при нормальном поливе у генотипов – носителей доминантного аллеля *Vrn-A1a* была на 0.6 г меньше, чем у носителей рецессивного аллеля. В этих условиях четыре сорта пше-

ницы (C29, ЯП, Н67 и Дм2) из первой группы не отличались достоверно друг от друга по массе корней. Значения составили от 0.23 до 0.40 г (см. табл. 1). В то же время масса корней у относящейся к этой же группе линии 821 оказалась почти в два раза выше, чем у перечисленных сортов. В группе генотипов – носителей рецессивного аллеля *vrn-A1*, самую большую массу корней на поливе (более 1 г) имели сорта М553 (*Vrn-B1a*) и ЧС (*Vrn-D1a*). У сорта Дуванка и Синбх этот показатель был значительно ниже, около 0.8 г, примерно такой же, как и у линии 821 из первой группы.

Сорт Дм2 отличался от других генотипов тем, что у него происходило увеличение массы корней во время засухи. Этот сорт продемонстрировал самый высокий индекс устойчивости признака – 135 % (см. табл. 2). У остальных генотипов во время засухи масса корней уменьшалась. Максимальное снижение, почти в пять раз, наблюдалось у сорта М553 (индекс устойчивости 19 %). Сорт Дуванка, имеющий одинаковый с М553 аллельный состав локуса *Vrn-1*, тоже показал значительное снижение этого признака на засухе (индекс устойчивости 37 %). Такое же существенное уменьшение массы корней отмечено и для линии 821 из первой группы образцов. При сравнении индексов устойчивости среди трех изученных признаков обнаружено, что масса корней наиболее чувствительна к засухе по сравнению с длиной корней и сроками цветения.

Был проведен корреляционный анализ по трем признакам для всего набора генотипов и отдельно для каждой из групп, различающихся по доминантному составу гена *Vrn-A1* (табл. 3). Для всей популяции была обнаружена корреляция между числом дней до цветения и массой корней как во время полива, так и на засухе. Длина корней коррелировала с числом дней до цветения только в условиях засухи во всей изученной популяции и среди носителей доминантного аллеля *Vrn-A1a*. В условиях полива наблюдалась корреляция между массой и длиной корней для всей популяции и для каждой группы генотипов в отдельности. На засухе эта корреляция сохраняется только для генотипов второй группы, имеющих рецессивный аллель *vrn-A1*.

Таблица 3. Коэффициенты корреляции между числом дней до цветения, длиной корней и массой корней при нормальном поливе и засухе у девяти генотипов пшеницы, различающихся аллельным состоянием генов локуса *Vrn-1*

Признак	Полив		Засуха	
	Число дней до цветения	Длина корней	Число дней до цветения	Длина корней
Во всей изученной популяции				
Длина корней	0.12	–	0.31**	–
Масса корней	0.36***	0.43***	0.24*	–0.02
Среди носителей доминантного аллеля <i>Vrn-A1a</i>				
Длина корней	–0.12	–	0.49***	–
Масса корней	0.23	0.42**	0.06	0.23
Среди носителей рецессивного аллеля <i>vrn-A1</i>				
Длина корней	–0.06	–	0.00	–
Масса корней	–0.05	0.28*	0.06	0.35*

Примечание. Различия достоверны при * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ и *** $p < 0.001$.

Обсуждение

Ранее было установлено участие локуса *Vrn-1* в формировании размеров корневой системы (Voss-Fels et al., 2018). Однако авторы в своем исследовании не использовали генетический материал с доминантным аллелем *Vrn-A1*. Нами было показано, что ген *Vrn-A1*, расположенный в хромосоме 5A, оказывает наиболее сильное влияние на развитие корневой системы по сравнению с генами *Vrn-B1* и *Vrn-D1* (Pshenichnikova et al., 2020). Данный эффект удалось обнаружить благодаря применению набора моносомных линий сорта С29. Следует отметить, что оба этих исследования были выполнены на экспериментальном генетическом материале – замещенных, изогенных или рекомбинантных линиях пшеницы.

В настоящей работе мы оценили зависимость развития корневой системы от аллельного состояния локуса *Vrn-1* у семи яровых сортов мягкой пшеницы, различающихся временем перехода к цветению, и линий с интрогрессиями от тетраплоидного вида *T. timopheevii* и *Ae. tauschii*. Мы также постарались установить, как длина и масса корней у различных сортов связаны с числом дней до цветения в нормальных условиях и в условиях засухи. Образцы были разделены на две группы. В первую группу вошли носители доминантного аллеля *Vrn-A1a*, во вторую – рецессивного аллеля *vrn-A1*. При этом восемь из девяти изученных генотипов несли доминантные аллели других генов локуса *Vrn-1*.

Мы показали, что раннецветущие сорта с доминантным аллелем *Vrn-A1a* имели в среднем достоверно более короткие корни по сравнению с позднецветущими носителями рецессивного аллеля. На поливе разница составила 3.4 см, на засухе – 2.8 см. По массе корней сорта с рецессивным аллелем *vrn-A1* тоже существенно превышали сорта первой группы: на поливе разница составила 0.6 г, а на засухе – 0.24 г (см. табл. 1). Аллелизм по гену *Vrn-B1* не влиял на размеры корневой системы у носителей доминантного аллеля *Vrn-A1a*.

В условиях как полива, так и засухи была обнаружена большая вариабельность по массе корней между группами и внутри групп. Масса увеличивалась за счет интенсивного образования вторичных корней. Скорее всего, этот процесс контролируется генными сетями, не связанными с локусом *Vrn-1*. Такое предположение было высказано ранее при изучении размеров корневой системы у линий с интрогрессиями от *Ae. tauschii* (Pshenichnikova et al., 2020). Оно нашло подтверждение в настоящем исследовании при изучении линии 821 – носителя доминантного аллеля *Vrn-A1a* и интрогрессий в хромосомы 2A и 2B. Длина корней у линии 821 была сопоставима с длиной корней у сортов первой группы (носители *Vrn-A1a*). Однако по массе корней линия 821 сравнима с образцами из второй группы. Ранее в хромосомах 2A и 2B мягкой пшеницы уже были выявлены локусы, ассоциированные с морфологией и размером корней (Ehdaie et al., 2016; Liu et al., 2019).

В нашем опыте засуха, наступавшая на ранней стадии развития растений, приводила к увеличению числа дней до цветения у всех генотипов (см. табл. 1). Этот эффект можно рассматривать как временные затраты растения, необходимые для адаптационной перестройки метаболиз-

ма. В условиях засухи среди всех изученных генотипов наблюдалась корреляция между числом дней до цветения и длиной и массой корней. Косвенно это может свидетельствовать об участии локуса *Vrn-1* в формировании корневой системы в ответ на засуху. Корреляции между массой и длиной корней в условиях засухи не наблюдались. Поскольку в условиях полива связь между этими признаками была существенна ($p < 0.001$, см. табл. 3), отсутствие корреляции в условиях засухи может говорить о рассогласовании генетических путей формирования корневой системы в неблагоприятных условиях. При корреляционном анализе, проведенном для отдельных групп, показано, что число дней до цветения коррелировало с длиной корней только у носителей доминантного аллеля *Vrn-A1a*. У носителей рецессивного аллеля *vrn-A1* никаких корреляций не выявлено. Возможно, это связано с тем, что к моменту наступления и развития засухи (начало кущения) у носителей доминантного аллеля *Vrn-A1* транскрипционный фактор VRN1 накапливается в листьях в большем количестве, чем у носителей рецессивного аллеля *vrn-A1* и доминантных генов *Vrn-B1* и *Vrn-D1* (Loukoianov et al., 2005). Это приводит к взаимодействию VRN1 с сетями гормональных и сигнальных ответов на более ранних этапах и к остановке роста корней. У сортов – носителей только доминантных генов *Vrn-B1* и *Vrn-D1* этот ответ отсрочен, и корни продолжают расти в длину.

Как уже отмечалось, воздействие засухи на два признака, длину и массу корней, было различным. Для каждого генотипа изменчивость по длине корней при двух режимах полива не была достоверной (см. табл. 1). Об этом свидетельствуют и индексы устойчивости к засухе, которые в основном были близки к 100 % (см. табл. 2). Максимальное снижение длины корней при засухе наблюдалось у яровизированного Синбх. Ранее мы обнаружили, что совместное действие яровизации и засухи существенно угнетает рост корневой системы, и выявили слабую зависимость длины корней от условий полива (Pshenichnikova et al., 2020). В настоящей работе мы показали, что у изученных генотипов длина корней в большей степени зависит от аллельного состояния локуса *Vrn-1*, чем от режима полива.

Масса корней, в отличие от длины, продемонстрировала большое разнообразие изменчивости на засухе. Это нашло отражение и в индексах устойчивости (см. табл. 2). Наибольшее снижение массы корней среди сортов – носителей доминантного аллеля гена *Vrn-A1* было обнаружено у засухоустойчивого С29. Он же имел и низкий индекс устойчивости (53 %). Линия 821, полученная на основе сорта С29, показала наибольшее снижение (в 3.2 раза) массы корней на засухе и самый низкий в первой группе индекс устойчивости – 32 %. Эти значения сопоставимы с уменьшением массы корней у сортов из второй группы, формирующих большую корневую систему в благоприятных условиях полива. У Дуванки масса корней снизилась в 2.7 раза при индексе устойчивости 37 %, а у М553 – в 5 раз при самом низком индексе устойчивости – 19 %. Сорт Дм2 был единственным из всей популяции, у которого на засухе отмечено увеличение массы корней в 1.2 раза; одновременно возрастала их длина. Сорт характеризовался высоким индексом устойчивости массы

корней. В целом похожую динамику снижения массы корней на засухе имели сорта – носители доминантного аллеля *Vrn-A1* и яровизированные в разные сроки сорт ЧС (носитель доминантного аллеля гена *Vrn-D1*) и озимый Синбх. Яровизация индуцирует интенсивную выработку транскрипционного фактора VRN-1 (Trevaskis et al., 2007) и, таким образом, выравнивает вегетационный статус яровизированных образцов и сортов – носителей доминантного аллеля гена *Vrn-A1*. Уровень транскрипционного фактора VRN-1 на момент наступления засухи у не подвергавшихся яровизации сортов М553 и Дуванка – носителей рецессивного аллеля гена *Vrn-A1* и доминантного аллеля гена *Vrn-B1*, может быть недостаточным для эффективного функционирования генных сетей защиты от засухи. Таким образом, снижение массы корней на засухе может косвенно указывать на существование связи между локусом *Vrn-1* и генными сетями ответа на засуху.

Отсутствие корреляции между массой и длиной корней во всей популяции на засухе говорит о разобщении процессов роста корня и накопления его биомассы, что может быть связано с ограничением формирования вторичных корней. В условиях засухи каждый сорт может включать разные индивидуальные адаптивные механизмы. В частности, сорт Tinsurin с небольшой корневой системой экономнее использует почвенную воду, что достигалось за счет снижения фотосинтетических процессов и ускорения налива зерна до наступления серьезных последствий водного стресса (Figueroa-Bustos et al., 2020). Участвовавший в нашем эксперименте сорт С29 также имеет маленькую корневую систему, но обладает высокой засухоустойчивостью (Ильина, 1989). Ранее было показано, что засухоустойчивость С29 обеспечивается другими физиологическими механизмами, не связанными с размерами корневой системы (Osipova et al., 2020).

Наиболее полно механизмы формирования корневой системы изучены у модельного диплоидного растения *Arabidopsis thaliana*. Обнаружено, что у арабидопсиса абсцизовая кислота может ингибировать количество и удлинение боковых корней на поливе (De Smet et al., 2006). Цитокинин оказывает ингибирующее действие на ветвление боковых корней, при этом мутанты по биосинтезу цитокининов демонстрируют увеличенное количество боковых корней (Smith, de Smet, 2012). Эти и другие исследования выявили отдельные компоненты развития корневой системы. В то же время было установлено, что развитие корней интегрировано в системную сигнализацию, которая через метаболизм сахаров координирует рост на уровне целого растения во время индукции цветения (Bouché et al., 2016). Эксперименты на трансгенном ячмене показали, что транскрипционный фактор VRN1 имеет, помимо основных сайтов связывания в промоторах генов инициации цветения, вторичные сайты связывания. Эти сайты были обнаружены в генах, которые играют центральную роль как в гормональных ответах, так и в метаболизме гормонов, к которым относятся абсцизовая кислота и цитокинины (Deng et al., 2015). Таким образом, принимая участие в регуляции гормональных путей, VRN1 может влиять на формирование корневой системы в условиях засухи.

Заключение

Аллельный состав локуса *Vrn-1* определяет время, необходимое растениям пшеницы для перехода в генеративную фазу развития. Исследования, связывающие сроки цветения с формированием корневой системы в нормальных и засушливых условиях, единичны. В настоящей работе мы показали, что сорта с доминантным аллелем гена *Vrn-A1* в нормальных условиях полива имеют корни меньшей массы и длины по сравнению с носителями доминантных гомеоаллелей *Vrn-B1* и *Vrn-D1*. Засуха, наступающая на стадии кущения, приводила к более позднему цветению изученных генотипов. Длина корней при этом уменьшалась незначительно, а вот масса корней достоверно снижалась у всех генотипов, за исключением Дм2. Большой размах изменчивости по массе корней в условиях засухи может указывать на участие большего количества генных сетей в формировании этого признака. Интрогрессии от *T. timopheevii* и *Ae. tauschii* приводили к увеличению размеров корневой системы. Это говорит о возможности использования сородичей в качестве источника увеличения размера корней у пшеницы.

Регулирование сроков цветения сортов с помощью локуса *Vrn-1* в зависимости от условий выращивания считается одним из главных способов тонкой настройки адапционного потенциала. Как показала наша работа, при этом следует учитывать и возможную связь данного локуса с размерами корневой системы. Селекционеры, работающие над созданием скороспелых сортов, могут столкнуться с уменьшением ее размеров, особенно в засушливых условиях. Размеры корневой системы у пшеницы могут поддерживаться за счет интрогрессий от видов-сородичей.

Список литературы / References

- Ильина Л.Г. Селекция яровой мягкой пшеницы на Юго-Востоке. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1989.
- [Ilyina L.G. Breeding of Spring Bread Wheat in Southeastern Regions. Saratov: Saratov Univ. Publ., 1989. (in Russian)]
- Ahmad I., Ali N., Ahmad H., Inamullah. Association mapping of root traits for drought tolerance in bread wheat. In: Wanyera R., Owuochi J. (Eds.) Wheat Improvement, Management and Utilization. London: InTech, 2017;39-57. DOI 10.5772/67242.
- Bouché F., D'Aloia M., Tocquin P., Lobet G., Detry N., Périlleux C. Integrating roots into a whole plant network of flowering time genes in *Arabidopsis thaliana*. *Sci. Rep.* 2016;6:29042. DOI 10.1038/srep29042.
- Comas L.H., Becker S.R., Cruz V.M.V., Byrne P.F., Dierig D.A. Root traits contributing to plant productivity under drought. *Front. Plant Sci.* 2013;4:442. DOI 10.3389/fpls.2013.00442.
- De Smet I., Zhang H., Inze D., Beeckman T. A novel role for abscisic acid emerges from underground. *Trends Plant Sci.* 2006;11(9):434-439. DOI 10.1016/j.tplants.2006.07.003.
- Den Herder G., Van Isterdael G., Beeckman T., De Smet I. The roots of a new green revolution. *Trends Plant Sci.* 2010;15(11):600-607. DOI 10.1016/j.tplants.2010.08.009.
- Deng W., Casao M., Wang P., Sato K., Hayes P.M., Finnegan E.J., Trevaskis B. Direct links between the vernalization response and other key traits of cereal crops. *Nat. Commun.* 2015;6:5882. DOI 10.1038/ncomms6882.
- Ehdaie B., Mohammadi S.A., Nouraein M. QTLs for root traits at mid-tillering and for root and shoot traits at maturity in a RIL population of spring bread wheat grown under well-watered conditions. *Euphytica.* 2016;211(1):17-38. DOI 10.1007/s10681-016-1670-x.

- Ehdaie B., Whitkus R.W., Waines J.G. Root biomass, water-use efficiency and performance of wheat-rye translocations of chromosomes 1 and 2 in spring bread wheat 'Pavon'. *Crop Sci.* 2003;43(2):710-717. DOI 10.2135/cropsci2003.7100.
- Feng K., Cui L., Lv S., Bian J., Wang M., Song W., Nie X. Comprehensive evaluating of wild and cultivated emmer wheat (*Triticum turgidum* L.) genotypes response to salt stress. *Plant Growth Regul.* 2018;84(2):261-273. DOI 10.1007/s10725-017-0337-5.
- Figueroa-Bustos V., Palta J.A., Chen Y., Stefanova K., Siddique K.H.M. Wheat cultivars with contrasting root system size responded differently to terminal drought. *Front. Plant Sci.* 2020;11:1285. DOI 10.3389/fpls.2020.01285.
- IPCC. Special report: Global Warming of 1.5 °C. Summary for Policymakers. 2018. Available at: <https://www.ipcc.ch/sr15/> (Date of application Aug. 30, 2021).
- Kitomi Y., Nakao E., Kawai S., Kanno N., Ando T., Fukuoka S., Irie K., Uga Y. Fine mapping of *QUICK ROOTING 1* and 2, quantitative trait loci increasing root length in rice. *G3: Genes Genomes Genetics (Bethesda)*. 2018;8(2):727-735. DOI 10.1534/g3.117.300147.
- Leonova I.N., Kalinina N.P., Budashkina E.B., Röder M.S., Salina E.A. Comparative molecular and genetic analysis of *Triticum aestivum* × *Triticum timopheevii* hybrid lines resistant to leaf rust. In: Proc. 11th EWAC Conf., Novosibirsk, 2001.
- Liu P., Jin Y., Liu J., Liu C., Yao H., Luo F., Guo Z., Xia X., He Z. Genome-wide association mapping of root system architecture traits in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*. 2019;215(7):121. DOI 10.1007/s10681-019-2452-z.
- Loukoianov A., Yan L., Blechl A., Sanchez A., Dubcovsky J. Regulation of *VRN-1* vernalization genes in normal and transgenic polyploid wheat. *Plant Physiol.* 2005;138(4):2364-2373. DOI 10.1104/pp.105.064287.
- McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J., Roger J., Morris C., Appels R., Xia X.C. Catalogue of Gene Symbols for Wheat: 12th Int. Wheat Genetics Symp., 8–13 Sept. 2013, Yokohama, Japan, 2013.
- Osipova S., Permyakov A., Permyakova M., Rudikovskaya E., Pomortsev A., Verkhoturov V., Pshenichnikova T. Drought tolerance evaluation of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) lines with the substitution of the second homeoecological group chromosomes. *Cereal Res. Comm.* 2020;48:267-273. DOI 10.1007/s42976-020-00043-y.
- Placido D.F., Campbell M.T., Folsom J.J., Cui X., Kruger G.R., Baenziger P.S., Walia H. Introgression of novel traits from a wild wheat relative improves drought adaptation in wheat. *Plant Physiol.* 2013;161:1806-1819. DOI 10.1104/pp.113.214262.
- Pshenichnikova T.A., Smirnova O.G., Simonov A.V., Shchukina L.V., Morozova E.V., Lohwasser U., Börner A. The relationship between root system development and vernalization under contrasting irrigation in bread wheat lines with the introgressions from a synthetic hexaploid. *Plant Growth Regul.* 2020;92(3):583-595. DOI 10.1007/s10725-020-00666-5.
- Shcherban A.B., Emtseva M.V., Efremova T.T. Molecular genetical characterization of vernalization genes *Vrn-A1*, *Vrn-B1* and *Vrn-D1* in spring wheat germplasm from Russia and adjacent regions. *Cereal Res. Comm.* 2012;40(3):351-361. DOI 10.1556/CRC.40.2012.3.4.
- Smith S., De Smet I. Root system architecture: insights from *Arabidopsis* and cereal crops. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2012;367(1595):1441-1452. DOI 10.1098/rstb.2011.0234.
- Trevaskis B., Hemming M.N., Dennis E.S., Peacock W.J. The molecular basis of vernalization-induced flowering in cereals. *Trends Plant Sci.* 2007;12(8):352-357. DOI 10.1016/j.tplants.2007.06.010.
- Uga Y., Sugimoto K., Ogawa S., Rane J., Ishitani M., Hara N., Kitomi Y., Inukai Y., Ono K., Kanno N., Inoue H., Takehisa H., Motoyama R., Nagamura Y., Wu J., Matsumoto T., Takai T., Okuno K., Yano M. Control of root system architecture by *DEEPER ROOTING 1* increases rice yield under drought conditions. *Nat. Genet.* 2013;45:1097-1102. DOI 10.1038/ng.2725.
- Voss-Fels K.P., Robinson H., Mudge S.R., Richard C., Newman S., Wittkop B., Stahl A., Friedt W., Frisch M., Gabur I., Miller-Cooper A., Campbell B.C., Kelly A., Fox G., Christopher J., Christopher M., Chenu K., Franckowiak J., Mace E.S., Borrell A.K., Eagles H., Jordan D.R., Botella J.R., Hammer G., Godwin I.D., Trevaskis B., Snowdon R.J., Hickey L.T. *VERNALIZATION1* modulates root system architecture in wheat and barley. *Mol. Plant.* 2018;11(1):226-229. DOI 10.1016/j.molp.2017.10.005.

ORCID ID

O.G. Smirnova orcid.org/0000-0002-3023-767X
T.A. Pshenichnikova orcid.org/0000-0001-5639-916X

Благодарности. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-416-540001 и договора № р-79 (21.06.2019) с администрацией Новосибирской области. Растения пшеницы выращивались в Центре коллективного пользования «Лаборатория искусственного выращивания растений» Института цитологии и генетики СО РАН при поддержке бюджетного проекта № 0259-2021-0012. Выражаем благодарность Щербаню Андрею Борисовичу за определение аллельного состояния локуса *Vrn-1*.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 31.08.2021. После доработки 11.10.2021. Принята к публикации 12.10.2021.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Биотехнологии гаплоидов как инструмент создания селекционного материала сахарной свеклы

Е.О. Колесникова , Е.И. Донских, Р.В. Бердников

Селекционно-генетический центр ООО «СоюзСемСвекла», пос. ВНИИСС, Рамонский район, Воронежская область, Россия
 kolelkb@mail.ru

Аннотация. С момента открытия явления гаплоидии биотехнологии стали неотъемлемой частью в процессе успешного создания новых сортов и гибридов различных видов растений. Особенно активно данные технологии применяются в сельском хозяйстве, которое заинтересовано в увеличении объемов и повышении качества производимой продукции. Интеграция приемов получения гаплоидов вместе с другими имеющимися биотехнологическими инструментами, такими как маркерная селекция (MAS), индуцированный мутагенез и генно-инженерные технологии, может значительно ускорить селекцию сельскохозяйственных культур. В статье показаны основные этапы развития биотехнологий начиная с 1921 г. Теперь они успешно используются при создании удвоенных гаплоидов для ускорения селекционного процесса различных растений, и в частности сахарной свеклы – важнейшей сахароносной культуры в регионах с умеренным климатом. Существует несколько методов получения форм с одинарным набором хромосом. Для сахарной свеклы целесообразным оказалось применение гиногенеза, поскольку остальные приемы были малоэффективны при массовом получении гаплоидов. В публикации рассматриваются этапы получения H- и DH-линий *Beta vulgaris* L., а также основные этапы биотехнологического производства гомозиготного селекционного материала этой культуры. К ним относятся: отбор родительских форм – доноров эксплантов; стерилизация бутонов и введение неопыленных семяпочек *in vitro*; получение гаплоидов; удвоение их хромосомного набора; создание удвоенных гаплоидов; определение пloidности на разных этапах; перевод полученных растений в закрытый грунт и выращивание штеклингов. Описан ряд преимуществ, которые имеет технология создания удвоенных гаплоидов *in vitro* по сравнению с традиционными методами селекции. Показано, что применение данных подходов является актуальным при получении новых высокопродуктивных гибридов и сортов сельскохозяйственных растений, однако приемы производства гомозиготных форм у сахарной свеклы все еще требуют проведения дополнительных исследований, направленных на увеличение эффективности и воспроизводимости каждого этапа процесса. Ключевые слова: сахарная свекла; гаплоид; удвоенный гаплоид; гиногенез; биотехнологии; *in vitro*; DH-линии.

Для цитирования: Колесникова Е.О., Донских Е.И., Бердников Р.В. Биотехнологии гаплоидов как инструмент создания селекционного материала сахарной свеклы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(8): 812-821. DOI 10.18699/VJ21.094

Haploid biotechnology as a tool for creating a selection material for sugar beets

Е.О. Kolesnikova , Е.И. Donskikh, R.V. Berdnikov

Breeding and Genetic Center "UnionSeedsBeet", Ltd., VNISS, Ramonsky district, Voronezh region, Russia
 kolelkb@mail.ru

Abstract. Since the discovery of the phenomenon of haploidy, biotechnology has become an integral part in the successful creation of new varieties and hybrids of various plant species. In particular, these technologies are actively used in agriculture, which is concerned with increasing the volume and improving the quality of products. The integration of haploid production techniques together with other available biotechnological tools such as marker selection (MAS), induced mutagenesis and genetic engineering technologies can significantly accelerate crop breeding. This article shows the main stages in the development of biotechnology since 1921. Now they are successfully used to create doubled haploids to accelerate the selection process of various plants and, in particular, sugar beet, which is the most important sugar crop in regions with a temperate climate. There are several methods for obtaining forms with a single set of chromosomes. For sugar beets, the use of gynogenesis turned out to be expedient, since in this case the other methods turned out to be ineffective in the mass production of haploids. The article considers the stages of obtaining the H and DH lines of *Beta vulgaris* L., as well as the main stages of biotechnological production of homozygous breeding material of this culture. These stages include selecting parental forms – donor explants, sterilizing buds and introducing non-pollinated ovules *in vitro*, obtaining haploids, doubling their chromosome set, creating doubled haploids, determining ploidy at different stages, relocating the obtained plants to greenhouses and growing stecklings. A number of advantages that the technology of creating doubled haploids *in vitro* has in comparison with traditional methods of selection are described. It has been shown that the use of these approaches is relevant when obtaining

new highly productive hybrids and varieties of agricultural plants; however, the methods for the production of homozygous forms in sugar beet still require additional research aimed at increasing the efficiency and reproducibility of each stage of the process.

Key words: sugar beet; haploid; doubled haploid; gynogenesis; biotechnology; *in vitro*; DH lines.

For citation: Kolesnikova E.O., Donskikh E.I., Berdnikov R.V. Haploid biotechnology as a tool for creating a selection material for sugar beets. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(8): 812-821. DOI 10.18699/VJ21.094

Введение

В связи с увеличением объемов потребления сельскохозяйственной продукции возникла острая необходимость в развитии технологий, ускоряющих селекционные процессы возделываемых культур. Сахарная свекла – одна из основных технических культур – не является исключением, поскольку потребление сахара растет с каждым годом. От общего производства сахара в мире на долю *Beta vulgaris* L. приходится значительная часть, и около 80 % полученного свекловичного сахара выпадает на долю европейских стран. Россия при этом является лидером по объемам выращивания сахарной свеклы.

Основной задачей селекции этой культуры в условиях интенсификации сельскохозяйственного производства является создание на линейной основе высокопродуктивных отечественных гибридов. Процесс получения перспективных гибридов осуществляется эффективнее при внедрении в него биотехнологического производства нового селекционного материала. Большое экономическое значение *Beta vulgaris* определяет высокий интерес к оптимизации процессов микроразмножения *in vitro*, создания гаплоидных и получения на их основе гомозиготных форм для селекционных работ. Современное агропромышленное производство должно иметь специалистов, владеющих методами биотехнологии и применяющих их с целью интенсификации производства продукции сельского хозяйства, улучшения ее качества.

Гомозиготные линии – это уникальный генетический материал для ускорения процесса создания новых гибридов и снижения его трудоемкости, для картирования популяций, использования в функциональной геномике и молекулярной селекции. Все гены гаплоидных растений представлены единственным аллелем, в связи с чем неблагоприятные рецессивные признаки могут быть выявлены на ранних стадиях селекционного процесса. На основе гаплоидов можно получать гомозиготные линии в течение 2 лет. В свою очередь классические методы при селекции на гетерозис у перекрестноопыляющихся культур позволяют достичь гомозиготности только после 6–7 лет инбридинга. Поскольку *Beta vulgaris* имеет 2-летний цикл развития, то в этом случае процесс длится в среднем 12 лет. Кроме того, для данной культуры характерны самонесовместимость, возникновение инбредной депрессии (Urazaliyev et al., 2013). На сегодняшний день производство удвоенных гаплоидов стало инструментом в программах селекции мировых исследовательских лабораторий в качестве альтернативы классическому методу получения гомозиготных линий. С пониманием важности применения такого подхода в селекции интерес к исследованиям в данном направлении неизменно возрастает (Datta, 2005). Ежегодно в мире регистрируется значитель-

ное число новых сортов растений, полученных на основе гаплоидов. До настоящего времени страны ЕС, Канада, Австралия, США и Китай были лидерами в области гаплоидных технологий (Dunwell, 2010).

Гаплоидия

Явление гаплоидии стало объектом внимания ученых с начала XX в. и на данный момент широко известно у многих покрытосеменных растений. Разработки методов экспериментальной гаплоидии начались немного позднее, когда был раскрыт потенциал применения растений с одинарным набором хромосом в создании чистых линий для нужд селекции. Существует несколько путей образования гаплоидов:

1. Опыление пыльцой растений того же вида (индукторов гаплоидов), которые классифицируются как отцовские или материнские индукторы на основе генетической конституции образующихся гаплоидов. Отцовские и материнские гаплоиды несут геном от мужского и женского родителей соответственно. При этом хромосомы-индукторы элиминируются в гаплоидных эмбриональных клетках в течение первой недели после опыления (Chaikam et al., 2019).
2. Опыление пыльцой неродственного вида, например, скрещивание пшеницы с кукурузой, что эффективно для получения гаплоидов у большинства генотипов *Triticum* spp., в том числе у трудно отзывчивых форм в культуре пыльников *in vitro*. По данным ученых, выход гаплоидных эмбрионов в отдельных скрещиваниях достигал 53 % (Джачук и др., 2019).
3. Опыление пыльцой дикорастущего родственного вида используют в селекции ячменя для получения гаплоидов при скрещивании *Hordeum vulgare* × *H. bulbosum* (так называемый *bulbosum*-метод). Элиминация хромосом *H. bulbosum* происходит во время митоза и в интерфазе, сопровождается формированием микроядер и гетерохроматинизацией. Полная элиминация хроматина луковичного ячменя происходит в течение 5–9 дней после опыления. Применение технологии спасения зародышей (*embryo rescue*) обеспечивает на следующем этапе повышение эффективности метода и возможность его использования в селекции (Sahijram, Rao, 2015).
4. Опыление облученной пыльцой является хорошо задокументированным методом индукции гаплоидов огурца, которые возможно получать из разнообразного материала, такого как селекционные линии, гибриды и сорта. Гаплоидные растения генетически стабильны, однако перед дальнейшим использованием в селекции необходимо удвоить количество хромосом, что считается очень важным этапом. Технология получения удвоенных гаплоидов огурца путем опыления облученной

пыльцой считается наиболее разработанной, удобной, обеспечивающей стабильный выход ДН-линий по сравнению с технологиями получения в культуре пыльников/микроспор и неопыленных семян *in vitro* (Gałazka et al., 2015).

5. В настоящее время известны некоторые протоколы СЕННЗ-опосредованной индукции гаплоидов. Однако для сельскохозяйственных культур эффективная гаплоидная технология на основе СЕННЗ пока недоступна, за исключением кукурузы, где уровень гаплоидов достигал 3.6 % (Kelliher et al., 2016). Интенсивные исследования сосредоточены на этой цели, ожидания по применению данного подхода к сельскохозяйственным культурам высоки, тогда как создание жизнеспособных методов гаплоидизации на основе СЕННЗ является сложной задачей и массового выхода в практику пока нет (Watts et al., 2016).

6. Получение гаплоидов путем андрогенеза (на искусственной питательной среде из изолированных пыльников и микроспор) и гиногенеза (на питательной среде из изолированных семян).

При андрогенезе мужской гаметофит под влиянием индуцирующих факторов *in vitro* переходит с гаметофитного пути развития на спорофитный с образованием эмбриоида или андрогенного каллуса, из которых возможна регенерация гаплоидов либо удвоенных гаплоидов. Культурой пыльников пользуются практически все биотехнологические лаборатории селекционно-генетических компаний Европы и США (Touraev et al., 2009; Basu et al., 2010).

При культивировании пыльников чаще происходит образование каллуса. В результате дальнейшего морфогенеза из каллусных клеток регенерируют растения. Редко встречаются случаи прямого эмбриогенеза, когда из незрелых пыльцевых зерен формируются проэмбриональные структуры, развивающиеся в эмбриониды, которые дают начало гаплоидным растениям.

Более перспективным способом получения удвоенных гаплоидов является культура изолированных микроспор, которые могут быть выделены в больших количествах, обеспечивая потенциально эмбриогенные одиночные гаплоидные клетки. Эта технология достаточно проста в исполнении, экономически эффективна и дает большой выход ДН-растений при оптимизации технологии под конкретный вид и генотип. Отсутствие соматических тканей в культуре микроспор *in vitro* позволяет не ставить под сомнение происхождение полученных растений (Домблдес и др., 2019).

Несмотря на успехи, достигнутые при разработке методов андрогенеза и создании на их основе группы сортов важнейших видов зерновых культур, их эффективное применение сдерживается рядом причин, главная из которых – воспроизводимость полученных результатов в различные сезоны для разных генотипов в сочетании со снижением затрат. Проблема также состоит в довольно большом выходе бесхлорофилльных проростков, что влияет на селекционные программы за счет снижения частоты регенерации зеленых проростков (Kasha et al., 2001).

Индукция *in vitro* материнских гаплоидов (гиногенез) используется в основном у растений, для которых андро-

генез и индукция опылением неэффективны. В отличие от индуцированного партеногенеза, при гиногенезе до опыления *in vitro* вводят завязи или выделенные семяпочки, а не неполноценные зародыши из семян. При культивировании на питательных средах гаплоидные клетки зародышевого мешка образуют эмбриониды (прямой эмбриогенез) или морфогенный каллус, из которого формируется растение (непрямой эмбриогенез). На процесс индукции гиногенеза тоже влияет большое число факторов: генотип, условия выращивания донорного растения, стадия развития гаметофита, состав питательной среды, стрессовые воздействия. У растений с мужской стерильностью культивирование неопыленных семян – единственная возможность получения гаплоидов. У некоторых растений, например у ячменя и риса, индукция зеленых растений намного выше при гиногенезе по сравнению с андрогенезом. Частота случайного появления растений с одинарным набором хромосом незначительна, до 0.01 %, т.е. является редким событием и имеет ограниченное практическое значение (Bohanec, 2009; Kielkowska et al., 2014).

История развития гаплоидных технологий растений

Первое растение, идентифицированное как гаплоид, по одной из версий, было обнаружено А.Д. Bergner в 1921 г. Использовать такие растения в селекции предложили А.Ф. Blakeslee и J. Belling. Ученые получили растения с одинарным набором хромосом при попытке вызвать мутации у дурмана (*Datura stramonium* L.), применяя холод в качестве стимула. Полученный гаплоид сразу стал инновацией среди цветковых растений как спорофит, имеющий набор хромосом, характерный для гаметофита (Blakeslee et al., 1922). Позднее гаплоидная форма была идентифицирована в потомстве F_1 при скрещивании видов *Nicotiana tabacum* и *N. sylvestris*. Растение имело некоторые морфологические отличия от родительских форм, например длинные узкие листья, меньший размер цветков, стерильную пыльцу и неспособность к формированию зрелых семян, что было подтверждено цитологическим исследованием (Clausen, Mann, 1924). По данным Е.Ф. Gains, в 1925 г. было обнаружено гаплоидное растение пшеницы с 21 хромосомой вместо 42, как у родительских особей. Гаплоидная форма практически не отличалась от диплоидной, однако имела большее кущение. Явные отличия стали заметны в момент цветения и при формировании незрелых семян (Gains, Aase, 1926). Позднее в ходе исследований индукция гаплоидов у пшеницы была достигнута путем опыления растений пыльцой, подвергавшейся рентгеновскому облучению. В результате мужские гаметы были инактивированы и потеряли способность сливаться с яйцеклеткой, но стимулировали ее деление и развитие зародыша (Katayama, 1934). Исследования с применением рентгеновского облучения не дали значительных количественных результатов и представляли опасность для человека.

На начальных этапах гаплоидные формы растений создавали традиционными методами селекции при помощи отдаленной гибридизации. Так, при скрещивании *Triticum aestivum* L. и *Secale cereale* L. были получены два гаплоид-

да (Sears, 1988). Позднее появились и другие методы с использованием различных химических веществ. С развитием биотехнологических приемов создание гаплоидов стало возможным для многих растительных культур.

Гаплоидная форма *Beta vulgaris* L. впервые была выявлена шведским ученым А. Levan в теплицах селекционной станции Hilleshog компании Swedish Sugar Co, где в 1942 г. он проводил обработку растений сахарной свеклы колхицином (Levan, 1945). Собранные семена прорастили и в 1943 г. исследовали количество хромосом у полученных растений. Помимо диплоидных, триплоидных и тетраплоидных растений, было одно гаплоидное растение с числом хромосом, равным 9, в отличие от родительских форм, имевших 18 хромосом. А. Levan предположил, что обработка колхицином вызвала повреждение гамет: одно пыльцевое зерно могло стимулировать развитие эмбриона, но было не способно к оплодотворению. В своей работе автор уделил особое внимание морфологии и цитологии гаплоидного растения. По его описанию, гаплоид обладал большим количеством узких листовых пластин, имевших меньший размер в сравнении с диплоидными, триплоидными и тетраплоидными растениями. По внешним признакам гаплоид был явно слабее и ниже, чем диплоидные растения, однако образовал нормально развитые соцветия и фертильную пыльцу, которая со временем подверглась деградации. На основании цитогенетических исследований А. Levan пришел к выводу, что у гаплоидов мейоз максимально приближен к таковому у диплоидов, однако из-за отсутствия гомологичных пар хромосом весь механизм заканчивался неудачей. Дальнейшие работы в данном направлении дали возможность экспериментально получать гаплоидные формы растений с частотой, превышающей естественный уровень.

В 1964 г. сотрудники отдела ботаники Университета г. Дели (Индия) S. Guha и S.C. Maheswari опубликовали данные биохимического анализа мейоза пыльников дурмана в культуре *in vitro* (Guha, Maheswari, 1964, 1966). При культивировании зрелых пыльников на питательных средах ученые обнаружили эмбриоиды, развивающиеся из незрелых микроспор. Некоторые из эмбриоидов, регенерировавших в ходе эксперимента, превратились в нормальные проростки. В дальнейшем было установлено, что некоторые из них имели гаплоидное число хромосом. Позднее был представлен метод, с помощью которого из пыльцевых зерен *in vitro* были сформированы сотни гаплоидных растений различных видов табака. При выращивании на питательной среде часть пыльцевых зерен разрасталась в зародышевые структуры, которые, поэтапно развиваясь, были способны к обильному цветению, но не формировали семена (Nitsch J., Nitsch C., 1969). Известно также об успешном получении *in vitro* гаплоидов риса (*Oryza sativa* L.) (Niizeki, Oono, 1968), гаплоидов пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в культуре пыльников (Ouyang et al., 1973).

Начиная с 1982 г. стала известна культура изолированных микроспор, которая была более эффективна при производстве гаплоидов (Lichter, 1982). Позднее гаплоиды *Triticum aestivum* L. были произведены в культуре изолированных микроспор (Datta, Wenzel, 1987; Tuveesson, Öhlund, 1993) с помощью отдаленной гибридизации с диким яч-

менем (*Hordeum bulbosum* L.) и кукурузой (*Zea mays* L.) (Barclay, 1975; Laurie, Bennett, 1986; Inagaki, Tahir, 1990).

Извлечение пыльников из бутонов, а также последующее их вскрытие для высвобождения микроспор являлось достаточно трудоемкой процедурой, которая была усовершенствована М. Zheng в ходе создания гаплоидов и удвоенных гаплоидов из микроспор пшеницы. Разработанная технология включала в себя этапы гомогенизации, фильтрации и центрифугирования полученного образца в градиенте плотности. В результате М. Zheng удалось собрать фракцию жизнеспособных эмбриогенных микроспор для культивирования на питательных средах в условиях *in vitro*, что позволило оптимизировать метод извлечения микроспор пшеницы (Zheng, 2003). Затем были опубликованы работы L. Cistué и Z. Labbani с соавторами с протоколом ДН для твердой пшеницы (Cistué et al., 2006; Labbani et al., 2007). Их главными усовершенствованиями были предобработка маннитом и использование колхицина *in vitro*.

С получением все новых данных о возможности создания гаплоидных форм высших растений *in vitro* была раскрыта ценность их применения в селекции и важность развития биотехнологических методов. К настоящему времени для многих растительных культур, таких как пшеница, тритикале, ячмень, рис, кукуруза, капуста, морковь и др., разработаны эффективные приемы, позволяющие получать гаплоидные растения для создания чистых линий.

Развитие гаплоидных биотехнологий сахарной свеклы

В 1971 г. N. Bosemark сообщил о получении пяти гаплоидов путем опыления растений пыльцой дикой свеклы и облученной пыльцой сахарной свеклы. Кроме гаплоидных форм, ему удалось создать гомозиготные диплоидные и тетраплоидные линии после обработки предварительно пророщенных семян колхицином (Bosemark, 1971). В 1983 г. стало известно о получении гаплоидов методом отдаленной гибридизации. При опылении стерильных растений сахарной свеклы пыльцой красной столовой свеклы частота возникновения гаплоидов составила 0.013 % (Seman, 1983). Данные методы были направлены на стимулирование неоплодотворенной яйцеклетки к развитию, однако показали незначительные результаты по количеству полученных гаплоидов, чего было недостаточно для масштабных селекционных работ.

Путь андрогенеза для получения гаплоидов сахарной свеклы в целом оказался неэффективным. Чаще всего на используемых минеральных средах пыльники индуцировали каллус, проэмбриогенные структуры и корни, но их количество зависело от комбинации используемых ростовых веществ. По итогам исследования J. Rogozinska и M. Goska лучшей средой для дифференциации была признана среда Линсмайера и Скуга с добавлением зеатина 6-(4-окси-3-метил-транс-2-бутиламино)пурин) или зеатина и НУК (1-нафталинукусной кислоты), а добавление PFP (*n*-фторфенилаланина) увеличивало долю дифференцировки пыльников (Rogozinska, Goska, 1982). Помимо каллуса и корней, на одном пыльнике из примерно 140000 проверенных формировались вегетативные

почки, из которых были получены многочисленные диплоидные растения. Цитологические анализы показали образование многоклеточных структур, которые впоследствии вырождались. В других подобных экспериментах развивались целые растения, но их ткань чаще оказывалась диплоидной, а гаметофитное происхождение регенерантов не подтверждалось (Gürel E. et al., 2008). В недавних исследованиях были разработаны условия для прямого индуцированного андрогенеза сахарной свеклы в культуре *in vitro*. Процесс получения гаплоидов включал холодовую предобработку эксплантов, которая являлась необходимым фактором инициации перехода микроспор с гаметофитного на спорофитный путь. Для культивирования пыльников и развившихся эмбриоидов был модифицирован состав среды, который включал 2,4-Д и 6-БАП. В результате эксперимента получено от 0.15 до 1.32 % микроклонов андрогенного происхождения (Гонтаренко, Герасименко, 2018), однако это оказалось недостаточно эффективным для массового получения гаплоидных форм. Множество исследований в данном направлении давали неудовлетворительные результаты. Морфогенетический ответ при культивировании *in vitro* элементов мужской генеративной системы *B. vulgaris*, по имеющимся на сегодня сведениям, считается очень низким.

Получение гаплоидов сахарной свеклы путем культивирования неопыленных семяпочек впервые удалось D. Hoesmans и D. Bossoutrot. В своем эксперименте ученые идентифицировали 0.17 % образовавшихся гаплоидов (Hoesmans, Bossoutrot, 1983; Bossoutrot, Hoesmans, 1985). Проведенное ими дальнейшее гистологическое исследование показало, что регенерировавшие эмбриоиды могли происходить из неоплодотворенной яйцеклетки или антипод. Однако полученные гиногенетические растения демонстрировали феномен эндополиплоидии на уровне корневой меристемы, в то время как меристема побегов оставалась гаплоидной. С момента, когда стало понятно, что такой подход может быть единственным эффективным методом получения гаплоидных растений сахарной свеклы, начались многочисленные исследования *in vitro* по оптимизации данного процесса.

Интерес к гиногенезу сахарной свеклы возрастал с каждым годом, и в 1987 г. J. Van Geyt с коллегами сообщили о получении гаплоидов из семяпочек с частотой до 6.1 % (Van Geyt et al., 1987). Результаты гистологического анализа в эксперименте подтвердили, что растения происходили из гаплоидных клеток зародышевого мешка, но на кончиках корней, так же как и в исследовании D. Hoesmans и D. Bossoutrot, наблюдалась спонтанная полиплоидизация (Hoesmans, Bossoutrot, 1983; Bossoutrot, Hoesmans, 1985). По данным J. Van Geyt, форма извлеченных семяпочек имела большое значение при введении в культуру тканей. Обнаружено, что потеря эксплантом формы запятой сопровождалась гибелью яйцеклетки. Также сообщалось, что регенерация растений тормозилась образованием каллуса из материнской ткани, но после его удаления и перенесения семяпочки на новую питательную среду, содержащую древесный уголь, можно подавить его повторное появление. Дальнейшее изучение гиногенеза позволило выявить зависимость данного процесса от различных условий.

В ходе исследований M. Doctrinal было установлено, что такие факторы, как природа и концентрация используемых гормонов, температура культивирования, сезонные эффекты и генотип, имели большое значение для процесса развития гаплоидных растений (Doctrinal et al., 1989). По итогам наблюдений для инициации эмбриогенеза у неопыленных семяпочек сахарной свеклы наиболее предпочтительной была температура 27 °С, при этом сезонный эффект оказывал значительное влияние. Самая активная регенерация наблюдалась в июле. Также установлено, что гормональный состав питательных сред влиял на пути морфогенеза женского гаметофита и образования морфологических структур. Наилучшие качественные и количественные показатели гиногенного ответа у исследуемых генотипов были отмечены на питательных средах, содержащих 2.85 мкМ 3-индолилуксусной кислоты и 0.88 мкМ 6-бензиламинопурина, и на среде, содержащей 2.3 мкМ кинетина. В зависимости от генотипа при использовании данных сред было получено от 6 до 10 % жизнеспособных растений, 81 % из которых оказались гаплоидами. Исследование M. Doctrinal подтвердило перспективность получения гаплоидов сахарной свеклы путем гиногенеза. Продолжилась разработка биотехнологических приемов с учетом множества факторов, влияющих на гиногенез *Beta vulgaris* L. *in vitro*, направленных на оптимизацию условий культивирования и повышение эффективности соответствующих методов.

В работах H. Lux с коллегами отмечалось, что выход регенерантов из семяпочек снижался от самой активной регенерации в сентябре до самой низкой в январе (Lux et al., 1990). Эти данные позволили предположить, что эффективность гиногенеза имела сезонную зависимость. По мнению авторов, несмотря на трудоемкость процесса, гиногенез оказался более подходящим методом для получения гаплоидов сахарной свеклы *in vitro* как вида, не поддающегося андрогенезу. В зависимости от генотипа было получено от 0 до 13 % гаплоидных растений, при этом у 10 % растений в процессе культивирования и размножения наблюдалось спонтанное удвоение хромосом, тогда как 90 % оставались гаплоидами.

Для успешного применения гиногенеза в практических задачах большое значение имеет количество образованных гаплоидных растений. S. Gürel с соавторами подтвердили, что предварительная холодовая обработка и действие активированного угля могут увеличить частоту образования эмбрионов (Gürel S. et al., 2000). В экспериментах эмбрионы, развившиеся из яйцеклетки, формировали побеги с гаплоидным числом хромосом. Однако при разработке оптимальных условий получения гаплоидов возникала проблема генотипической зависимости ответа на условия культивирования. Выход полученных эмбриоидов различался у линий сахарной свеклы, так же как и реакция развитых микроклонов на разные условия роста. Генотипические различия в реакции на условия культивирования являются серьезной проблемой не только в культуре семяпочек (Hansen et al., 1995), но и в работе с другими тканями сахарной свеклы (Mikami et al., 1989; Gürel E., 1997), поэтому состав питательной среды, а также условия культивирования рекомендовано подбирать для каждого генотипа индивидуально.

Исследования многих ученых свидетельствовали о важности предварительной холодовой обработки материала для увеличения скорости гиногенеза *B. vulgaris* (Lux et al., 1990; Gürel S. et al., 2000; Svirshchevskaya, Dolezel, 2000; Pazuki et al., 2018a). Н. Lux с коллегами показали, что обработка холодом (4 °С) в течение четырех-пяти дней была способна значительно повысить скорость гиногенеза сахарной свеклы. Увеличение срока холодового воздействия на соцветия свыше одной недели снижало гиногенный ответ семяпочек, в то время как предварительная холодовая обработка в течение семи дней и использование БАП в концентрации 1 мг/л оказывали стимулирующий эффект при переключении развития эксплантов с гаметофитного на спорофитный путь. Подчеркивалось, что влияние сезона и генотипа на скорость регенерации было значительным. Помимо холодовой предобработки, регенерация повышалась при смещении спектра светового облучения, используемого при культивировании семяпочек в условиях термального помещения, в сторону красного участка спектра (D'Halluin, Keimer, 1986).

Е. Weich и М. Levall (2003) предложили протокол для получения удвоенных гаплоидов сахарной свеклы, в котором были рассмотрены все стадии создания селекционного материала: выращивание донорских растений, сбор соцветий, поверхностная стерилизация материала, выделение семяпочек, культивирование гаплоидных эмбрионидов, размножение гаплоидов, получение удвоенных гаплоидов, их укоренение, перенос в тепличные условия и акклиматизация. Описаны условия проведения каждого этапа, даны рекомендации по манипуляциям с растительным материалом, приведены составы оптимальных питательных сред. Протокол носил рекомендательный характер, в связи с разнообразием генотипического ответа на условия культивирования он должен быть модифицирован под различные генотипы сахарной свеклы.

Для эффективного получения гаплоидов М. Tomaszewska-Sowa описала двухэтапный процесс культивирования, в котором экспланты представляли собой неопыленные семяпочки, выделенные после стерилизации из бутонов генеративных побегов растений сахарной свеклы. Репродуктивные структуры выдерживали в жидкой питательной среде в течение 12 недель (Tomaszewska-Sowa et al., 2017). Регенерировавшие экспланты переносили на твердую питательную среду с модифицированным составом, после наблюдали образование побегов. Было установлено, что органогенез семяпочек при двухфазном методе был не прямым, а проходил через формирование каллусной ткани. Эффективность регенерации зависела от типа и происхождения экспланта. Процессы дифференцировки в соматических эмбриоидах усиливались наличием 6-БАП и 2,4-Д в среде, что в свою очередь увеличивало количество образовавшихся специализированных тканевых структур.

Соотношение гормонов в субстрате оказывает основное влияние на пути развития эмбриональной структуры. В настоящее время протоколы получения гаплоидов сахарной свеклы требуют дальнейших разработок и совершенствования, поэтому исследования по подбору оптимального состава сред и поиску других стимулирующих гиногенез факторов все еще продолжаются.

Этапы создания гомозиготного материала *in vitro*

Отбор родительских форм

Итак, первой стадией, с которой начинается работа по введению растительного материала *in vitro*, можно считать выбор донорских растений. Для снижения уровня инфицированности эксплантов сбор соцветий надо осуществлять в сухую погоду, при длительном отсутствии осадков. Процедуру лучше проводить в начале периода цветения. В зависимости от региона произрастания это может быть май–июль. Собранные соцветия каждого генотипа помещают в пластиковые пакеты, маркируют и хранят в холоде до этапа стерилизации растительного материала в условиях лаборатории.

Стерилизация материала

при введении семяпочек *in vitro*

Растения легко поражаются различными эпифитными и эндофитными микроорганизмами и вирусами. Именно поэтому стадией, определяющей успех процесса введения материала *in vitro*, является качественная стерилизация исходного материала. Ранее разработанные методики стерилизации эксплантов с применением ряда ртутьсодержащих препаратов (сулемы, диоксида, мертиолята) были признаны эффективными (Гранда, 2009), но очень токсичными как для человека, так и для растений. Со временем они были вытеснены приемами с использованием других веществ. Для поверхностной стерилизации растительные ткани могут быть обработаны хлорсодержащими веществами (гипохлорит кальция или натрия, хлорная известь, хлорамин), перекисью водорода, этиловым спиртом. О. Jones предлагал для стерилизации растворы, содержащие в качестве дезинфицирующего вещества гипохлорит натрия (Domestos) (Jones et al., 1979). Е. Weich и М. Levall в своей работе использовали для стерилизации коммерческое средство Klorin или 3 % гипохлорит натрия. После стерилизации материал тщательно промывали бидистиллированной водой и хранили в холодильнике при 8 ± 2 °С (Weich, Levall, 2003). При выборе способа стерилизации необходимо учитывать как ее эффективность против бактериальной и грибковой инфекции, так и предотвращение повреждения растительных тканей. Применение новых стерилизующих веществ повышает вероятность эффективного процесса стерилизации эксплантов.

Введение семяпочек в культуру *in vitro*

К настоящему времени, несмотря на появление высокотехнологичных аппаратов и устройств, облегчающих некоторые манипуляции в лабораториях, создание гаплоидного материала зависит от тонкой ручной работы оператора. Процесс извлечения семяпочек сахарной свеклы при введении в культуру *in vitro* подробно описан А. Pazuki с соавторами (Pazuki et al., 2018b). Ученые проводили данную процедуру в стерильных условиях под стереомикроскопом с помощью пинцетов и скальпеля. Первый закрытый и последующие бутоны вскрывали в направлении к верхушке соцветия, вносили в чашки Петри, содер-

жащие питательную среду. Культивирование проводили при температуре 27 ± 2 °C с 18-часовым фотопериодом. Регенерировавшие семяпочки переносили на MS среду пролиферации и размножения, содержащую 0.2 мг/л кинетин, 10 г/л сахарозы. В связи с различной реакцией генотипов состав питательных сред и условия культивирования могут быть различны для каждого генотипа на всех этапах создания селекционного материала. Регенерация семяпочек может начаться уже через две-три недели после введения. Развившиеся полноценные микроклоны в дальнейшем поддерживают в культуре *in vitro*.

Определение плоидности полученного регенеранта

Фенотипически гаплоидные растения отличаются от диплоидных высотой, размером и количеством органов, более узкими листовыми пластинами, однако визуальное определение плоидности не дает точных результатов. После формирования из неопыленных семяпочек нормально развитых регенерантов проводят проверку их плоидности, так как есть вероятность получения проростков, произошедших из соматических клеток, имеющих диплоидный или миксоплоидный хромосомный набор.

Одним из надежных способов определения плоидности является подсчет хромосом, находящихся в стадии митоза активно растущих тканей (зоны роста корня или молодых листьев). Метод трудоемкий и требует продолжительной подготовки. Процесс подсчета хромосом в клетках сахарной свеклы подробно описан в работе (Pazuki et al., 2018a). Молодые листья проростков *in vitro* обрабатывали 3 ч раствором 8-гидроксихинолина (0.002 М) с последующей фиксацией в свежеприготовленном растворе 96 % этанола и соляной кислоты (2:1). После этого их промывали и хранили в дистиллированной воде. Далее небольшой кусочек листовой ткани переносили в каплю 3 % орсеина в 45 % уксусной кислоте на предметное стекло и раздавливали его под покровным стеклом. Затем проводили подсчет хромосом под световым микроскопом.

Альтернативой трудоемкому подсчету хромосом под микроскопом стала проточная цитометрия клеточных ядер; это более удобный и быстрый способ определения плоидности. Данный аппаратный метод основан на измерении количества ДНК в ядрах клеток в режиме поштучного анализа в потоке жидкости по сигналам светорассеяния и флуоресценции, обладает высокой точностью и производительностью (Galbraith, 2010). Метод проточной цитометрии позволяет в короткие сроки определить плоидность микроклонов без нанесения значительных повреждений исследуемым растениям, что имеет важное значение при работе с ограниченным объемом регенерировавшего материала.

Удвоение числа хромосом

Основной целью индукции гиногенеза является получение гаплоидов для создания чистых линий. Для этого на следующем этапе у нормально развитых гаплоидов число хромосом должно быть удвоено *in vitro* или *in vivo* методами. А. Hansen с коллегами изучили эффективность антимиотических агентов непосредственно в культуре семяпочек сахарной свеклы (Hansen et al., 1998). По

результатам эксперимента амипрофосметил показал относительно низкую токсичность в отношении зародыша и способствовал получению в среднем 4.7 диплоидного растения на 100 введенных эксплантов. По мнению S. Gürel, самым эффективным методом создания удвоенных гаплоидов является обработка растений антимиотическими агентами, такими как колхицин, оризалин, трифлуралин, или непродолжительное культивирование побегов на питательных средах, содержащих перечисленные вещества. Колхицин – наиболее часто применяемый алкалоид, который способен ингибировать образование веретена деления на стадии профазы и останавливать расхождение хромосом к полюсам дочерних клеток. Нарушение данного процесса приводит к удвоению числа хромосом в материнской клетке. В исследованиях было показано, что обработка гаплоидов колхицином и трифлуралином дает схожие результаты, причем оба агента были более эффективны при применении в форме жидких растворов, чем при добавлении их в агаризованную среду (Gürel S. et al., 2000). Для успешной диплоидизации ученые погружали проросшие гаплоиды в жидкую MS среду, содержащую 150 мг/л антимиотического агента (колхицина), 1 мг/л БАП и 3 % сахарозы, на 48 ч при температуре 27 °C. После обработки побеги промывали стерильной дистиллированной водой и переносили на твердую питательную среду MS с добавлением 1 мг/л БАП. Число растений с удвоенным хромосомным набором достигало 29.1 %.

E. Weich и M. Levall (2003) для получения ДН-растений выдерживали гаплоидные растения с корнями, у которых удалили кончики, в течение 5 ч в растворе 0.2 % колхицина и 0.25 % ДМСО. Подобный прием использовали с 0.3 % раствором колхицина, в который регенеранты погружали корневой системой на 24 ч, а затем высаживали в почвенную смесь. При этом 19 % обработанных гаплоидных растений удвоили набор хромосом (Svirshchevskaya, Dolezel, 2000). Также сообщалось, что нанесение 0.1 % раствора колхицина с 2 % ДМСО на меристему гаплоидов сахарной свеклы один раз в день в течение трех дней приводило к удвоению набора хромосом (D'Halluin, Keimer, 1986). M. Ragot и P. Steen (1992) помещали ватный тампон, смоченный раствором 0.2 % колхицина, на три дня на верхушечные почки гаплоидных растений в горшках, получая в итоге до 50 % удвоенных гаплоидов.

Следует заметить, что после обработки гаплоидов антимиотическими агентами через некоторое время требуется повторный анализ плоидности микроклонов и тщательный отбор полученных удвоенных гаплоидов из всего объема экспериментального материала.

В современных селекционных программах для определения ценных сельскохозяйственных свойств полученных форм дополнительно используют молекулярно-генетические методы, направленные на выявление генов устойчивости к стрессам, идентификацию целевых аллелей, отвечающих за кодирование конкретного признака. Это позволяет значительно сократить селекционный процесс и аккумулировать желаемые аллели в одном генотипе. Главным методом молекулярной селекции стал маркеропосредованный отбор (marker assisted selection, MAS), который широко применяется в селекции множества сель-

скохозяйственных культур (Muranty et al., 2014). Генетические маркеры могут быть использованы на различных стадиях биотехнологического процесса и селекционных программ в целях отбора перспективных генотипов.

Укоренение удвоенных гаплоидов и получение штеклингов

Следующим этапом является укоренение удвоенных гаплоидов *in vitro* с целью повышения их выживаемости при адаптации к условиям закрытого грунта. В период подготовки растений к высадке в условия закрытого грунта можно также столкнуться с низкой частотой образования корней. Ризогенез *in vitro* могут задерживать яркое освещение, необходимое зеленой части микроклонов, высокая концентрация солей и углеводов, наличие гормонов и низкая концентрация кислорода в питательной среде. В связи с различным генотипическим ответом поиск оптимального состава питательного субстрата и условий культивирования микроклонов продолжается.

Нормально развитые ДН-микроклоны с корневой системой высаживают в условия закрытого грунта. В связи с пересадкой из условий *in vitro* этап адаптации высаженных растений длится до четырех недель, в это время в тепличном помещении постепенно снижают влажность воздуха. В последующем, через два-три месяца доращивания, формируются штеклинги и растения будут готовы к уборке. Биотехнологический цикл создания нового гомозиготного материала завершается этапом искусственной яровизации штеклингов в условиях пониженных температур. После этого гомозиготный материал направляют на дальнейшие этапы селекционного процесса – высаживают в опытные полевые условия с целью выращивания цветочных растений и проведения скрещиваний.

Заключение

Благодаря внедрению биотехнологий, процесс создания новых гибридов сахарной свеклы может быть значительно ускорен. Получение удвоенных гаплоидов позволяет существенно сократить время и ресурсы, затрачиваемые на создание чистых линий. Наиболее успешным методом получения гаплоидов *Beta vulgaris* L. признан метод индуцированного гиногенеза – культивирование неопыленных семян *in vitro* с последующим формированием растений с гаплоидным набором хромосом. Для создания ДН-линий применяют удвоение числа хромосом гаплоидов с использованием антимитотических агентов, контроль пloidности созданного материала, выращивание микроклонов в тепличных условиях. Биотехнологический этап завершается получением штеклингов растений удвоенных гаплоидов.

Процессы в культуре тканей сахарной свеклы, в частности индукция Н- и ДН-форм, все еще требуют проведения дополнительных научных исследований. Анализ научной литературы показывает, что для максимального увеличения эффективности и воспроизводимости надо более детально изучать производство удвоенных гаплоидов *Beta vulgaris* L. и улучшать его с применением новых подходов. Биотехнологическим лабораториям необходимо иметь возможность получать гаплоиды в большом количестве. Поэтому требуют повышения эффективности

приемы культивирования эксплантов, диплоидизации, укоренения, адаптации регенерантов при пересадке из стерильных условий *in vitro* в грунт. Совершенствование каждой стадии процесса до сих пор остается актуальной задачей, конечной целью при этом станет повышение качества и объемов выхода готового гомозиготного материала.

Список литературы / References

- Гонтаренко С.Н., Герасименко А.Н. Прямой индуцированный андрогенез в культуре *in vitro* сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.). *Plant Varieties Studying and Protection*. 2018;14(4):375-381. DOI 10.21498/2518-1017.14.4.2018.151900.
[Hontarenko S.M., Herasymenko H.M. Direct induced androgenesis in culture *in vitro* in sugar beet (*Beta vulgaris*). *Plant Varieties Studying and Protection*. 2018;14(4):375-381. DOI 10.21498/2518-1017.14.4.2018.151900. (in Ukrainian)]
- Гранда Х.Р.К. Микроклональное размножение хризантем. *Изв. Тумирязев. с.-х. академии*. 2009;1:145-148.
[Granda H.R.K. Micropropagation of chrysanthemums. *Izvestiya Timiryazevskoy Selskokhozyaystvennoy Akademii = Bulletin of the Timiryazev Agricultural Academy*. 2009;1:145-148. (in Russian)]
- Джачук Т.И., Акинина В.Н., Хомякова О.В., Калашникова Е.В. Отдаленная гибридизация как метод получения гаплоидных растений у злаков. *Биотехнология и селекция растений*. 2019; 2(2):44-52. DOI 10.30901/2658-6266-2019-2-44-52.
[Djatchouk T.I., Akinina V.N., Khomyakova O.V., Kalashnikova E.V. Distant hybridization as a method of haploid production in cereals. *Biotehnologiya i Seletsiya Rastenii = Plant Biotechnology and Breeding*. 2019;2(2):44-52. DOI 10.30901/2658-6266-2019-2-44-52. (in Russian)]
- Домблидес Е.А., Белов С.Н., Солдатенко А.В., Пивоваров В.Ф. Получение удвоенных гаплоидов огурца (*Cucumis sativus* L.). *Овощи России*. 2019;5:3-14. DOI 10.18619/2072-9146-2019-5-3-14.
[Domblides E.A., Belov S.N., Soldatenko A.V., Pivovarov V.F. Production of doubled haploids in cucumber. *Ovoshchi Rossii = Vegetable Crops of Russia*. 2019;5:3-14. DOI 10.18619/2072-9146-2019-5-3-14. (in Russian)]
- Barclay I.R. High frequencies of haploid production in wheat (*Triticum aestivum*) by chromosome elimination. *Nature*. 1975;256: 410-411.
- Basu S.K., Eudes F., Kovalchuk I. Role of recA/RAD51 gene family in homologous recombination repair and genetic engineering of transgenic plants. In: Kumar A., Sopory S. (Eds.) *Applications of Plant Biotechnology: In vitro propagation, plant transformation and secondary metabolite production*. Ch. 12. India, New Delhi: I K Int. Publ. House Pvt. Ltd., 2010;231-255.
- Blakeslee A.F., Belling J., Farnham M.E., Bergner A.D. A haploid mutant in the Jimson Weed, "*Datura stramonium*". *Science*. 1922; 55(1433):646-647. DOI 10.1126/science.55.1433.646.
- Bohanec B. Doubled haploids *via* gynogenesis. In: Touraev A., Foster B.P., Jain E.M. (Eds.) *Advances in Haploid Production in Higher Plants*. Dordrecht: Springer Science + Business Media BV, 2009; 35-46. DOI 10.1007/978-1-4020-8854-4.
- Bosemark N.O. Haploids and homozygous diploids, triploids and tetraploids in sugar beet. *Hereditas*. 1971;69(2):193-204. DOI 10.1111/j.1601-5223.1971.tb02433.x.
- Bossoutrot D., Hosemans D. Gynogenesis in *Beta vulgaris* L.: from *in vitro* culture of unpollinated ovules to the production of doubled haploid plants in soil. *Plant Cell Rep*. 1985;4:300-303. DOI 10.1007/BF00269883.
- Chaikam V., Molenaar W., Melchinger A.E., Boddupalli P.M. Doubled haploid technology for line development in maize: technical advances and prospects. *Theor. Appl. Genet*. 2019;132:3227-3243. DOI 10.1007/s00122-019-03433-x.

- Cistué L., Soriano M., Castillo A.M., Vallés M.P., Sanz J.M., Echarri B. Production of doubled haploid in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Rep.* 2006;25(4):257-264. DOI 10.1007/s00299-005-0047-8.
- Clausen R.E., Mann M.C. Inheritance in *Nicotiana tabacum*: V. The occurrence of haploid plants in interspecific progenies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1924;10(4):121-124. DOI 10.1073/pnas.10.4.121.
- Datta S.K. Androgenic haploids: factors controlling development and its application in crop improvement. *Curr. Sci.* 2005;89(11):1870-1878. DOI 10.1007/978-94-017-1203-319.
- Datta S.K., Wenzel G. Isolated microspore derived plant formation via embryogenesis in *Triticum aestivum* L. *Plant Sci.* 1987;48:49-54.
- D'Halluin K., Keimer B. Production of haploid sugarbeets (*Beta vulgaris* L.) by ovule culture. In: Horn W., Jensen C.J., Odenbach W., Schieder O. (Eds.) Genetic Manipulation in Plant Breeding. Berlin: Walter de Gruyter & Co., 1986;307-309.
- Doctrinal M., Sangwan R.S., Sangwan-Norree B.S. *In vitro* gynogenesis in *Beta vulgaris* L.: effects of plant growth regulators, temperature, genotypes and season. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1989;17:1-12. DOI 10.1007/BF00042276.
- Dunwell J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploration. *Plant Biotechnol. J.* 2010;8(4):377-424. DOI 10.1111/j.1467-7652.2009.00498.x.
- Gains E.F., Aase H.C. A haploid wheat plant. *Am. J. Bot.* 1926;13(6):373-385.
- Gałązka J., Słomnicka R., Góral-Radziszewska K., Niemirowicz-Szczytt K. From pollination to DH lines – verification and optimization of protocol for production of doubled haploids in cucumber. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus.* 2015;14(3):81-92.
- Galbraith D.W. Flow cytometry and fluorescence-activated cell sorting in plants: the past, present, and future. *Biomédica.* 2010;30(Suppl.):65-70. DOI 10.7705/biomedica.v30i0.824.
- Guha S., Maheshwari S. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature.* 1964;204:497. DOI 10.1038/204497a0.
- Guha S., Maheshwari S. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura* *in vitro*. *Nature.* 1966;212:97-98. DOI 10.1038/212097a0.
- Gürel E. Callus and root development from leaf explants of sugar beet (*Beta vulgaris* L.): variability at variety, plant and organ level. *Turk. J. Botany.* 1997;21:131-136.
- Gürel E., Gürel S., Lemaux P.G. Biotechnology applications for sugar beet. *Crit. Rev. Plant Sci.* 2008;27(2):108-140. DOI 10.1080/07352680802202000.
- Gürel S., Gürel E., Kaya Z. Doubled haploid plant production from unpollinated ovules of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Cell Rep.* 2000;19(12):1155-1159. DOI 10.1007/s002990000248.
- Hansen A.L., Gertz A., Joersbo M., Andersen S.B. Short-duration colchicine treatment for *in vitro* chromosome doubling during ovule culture of *Beta vulgaris* L. *Plant Breed.* 1995;114(6):515-519. DOI 10.1111/j.1439-0523.1995.tb00847.x.
- Hansen A.L., Gertz A., Joersbo M., Andersen S.B. Antimicrotubule herbicides for *in vitro* chromosome doubling in *Beta vulgaris* L. ovule culture. *Euphytica.* 1998;101(2):231-237. DOI 10.1023/a:1018380103304.
- Hosemans D., Bossoutrot D. Induction of haploid plants from *in vitro* culture of unpollinated beet (*Beta vulgaris* L.). *Z. Pflanzenzücht.* 1983;91(1):74-77.
- Inagaki M.N., Tahir M. Comparison of haploid production frequencies in wheat varieties crossed with *Hordeum bulbosum* L. and maize. *Jpn. J. Breed.* 1990;40(2):209-216. DOI 10.1270/jsbbs1951.40.209.
- Jones O.P., Pontikis C.A., Hopgood M.E. Propagation *in vitro* of five apple scion cultivars. *J. Hortic. Sci.* 1979;54(2):155-158. DOI 10.1080/00221589.1979.11514863.
- Kasha K.J., Simion E., Oro R., Yao Q.A., Hu T.C., Carlson A.R. An improved *in vitro* technique for isolated microspore culture of barley. *Euphytica.* 2001;120:379-385. DOI 10.1023/A:1017564100823.
- Katayama Y. Haploid formation by X-rays in *Triticum monococcum*. *Cytologia.* 1934;5(2):235-237.
- Kelliher T., Starr D., Wang W., McCuiston J., Zhong H., Nuccio M.L., Martin B. Maternal haploids are preferentially induced by CENH3-tailswap transgenic complementation in maize. *Front. Plant Sci.* 2016;7:414. DOI 10.3389/fpls.2016.00414.
- Kielkowska A., Adamus A., Baranski R. An improved protocol for carrot haploid and doubled haploid plant production using induced parthenogenesis and ovule excision *in vitro*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2014;50(3):376-383. DOI 10.1007/s11627-014-9597-1.
- Labbani Z., Buysier J.D., Picard E. Effect of mannitol pretreatment to improve green regeneration on isolated microspore culture in *Triticum turgidum* ssp. *durum* cv. 'Jannah Khetifa'. *Plant Breed.* 2007;126(6):565-568. DOI 10.1111/j.1439-0523.2007.01399.x.
- Laurie D.A., Bennett M.D. Wheat × maize hybridization. *Can. J. Genet. Cytol.* 1986;28(2):313-316. DOI 10.1139/g86-046.
- Levan A. A haploid sugar beet after colchicine treatment. *Hereditas.* 1945;31:399-410. DOI 10.1111/j.1601-5223.1945.tb02760.x.
- Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Z. Pflanzenphysiol.* 1982;105(5):427-434. DOI 10.1016/S0044-328X(82)80040-8.
- Lux H., Herrmann L., Wetzel C. Production of haploid sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by culturing unpollinated ovules. *Plant Breed.* 1990;104:177-183. DOI 10.1111/j.1439-0523.1990.tb00420.x.
- Mikami T., Sudoh R., Nagao E., Kinoshita T. Genotypic variation in the *in vitro* morphogenesis from leaf explants of *Beta vulgaris* L. and *Beta maritima* L. *Euphytica.* 1989;40:271-273. DOI 10.1007/BF00024523.
- Muranty H., Jorje V., Bastien C., Lepoittevin C., Bouffier L., Sanchez L. Potential for marker-assisted selection for forest tree breeding: lessons from 20 years of MAS in crops. *Tree Genet. Genomes.* 2014;10:1491-1510. DOI 10.1007/s11295-014-0790-5.
- Niizeki H., Oono K. Induction of haploid rice plant from anther culture. *Proc. Jpn. Acad.* 1968;44(6):554-557. DOI 10.2183/pjab1945.44.554.
- Nitsch J.P., Nitsch C. Haploid plants from pollen grains. *Science.* 1969;163(3862):85-87. DOI 10.1126/science.163.3862.85.
- Ouyang Y.W., Hu C.C., Chuang C.C., Tseng C.C. Induction of pollen plants from anthers of *Triticum aestivum* L. cultured *in vitro*. *Sci. Sin.* 1973;16:79-95.
- Pazuki A., Aflaki F., Gürel E., Ergül A., Gürel S. Gynogenesis induction in sugar beet (*Beta vulgaris*) improved by 6-benzylaminopurine (BAP) and synergized with cold pretreatment. *Sugar Tech.* 2018a;20:69-77. DOI 10.1007/s12355-017-0522-x.
- Pazuki A., Aflaki F., Gürel S., Ergül A., Gürel E. Production of doubled haploids in sugar beet (*Beta vulgaris*): an efficient method by a multivariate experiment. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2018b;132(1):85-97. DOI 10.1007/s11240-017-1313-5.
- Ragot M., Steen P. Genetic and environmental effects on chromosome doubling of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) haploids. *Euphytica.* 1992;63:233-237. DOI 10.1007/BF00024549.
- Rogozinska J.H., Goska M. Attempts to induce haploids in anther culture of sugar, fodder and wild species of beet. *Acta Soc. Bot. Pol.* 1982;51(1):91-105.
- Sahijram S., Rao B.M. (Eds.) Hybrid Embryo Rescue in Crop Improvement. Plant Biology and Biotechnology. Division of Biotechnology, Indian Institute of Horticultural Research (IIHR). India: Bangalore, 2015;2:363-383. DOI 10.1007/978-810322-2283-5_18.
- Sears E.R. History of Chinese Spring aneuploids. In: Proc. 7th Int. Wheat Genetics Symp. 1988;1:4-6.
- Seman I. Possibilities of detection and induction of haploids in *Beta vulgaris* L. *Biologia (Bratislava).* 1983;38(11):1113-1122.
- Svirshchevskaya A.M., Dolezel F.J. Production and performance of gynogenetic sugarbeet lines. *J. Sugar Beet Res.* 2000;37(4):117-133. DOI 10.5274/jsbr.37.4.117.
- Tomaszewska-Sowa M., Figas A.S., Gatz A. Histological analysis of organogenesis and somatic embryogenesis during shoot formation

- in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) via gynogenesis. *Polish J. Nat. Sci.* 2017;32(4):705-717.
- Touraev A., Forster B.P., Jain S.M. (Eds.) *Advances in Haploid Production in Higher Plants*. Dordrecht: Springer Science + Business Media BV, 2009;347. DOI 10.1007/978-1-4020-8854-4.
- Turesson I.K.D., Öhlund R.C.V. Plant regeneration through culture of isolated microspores of *Triticum aestivum* L. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1993;34:163-167.
- Urazaliyev K.R., Orsini J.M., Abekova A.M., Bazylova T.A., Daniyarova A.K. Speeding wheat breeding using dihaploids obtained by microspore culture. *Vestnik KazNU. Seriya Ekologicheskaya = Bulletin of the KNU: Environmental Series.* 2013;38(2/2):369-374.
- Van Geyt J., Speckmann G.J., D'Halluin K., Jacobs M. *In vitro* induction of haploid plants from unpollinated ovules and ovaries of the sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). *Theor. Appl. Genet.* 1987;73(6):920-925. DOI 10.1007/BF00289399.
- Watts A., Kumar V., Bhat S.R. Centromeric histone H3 protein: from basic study to plant breeding applications. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 2016;25:339-348. DOI 10.1007/s13562-016-0368-4.
- Weich E.W., Levall M.W. Doubled haploid production of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). In: Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. (Eds.) *Doubled Haploid Production in Crop Plants*. New York: Springer Science + Business Media, 2003;255-263. DOI 10.1007/978-94-017-1293-4_38.
- Zheng M.Y. Microspore culture in wheat (*Triticum aestivum*) – doubled haploid production via induced embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2003;73:213-230. DOI 10.1023/A:1023076213639.

ORCID ID

E.O. Kolesnikova orcid.org/0000-0002-7926-5129

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 19.05.2021. После доработки 30.09.2021. Принята к публикации 08.10.2021.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Генетическое разнообразие популяции центральноевропейского кабана (*Sus scrofa scrofa*) и пород домашних свиней (*Sus scrofa domesticus*) на основе микросателлитных локусов ДНК

Э.А. Снегин¹✉, В.М. Макеева², А.П. Каледин³, А.М. Остапчук³, И.Д. Алазтели², А.В. Смунов²

¹ Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, Россия

✉ snegin@bsu.edu.ru

Аннотация. В работе приведены результаты исследований генетической структуры популяции центральноевропейского кабана (*Sus scrofa scrofa*) и четырех пород домашних свиней (дюрок, йоркшир, крупная белая и ландрас), разводимых в Центрально-Черноземном регионе России. На основе 12 микросателлитных локусов установлено достоверное ($p < 0.05$) снижение генетической изменчивости в разводимых породах. Ожидаемая гетерозиготность и индекс Шеннона были равными: у кабана – $H_o = 0.763 \pm 0.026$, $I = 1.717 \pm 0.091$; у пород дюрок – $H_o = 0.569 \pm 0.068$, $I = 1.191 \pm 0.157$; ландрас – $H_o = 0.618 \pm 0.062$, $I = 1.201 \pm 0.147$; крупная белая – $H_o = 0.680 \pm 0.029$, $I = 1.362 \pm 0.074$; йоркшир – $H_o = 0.642 \pm 0.065$, $I = 1.287 \pm 0.156$. Результаты проверки генотипического равновесия Харди–Вайнберга на основе G-теста максимального правдоподобия показали, что в популяции кабана большинство локусов находилось в состоянии генотипического равновесия Харди–Вайнберга. Напротив, в популяциях различных пород свиней часть локусов демонстрирует достоверное отклонение от отмеченного равновесия. Кроме того, в популяциях йоркшир, крупная белая и ландрас присутствовали локусы, для которых достоверно отвергалась гипотеза о нейтральности на основании результатов теста Эвенса–Ваттерсона (Ewens–Watterson test). Обнаруженные приватные аллели, характерные для кабана и различных пород, в дальнейшем могут быть использованы для их идентификации. Ординация центроидов разных стад в пространстве первых двух главных координат на основании матрицы попарных оценок генетических дистанций M. Nei показала, что наиболее удаленные популяции – породы дюрок и кабан, а самые генетически близкие – йоркшир и ландрас. Ближе всех к популяции кабана была порода крупная белая. Оценка эффективной численности, проведенная с использованием метода, основанного на неравновесии по сцеплению (linkage disequilibrium) и МС-метода (the molecular coancestry method), продемонстрировала, что во всех изученных группах, включая и популяцию кабана, эффективный размер оказался меньше 100 особей. Низкое значение эффективного размера популяции кабана ($N_e = 21.8$, $N_{eb} = 4.0$), вероятно, является следствием падежа и отстрела животных из-за африканской чумы свиней (*Pestis africana suum*). Ключевые слова: кабан; породы свиней; микросателлитные локусы; генетическая структура; эффективная численность популяции.

Для цитирования: Снегин Э.А., Макеева В.М., Каледин А.П., Остапчук А.М., Алазтели И.Д., Смунов А.В. Генетическое разнообразие популяции центральноевропейского кабана (*Sus scrofa scrofa*) и пород домашних свиней (*Sus scrofa domesticus*) на основе микросателлитных локусов ДНК. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2021;25(8): 822-830. DOI 10.18699/VJ21.095

Genetic diversity of the Central European wild boar (*Sus scrofa scrofa*) population and domestic pig (*Sus scrofa domesticus*) breeds based on a microsatellite DNA locus

E.A. Snegin¹✉, V.M. Makeeva², A.P. Kaledin³, A.M. Ostapchuk³, I.D. Alazneli², A.V. Smurov²

¹ Belgorod National Research University, Belgorod, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia

✉ snegin@bsu.edu.ru

Abstract. The results of studies of the genetic structure of the Central European wild boar (*Sus scrofa scrofa*) population and four breeds of domestic pigs (Duroc, Yorkshire, Large White and Landrace) bred in the Central Black Earth region of Russia are presented in this work. Based on 12 microsatellite loci, a significant ($p < 0.05$) decrease in the level of genetic variability in bred breeds was shown. The expected heterozygosity and Shannon index were as fol-

lows: in the wild boar, $H_o = 0.763 \pm 0.026$, $I = 1.717 \pm 0.091$; in the Duroc breed, $H_o = 0.569 \pm 0.068$, $I = 1.191 \pm 0.157$; in the Landrace, $H_o = 0.618 \pm 0.062$, $I = 1.201 \pm 0.147$; in the Large White, $H_o = 0.680 \pm 0.029$, $I = 1.362 \pm 0.074$; and in the Yorkshire, $H_o = 0.642 \pm 0.065$, $I = 1.287 \pm 0.156$. The results of checking genotypic Hardy–Weinberg equilibrium based on the G-test of maximum likelihood demonstrated that the overwhelming majority of loci in the wild boar population were in the state of said equilibrium. By contrast, in pig breed populations, some loci demonstrated a significant deviation from the indicated equilibrium. In addition, the Yorkshire, Large White, and Landrace populations had loci, for which the hypothesis of neutrality was reliably rejected based on the results of the Ewens–Watterson test. The revealed private alleles, characteristic of the wild boar and breeds, can later be used to identify them. The ordination of the centroids of different herds in the space of the first two principal coordinates based on the matrix of pairwise estimates of Nei's genetic distances showed that the most distant populations are the Duroc and Boar breeds, and the most genetically close are the Yorkshire and Landrace breeds. The closest to the wild boar population was the Large White breed. The assessment of the effective size, carried out using the method based on the linkage disequilibrium and the molecular coancestry method, showed that in all studied groups, including the wild boar population, the effective size was less than 100 individuals. The low effective size of the wild boar population ($N_e = 21.8$, $N_{eb} = 4.0$) is probably caused by the death and shooting of animals due to *Pestis africana suum*.

Key words: wild boar; pig breeds; microsatellite loci; genetic structure; effective population size.

For citation: Snegin E.A., Makeeva V.M., Kaledin A.P., Ostapchuk A.M., Alazneli I.D., Smurov A.V. Genetic diversity of the Central European wild boar (*Sus scrofa scrofa*) population and domestic pig (*Sus scrofa domesticus*) breeds based on a microsatellite DNA locus. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(8): 822-830. DOI 10.18699/VJ21.095

Введение

Одомашнивание кабана началось, по разным оценкам, 7–9 тыс. лет назад. За это время создано более 730 пород этих животных. Очевидно, что за столь длительную «культурную» эволюцию различные породы, являясь так называемыми чистыми линиями, во многом утратили природный генетический потенциал, обеспечивающий гомеостатические механизмы. В результате поддержание стабильности существующих пород, как и любых искусственно созданных систем, требует значительных финансовых вложений. В связи с этим изучение генетического потенциала природных популяций кабанов для возможного повышения устойчивости пород свиней (например, методами генного редактирования и др.) весьма актуально.

Изучение генетики дикого кабана сейчас уделяется большое внимание как в России, так и за рубежом (Гладырь и др., 2009; Зиновьева и др., 2013; Rębała et al., 2016; Mihalik et al., 2020). Кроме того, из-за постоянных вспышек на территории России африканской чумы свиней (*Pestis africana suum*) регулярно осуществляется отстрел диких кабанов как потенциальных переносчиков данного заболевания. При этом не учитывается популяционная структура кабана, что может вызвать обеднение генофонда и на фоне все возрастающего антропогенного давления привести к вымиранию некоторых групп. Такие примеры хорошо известны, когда из-за пренебрежения данными о состоянии генофонда происходит значительное сокращение численности популяций промысловых видов (Алтухов, 2003).

В практике работы молекулярно-генетических лабораторий в криминалистическом аспекте часто возникает необходимость диагностировать образцы тканей незаконно добытых кабанов и доказывать их принадлежность к дикому виду, а не одомашненным формам свиней (Кипень и др., 2016; Lorenzini et al., 2020), или идентифицировать ткани кабана в продуктах питания (Szemethy et al., 2021). Поэтому выявление частных аллелей для природных популяций – также насущная проблема.

Весьма удобные маркеры для изучения генетических процессов в популяциях – микросателлитные локусы ДНК (STR-маркеры), представляющие собой тандемные повторы некодирующей части ядерной ДНК. Существует множество работ по оценке популяционных генофондов как домашних свиней, так и диких кабанов в различных регионах (Vernesi et al., 2003; Ferreira et al., 2009; Nikolov et al., 2009; da Silva et al., 2011; Choi et al., 2014; Sahoo et al., 2016; Рябцева и др., 2018; Han et al., 2021; Snegin et al., 2021).

Цель настоящей работы – оценить генетическое разнообразие микросателлитных локусов популяции центральноевропейского кабана (*Sus scrofa scrofa*) и наиболее распространенных пород свиней (*Sus scrofa domesticus*), разводимых в Центрально-Черноземном регионе России. Следует отметить, что ранее подобные исследования в указанном регионе не проводились.

Материалы и методы

В исследовании было задействовано 320 животных. Выборка из популяций кабанов в количестве 30 голов была произведена на территории Орловской области (районы: Корсаковский, Залегощенский, Новосильский, Покровский, Шаблыкинский). Кабаны были добыты в ходе охотничьего сезона в 2018 г. Для сравнения были использованы выборки из четырех популяций различных пород домашних свиней, разводимых в хозяйствах Центрально-Черноземного региона России: дюрок – 67 голов (Белгородская область), йоркшир – 108 (Курская область), ландрас – 50 (Белгородская область), крупная белая – 65 голов (Воронежская область). Все анализируемые животные относятся к породам канадской селекции.

В качестве ДНК-маркеров использовали 12 микросателлитных локусов, рекомендованных ISAG-FAO (International Society for Animal Genetics, Food and Agriculture Organization) (FAO SoW-AnGR..., 2006) и скомпонованных в одну мультиплексную панель (*S0101, S0155, S0228, S0355, S0386, SW24, SW240, SW72, SW857, SW911, SW936, SW951*) (табл. 1). Праймеры для ПЦР были подобраны с

Таблица 1. Характеристика микросателлитных локусов, рекомендованных ISAG для определения достоверности происхождения свиней

Локус	Длина аллелей, п. н.	Краситель	Праймеры (5'-----3')
S0101	193–221	R6G	F: GAATGCAAAGAGTTCAGTGTAGG R: GTCTCCCTCACACTTACCGCAG
S0155	142–166	TAMRA	F: TGTTCCTCTGTTTCTCCTCTGTTG R: AAAGTGAAAGAGTCAATGGCTAT
S0228	218–270	TAMRA	F: GGCATAGGCTGGCAGCAACA R: AGCCACCTCATCTTATCTACACT
S0355	223–277	FAM	F: TCTGGCTCCTACACTCCTTCTTGATG R: TTGGGTGGGTGCTGAAAAATAGGA
S0386	164–182	FAM	F: GAACTCCTGGGTCTTATTTCTA R: GTCAAAAATCTTTTATCTCCAACAGTAT
SW24	95–124	ROX	F: CTTTGGGTGGAGTGTGTGC R: ATCCAAATGCTGCAAGCG
SW240	92–124	R6G	F: AGAAATTAGTGCCTCAAATTGG R: AAACCATTAAGTCCCTAGCAAA
SW72	97–125	TAMRA	F: ATCAGAACAGTGCGCCGT R: TTTGAAAATGGGGTGTTC
SW857	137–161	R6G	F: TGAGAGGTCAGTTACAGAAGACC R: GATCCTCCTCCAATCCCAT
SW911	149–177	ROX	F: CTCAGTTCTTTGGGACTGAACC R: CATCTGTGGAAAAAAAAGCC
SW936	81–117	FAM	F: TCTGGAGCTAGCATAAGTGCC R: GTGCAAGTACACATGCAGGG
SW951	124–134	FAM	F: TTTCACAACCTGGCACCAG R: GATCGTGCCCAATGGAC

учетом проведения амплификации всех 12 локусов в одной пробирке. Размер всех амплифицируемых ПЦР-продуктов с учетом всех известных аллелей составил более 300 пар нуклеотидов.

Выделение ДНК у домашних свиней осуществляли из ушных выщипов, а у кабанов – из образцов мышечной ткани. Для этой цели использовали наборы с протеиназой К «ДНК-Экстран-2» (Синтол, Россия). ПЦР-реакцию проводили на амплификаторе Verity (Applied Biosystems, США) в 20 мкл смеси, содержащей 20 нг геномной ДНК, ПЦР-буфер (10 ммоль трис-НСl (рН 8.3), 50 ммоль КСl, 2 ммоль MgCl₂), 0.25 ммоль dNTP, 0.5 мкмоль праймера, 1 ед. Taq-ДНК-полимеразы (ингибированной для горячего старта).

Параметры ПЦР: 94 °С – 3 мин; (98 °С – 30 с, 59 °С – 120 с, 72 °С – 90 с) – 4 цикла; (94 °С – 30 с, 59 °С – 120 с, 72 °С – 90 с) – 6 циклов; (90 °С – 30 с, 59 °С – 120 с, 72 °С – 75 с) – 20 циклов; 68 °С – 30 мин. Скорость нагрева с 59 до 72 °С составляла не более 0.3 °С/1 с.

Фрагментный анализ ПЦР-продуктов проведен на автоматическом капиллярном ДНК-секвенаторе ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, США), при этом использовали капилляры длиной 50 см и полимерную матрицу POP-7™. Анализ размера фрагментов осуществляли с помощью программного обеспечения GeneMapper R Software v. 4.1 (Applied Biosystems).

Для статистической обработки полученных данных использовали программы GenAIEx v. 6.5 (Peakall, Smouse, 2006) и PopGene 1.32 (Yeh et al., 1999).

Результаты

Частоты аллелей микросателлитных локусов, взятых для анализа, представлены в табл. 2. Данные дают представление о распределении различных аллелей среди популяций домашних свиней и кабана.

Наличие приватных аллелей в различных популяциях продемонстрировано в табл. 3. Результаты показывают высокое содержание уникальных аллелей в популяции кабана (16 аллелей). Наибольшая частота приватных аллелей выявлена в локусах SW24 и SW72 (по 0.25 в каждом). При этом чаще других среди приватных аллелей встречается аллель 97 в локусе SW24, и аллель 99 – в локусе SW72. Немного уступают кабана по количеству приватных аллелей свиньи породы дюрок, при этом наибольшую частоту встречаемости имели аллели 105 и 111 в локусе SW936 (0.246 и 0.276 соответственно). Крупная белая порода почти в три раза уступает по количеству приватных аллелей популяции кабана и свиней породы дюрок. Однако некоторые из оригинальных аллелей встречаются в этой группе животных со значительной частотой. Например, уникальный для этой породы аллель 141 в локусе SW857 отмечен у половины проанализированных животных (час-

Таблица 2. Частоты аллелей микросателлитных локусов в популяциях различных пород свиней и кабана

Локус	Популяция					Локус	Популяция					Локус	Популяция				
S0101	1	2	3	4	5	S0386	1	2	3	4	5	SW72	1	2	3	4	5
193	0	0	0.169	0	0	164	0.022	0	0.008	0	0.017	119	0.500	0.361	0	0.250	0.017
195	0	0.055	0	0.090	0.017	166	0.045	0	0.054	0.140	0.133	121	0.097	0	0	0	0.050
197	0	0	0	0.020	0.150	168	0	0.231	0.015	0.060	0.150	123	0.052	0	0	2	0
199	0	0.097	0	0.030	0.017	170	0.007	0	0.131	0.090	10	SW857	1	2	3	4	5
201	0	0.028	0	0	0.083	172	0.060	0.014	0.023	0	0.117	137	0.007	0	0	0	0
203	0	0	0	0	0.050	174	0.112	0.14	0	0.010	0.017	141	0	0	0.500	0	0
205	0.007	0	0.015	0	0	176	0.015	0	0.215	0	0.033	143	0	0	0.008	0	0
207	0	0.319	0.008	0.310	0.317	178	0.022	0.630	0.346	0.630	10	147	0.007	0	0	0	0
209	0	0.241	0.061	0.280	0.200	180	0.649	0.083	0.208	0.040	0.017	149	0	0	0.231	0	0.317
211	0.851	0.014	0.746	0.210	0.100	182	0.067	0.028	0	0.030	11	151	0	0.352	0.100	0.370	0.150
213	0.142	0.176	0	0.060	0	SW24	1	2	3	4	5	153	0.052	0.194	0.077	0	0.333
215	0	0.069	0	0	2	95	0	0	0	0	0.050	155	0.627	0.014	0	0	0.050
217	0	0	0	0	2	97	0	0	0	0	0.183	157	0	0.241	0.054	0.470	0.067
S0155	1	2	3	4	5	99	0	0	0	0	0.017	159	0.298	0.143	0.031	0.160	0.083
144	0.015	0	0	0	0	101	0.037	0	0	0	0.017	161	0.007	0.056	0	0	0
146	0.022	6	0.061	0	0.433	105	0	0	0.046	0.410	0.050	SW911	1	2	3	4	5
148	0.007	0.352	0.008	0.250	0.117	107	0	0.245	0	0	0.050	149	0	0	0.046	0	0.017
150	0	0	0	0	0.017	109	0.455	0.157	0	0	0.050	151	0.007	0	0	0	0
152	0.007	0	0	0	0	111	0	0	0.261	0.010	0.017	153	0.022	3	0	0	0
154	0	0	0	0	0.133	113	0	0.018	0.046	0	0	155	0	0	0.208	0	0
156	0.589	0	0.208	0	0.017	115	0.134	0.111	0.069	0.150	0.067	157	0.187	0.217	0.100	0.350	0
158	0	0.264	0.346	0.420	0.100	117	0	0.060	0.354	0.310	0.267	159	0	0	0.485	0	0.200
160	0.022	0.356	0.223	0.330	0.083	119	0.052	0.380	0.215	0.070	0.067	161	0	0.444	0.054	0.430	0.117
162	0.328	0	0.154	0	0.083	121	0.216	0.028	0.008	0.030	0.133	163	0.537	0	0.008	0	0.117
164	0.007	0	0	0	0	123	0.097	0	0	0.020	0.033	165	0	0	0.015	0	0.333
166	0	0	0	0	0.017	125	0.007	0	0	0	0	167	0	0.264	0.085	0.130	0.017
S0228	1	2	3	4	5	SW240	1	2	3	4	5	SW911	1	2	3	4	5
220	0.015	0.236	0.008	0.240	0	93	0	0.305	0	0	0	169	0.119	0.060	0	0.090	11
222	0.134	0.278	0	0.060	0.017	97	0.007	0	0.231	0	0.017	171	0.112	0	0	0	0.017
224	0.157	0.018	0	0.040	0	99	0	0	0.008	0	0.367	177	0.015	0	0	0	0
226	0	0	0.061	0.030	0	101	0.060	0	0.185	0	0.033	SW936	1	2	3	4	5
228	0	0.056	0.023	0.050	0.433	103	0.082	0	0	0	0.017	85	0	0	0	0.500	0.033
230	0.037	0	0	0.020	0.017	105	0.254	0	0.200	0	0	87	0.015	0.500	0	0	0
232	0.022	0.014	0	0.090	0.017	107	0.164	0	0	0.030	0	91	0	0	0	0.500	0.383
234	0.022	0.167	0	0.330	0	109	0.246	0.046	0	0.120	0	93	0	0.500	0.346	0	0.150
236	0.007	0.060	0	0.040	0.267	111	0	0.028	0	0.030	0	95	0	0	0.254	0	0
238	0	0.028	0.061	0.010	0.050	113	0	0.018	0.315	0	0.233	97	0	0	0	0	0.150
240	0.007	0.055	0.015	0.010	0.033	115	0	0.055	0	0	0.133	99	0	0	0	0	0.050
242	0	0.028	0.015	0.020	0.083	117	0.030	0.088	0.054	0.430	0	101	0	0	0	0	0.017
244	0	0	0.515	0.020	0.050	119	0.127	0.296	0	0	0	103	0.007	0	0	0	0.033
246	0.366	0.032	0.031	0	0	121	0.015	0.162	0.008	0.390	0.033	105	0.246	0	0	0	0
248	0.231	0.028	0.269	0.040	0.033	123	0.015	0	0	0	0.167	107	0.022	0	0.231	0	0.183
S0355	1	2	3	4	5	SW72	1	2	3	4	5	109	0.045	0	5	0	0
243	0	0	0.415	0	0.667	99	0	0	0	0	0.233	111	0.276	0	0	0	0
245	0	0.125	0	0.110	0.083	101	0.015	0	0	0	0.033	113	0.246	0	0.061	0	0
247	1.0	0	0.300	0	0	103	0	0	0	0	0.017	115	0.097	0	0.069	0	0
249	0	0.088	0	0.190	0	105	0	0	0.162	0.420	0.133	117	0.045	0	0	0	0
255	0	0	0	0	0.033	107	0	0.245	0.115	0	0.017	SW951	1	2	3	4	5
259	0	0.301	0	0.210	0.100	109	0.298	0.171	0	0	0.050	126	0.134	0	0.154	0	0.383
261	0	0	0	0	0.050	111	0.007	0	0	0	0	128	0.045	1.0	0.246	1.0	0.200
269	0	0	0	0	0.067	113	0.015	0	0.531	0	0.133	130	0.619	0	0.054	0	0.067
271	0	0	0.285	0.160	0	115	0	0.181	0.192	0.220	0.150	132	0.134	0	0.546	0	0.350
273	0	0.486	0	0.330	0	117	0.015	0.042	0	0.090	0.167	134	0.067	0	0	0	0

Примечание. Популяции: 1 – дюрк; 2 – йоркшир; 3 – крупная белая; 4 – ландрас; 5 – кабан.

Таблица 3. Приватные аллели в исследуемых популяциях различных пород свиней и кабана

Популяция	Локусы									
	S0101	S0155	S0355	SW24	SW240	SW72	SW857	SW911	SW936	SW951
Дюрок	144, 152, 164			125		111	137, 147	151, 177	105, 111, 117	134
Йоркшир	93									
Крупная белая	193						141, 143	155	95	
Кабан	203, 217	150, 154, 166	255, 261, 269	95, 97, 99		99, 103			97, 99, 101	

Примечание. В популяции свиней породы ландрас приватных аллелей не обнаружено.

Таблица 4. Генетическое разнообразие в исследуемых группах свиней и кабана (Mean ± SE)

Популяция	N	P, %	Aa	Ae	I	Ho	He	F	N _{pa}
Дюрок	67	91.7	6.917±0.802	2.913±0.396	1.191±0.157	0.525±0.079	0.569±0.068	0.076±0.076	1.083±0.336
Йоркшир	108	91.7	5.667±0.847	3.452±0.384	1.287±0.156	0.716±0.086	0.642±0.065	-0.128±0.104	0.083±0.083
Крупная белая	65	100.0	6.167±0.534	3.350±0.241	1.362±0.074	0.660±0.060	0.680±0.029	0.022±0.075	0.417±0.193
Ландрас	50	91.7	5.250±0.978	3.124±0.336	1.201±0.147	0.713±0.081	0.618±0.062	-0.175±0.101	0.000
Кабан	30	100.0	8.583±0.712	4.702±0.444	1.717±0.091	0.844±0.038	0.763±0.026	-0.106±0.033	1.333±0.414

Примечание. N – число особей в выборке; P – процент полиморфных локусов; Aa – среднее число аллелей; Ae – эффективное число аллелей; I – индекс Шеннона; Ho – наблюдаемая гетерозиготность; He – ожидаемая гетерозиготность; F – коэффициент инбридинга; N_{pa} – среднее число приватных аллелей на локус; Mean ± SE – среднее ± ошибка среднего.

Таблица 5. Результаты проверки генотипического равновесия Харди–Вайнберга для 12 микросателлитных локусов ДНК в стадах свиней разных пород и кабана на основе G-теста максимального правдоподобия (likelihood ratio G-test)

Локус	Популяция				
	Дюрок	Йоркшир	Крупная белая	Ландрас	Кабан
S0101	ns	< 0.001	ns	ns	ns
S0155	ns	ns	ns	0.019	ns
S0228	0.014	< 0.001	ns	ns	ns
S0355	mono	ns	ns	< 0.001	ns
S0386	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	ns
SW24	ns	< 0.001	< 0.001	0.004	ns
SW240	ns	< 0.001	< 0.001	< 0.001	ns
SW72	ns	< 0.001	ns	0.001	ns
SW857	ns	< 0.001	ns	< 0.001	ns
SW911	ns	< 0.001	ns	0.032	ns
SW936	ns	< 0.001	0.014	< 0.001	0.002
SW951	< 0.001	mono	0.017	mono	< 0.001

Примечание. ns – соответствие равновесию Харди–Вайнберга, $p > 0.05$; mono – мономорфный локус.

тота 0.5). В популяции ландрас приватных аллелей не обнаружено и один приватный аллель отмечен в популяции йоркшир.

Популяция кабана имеет достоверно высокие значения показателей генетической изменчивости по сравнению с породами свиней. Сопоставление осуществлялось с помощью критерия χ^2 Пирсона ($p < 0.05$) (табл. 4).

Уровень инбридинга (F) в изучаемых группах оказался невысоким, а в популяциях кабана, а также свиней пород

йоркшир, ландрас он получил отрицательное значение из-за преобладания фактической гетерозиготности над теоретически ожидаемой (см. табл. 4).

Результаты проверки генотипического равновесия Харди–Вайнберга на основе G-теста максимального правдоподобия демонстрируют, что в популяции кабана большинство локусов находилось в состоянии генотипического равновесия Харди–Вайнберга (табл. 5). Напротив, в популяциях различных пород свиней часть локусов по-

Таблица 6. Результаты теста на нейтральность

Эвенса–Ваттерсона для 12 локусов микросателлитной ДНК для различных пород свиней и кабана (приведены только локусы, для которых гипотеза о нейтральности достоверно отклоняется)

Популяция	Локус	Obs. F	L95–U95
Йоркшир	S0155	0.321	0.332–0.906
	SW72	0.254	0.282–0.893
	SW936	0.500	0.502–0.991
Крупная белая	S0355	0.344	0.367–0.970
	S0155	0.348	0.371–0.961
	S0355	0.227	0.267–0.831
Ландрас	S0355	0.227	0.267–0.831
	SW936	0.500	0.503–0.980

Примечание. Obs. F – фактическая сумма квадратов частот аллелей; L95, U95 – нижнее и верхнее значения 95 % доверительного интервала оценки Obs. F, рассчитанные на основании 1000 симуляций.

казывают достоверное отклонение от указанного равновесия. Кроме того, в трех группах (дюрок, йоркшир и ландрас) отмечены мономорфные локусы. В популяциях йоркшир, крупная белая и ландрас также присутствовали микросателлитные локусы, для которых гипотеза о нейтральности достоверно отклонялась на основании результатов теста Эвенса–Ваттерсона (Ewens, 1972; Watterson, 1978) (табл. 6). Больше всего таких локусов отмечено в породе йоркшир и ландрас.

Степень подобия генетической структуры свиней была оценена с использованием анализа главных координат, результатом которого стала ординация центроидов разных стад в пространстве первых двух главных координат на основании матрицы попарных оценок генетических дистанций M. Nei (табл. 7, см. рисунок). Согласно полученным данным, наиболее удаленными оказались популяции породы дюрок и кабана, а самыми генетически близкими – породы йоркшир и ландрас. Ближе всех к популяции кабана была порода крупная белая.

Оценка эффективной численности была проведена с использованием метода, основанного на неравновесии по сцеплению (linkage disequilibrium, LD) (Hill 1981; Waples, 2006; Waples, Do, 2010), а также МС-метода (the molecular coancestry method) (Nomura, 2008). Расчеты выполнены с помощью программы NeEstimator V2 (Do et al., 2014). Результаты приведены в табл. 8.

Обсуждение

Достоверно высокие показатели генетической изменчивости ($p < 0.05$), отмеченные в популяции кабана, – вполне ожидаемое явление, несмотря на то, что выборка из проанализированной группы была меньше выборки из стад домашних свиней. Это наглядно демонстрирует последствия панмиксии и генетико-автоматических процессов, которые в сочетании с естественным отбором формируют генофонды природных популяций. Причем в анализируемой нами популяции кабана уровень фак-

Таблица 7. Значения генетических расстояний (по M. Nei) между исследуемыми группами свиней и кабана

Популяция	Дюрок	Йоркшир	Крупная белая	Ландрас	Кабан
Дюрок	0.000				
Йоркшир	1.831	0.000			
Крупная белая	0.988	1.209	0.000		
Ландрас	1.976	0.318	1.087	0.000	
Кабан	1.803	1.091	0.707	0.968	0.000



Ординация центроидов на основании матрицы попарных оценок генетических дистанций M. Nei на основе распределения частот аллелей 12 локусов МС-ДНК.

Таблица 8. Оценки эффективной численности популяции (N_e , N_{eb}) для стад различных пород свиней, рассчитанные на основе LD- и МС-метода с использованием 12 локусов МС-ДНК

Популяция	LD-метод		МС-метод	
	N_e	95 % CI	N_{eb}	95 % CI
Дюрок	86.1	54.9–164.2	19.4	2.3–54.0
Йоркшир	7.4	5.9–8.9	7.6	4.3–11.7
Крупная белая	44.6	34.0–60.9	15.5	6.7–28.0
Ландрас	9.0	6.6–11.8	2.1	1.3–3.5
Кабан	21.8	17.1–28.9	4.0	2.7–5.6

Примечание. 95 % CI – границы 95 % доверительного интервала.

тической гетерозиготности был достоверно выше, чем в популяциях этого животного как в Европе, так и в Азии. При этом орловская группа по уровню генетического разнообразия была сходной с китайскими и вьетнамскими популяциями кабана (табл. 9).

Напротив, переход ряда локусов в мономорфное состояние и отсутствие равновесия по Харди–Вайнбергу, отмеченное нами по большинству локусов у пород домашних свиней, – следствие длительной искусственной селекционной работы, в результате которой были утраче-

Таблица 9. Уровень фактической гетерозиготности (H_o) по микросателлитным маркерам в различных популяциях кабана

Страна	H_o	Литературный источник	Страна	H_o	Литературный источник
Португалия	0.627	Ferreira et al., 2009	Япония	0.473	Choi et al., 2014
Южная Корея	0.682	Han et al., 2021	Индонезия	0.658	
	0.422–0.673	Choi et al., 2014	Россия		
Болгария	0.620	Nikolov et al., 2009	Приморский край	0.710	Choi et al., 2014
Германия	0.460		Кировская область	0.463	Гладырь и др., 2009
Италия	0.520-0.720	Vernesi et al., 2003	Ярославская область	0.535	
Венгрия	0.750		Оренбургская область	0.722	
Китай	0.845	Choi et al., 2014	Краснодарский край	0.614	
Вьетнам	0.859		Хабаровский край	0.670	

ны многие аллели «дикого» типа, что привело к потере генетического разнообразия. Об этом же свидетельствует достоверное отклонение от нейтральности некоторых микросателлитных локусов в породах ландрас, йоркшир и крупная белая, которое было нами установлено с помощью теста Эвенса–Ваттерсона (см. табл. 6).

Следствием аллельного разнообразия является большое количество частных аллелей, отмечаемое в популяции кабана. Вместе с тем популяция свиней породы дюрок, несмотря на большое число частных аллелей, была самой мономорфной среди изученных групп. Вероятно, это свидетельствует о длительной селекции данной породы красной масти в условиях Северо-Американского континента, изолированной от скрещивания с другими породами свиней, включая породы белой масти европейского происхождения (крупная белая, йоркшир и ландрас). Этим можно объяснить значительную генетическую дистанцию породы дюрок как от кабана, так и от европейских пород свиней. Возможно, наличие оригинальных аллелей в исследуемых популяциях в дальнейшем можно будет использовать для диагностики как породной принадлежности свиней, так и принадлежности к популяции дикого кабана.

Нужно отметить, что наши результаты отчасти согласуются с данными, полученными в работе Е.А. Гладырь с коллегами (2009). В их исследовании уровень фактической гетерозиготности в трех популяциях кабана из пяти оказался выше, чем у домашних свиней. Однако среднее число эффективных аллелей было одинаковым ($A_e = 2.6$). По числу частных аллелей популяция кабана также превзошла домашних свиней (21 против 10 соответственно).

Расчет эффективной численности на основе LD-метода выявил, что почти во всех изученных группах, включая и популяцию кабана, эффективный размер был меньше 50 особей. Исключение составила только порода дюрок ($N_e = 86.1$). Данные свидетельствуют о наблюдаемом неравновесии по сцеплению, которое вызвано, вероятно, близкородственным скрещиванием в анализируемых группах домашних свиней. Такой генетический дрейф породил неслучайную ассоциацию между аллелями в разных локусах.

Расчеты, проведенные с помощью МС-метода, показали еще меньшие значения. Это, вероятнее всего, связано с малым количеством родительских особей (в первую очередь, самцов), которые являются основателями исследуемых популяций. Следует отметить, что аналогичная картина была в работе по оценке эффективного размера популяции породы свиней *Gochu Asturcelta*, находящейся под угрозой исчезновения (Menendez et al., 2016).

Если в отношении пород домашних свиней результаты были сопоставимыми с данными, полученными в других работах, где N_e в целом варьировала от 20 до 92 голов (Šveistienė, Razmaitė, 2013; Krupa et al., 2015; Zanella et al., 2016; Lugovoy et al., 2018), то в отношении популяции кабана результат оказался несколько неожиданным, так как в проведенных ранее исследованиях эффективная численность (N_e) природных популяций находилась в диапазоне от 180 до 1477 голов (Cowled et al., 2008; Herero-Medrano et al., 2013).

Такое низкое значение N_e , отмеченное в популяции кабана Орловской области, можно отчасти объяснить небольшой выборкой, однако возможны и другие более серьезные причины. В частности, известно, что на территории Центрально-Черноземного региона, куда входит указанная область, довольно часто фиксируют вспышки африканской чумы свиней (*Pestis africana suum*) (<https://www.kommersant.ru/doc/4236233>), вследствие чего происходит падёж кабанов. Кроме того, для недопущения распространения инфекции охотничьи хозяйства вынуждены производить отстрел значительной части животных. Вероятно, эти факторы сказываются на эффективном размере популяций дикого кабана.

Заключение

Таким образом, на основании проведенных исследований продемонстрировано сокращение генетического разнообразия пород домашних свиней по сравнению с природной популяцией кабана. Наличие частных аллелей может в дальнейшем помочь в идентификации кабана и разных пород свиней. Низкие значения эффективной численности исследуемых групп требуют внимания со стороны селекционеров в отношении разводимых пород свиней.

В частности, свиноводческим компаниям исследуемого региона необходимо использовать большее количество производителей (в первую очередь самцов) для получения ремонтного поголовья. В отношении популяций кабана профилактический отстрел и промысловая нагрузка должны осуществляться под контролем природоохранных органов с обязательным мониторингом состояния популяционных генофондов.

Список литературы / References

- Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. М.: Академкнига, 2003.
[Altukhov Yu.P. Genetic Processes in Populations. Moscow: Akademkniga Publ., 2003. (in Russian)]
- Гладырь Е.А., Эрнст Л.К., Костюнина О.В. Изучение генома свиней (*Sus scrofa*) с использованием ДНК-маркеров. *С.-х. биология*. 2009;2:16-26.
[Gladyr E.A., Ernst L.K., Kostyunina O.V. Study of *Sus scrofa* genome with the use of DNA-markers. *Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2009;2:16-26. (in Russian)]
- Зиновьева Н.А., Костюнина О.В., Экономов А.В., Шевнина М.С., Домский И.А., Гладырь Е.А., Брем Г. Полиморфизм генов, ассоциированных с локусами количественных признаков, у кабана (*Sus scrofa* L. 1758), обитающего на территории России. *С.-х. биология*. 2013;2:77-82. DOI 10.15389/agrobiol.2013.2.77rus [Zinovieva N.A., Kostyunina O.V., Ekonomov A.V., Shevnina M.S., Domskey I.A., Gladyr E.A., Brem G. Polymorphism of genes associated with the quantitative trait loci in wild boar (*Sus scrofa* L., 1758) in Russia. *Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2013;2:77-82. DOI 10.15389/agrobiol.2013.2.77rus (in Russian)]
- Кипень В.Н., Рябцева А.О., Котова С.А., Цыбовский И.С. Современные подходы к дифференциации кабана европейского (*Sus scrofa scrofa*) и его домашней разновидности (*Sus scrofa domesticus*) с использованием молекулярно-генетических методов. *Вопр. криминологии, криминалистики и судебной экспертизы*. 2016;2(40):127-134.
[Kipen V.N., Ryabtseva A.O., Kotova S.A., Tsybovskiy I.S. Modern approaches to the differentiation of the European wild boar (*Sus scrofa scrofa*) and its domestic variety (*Sus scrofa domesticus*) using molecular genetic methods. *Voprosy Kriminologii, Kriminalistiki i Sudebnoy Ekspertizy = Questions of Criminology, Forensic Science and Forensic Examination*. 2016; 2(40):127-134. (in Russian)]
- Рябцева А.О., Цыбовский И.С., Котова С.А. Микросателлитные маркеры в исследовании полиморфизма дикого кабана (*Sus scrofa*) и свиньи домашней (*Sus scrofa domesticus*), обитающих на территории Республики Беларусь. *Молекуляр. и прикл. генетика*. 2018;25:56-66.
[Ryabtseva A.O., Tsybovskiy I.S., Kotova S.A. Microsatellite markers in the study of polymorphism of wild boar (*Sus scrofa*) and domestic pig (*Sus scrofa domesticus*) inhabiting the territory of the Republic of Belarus. *Molekulyarnaya i Prikladnaya Genetika = Molecular and Applied Genetics*. 2018;25:56-66. (in Russian)]
- Choi S.K., Lee J.-E., Kim Y.-J., Min M.-S., Voloshina I., Myslenkov A., Oh J.G., Kim T.-H., Markov N., Seryodkin I., Ishiguro N., Yu L., Zhang Y.-P., Lee H., Kim K.S. Genetic structure of wild boar (*Sus scrofa*) populations from East Asia based on microsatellite loci analyses. *BMC Genet*. 2014;15:85. DOI 10.1186/1471-2156-15-85.
- Cowled B.D., Aldenhoven J., Odeh I.O.A., Garrett T., Moran Ch., Lapidge S.J. Feral pig population structuring in the rangelands of eastern Australia: applications for designing adaptive management units. *Cons. Genet*. 2008;9:211-224. DOI 10.1007/s10592-007-9331-1.
- Do C., Waples R.S., Peel D., Macbeth G.M., Tillett B.J., Ovenden J.R. NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (*N_e*) from genetic data. *Mol. Ecol. Resour*. 2014;14(1):209-214. DOI 10.1111/1755-0998.12157.
- Ewens W. The sampling theory of selectively neutral alleles. *Theor. Popul. Biol*. 1972;3:87-112.
- FAO SoW-AnGR. The State of the World's Animal Genetic Resources. Rome, 2006.
- Ferreira E., Souto L., Soares A.M.V.M., Fonseca C. Genetic structure of the wild boar population in Portugal: Evidence of a recent bottleneck. *Mamm. Biol*. 2009;74:274-285. DOI 10.1016/j.mambio.2008.05.009.
- Han S.W., Park H.Ch., Kim J.H., Suh J.H., Lee H., Min M.S. Population genetic structure of wild boar and dispersal performance based on kinship analysis in the Northern Region of South Korea. *Research Square*. 2021. DOI 10.21203/rs.3.rs-368091/v1.
- Herrero-Medrano J.M., Megens H.J., Groenen M.A.M., Ramis G., Bosse M., Perez-Enciso M., Crooijmans R.P. Conservation genomic analysis of domestic and wild pig populations from the Iberian Peninsula. *BMC Genet*. 2013;14(1):106. DOI 10.1186/1471-2156-14-106.
- Hill W.G. Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. *Genet. Res*. 1981;38(3):209-216.
- Krupa E., Žáková E., Krupová Z. Evaluation of inbreeding and genetic variability of five pig breeds in Czech Republic. *Asian-Australas. J. Anim. Sci*. 2015;28(1):25-36. DOI 10.5713/ajas.14.0251.
- Lorenzini R., Fanelli R., Tancredi F., Siclari A., Garofalo L. Matching STR and SNP genotyping to discriminate between wild boar, domestic pigs and their recent hybrids for forensic purposes. *Sci. Rep*. 2020;10:3188. DOI 10.1038/s41598-020-59644-6.
- Lugovoy S.I., Kharzinova V.R., Kramarenko S.S., Lykhach A.V., Kramarenko A.S., Lykhach V.Ya. Genetic polymorphism of microsatellite loci and their association with reproductive traits in Ukrainian meat breed pigs. *Cytol. Genet*. 2018;52(5):360-367. DOI 10.3103/S0095452718050079.
- Menendez J., Alvarez I., Fernandez I., Menendez-Arias N.A., Goyache F. Assessing performance of single-sample molecular genetic methods to estimate effective population size: empirical evidence from the endangered Gochu Asturcelta pig breed. *Ecol. Evol*. 2016;6(14):4971-4980. DOI 10.1002/ece3.2240.
- Mihalik B., Frank K., Astuti P.K., Szemethy D., Szendrei L., Szemethy L., Kusza S., Stéger V. Population genetic structure of the wild boar (*Sus scrofa*) in the Carpathian Basin. *Genes*. 2020;11:1194. DOI 10.3390/genes11101194.
- Nikolov I.S., Gum B., Markov G., Kuehn R. Population genetic structure of wild boar *Sus scrofa* in Bulgaria as revealed by microsatellite analysis. *Acta Theriol*. 2009;54(3):193-205. DOI 10.4098/j.at.0001-7051.049.2008.
- Nomura T. Estimation of effective number of breeders from molecular coancestry of single cohort sample. *Evol. Appl*. 2008;1(3):462-474. DOI 10.1111/j.1752-4571.2008.00015.x.
- Peakall R., Smouse P.E. GenA1Ex V6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes*. 2006;6(1):288-295.
- Rębała K., Rabtsava A.A., Kotova S.A., Kipen V.N., Zhurina N.V., Gandzha A.I., Tsybovsky I.S. STR profiling for discrimination between wild and domestic swine specimens and between main breeds of domestic pigs reared in Belarus. *PLoS One*. 2016;11(11):e0166563. DOI 10.1371/journal.pone.0166563.
- Sahoo N.R., Naskar S., Banik S., Pankaj P.K. Microsatellite based diversity analysis of native pigs of North-Eastern India. *Indian J. Anim. Res*. 2016;50(6):831-838. DOI 10.18805/ijar.7086.
- Silva P.V.C., Lui J.F., Band G.O., Regitano L.C.A., Grossi S.F., Soltero B.P., Nunes C.S. Genetic variability among the wild boars (*Sus scrofa scrofa*), crossbred animals and pigs using microsatellite markers (STRs). *Braz. Arch. Biol. Technol*. 2011;54(2):301-306.
- Snegin E.A., Kramarenko A.S., Artemchuk O.Y., Kramarenko S.S. Intra- and interbreed genetic heterogeneity and divergence in four commercial pig breeds based on microsatellite markers. *Regul. Mech. Biosyst*. 2021;12(1):128-135. DOI 10.15421/022120.

- Szemethy D., Mihalik B., Frank K., Nagy T., Újváry D., Kusza S., Szemethy L., Barta E., Stéger V. Development of wild boar species-specific DNA markers for a potential quality control and traceability method in meat products. *Food Anal. Methods*. 2021;14:18-27. DOI 10.1007/s12161-020-01840-1.
- Šveistienė R., Razmaitė V. Animal genetic resources in Lithuania. *Slovak J. Anim. Sci.* 2013;46(4):131-136.
- Vernesi C., Crestanello B., Pecchioli E., Tartari D., Caramelli D., Hauffe H., Bertorelle G. The genetic impact of demographic decline and reintroduction in the wild boar (*Sus scrofa*): a microsatellite analysis. *Mol. Ecol.* 2003;12(3):585-595. DOI 10.1046/j.1365-294x.2003.01763.x.
- Waples R.S. A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci. *Conserv. Genet.* 2006;7(2):167-184. DOI 10.1007/s10592-005-9100-y.
- Waples R.S., Do C. Linkage disequilibrium estimates of contemporary N_e using highly variable genetic markers: a largely untapped resource for applied conservation and evolution. *Evol. Appl.* 2010; 3(3):244-262. DOI 10.1111/j.1752-4571.2009.00104.x.
- Watterson G. The homozygosity test of neutrality. *Genetics*. 1978;88: 405-417.
- Yeh F.C., Yang R., Boyle T. POPGENE Version 1.32: Microsoft Window-Based Freeware for Population Genetic Analysis. Edmonton: University of Alberta, Center of International Forestry Research, 1999.
- Zanella R., Peixoto J.O., Cardoso F.F., Cardoso L.L., Biegelmeier P., Cantao M.E., Otaviano A., Freitas M.S., Caetano A.R., Ledur M.C. Genetic diversity analysis of two commercial breeds of pigs using genomic and pedigree data. *Genet. Sel. Evol.* 2016;48(24). DOI 10.1186/s12711-016-0203-3.

ORCID ID

E.A. Snegin orcid.org/0000-0002-7574-6910
V.M. Makeeva orcid.org/0000-0002-4360-5371
A.P. Kaledin orcid.org/0000-0002-1769-5043
A.M. Ostapchuk orcid.org/0000-0002-9202-8611
I.D. Alazneli orcid.org/0000-0001-9305-8030
A.V. Smurov orcid.org/0000-0001-5143-1634

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 21.03.2021. После доработки 18.09.2021. Принята к публикации 27.09.2021.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Оценка генетического разнообразия и филогенетических отношений черно-пестрого скота Новосибирской области с использованием микросателлитных маркеров

Р.Б. Айтназаров, Т.М. Мишакова, Н.С. Юдин 

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
 yudin@bionet.nsc.ru

Аннотация. В настоящее время известно более 1000 аборигенных пород крупного рогатого скота, которые хорошо приспособлены к местным условиям среды благодаря длительной адаптации и селекции. Крайне актуально выявление генетических вариантов, контролирующих адаптацию местного скота, для переноса этих вариантов в геномы высокопродуктивных глобальных пород. Исследования отдельных популяций внутри одной породы с помощью микросателлитных маркеров позволяют оценить их генетическое разнообразие, родственные взаимоотношения и перспективы их использования для улучшения породы. Черно-пестрая порода – наиболее массовая порода крупного рогатого скота молочного направления на территории России. Однако имеются лишь единичные работы, посвященные изучению генетического разнообразия местных популяций этой породы в отдельных областях России. Целью работы являются: анализ генетического разнообразия популяций черно-пестрого скота Новосибирской области и их сравнение с другими российскими популяциями; идентификация популяций, существенно отличающихся от всех остальных, для их дальнейшего использования в программах по сохранению генетического разнообразия отечественной черно-пестрой породы. Образцы ДНК от 4788 животных черно-пестрой породы из шести племенных хозяйств Новосибирской области были исследованы по 11 микросателлитным маркерам. Значения всех показателей генетической изменчивости достоверно не различались между отдельными популяциями. Приватные аллели были обнаружены в пяти популяциях из шести. В пяти популяциях коэффициент инбридинга F_{IS} был достоверно ниже нуля, что говорит об избытке гетерозигот. Результаты теста распределения по популяциям, анализа методом главных компонент, анализа показателей F_{ST} и D_{EST} , а также кластерного и филогенетического анализов свидетельствуют о генетической обособленности двух популяций от всех остальных. Таким образом, параметры генетического разнообразия исследованных нами шести популяций черно-пестрого скота Новосибирской области существенно не отличаются от других российских популяций данной породы. В большинстве этих хозяйств наблюдается избыток гетерозигот, что говорит о низкой степени инбридинга. При разработке мероприятий, направленных на сохранение генетического разнообразия отечественного черно-пестрого скота, мы рекомендуем использовать животных из двух популяций, которые по генетическим характеристикам существенно отличаются от других. Ключевые слова: крупный рогатый скот; черно-пестрая порода; Новосибирская область; микросателлит; генетическое разнообразие; сохранение биоразнообразия.

Для цитирования: Айтназаров Р.Б., Мишакова Т.М., Юдин Н.С. Оценка генетического разнообразия и филогенетических отношений черно-пестрого скота Новосибирской области с использованием микросателлитных маркеров. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(8):831-838. DOI 10.18699/VJ21.096

Assessment of genetic diversity and phylogenetic relationships in Black Pied cattle in the Novosibirsk Region using microsatellite markers

R.B. Aitnazarov, T.M. Mishakova, N.S. Yudin 

Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
 yudin@bionet.nsc.ru

Abstract. There are currently over a thousand indigenous cattle breeds well adapted to local habitat conditions thanks to their long history of evolution and breeding. Identification of the genetic variations controlling the adaptation of local cattle breeds for their further introduction into the genome of highly productive global breeds is a matter of great relevance. Studying individual populations of the same breed with the use of microsatellite markers makes it possible to assess their genetic diversity, relationships, and breed improvement potential. Although the Black Pied breed is the most common dairy cattle breed in Russia, there are only a few studies on genetic diversity in local Black Pied populations in some Russian regions. The goal of the present study was to analyze the genetic diversity in Black Pied cattle populations in the Novosibirsk Region and compare them with other Russian populations; to identify significantly di-

vergent populations with a view to preserving them under the programs aimed at maintaining the genetic diversity of the domestic Black Pied breed. DNA samples from 4788 animals of the Black Pied breed from six breeding enterprises in the Novosibirsk Region have been studied using 11 microsatellite markers. No significant differences in genetic variability parameters were found between individual populations. Private alleles have been identified in five out of six populations. Five populations have shown inbreeding coefficient values (F_{IS}) below zero, which indicates heterozygosity excess. The population distribution test, principal component analysis, F_{ST} and D_{EST} values, cluster analysis, and phylogenetic analysis have revealed two populations genetically distinct from the others. Essentially, the genetic diversity parameters of the six studied Black Pied cattle populations from the Novosibirsk Region show no significant differences from other Russian populations of the breed. Excess heterozygosity is observed in most breeding enterprises, which is a sign of a low inbreeding rate. To maintain the genetic diversity of the Russian Black Pied cattle, we recommend focusing on the two populations with significant genetic distinctions from the others.

Key words: cattle; Black Pied breed; Novosibirsk Region; microsatellite; genetic diversity; diversity preservation.

For citation: Aitnazarov R.B., Mishakova T.M., Yudin N.S. Assessment of genetic diversity and phylogenetic relationships in Black Pied cattle in the Novosibirsk Region using microsatellite markers. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(8):831-838. DOI 10.18699/VJ21.096

Введение

Известно более 1000 аборигенных пород крупного рогатого скота, хорошо приспособленных к условиям окружающей среды благодаря длительной адаптации и селекции (Buchanan, Lenstra, 2015). Эти породы имеют большую экономическую, научную и культурно-историческую ценность (Столповский, Захаров-Гезехус, 2017). При этом во всем мире активно идет экономически обусловленный процесс вытеснения локальных пород и замещения их несколькими высокопродуктивными глобальными породами (Столповский, 2013). Однако, как правило, эти породы плохо адаптируются к местным условиям обитания и не показывают в полной мере своих выдающихся свойств (Мохов, Шабалина, 2011). Поэтому крайне актуально выявление генетических вариантов, которые контролируют адаптацию местных пород к их среде обитания, для переноса их в геномы высокопроизводительных пород (Madan, 2005). Это позволит создавать новые породы, сочетающие в себе выдающиеся производительные качества и адаптацию для обитания в различных географических районах. Например, недавно у якутского скота нами была обнаружена мутация N100Q в гене *NRAP*, которая, по-видимому, влияет на его адаптацию к экстремально холодным условиям обитания (Buggiotti et al., 2021). Эффективность такого подхода возрастает в связи с обнадеживающими результатами внедрения в животноводство технологии геномного редактирования CRISPR/Cas (Bevacqua et al., 2016; Ikeda et al., 2017).

На территории России черно-пестрая порода – наиболее массовая порода крупного рогатого скота молочного направления (Справочник..., 2013). В настоящее время в Сибирском регионе проводится интенсивная селекционная работа с четырьмя утвержденными внутривидовыми типами черно-пестрого скота (ирменский, приобский, красноярский, прибайкальский), которые хорошо приспособлены к экстремальным климатическим условиям и местным кормам (Клименок и др., 2014). Недавно методом сложного воспроизводительного скрещивания коров черно-пестрой породы с голштинскими быками-производителями в 12 хозяйствах-оригинаторах Западной и Восточной Сибири была выведена новая высокопродуктивная порода молочного направления Сибирячка (Яранцева и др., 2019).

Высокополиморфные микросателлитные локусы широко используют в качестве генетических маркеров в популяционной и природоохранной генетике, для идентификации родства и других целей (Guichoux et al., 2011; Städele, Vigilant, 2016; Галинская и др., 2019). В частности, микросателлиты применяют для анализа происхождения и филогенетических связей местных пород крупного рогатого скота (Olschewsky, Hinrichs, 2021). Исследования отдельных популяций внутри одной породы позволяют оценить их генетическое разнообразие, родственные взаимоотношения и перспективы их использования для улучшения породы (Zsolnai et al., 2014; Agung et al., 2016; Szucs et al., 2019). Однако имеются лишь единичные работы, посвященные изучению генетического разнообразия местных популяций черно-пестрой породы в отдельных областях России (Смарагдов, 2018; Модоров и др., 2021). Новосибирская область в этом отношении остается неизученной.

Цель настоящей работы – анализ генетического разнообразия шести популяций черно-пестрого скота Новосибирской области и их сравнение с другими российскими популяциями, а также идентификация популяций, существенно отличающихся от всех остальных, для использования в программах по сохранению генетического разнообразия отечественной черно-пестрой породы.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили образцы крови от 4788 животных черно-пестрой породы крупного рогатого скота обоего пола из шести племенных хозяйств Новосибирской области (далее обозначены как популяции А–F). Для анализа структуры популяций и филогенетических отношений в качестве контроля использовали данные голштинской породы крупного рогатого скота (далее обозначена как популяция HOL) (van de Goor et al., 2011).

Тотальную ДНК выделяли с помощью реагента COrDIS SPRINT (ООО «Гордиз», Москва, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Полимеразную цепную реакцию 11 микросателлитных маркеров (ETH3, INRA023, TGLA227, TGLA126, TGLA122, SPS115, ETH225, BM2113, BM1824, ETH10, BM1818) проводили с применением набора реагентов COrDIS Cattle (ООО «Гордиз») по протоколу фирмы-изготовителя. Фрагментный

Таблица 1. Параметры генетической изменчивости микросателлитных локусов у черно-пестрой породы крупного рогатого скота Новосибирской области ($N = 4788$)

Локус	N_A	N_E	H_O	H_E	Приватные аллели*
BM1818	7.000 ± 0.447	2.658 ± 0.040	0.648 ± 0.011	0.623 ± 0.005	–
BM1824	5.833 ± 0.307	3.321 ± 0.259	0.726 ± 0.021	0.690 ± 0.024	185
BM2113	7.500 ± 0.500	4.212 ± 0.087	0.808 ± 0.009	0.762 ± 0.005	153
ETH3	7.333 ± 0.333	3.047 ± 0.124	0.733 ± 0.023	0.669 ± 0.013	–
ETH10	8.000 ± 0.258	3.905 ± 0.129	0.777 ± 0.009	0.743 ± 0.009	–
ETH225	6.667 ± 0.333	3.031 ± 0.151	0.681 ± 0.017	0.666 ± 0.015	–
TGLA122	12.833 ± 1.195	5.760 ± 0.165	0.879 ± 0.020	0.826 ± 0.005	139, 145, 179
TGLA126	5.333 ± 0.211	2.348 ± 0.045	0.569 ± 0.006	0.573 ± 0.008	113, 125
TGLA227	9.667 ± 0.211	5.324 ± 0.262	0.864 ± 0.010	0.810 ± 0.009	95, 101
INRA023	7.167 ± 0.477	3.876 ± 0.098	0.776 ± 0.010	0.741 ± 0.006	198, 216
SPS115	6.333 ± 0.211	2.160 ± 0.058	0.554 ± 0.017	0.535 ± 0.013	–
Среднее	7.606 ± 0.281	3.604 ± 0.143	0.729 ± 0.013	0.694 ± 0.011	–

Примечание. Здесь и далее показатель приводится в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое; m – стандартная ошибка; N_A – среднее число аллелей на локус; N_E – число эффективных аллелей на локус; H_O – наблюдаемая гетерозиготность; H_E – ожидаемая гетерозиготность; * уникальные аллели, характерные только для определенной популяции.

анализ амплификатов выполняли с использованием автоматического генетического анализатора «НАНОФОР-05» (ООО «Синтол», Москва, Россия). Размеры микросателлитных ДНК-маркеров определяли с помощью программы GeneMapper Software 5 (Thermo Fisher Scientific, США).

Показатели генетического разнообразия, F -статистики, тест распределения по популяциям, а также достоверность отклонения распределения генотипов от ожидаемого по равновесию Харди–Вайнберга вычисляли с применением пакета программ GenAlEx 6.5 (Peakall, Smouse, 2012). Аллельное обогащение (Allelic Richness, AR) вычисляли с использованием алгоритма «разряжения» (rarefaction) в программе HP-Rare (Kalinowski, 2005). Парные значения индекса фиксации, F_{ST} , а также проверку достоверности отличий от нуля коэффициента фиксации, F_{IS} , проводили методом бутстрэп-анализа с коррекцией на множественные сравнения в программе FSTAT (Goudet, 2003). Кластерный анализ выполняли с помощью программы STRUCTURE (Hubisz et al., 2009). Достоверность различий показателей между отдельными популяциями оценивали посредством критерия Стьюдента или однофакторного дисперсионного анализа с последующим post hoc тестом по Бонферрони с использованием пакета Statistica версии 8.0.

Филогенетическое дерево было построено с применением метода парного внутригруппового невзвешенного среднего арифметического (UPGMA) на основании генетических дистанций Neя с помощью программы PHOTREE2 (Takezaki et al., 2010). Статистическую надежность филогенетического дерева оценивали с использованием бутстрэп-анализа для 1000 реплик (Szucs et al., 2019). Достоверными считали узлы, превышающие порог 70 (Лукашов, 2009).

Результаты

Данные анализа генетической изменчивости популяций черно-пестрой породы крупного рогатого скота Новосибирской области представлены в табл. 1. Все микросателлитные локусы оказались высокополиморфными и в целом содержали 105 аллелей. Среднее число аллелей на локус составляло 7.606, эффективное число аллелей на локус – 3.604. Наблюдаемая гетерозиготность (0.729) достоверно не отличалась от ожидаемой (0.694).

Попарные сравнения генетических различий между хозяйствами с помощью точного теста Фишера в программе Генератор показали, что все хозяйства можно рассматривать как отдельные популяции, достоверно различающиеся друг от друга (Приложение 1)¹. Параметры генетической изменчивости в отдельных популяциях приведены в табл. 2. Максимальное (8.455) число аллелей на локус было в популяции А, минимальное (6.273) – в популяции В. Аллельное обогащение и среднее число эффективных аллелей между популяциями варьировали в пределах 6.087 (С) – 6.863 (F) и 3.437 (В) – 3.873 (D) соответственно. Наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность – в пределах от 0.701 (F) до 0.755 (В) и от 0.682 (С) до 0.714 (D) соответственно. Значения всех перечисленных выше показателей достоверно не различались между отдельными популяциями.

Приватные, т. е. уникальные аллели, характерные только для данной популяции животных, были обнаружены в пяти популяциях из шести. В популяциях А–Е коэффициент инбридинга F_{IS} был достоверно ниже нуля. Именно в этих популяциях нами выявлены достоверные отклонения распределения генотипов отдельных локусов

¹ Приложения 1–4 см. по адресу:

<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2021-25/appx14.pdf>

Таблица 2. Параметры генетического разнообразия микросателлитных локусов в отдельных популяциях черно-пестрой породы крупного рогатого скота Новосибирской области

Показатель	Популяция					
	A	B	C	D	E	F
Число животных	2408	65	1065	630	459	161
Число аллелей (N_A)	8.455 ± 0.835	6.273 ± 0.524	8.000 ± 1.000	7.818 ± 0.536	7.455 ± 0.562	7.636 ± 0.472
Аллельное обогащение (AR)	6.452 ± 0.422	6.273 ± 0.524	6.087 ± 0.474	6.650 ± 0.409	6.450 ± 0.393	6.863 ± 0.438
Число эффективных аллелей (N_E)	3.611 ± 0.368	3.437 ± 0.340	3.457 ± 0.350	3.873 ± 0.375	3.587 ± 0.325	3.658 ± 0.408
Число приватных аллелей	4	0	3	1	2	1
Число животных с одним и более приватным аллелем	6	0	7	1	5	1
Наблюдаемая гетерозиготность (H_O)	0.724 ± 0.035	0.755 ± 0.035	0.706 ± 0.035	0.749 ± 0.034	0.737 ± 0.032	0.701 ± 0.030
Ожидаемая гетерозиготность (H_E)	0.692 ± 0.032	0.683 ± 0.027	0.682 ± 0.030	0.714 ± 0.030	0.699 ± 0.026	0.696 ± 0.029
Коэффициент инбридинга (F_{IS})	-0.046 ± 0.011*	-0.103 ± 0.016*	-0.032 ± 0.010*	-0.047 ± 0.010*	-0.052 ± 0.016*	-0.007 ± 0.014

* Значение индекса фиксации достоверно ($p < 0.05$) отличается от нуля.

от равновесия Харди–Вайнберга (Приложение 2). При этом наибольшее число (6) таких локусов наблюдалось в популяциях А и D. Распределение генотипов локусов *ETH225* и *TGLA126* соответствовало равновесию Харди–Вайнберга во всех исследованных популяциях.

При проведении теста распределения по популяциям в среднем 45.7 % животных были приписаны правильно (Приложение 3). Однако для популяции В этот показатель составлял 70.8 %, что свидетельствует о значительном отличии этой популяции от всех остальных. Анализ значений F_{ST} с помощью метода главных компонент показал, что популяция В существенно отличалась от всех остальных при разделении по первой компоненте, которая отражала 36.73 % генетической изменчивости всего массива данных (рис. 1). При разделении по второй компоненте, которая отвечала за 27.61 % генетической изменчивости, из общего массива выделялась популяция D.

Наибольшая степень генетической дифференциации как по показателю индекса аллельной дифференциации Джоста, так и по индексу фиксации F_{ST} наблюдалась между популяциями В и D (Приложение 4). Наиболее близкими по обоим показателям оказались популяции А и С.

Результаты анализа с помощью алгоритма генетической кластеризации в программе STRUCTURE при $k = 2$ свидетельствовали о распределении популяций черно-пестрой и голштинской пород между двумя различными кластерами (табл. 3). При этом животные голштинской породы имели наибольшие значения коэффициента подобия Q в одном из кластеров. Значения этого коэффициента для всех популяций черно-пестрого скота, за исключением D, были достоверно ниже по сравнению с голштинской породой.

На филогенетическом дереве, построенном методом UPGMA, на основании генетических дистанций Нея популяции В и D находились на отдельных ветвях с высоким

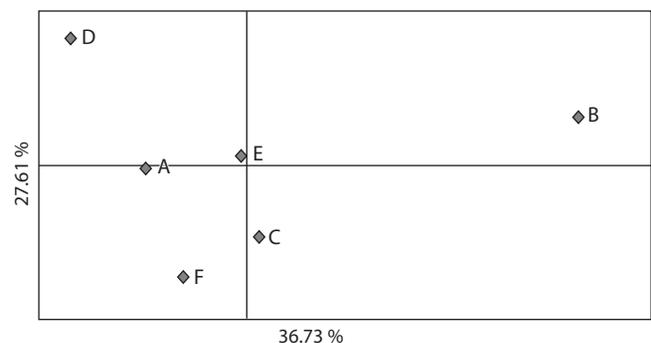


Рис. 1. Результаты анализа значений индекса фиксации F_{ST} методом главных компонент.

По осям приведен процент объясненной дисперсии.

Таблица 3. Результаты кластерного анализа популяций черно-пестрой (А–F) и голштинской (HOL) пород

Популяция	Коэффициент подобия Q	N
A	0.456 ± 0.004*	2408
B	0.507 ± 0.019*	65
C	0.481 ± 0.005*	1065
D	0.604 ± 0.007	630
E	0.549 ± 0.008*	459
F	0.551 ± 0.013*	161
HOL	0.622 ± 0.009	254

Примечание. Приведено значение коэффициента подобия Q (Pritchard et al., 2000), рассчитанного для числа кластеров $k = 2$ (Q1 и Q2). Данные по голштинской породе взяты из работы (van de Goor et al., 2011). * $p < 0.001$ в результате попарного сравнения по критерию Стьюдента с популяцией HOL.

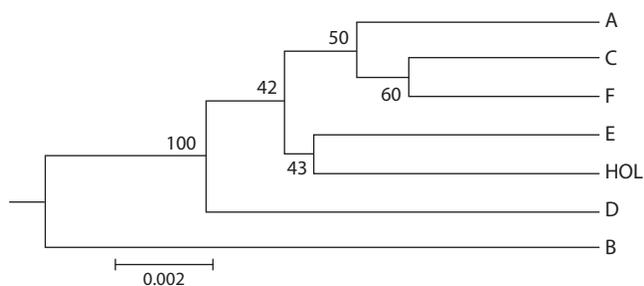


Рис. 2. Филогенетическая дендрограмма генетических взаимоотношений популяций черно-пестрой (A–F) (собственные данные) и голштинской (HOL) (van de Goor et al., 2011) пород.

В узлах указаны значения бутстрэп-анализа.

уровнем статистической надежности (рис. 2). Все остальные популяции, включая контрольную выборку голштинской породы, формировали единый кластер.

Обсуждение

При анализе 11 микросателлитных локусов во всей выборке черно-пестрой породы крупного рогатого скота Новосибирской области нами установлено 105 аллелей. Это значение несколько ниже оценки, полученной при исследовании 13 224 особей голштинизированного черно-пестрого скота Свердловской области (Модоров и др., 2021). В 15 локусах, в том числе использованных нами микросателлитов, авторы обнаружили 164 аллеля, но при этом частота встречаемости 38 из них составляла менее 0.1 %. С другой стороны, исследование 76 животных голштинско-фризской породы из Польши с применением сходного набора локусов (совпадали 10 маркеров из 11) выявило в сумме 76 аллелей (Radko et al., 2005). Наблюдаемые расхождения могут быть связаны с размером выборки и/или числом использованных микросателлитных локусов.

Локус *TGLA122* характеризовался наибольшим средним количеством аллелей на локус (12.833). Сходный показатель по данному локусу (14 аллелей) был найден при исследовании черно-пестрой породы в Псковской области (Аржанкова и др., 2015). Наименьшее (5.333) среднее количество аллелей на локус обнаружено нами в локусе *TGLA126*. Это значение хорошо совпадает с аналогичным параметром у черно-пестрой породы в Свердловской области (7 аллелей, из них 2 аллеля с частотой менее 0.1 %) (Модоров и др., 2021). Наибольшее (5.760) и наименьшее (2.160) число эффективных аллелей было найдено нами в локусах *TGLA122* и *SPS115*, что также хорошо соответствует результатам М.В. Модорова с коллегами (2021). Полученные нами значения наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности (0.729 и 0.694) практически идентичны оценкам, сделанным для черно-пестрого скота в Свердловской области (0.73 и 0.72) (Модоров и др., 2021), но несколько ниже оценок при исследовании быков-производителей этой же породы (0.779 и 0.751) (Зиновьева и др., 2015).

Известно, что случайно выбранных из популяции 25–30 особей достаточно для надежной оценки частот аллелей, ожидаемой гетерозиготности и генетических рас-

стояний (Hale et al., 2012). Размеры выборок в нашем исследовании значительно превосходили этот порог. Анализ с помощью точного теста Фишера показал, что все шесть исследованных выборок можно считать отдельными популяциями (см. Приложение 1), что позволило нам перейти к более детальному анализу генетических различий между ними.

Число эффективных аллелей, аллельное обогащение, наблюдаемую и ожидаемую гетерозиготность широко используют для оценки генетического разнообразия между популяциями, поскольку эти параметры не зависят от численности выборок (Leberg et al., 2002; Галинская и др., 2019). В нашем исследовании эти показатели достоверно не различались между изученными популяциями (см. табл. 2). По-видимому, все исследованные хозяйства в селекционно-племенной работе использовали спермопродукцию из сходных источников.

Наши результаты хорошо согласуются с исследованием 29 стад голштинизированного черно-пестрого скота на территории Свердловской области, в котором 27 стад статистически значимо не различались по значениям генетической дифференциации (Модоров и др., 2021). К сожалению, в работах по мониторингу популяций крупного рогатого скота с применением микросателлитных маркеров внутри одной породы исследователи, как правило, не используют статистические методы для сравнения показателей генетического разнообразия (Глинская, 2013; Кузнецов, 2014; Zsolnai et al., 2014; Agung et al., 2016; Szucs et al., 2019). Приватные аллели были обнаружены нами во всех изученных популяциях, кроме популяции В. Вероятно, это связано с наименьшей численностью животных в этой популяции ($N = 65$). По этому показателю популяции черно-пестрой породы Новосибирской области значительно превосходили черно-пестрый скот Республики Беларусь, в которой приватные аллели были выявлены только в трех из девяти популяций (Глинская, 2013).

Известно, что F_{IS} , коэффициент инбридинга особей в субпопуляциях, может указывать на редукцию гетерозиготности из-за неслучайного спаривания (Кузнецов, 2014). При $F_{IS} > 0$ имеет место дефицит гетерозиготных особей (родственное спаривание), при $F_{IS} < 0$ – избыток гетерозигот (неродственное спаривание), при $F_{IS} = 0$ – случайное спаривание (соответствие распределению Харди–Вайнберга). В нашем исследовании в большинстве популяций (A–E) значения F_{IS} были существенно ниже нуля, что говорит об избытке гетерозигот. Действительно, в популяциях A–E нами были обнаружены достоверные отклонения распределения генотипов отдельных локусов от равновесия Харди–Вайнберга (см. Приложение 2), что хорошо согласуется с приведенным выше результатом. Наиболее вероятная причина наблюдаемого эффекта – применение в этих хозяйствах системы спаривания, направленной на снижение инбридинга (аутбридинг, дисассортативное спаривание и т.д.) (Кузнецов, 2014), хотя не исключено также действие других факторов (конечные размеры популяции, неслучайное скрещивание особей, влияние отбора и др.) (Галинская и др., 2019).

В тесте распределения по популяциям в среднем 45.7 % животных в нашем исследовании были корректно отнесены к их оригинальным группам (см. Приложение 3).

Сходное значение (48 %) было получено при исследовании 16 стад лимузинской породы в Венгрии (Szucs et al., 2019). Однако для популяции В этот показатель составлял 70.8 %, что свидетельствует о существенном отличии этой популяции от всех остальных.

Результаты анализа значений субпопуляционного индекса фиксации F_{ST} с помощью метода главных компонент показывают, что популяции А, С, Е и F формируют компактную группу (см. рис. 1). Значения F_{ST} в пределах этой группы составляли от 0.004 до 0.008 (см. Приложение 4). Популяции В и D удалены от этой группы животных по первой и второй компоненте соответственно. Наибольшее генетическое расстояние, согласно индексу фиксации, наблюдалось между группами В и D и составляло 0.013. Этот диапазон генетических расстояний по F_{ST} хорошо соответствует данным, полученным по однонуклеотидным полиморфизмам с помощью биочипа Illumina BovineSNP50, для шести племенных заводов голштинизированного черно-пестрого скота Ленинградской области (0.002–0.012) (Смарагдов, 2018) и популяций джерсейской породы в США, Канаде и Великобритании (0.006–0.016) (Cooper et al., 2016).

Согласно классификации С. Райта, генетическая дифференциация популяций считается незначительной, если F_{ST} не превышает 0.05 (Wright, 1978). В.М. Кузнецов (2020) считает, что дифференциацию менее 0.01 можно отнести к категории, «не имеющей существенного значения или ничтожной», поэтому интерпретировать ее необходимо с осторожностью. Тем не менее Т.В. Галинская с коллегами (2019) полагают, что «интерпретация величины F_{ST} более сложна, чем простая ссылка на это количественное руководство». По мнению этих авторов, «более важный вопрос заключается в том, можем ли мы обнаружить статистически значимую генетическую дифференциацию ($F_{ST} > 0$) или нет».

С помощью пермутационного теста мы показали, что все найденные оценки F_{ST} достоверны на уровне $p < 0.01$ (см. Приложение 4), что также говорит в пользу генетической обособленности популяций В и D.

Хотя F_{ST} широко используется в качестве показателя генетической дифференциации популяций, его применение для мультиаллельных мультилокусных маркеров, какими являются микросателлиты, часто вызывает критику (Meirmans, Hedrick, 2011; Кузнецов, 2021). Для таких маркеров было предложено несколько альтернативных статистик, в частности показатель аллельной дифференциации Джоста D_{EST} , который основан на изменчивости эффективного числа аллелей (Jost et al., 2018). Считается, что эти два показателя взаимно дополняют друг друга и их следует использовать совместно (Meirmans, Hedrick, 2011; Кузнецов, 2021). В нашем исследовании дистанции D_{EST} достоверно коррелировали с оценками F_{ST} (коэффициент корреляции Пирсона $r = 0.92$, $p < 0.0001$). Генетически наиболее далекими как по индексу фиксации F_{ST} , так и по показателю D_{EST} оказались популяции В и D.

Кластерный анализ выявил распределение исследованных популяций черно-пестрой породы Новосибирской области и референсной популяции голштинской породы между двумя различными кластерами (см. табл. 3), что

подтверждает их генетическое родство (Yurchenko et al., 2018; Юдин, Ларкин, 2019). Значения коэффициента подобия для всех популяций черно-пестрой породы, за исключением D, оказались существенно ниже, чем у голштинов, это свидетельствует о различной доли кровности голштинского скота в исследованных нами популяциях (Зиновьева и др., 2015).

При филогенетическом анализе популяции черно-пестрой породы разделились на три группы (см. рис. 2). Одну группу образовали близкие к голштинской породе популяции А, С, Е и F. Между тем популяции В и D формировали две отдельные ветви с высоким уровнем статистической поддержки. Этот результат подтверждает приведенные выше данные теста распределения по популяциям, анализа методом главных компонент, анализа показателей F_{ST} и D_{EST} , а также кластерного анализа, о генетической обособленности популяций В и D.

Считается, что при сохранении породы в качестве потенциального материала для последующего использования в селекции очень важно сберечь весь ее генофонд, поскольку в большинстве случаев нам неизвестно, какими именно генами или их сочетаниями определяются хозяйственно важные свойства породы (Столповский, 2013; Столповский, Захаров-Гезехус, 2017). По мнению этих же авторов, задача программ по сохранению биоразнообразия заключается «в поддержании разнообразия аллелей, имеющихся в настоящее время у вида (породы), а также в поддержании нормального накопления и потенциального сохранения вновь возникающих мутантных аллелей – источника постоянной эволюции животных и их усовершенствования».

В нашем исследовании результаты теста распределения по популяциям, анализа методом главных компонент, анализа показателей F_{ST} и D_{EST} , а также кластерного и филогенетического анализов свидетельствуют о генетической обособленности двух популяций, В и D, от всех остальных. Исходя из вышеизложенного, для сохранения генофонда черно-пестрой породы нужно использовать в первую очередь животных именно этих популяций.

Заключение

Таким образом, параметры генетического разнообразия исследованных нами шести популяций черно-пестрого скота Новосибирской области существенно не отличаются от других российских популяций данной породы. В большинстве этих хозяйств наблюдается избыток гетерозигот, что говорит о низкой степени инбридинга. При разработке мероприятий, направленных на сохранение генетического разнообразия отечественного черно-пестрого скота, мы рекомендуем использовать животных из двух популяций, которые по генетическим характеристикам существенно отличаются от всех остальных.

Список литературы / References

- Аржанкова Ю.В., Мосачихина И.А., Харитонов А.В. Генетические особенности черно-пестрого и помесного крупного рогатого скота по микросателлитным локусам. *Изв. Великолук. гос. с.-х. академии*. 2015;1:7-11.
[Arzhankova Yu. V., Mosachikhina I. A., Kharitonov A. V. Genetic features of Black Pied and cross-breeding cattle by microsatellite loci.

- Izvestiya Velikolukskoy Gosudarstvennoy Sel'skokhozyaystvennoy Akademii = Bulletin of the Velikie Luki State Agricultural Academy.* 2015;1:7-11. (in Russian)]
- Галинская Т.В., Щепетов Д.М., Лысенков С.Н. Предубеждения о микросателлитных исследованиях и как им противостоять. *Генетика.* 2019;55(6):617-632. DOI 10.1134/S0016675819060043.
- [Galinskaya T.V., Schepetov D.M., Lysenkov S.N. Prejudices against microsatellite studies and how to resist them. *Russ. J. Genet.* 2019;55(6):657-671. DOI 10.1134/S1022795419060048].
- Глинская Н.А. Анализ генетической дифференциации популяций крупного рогатого скота черно-пестрой породы белорусской селекции по STR-локусам. *Вестн. Полес. гос. ун-та.* 2013;2: 21-26.
- [Glinskaya N.A. The STR analysis of genetic differentiation in Black-Pied cattle populations bred in Belarus. *Vestnik Poleskogo Gosudarstvennogo Universiteta = Bulletin of the Polesky State University.* 2013;2:21-26. (in Russian)].
- Зиновьева Н.А., Гладырь Е.А., Багиров В.А., Брем Г. Динамика биоразнообразия отечественного черно-пестрого скота под воздействием кроссбридинга. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2015;19(2):222-225.
- [Zinovieva N.A., Gladyr E.A., Bagirov V.A., Brem G. Dynamics of the biodiversity of Black and White cattle influenced by crossbreeding. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2015;19(2):222-225. (in Russian)].
- Клименок И.И., Яранцева С.Б., Шишкина М.А. Продуктивные и племенные качества черно-пестрого скота Сибирского региона. *Генетика и разведение животных.* 2014;2:30-33.
- [Klimenok I.I., Yaranceva S.B., Shishkina M.A. Productive and breeding qualities of black and motley cattle Siberian region. *Genetika i Razvedeniye Zhivotnykh = Genetics and Breeding of Animals.* 2014;2:30-33. (in Russian)]
- Кузнецов В.М. F-статистики Райта: оценка и интерпретация. *Проблемы биологии продуктивных животных.* 2014;4:80-104.
- [Kuznetsov V.M. Wright's F-statistics: evaluation and interpretation. *Problemy Biologii Produktivnykh Zhivotnykh = Problems of Productive Animal Biology.* 2014;4:80-104. (in Russian)]
- Кузнецов В.М. Методы Нея для анализа генетических различий между популяциями. *Проблемы биологии продуктивных животных.* 2020;1:91-110. DOI 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2020.1.91-110.
- [Kuznetsov V.M. Nei's methods for analyzing genetic differences between populations. *Problemy Biologii Produktivnykh Zhivotnykh = Problems of Productive Animal Biology.* 2020;1:91-110. DOI 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2020.1.91-110. (in Russian)]
- Кузнецов В.М. Оценка генетической дифференциации популяций молекулярным дисперсионным анализом (аналитический обзор). *Аграр. наука Евро-Северо-Востока.* 2021;22(2):167-187. DOI 10.30766/2072-9081.2020.21.2.167-187.
- [Kuznetsov V.M. Assessment of genetic differentiation of populations by analysis of molecular variance (analytical review). *Agrarnaya Nauka Evro-Severo-Vostoka = Agricultural Science Euro-North-East.* 2021;22(2):167-187. DOI 10.30766/2072-9081.2020.21.2.167-187. (in Russian)]
- Лукашов В.В. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2009.
- [Lukashov V.V. Molecular Evolution and Phylogenetic Analysis. Moscow: Binom Publ., 2009. (in Russian)]
- Модоров М.В., Ткаченко И.В., Грин А.А., Севостьянов М.Ю., Зезин Н.Н. Генетическая структура популяции голштинизированного черно-пестрого скота на территории Урала. *Генетика.* 2021;57(4):437-444. DOI 10.31857/S001667582104010X.
- [Modorov M.V., Tkachenko I.V., Grin A.A., Sevost'yanov M.Yu., Zezin N.N. Population genetic structure of Ural Black Pied cattle. *Russ. J. Genet.* 2021;57(4):453-459. DOI 10.1134/S1022795421040104.]
- Мохов Б.П., Шабалина Е.П. Влияние наследственности и экогенеза на адаптацию и молочную продуктивность коров. *Вестн. Ульян. гос. с.-х. академии.* 2011;2(14):90-96.
- [Mokhov B.P., Shabalina E.P. Influence of heredity and ecogenesis for adaptation and productivity of dairy cows. *Izvestiya Ul'yanskoys Gosudarstvennoy Sel'skokhozyaystvennoy Akademii = Bulletin of the Ulyanovsk State Agricultural Academy.* 2011;2(14):90-96. (in Russian)]
- Смарагдов М.Г. Полногеномная оценка межстадного генетического различия крупного рогатого скота. *Достижения науки и техники АПК.* 2018;32(4):47-49. DOI 10.24411/0235-2451-2018-10411.
- [Smaragdov M.G. Genome wide assessment of inter-herd genetic differences of cattle. *Dostizheniya Nauki i Tekhniki APK = Achievements of Science and Technology of AIC.* 2018;32(4):47-49. DOI 10.24411/0235-2451-2018-10411. (in Russian)]
- Справочник пород и типов сельскохозяйственных животных, разводимых в Российской Федерации. Словарь терминов по разведению, генетике, селекции и биотехнологии разведения сельскохозяйственных животных. Перечень российских и международных организаций в сфере животноводства. М.: ВНИИплем, 2013.
- [Breeds and Types of Farm Animals in the Russian Federation. Dictionary of Terms Concerning the Industry, Genetics, Breeding, and Reproduction Technology of Farm Animals. List of Russian and International Organizations in the Field of Animal Husbandry. Moscow: All-Russia Research Institute of Animal Breeding, 2013. (in Russian)]
- Столповский Ю.А. Популяционно-генетические основы сохранения генофондов domestцированных видов животных. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2013;17(4/2):900-915.
- [Stolpovskiy Yu.A. Population genetics studies underlying preservation of domesticated animal species gene pools. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2013;17(4/2):900-915. (in Russian)]
- Столповский Ю.А., Захаров-Гезехус И.А. Проблема сохранения генофондов domestцированных животных. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2017;21(4):477-486. DOI 10.18699/VJ17.266.
- [Stolpovskiy Yu.A., Zakharov-Gezekhus I.A. The problem of conservation of gene pools of domesticated animals. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2017;21(4):477-486. DOI 10.18699/VJ17.266. (in Russian)]
- Юдин Н.С., Ларкин Д.М. Происхождение, селекция и адаптация российских пород крупного рогатого скота по данным полногеномных исследований. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2019;23(5):559-568. DOI 10.18699/VJ19.525.
- [Yudin N.S., Larkin D.M. Whole genome studies of origin, selection and adaptation of the Russian cattle breeds. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2019;23(5):559-568. DOI 10.18699/VJ19.525. (in Russian)]
- Яранцева С.Б., Герасимчук Л.Д., Шишкина М.А. Новая порода крупного рогатого скота молочного направления Сибирячка. *Сиб. вестн. с.-х. науки.* 2019;49(6):62-70. DOI 10.26898/0370-8799-2019-6-7.
- [Yarantseva S.B., Gerasimchuk L.D., Shishkina M.A. New breed of dairy cattle Sibiryachka. *Sibirskii Vestnik Sel'skokhozyaystvennoy Nauki = Siberian Herald of Agricultural Science.* 2019;49(6): 62-70. DOI 10.26898/0370-8799-2019-6-7. (in Russian)]
- Agung P.P., Saputra F., Septian W.A., Lusiana Zein M.S., Sulandari S., Anwar S., Wulandari A.S., Said S., Tappa B. Study of genetic diversity among Simmental cross cattle in West Sumatra based on microsatellite markers. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 2016;29(2): 176-183. DOI 10.5713/ajas.15.0155.
- Bevacqua R.J., Fernandez-Martín R., Savy V., Canel N.G., Gismondi M.I., Kues W.A., Carlson D.F., Fahrenkrug S.C., Niemann H., Taboga O.A., Ferraris S., Salamone D.F. Efficient edition of the bo-

- vine PRNP prion gene in somatic cells and IVF embryos using the CRISPR/Cas9 system. *Theriogenology*. 2016;86(8):1886-1896.e1. DOI 10.1016/j.theriogenology.2016.06.010.
- Buchanan D.S., Lenstra J.A. Breeds of cattle. In: Garrick D.J., Ruvinsky A. (Eds.) *The Genetics of Cattle*. 2nd ed. CABI: Wallingford, UK, 2015;33-66. DOI 10.1079/9781780642215.0033.
- Buggiotti L., Yurchenko A.A., Yudin N.S., Vander Jagt C.J., Vorobieva N.V., Kusliy M.A., Vasiliev S.K., Rodionov A.N., Boronetskaya O.I., Zinovieva N.A., Graphodatsky A.S., Daetwyler H.D., Larkin D.M. Demographic history, adaptation, and NRAP convergent evolution at amino acid residue 100 in the world northernmost cattle from Siberia. *Mol. Biol. Evol.* 2021;38(8):3093-3110. DOI 10.1093/molbev/msab078.
- Cooper T.A., Eaglen S.A.E., Wiggans G.R., Jenko J., Huson H.J., Morrice D.R., Bichard M., Luff W.G.L., Woolliams J.A. Genomic evaluation, breed identification, and population structure of Guernsey cattle in North America, Great Britain, and the Isle of Guernsey. *J. Dairy Sci.* 2016;99(7):5508-5515. DOI 10.3168/jds.2015-10445.
- Goudet J. Fstat (ver. 2.9.4). a program to estimate and test population genetics parameters. 2003. Available from: <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Guichoux E., Lagache L., Wagner S., Chaumeil P., Léger P., Lepais O., Lepoittevin C., Malausa T., Revardel E., Salin F., Petit R.J. Current trends in microsatellite genotyping. *Mol. Ecol. Resour.* 2011; 11(4):591-611. DOI 10.1111/j.1755-0998.2011.03014.x.
- Hale M.L., Burg T.M., Steeves T.E. Sampling for microsatellite-based population genetic studies: 25 to 30 individuals per population is enough to accurately estimate allele frequencies. *PLoS One*. 2012; 7(9):e45170. DOI 10.1371/journal.pone.0045170.
- Hubisz M.J., Falush D., Stephens M., Pritchard J.K. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Mol. Ecol. Resour.* 2009;9(5):1322-1332. DOI 10.1111/j.1755-0998.2009.02591.x.
- Ikeda M., Matsuyama S., Akagi S., Ohkoshi K., Nakamura S., Minabe S., Kimura K., Hosoe M. Correction of a disease mutation using CRISPR/Cas9-assisted genome editing in Japanese Black cattle. *Sci. Rep.* 2017;7(1):17827. DOI 10.1038/s41598-017-17968-w.
- Jost L., Archer F., Flanagan S., Gaggiotti O., Hoban S., Latch E. Differentiation measures for conservation genetics. *Evol. Appl.* 2018; 11(7):1139-1148. DOI 10.1111/eva.12590.
- Kalinowski S.T. HP-Rare: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic diversity. *Mol. Ecol. Notes*. 2005;5(1): 187-189. DOI 10.1111/j.1471-8286.2004.00845.x.
- Leberg P.L. Estimating allelic richness: effects of sample size and bottle-necks. *Mol. Ecol.* 2002;11(11):2445-2449. DOI 10.1046/j.1365-294x.2002.01612.x.
- Madan M.L. Animal biotechnology: applications and economic implications in developing countries. *Rev. Sci. Tech.* 2005;24(1):127-139. DOI 10.20506/rst.24.1.1555.
- Meirmans P.G., Hedrick P.W. Assessing population structure: F_{ST} and related measures. *Mol. Ecol. Resour.* 2011;11(1):5-18. DOI 10.1111/j.1755-0998.2010.02927.x.
- Olschewsky A., Hinrichs D. An overview of the use of genotyping techniques for assessing genetic diversity in local farm animal breeds. *Animals (Basel)*. 2021;11(7):2016. DOI 10.3390/ani11072016.
- Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*. 2012;28(19):2537-2539. DOI 10.1093/bioinformatics/bts460.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000;155(2):945-959.
- Radko A., Zyga A., Zabek T., Słota E. Genetic variability among Polish Red, Hereford and Holstein-Friesian cattle raised in Poland based on analysis of microsatellite DNA sequences. *J. Appl. Genet.* 2005; 46(1):89-91.
- Städele V., Vigilant L. Strategies for determining kinship in wild populations using genetic data. *Ecol. Evol.* 2016;6(17):6107-6120. DOI 10.1002/ece3.2346.
- Szucs M., Szabó F., Bán B., Józsa C., Rózsa L., Zsolnai A., Anton I. Assessment of genetic diversity and phylogenetic relationship of Limousin herds in Hungary using microsatellite markers. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 2019;32(2):176-182. DOI 10.5713/ajas.18.0164.
- Takezaki N., Nei M., Tamura K. POPTREEW: web version of POP-TREE for constructing population trees from allele frequency data and computing some other quantities. *Mol. Biol. Evol.* 2014; 31(6):1622-1624. DOI 10.1093/molbev/msu093.
- van de Goor L.H., Koskinen M.T., van Haeringen W.A. Population studies of 16 bovine STR loci for forensic purposes. *Int. J. Legal. Med.* 2011;125(1):111-119. DOI 10.1007/s00414-009-0353-8.
- Wright S. *Evolution and the Genetics of Population*. Vol. 4. Variability within and Among Natural Populations. Chicago: Univ. Chicago Press, 1978.
- Yurchenko A., Yudin N., Aitnazarov R., Plyusnina A., Brukhin V., Soloshenko V., Lhasaranov B., Popov R., Paronyan I.A., Plemyshev K.V., Larkin D.M. Genome-wide genotyping uncovers genetic profiles and history of the Russian cattle breeds. *Heredity*. 2018; 120(2):125-137. DOI 10.1038/s41437-017-0024-3.
- Zsolnai A., Kovács A., Anton I., Rátky J., Brüssow K.P., Józsa C., Bán B., Gyurmán A. Comparison of different Hungarian Grey herds as based on microsatellite analysis. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 2014; 32(2):121-130.

ORCID ID

R.B. Aitnazarov orcid.org/0000-0001-6929-7648
N.S. Yudin orcid.org/0000-0002-1947-5554

Благодарности. Исследование выполнено при поддержке бюджетного проекта № 0259-2021-0015.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 06.09.2021. После доработки 17.10.2021. Принята к публикации 17.10.2021.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Вовлеченность генов *KIBRA* и *APOE* в формирование особенностей пространственного мышления человека

А.В. Казанцева^{1, 2}✉, Р.Ф. Еникеева¹, Ю.Д. Давыдова¹, Р.Н. Мустафин³, З.Р. Тахирова⁴, С.Б. Малых^{5, 6}, М.М. Лобаскова⁵, Т.Н. Тихомирова^{5, 6}, Э.К. Хуснутдинова^{1, 6}

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

² Уфимский государственный нефтяной технический университет, кафедра молекулярных технологий, Уфа, Россия

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

⁴ Башкирский государственный университет, кафедра генетики и фундаментальной медицины, Уфа, Россия

⁵ Психологический институт Российской академии образования, Москва, Россия

⁶ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет психологии, Москва, Россия

✉ Kazantsa@mail.ru

Аннотация. В современном высокотехнологичном обществе пространственные способности являются предиктором успешности в жизни и профессиональной деятельности, особенно в STEM дисциплинах (*от англ. Science, Technology, Engineering, and Mathematics*). Согласно нейробиологическим гипотезам, существование индивидуальных различий в когнитивных способностях может быть обусловлено особенностями функционирования генов, участвующих в регуляции нейрогенеза и синаптической пластичности. С другой стороны, полногеномный анализ ассоциаций идентифицировал rs17070145 в гене *KIBRA*, ассоциированный с индивидуальными различиями в эпизодической памяти. Учитывая важную роль генетической и средовой компоненты в манифестации когнитивных функций, целью настоящего исследования являлись оценка основного эффекта полиморфных вариантов генов *NGF* (rs6330), *NRXN1* (rs1045881, rs4971648), *KIBRA* (rs17070145), *NRG1* (rs6994992), *BDNF* (rs6265), *GRIN2B* (rs3764030), *APOE* (rs7412, rs429358), *SNAP25* (rs363050) и оценка ген-средовых взаимодействий в формировании индивидуальных особенностей пространственного мышления у индивидов без когнитивных нарушений 18–25 лет ($N = 1011$, 80 % женщин). Измерение уровня пространственных способностей осуществлялось с помощью батареи тестовых заданий на вращение 3D фигур (*shape rotation*). Множественный линейный регрессионный анализ, проведенный в общей выборке с включением половой, этнической принадлежности и наличия «рискового» аллеля *APOE* $\epsilon 4$ в качестве ковариат, продемонстрировал ассоциацию аллеля rs17070145*Т в гене *KIBRA* с более высоким уровнем пространственного мышления ($\beta = 1.32$; $p_{FDR} = 0.037$) по сравнению с носителями генотипа rs17070145*СС. Анализ ген-средовых взаимодействий выявил, что табакокурение ($\beta = 3.74$; $p = 0.010$) и место воспитания в детстве ($\beta = -6.94$; $p = 0.0002$) модулируют ассоциацию полиморфных вариантов в гене *KIBRA* (rs17070145) и гене *APOE* (rs7412, rs429358) с индивидуальными различиями в пространственных способностях соответственно. Полученные результаты подтверждают связь аллеля rs17070145*Т в гене *KIBRA* с улучшением когнитивных функций и впервые свидетельствуют об ассоциации данного генетического варианта с особенностями пространственного мышления. «Протективный» эффект аллеля *APOE* $\epsilon 2$ на улучшение когнитивного функционирования наблюдается только при сочетании определенных особенностей воспитания в детстве.
Ключевые слова: *KIBRA*; *APOE*; когнитивные способности; мысленное вращение предметов; линейная регрессия; ген-средовые взаимодействия.

Для цитирования: Казанцева А.В., Еникеева Р.Ф., Давыдова Ю.Д., Мустафин Р.Н., Тахирова З.Р., Малых С.Б., Лобаскова М.М., Тихомирова Т.Н., Хуснутдинова Э.К. Вовлеченность генов *KIBRA* и *APOE* в формирование особенностей пространственного мышления человека. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(8):839-846. DOI 10.18699/VJ21.097

The role of the *KIBRA* and *APOE* genes in developing spatial abilities in humans

A.V. Kazantseva^{1, 2}✉, R.F. Enikeeva¹, Yu.D. Davydova¹, R.N. Mustafin³, Z.R. Takhirova⁴, S.B. Malykh^{5, 6}, M.M. Lobaskova⁵, T.N. Tikhomirova^{5, 6}, E.K. Khusnutdinova^{1, 6}

¹ Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

² Ufa State Petroleum Technological University, Department of molecular technologies, Ufa, Russia

³ Bashkir State Medical University, Department of medical genetics and fundamental medicine, Ufa, Russia

⁴ Bashkir State University, Department of genetics and fundamental medicine, Ufa, Russia

⁵ Psychological Institute of the Russian Academy of Education, Moscow, Russia

⁶ Lomonosov Moscow State University, Department of psychology, Russia

✉ Kazantsa@mail.ru

Abstract. In the contemporary high-tech society, spatial abilities predict individual life and professional success, especially in the STEM (Science, Technology, Engineering, and Mathematics) disciplines. According to neurobiological hypotheses, individual differences in cognitive abilities may be attributed to the functioning of genes involved in the regulation of neurogenesis and synaptic plasticity. In addition, genome-wide association studies identified rs17070145 located in the *KIBRA* gene, which was associated with individual differences in episodic memory. Considering a significant role of genetic and environmental components in cognitive functioning, the present study aimed to estimate the main effect of *NGF* (rs6330), *NRXN1* (rs1045881, rs4971648), *KIBRA* (rs17070145), *NRG1* (rs6994992), *BDNF* (rs6265), *GRIN2B* (rs3764030), *APOE* (rs7412, rs429358), and *SNAP25* (rs363050) gene polymorphisms and to assess the effect of gene-environment interactions on individual differences in spatial ability in individuals without cognitive decline aged 18–25 years ($N = 1011$, 80 % women). Spatial abilities were measured using a battery of cognitive tests including the assessment of “3D shape rotation” (mental rotation). Multiple regression analysis, which was carried out in the total sample controlling for sex, ethnicity and the presence of the “risk” *APOE* $\epsilon 4$ allele, demonstrated the association of the rs17070145 T-allele in the *KIBRA* gene with enhanced spatial ability ($\beta = 1.32$; $p_{FDR} = 0.037$) compared to carriers of the rs17070145 CC-genotype. The analysis of gene-environment interactions revealed that nicotine smoking ($\beta = 3.74$; $p = 0.010$) and urban/rural residency in childhood ($\beta = -6.94$; $p = 0.0002$) modulated the association of *KIBRA* rs17070145 and *APOE* (rs7412, rs429358) gene variants with individual differences in mental rotation, respectively. The data obtained confirm the effect of the *KIBRA* rs17070145 T-allele on improved cognitive functioning and for the first time evidence the association of the mentioned genetic variant with spatial abilities in humans. A “protective” effect of the *APOE* $\epsilon 2$ allele on enhanced cognitive functioning is observed only under certain conditions related to childhood rearing.
Key words: *KIBRA*; *APOE*; cognitive abilities; mental rotation; linear regression; gene-environment interactions.

For citation: Kazantseva A.V., Enikeeva R.F., Davydova Yu.D., Mustafin R.N., Takhirova Z.R., Malykh S.B., Lobaskova M.M., Tikhomirova T.N., Khusnutdinova E.K. The role of the *KIBRA* and *APOE* genes in developing spatial abilities in humans. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(8):839–846. DOI 10.18699/VJ21.097

Введение

Изучение продуктивности когнитивных функций как составной части индивидуального личностного потенциала приобретает сегодня все большую актуальность в связи с тем, что уровень когнитивного функционирования лежит в основе жизненного успеха и самореализации каждого человека. В частности, в современном высокотехнологичном обществе пространственные способности (т. е. способности к пространственному мышлению) являются предиктором успешности в жизни и профессиональной деятельности, особенно в STEM (от *англ.* Science, Technology, Engineering, and Mathematics) дисциплинах (Nagy-Kondor, 2017). Существующие к настоящему времени гипотезы индивидуального развития пространственного мышления предполагают значительную роль генетических, эпигенетических и средовых факторов (Mustafin et al., 2020; Тахирова и др., 2021). По данным близнецовых исследований, вклад генетического компонента в вариации этого признака составляет 64–84 %, меняясь в зависимости от исследуемого типа пространственных способностей (Malanchini et al., 2020).

Согласно нейробиологическим гипотезам, существование индивидуальных различий в когнитивных способностях может быть обусловлено особенностями функционирования генов, участвующих в регуляции нейрогенеза и синаптической пластичности в таких регионах мозга, как префронтальная кора и гиппокамп (Mustafin et al., 2020). Последний процесс представляет собой формирование новых нейрональных связей в ответ на приобретение нового опыта. Важная роль в регуляции этого процесса принадлежит нейротрофическим факторам (*BDNF*, *NGF*), нейрексинам (*NRXN1*), нейрегулину (*NRG1*), синаптосомально-ассоциированному белку (*SNAP25*), глутаматергическому рецептору (*GRIN2B*) (Еникеева и др., 2017; Mustafin et al., 2020). Одним из наиболее значимых и повторяющихся результатов в области изучения когнитивного функционирования является связь аллельного варианта гена *APOE* $\epsilon 4$

с риском развития болезни Альцгеймера и повышенным темпом снижения когнитивных способностей (Porter et al., 2018; Li X. et al., 2019). Ранее предпринимались попытки оценить эффект различных вариантов генов, участвующих в регуляции нейрогенеза (*APOE*, *TOMM40*, *BDNF*, *SORL1*, *CLSTN2*), на скорость изменения когнитивных функций у индивидов старше 65–70 лет без когнитивного дефицита (Laukka et al., 2020). Учитывая, что около 60 % вариаций в когнитивных изменениях в онтогенезе коррелируют между различными когнитивными особенностями (эпизодической и семантической памятью, скоростью обработки информации, невербальным интеллектом, пространственным мышлением и др.) (Tucker-Drob et al., 2019), можно предположить, что аллельные варианты генов, белковые продукты которых связаны с регуляцией нейрогенеза, могут быть тоже ассоциированы с пространственными способностями.

Наряду с гено-кандидатным подходом существенный вклад в изучение генов комплексных признаков вносит другой методологический подход – полногеномный анализ ассоциаций (GWAS), позволивший выявить генетические варианты, участвующие в регуляции когнитивного функционирования. Одним из таких локусов является rs17070145, локализованный в интроне 9 гена *KIBRA* (Kidney and BRAin expressed protein), который был изначально идентифицирован в ходе GWAS эпизодической памяти в когортах из Швеции и Америки (Papassotiropoulos et al., 2006). Последующие работы подтвердили ассоциацию минорного аллеля T с улучшением эпизодической памяти (Porter et al., 2018) и пространственного обучения (Schuck et al., 2013). Недавний метаанализ, включавший 20 выборки по типу «случай-контроль», подтвердил ассоциацию аллеля rs17070145*С с увеличением риска развития болезни Альцгеймера и когнитивного дефицита среди индивидов зрелого возраста (Ling et al., 2018). Известно, что ген *KIBRA* (известный также как *WWC1*, WW domain-containing protein 1) кодирует белок сигнальной транс-

дукции, широко экспрессируемый в почках и отделах головного мозга, связанных с регуляцией памяти (гиппокамп, префронтальная кора, мозжечок и гипоталамус). Он участвует в большом количестве клеточных функций, включая миграцию клеток, везикулярный транспорт, регуляцию транскрипции, синаптогенез, нейрональный сигналинг, а также оказывает нейропротективное действие, способствуя ингибированию $\text{A}\beta$ -индуцированного апоптоза (Heitz et al., 2016). Кроме того, на функциональном уровне было показано, что снижение постсинаптического уровня белка *Kibra* опосредует снижение памяти и синаптической пластичности (Heitz et al., 2016). Необходимо отметить, что когнитивное функционирование может быть опосредовано аддитивным и эпистатическим взаимодействием белковых продуктов генов *APOE* и *KIBRA* (Wang et al., 2019), что говорит о необходимости одновременного анализа обоих генов.

К настоящему времени неизвестно, вовлечен ли локус rs17070145 в гене *KIBRA* в регуляцию других когнитивных способностей (в том числе пространственных) у индивидов более раннего возраста. Таким образом, учитывая, что аллель T в гене *KIBRA* в большинстве исследований лиц без когнитивного дефицита был ассоциирован с улучшением памяти и исполнительных функций и связан с лучшим функционированием префронтальной коры и гиппокампа (Papassotiropoulos et al., 2006; Zhang et al., 2009), мы предположили, что подобная связь может существовать и в отношении улучшения пространственного мышления у психически здоровых индивидов.

Помимо генетического компонента, индивидуальные вариации в пространственных способностях могут быть обусловлены особенностями микро- и макроокружения в онтогенезе, включая половую принадлежность (Laue et al., 2019). В связи с этим целью настоящего исследования является: 1) оценка основного эффекта полиморфных вариантов генов, участвующих в регуляции нейрогенеза и синаптической пластичности; 2) оценка ген-средовых взаимодействий в формировании индивидуальных особенностей пространственного мышления у индивидов без когнитивных нарушений.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 1011 психически здоровых индивидов (80 % женщин) – студенты вузов Республики Башкортостан и Удмуртской Республики (средний возраст 19.79 ± 1.69 года), из них: русских – 535, татар – 231, удмуртов – 160, индивидов смешанной этнической принадлежности – 85. Все добровольцы отрицали у себя отягощенную наследственность по психическим заболеваниям и не состояли на учете у психиатра и нарколога.

Оценка пространственных способностей проводилась в 2017–2019 гг. с помощью батареи тестовых заданий, оцениваемых как число правильных ответов на вопросы о вращении 3D фигур (shape rotation), которая была реализована в цифровом формате на психодиагностической платформе Российской академии образования. Все включенные индивиды прошли также анкетирование, учитывающее этническую принадлежность до трех поколений и ряд вопросов социального характера: особенности детско-родительских отношений (стиль родительского воспита-

ния, эпизоды плохого обращения в детстве, воспитание в полной/неполной семье), уровень доходов семьи, возраст матери и отца при рождении ребенка, вес ребенка при рождении, место воспитания, число детей в семье и порядок рождения, знание своего родного языка (билингвизм), наличие хронических заболеваний и табакокурения. Место воспитания (городская/сельская местность) определялось на основании численности населенного пункта, согласно (Kazantseva et al., 2020): к сельской местности были отнесены демографические единицы численностью менее 50000 человек. Все респонденты заполнили добровольное согласие на участие в исследовании. Исследование было одобрено биоэтическим комитетом Института биохимии и генетики УФИЦ РАН.

Сбор биологического материала осуществлялся в 2017–2019 гг. с последующим выделением ДНК из лимфоцитов периферической крови. Генотипирование 10 полиморфных локусов генов *NGF* (rs6330), *NRXN1* (rs1045881, rs4971648), *KIBRA* (rs17070145), *NRG1* (rs6994992), *BDNF* (rs6265), *GRIN2B* (rs3764030), *APOE* (rs7412, rs429358), *SNAP25* (rs363050) выполнялось методом ПЦР в реальном времени с использованием наборов KASP (LGC Genomics, Великобритания) на амплификаторе CFX96 (BioRad, США) с возможностью проведения анализа флуоресценции по конечной точке. Генотипы в гене *APOE* были сгруппированы на основании наличия аллелей $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$.

Количественные данные проверяли на подчинение закону распределения Гаусса с помощью *W*-теста Шапиро–Уилка ($p > 0.05$). Основной эффект полиморфных локусов оценивали с помощью множественного линейного регрессионного анализа. Были проанализированы различные статистические модели (аддитивная, доминантная, рецессивная) в программе PLINK v.1.09, при этом половая, этническая принадлежность и наличие аллеля *APOE* $\epsilon 4$ были включены в качестве независимых переменных наряду с генотипами (формула (1)). В модель линейной регрессии для оценки ген-средовых взаимодействий также были включены изученные социодемографические параметры и генотипы в качестве независимых переменных, согласно формуле (2):

$$Y_{(G)} = k + \beta_1 \text{COV}_1 + \beta_2 \text{COV}_2 + \beta_3 \text{COV}_3 + \beta_4 x_4, \quad (1)$$

$$Y_{(G \times E)} = k + \beta_1 \text{COV}_1 + \beta_2 \text{COV}_2 + \beta_3 \text{COV}_3 + \beta_4 x_4 + \beta_5 \text{COV}_5 + \beta_6 x_4 \text{COV}_5, \quad (2)$$

где Y – показатель пространственного мышления; k – константа; β_1, \dots, β_6 – коэффициенты регрессии; COV_1 – половая принадлежность; COV_2 – этническая принадлежность; COV_3 – наличие/отсутствие аллеля *APOE* $\epsilon 4$; x_4 – наличие минорного аллеля анализируемого локуса в случае доминантной модели (число копий минорного аллеля – для аддитивной модели); COV_5 – средовой фактор; $x_4 \text{COV}_5$ – эффект взаимодействия аллеля и средового фактора.

В случае выявления статистически значимой модели ген-средового взаимодействия проводился стратификационный анализ между группами, разделенными как по средовому, так и по генетическому компоненту (SPSS 23.0). Для коррекции на множественность сравнений была осуществлена процедура FDR (PLINK v.1.09).

Результаты

В настоящей работе распределение частот аллелей и генотипов изученных полиморфных локусов генов соответствовало распределению Харди–Вайнберга (см. таблицу). Последующий множественный линейный регрессионный анализ, проведенный в общей выборке с включением половой, этнической принадлежности и наличия «рискового» аллеля *APOE* $\epsilon 4$ в качестве ковариат, продемонстрировал ассоциацию аллеля Т полиморфного локуса rs17070145 в гене *KIBRA* с более высоким уровнем пространственного мышления ($\beta = 1.32$; $\beta_{ST} = 0.10$; $p = 0.003$; $p_{FDR} = 0.037$; $r^2 = 0.007$) по сравнению с носителями генотипа rs17070145*CC (в аддитивной модели, см. таблицу).

При моделировании линейной регрессии отдельно в группах женщин, мужчин, носителей и носителей аллеля *APOE* $\epsilon 4$ не выявлено статистически значимого эффекта изученных локусов после коррекции на множественность сравнений ($p_{FDR} > 0.05$, см. таблицу). Средние значения уровня пространственного мышления в зависимости от генотипа полиморфного локуса rs17070145 в гене *KIBRA*

в общей группе и с учетом половой принадлежности и наличия/отсутствия аллеля *APOE* $\epsilon 4$ продемонстрированы на рис. 1.

В результате анализа ген-средовых взаимодействий, учитывающего, наряду с генетическими вариантами, эффект различных социальных параметров, было показано, что табакокурение модулирует ассоциацию локуса rs17070145 в гене *KIBRA* с индивидуальными различиями в пространственных способностях ($\beta = 3.74$; $\beta_{ST} = 0.14$; $p = 0.010$). Для уточнения эффекта статуса курения на уровень когнитивных способностей был проведен стратификационный анализ, который продемонстрировал, что лучшее пространственное мышление характерно для носителей аллеля rs17070145*Т, заявивших о табакокурении, по сравнению с теми, кто отрицал у себя наличие такого поведения ($\beta = 4.59$; $\beta_{ST} = 0.22$; $r^2 = 0.003$; $p_{FDR} = 0.004$) (рис. 2, а). Кроме того, модель, включавшая в себя варианты гена *APOE* и место воспитания в детстве, также достигла уровня статистической значимости ($\beta = -6.94$; $\beta_{ST} = -0.23$; $p = 0.0002$). Причем наилучший уровень

Изученные полиморфные локусы, тест Харди–Вайнберга и результаты линейного регрессионного анализа ассоциации генов с пространственными способностями (аддитивная модель) в общей группе и подгруппах

Ген	SNP	Аллели ^а	MAF	p_{HWE}	Общая выборка		Женщины		Мужчины		<i>APOE</i> $\epsilon 4+$		<i>APOE</i> $\epsilon 4-$	
					β_{ST}	p	β_{ST}	p	β_{ST}	p	β_{ST}	p	β_{ST}	p
<i>NGF</i>	rs6330	A/G	0.400	0.056	-0.01	0.582	0.01	0.677	-0.14	0.056	0.01	0.846	-0.01	0.835
<i>NRXN1</i>	rs1045881	T/C	0.176	0.446	-0.04	0.216	-0.05	0.200	-0.01	0.868	-0.08	0.213	-0.01	0.851
	rs4971648	C/T	0.223	0.053	0.01	0.813	0.02	0.648	-0.03	0.711	-0.05	0.467	0.01	0.715
<i>NRG1</i>	rs6994992	T/C	0.428	0.697	-0.05	0.168	-0.04	0.288	-0.08	0.327	-0.15	0.027 ^f	-0.02	0.604
<i>BDNF</i>	rs6265	A/G	0.146	0.248	0.01	0.890	0.01	0.857	0.01	0.949	0.07	0.325	-0.01	0.790
<i>GRIN2B</i>	rs3764030	T/C	0.224	0.359	0.08	0.019 ^b	0.07	0.079	0.13	0.083	0.13	0.049	0.06	0.137
<i>APOE</i>	rs7412	$\epsilon 4+$	0.134	0.825	-0.12	0.337	-0.32	0.036 ^d	0.29	0.211	-	-	-	-
	rs429358	$\epsilon 2+$	0.079	0.359	-0.02	0.468	-0.02	0.608	-0.07	0.399	-	-	-	-
<i>SNAP25</i>	rs363050	G/A	0.442	0.897	0.01	0.801	0.02	0.679	-0.02	0.789	0.01	0.914	0.01	0.875
<i>KIBRA</i>	rs17070145	T/C	0.431	0.055	0.10	0.003^c	0.09	0.022 ^e	0.15	0.057	0.15	0.0339	0.08	0.036 ^h

Примечание. MAF – частота минорного аллеля; p_{HWE} – p -value для теста Харди–Вайнберга; β_{ST} – стандартизованный коэффициент регрессии; p – p -value для теста Вальда (Wald test). Статистически значимые различия (после FDR-коррекции) выделены жирным шрифтом. ^а минорный/мажорный аллели; ^b $p_{FDR} = 0.098$; ^c $p_{FDR} = 0.037$; ^d $p_{FDR} = 0.183$; ^e $p_{FDR} = 0.183$; ^f $p_{FDR} = 0.164$; ^g $p_{FDR} = 0.164$; ^h $p_{FDR} = 0.368$.

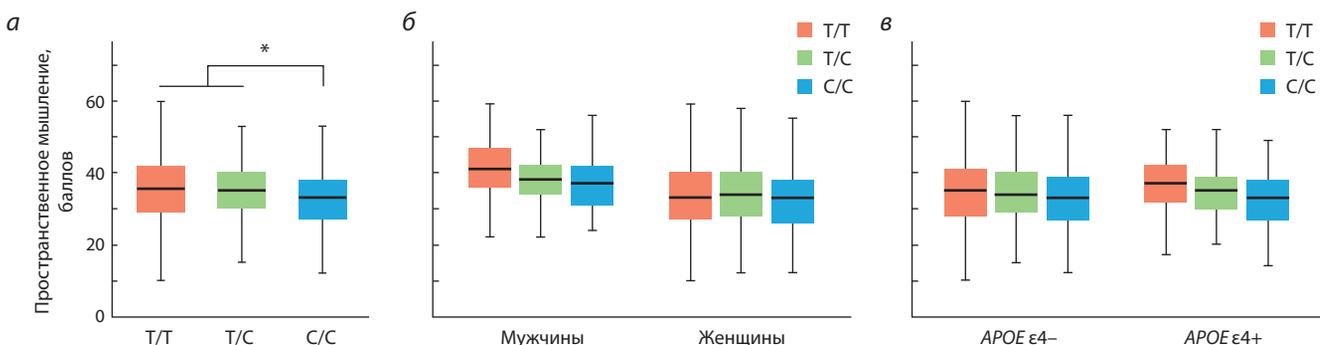


Рис. 1. Средние значения уровня пространственного мышления в зависимости от генотипа полиморфного локуса rs17070145 в гене *KIBRA* в общей группе (а) и с учетом половой принадлежности (б) и наличия/отсутствия аллеля *APOE* $\epsilon 4$ (в).

Статистически значимые различия в уровне пространственных способностей между группами отмечены скобками (* $p_{FDR} < 0.05$).

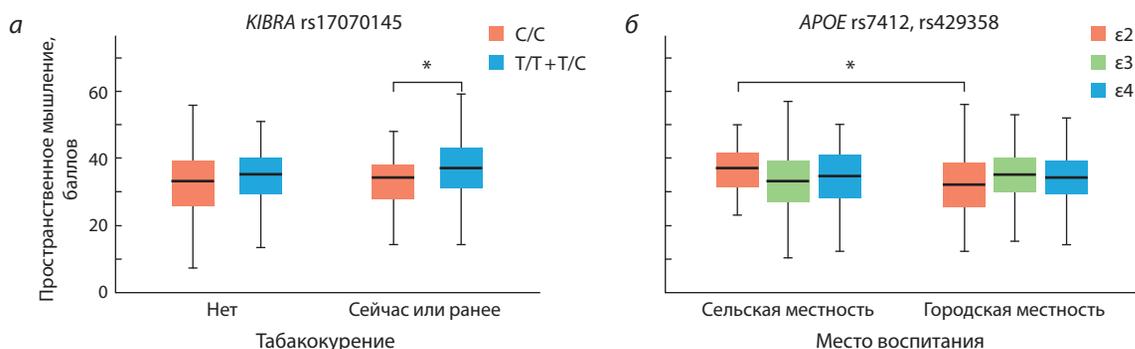


Рис. 2. Результаты анализа ген-средовых взаимодействий, демонстрирующие модулирующий эффект (а) табакокурения на ассоциацию полиморфного варианта rs17070145 в гене *KIBRA*, (б) места воспитания на ассоциацию вариантов гена *APOE* с уровнем пространственного мышления.

Статистически значимые различия в уровне пространственных способностей между группами отмечены скобками (* $p_{FDR} < 0.05$).

пространственных способностей был обнаружен у носителей «благоприятного» аллеля *APOE* $\epsilon 2$, воспитанных в сельской местности, по сравнению с теми, кто провел свое детство в городских условиях ($\beta = -6.04$; $\beta_{ST} = -0.25$; $r^2 = 0.06$; $p_{FDR} = 0.021$) (см. рис. 2, б).

Обсуждение

Поскольку ранее была продемонстрирована необходимость включения в оцениваемые статистические модели известного фактора риска формирования когнитивного дефицита (аллеля $\epsilon 4$ в гене *APOE*) (Porter et al., 2018; Li X. et al., 2019), в настоящей работе осуществлялась проверка гипотез как в общей выборке (с включением этого «рискового» аллеля в модель линейной регрессии как ковариаты), так и в выборках, разделенных на основании носительства аллеля *APOE* $\epsilon 4$. Предыдущие исследования свидетельствуют о том, что у индивидов без когнитивного дефицита, содержащих в своем геноме аллель *APOE* $\epsilon 4$ (связанный с накоплением А β -амилоида), наблюдалась большая скорость снижения вербальной эпизодической памяти и гипотрофии гиппокампа в случае присутствия генотипа rs17070145*CC в гене *KIBRA* по сравнению с носителями минорного аллеля Т (Porter et al., 2018). В нашем исследовании при анализе индивидов возрастной группы 18–25 лет без когнитивных нарушений не обнаружено существенного эффекта наличия аллеля *APOE* $\epsilon 4$ на ассоциацию вариантов гена *KIBRA* с уровнем пространственных способностей. Тем не менее мы включили данный «рисковый» аллель в гене *APOE* в качестве независимой переменной в модель множественной регрессии. В результате нами впервые был продемонстрирован позитивный эффект полиморфного варианта rs17070145*Т в гене *KIBRA* на формирование более высокого уровня пространственного мышления у лиц без когнитивного дефицита, что в определенной мере согласуется с данными, полученными другими научными группами у психически здоровых лиц без когнитивных нарушений (Schuck et al., 2013; Porter et al., 2018).

Выявленный нами эффект подтверждается результатами функциональных исследований, в которых было показано, что полиморфный вариант rs17070145 в гене *KIBRA* связан с объемом серого вещества в префронтальной коре и парагиппокампальной извилине у лиц пожилого

возраста (Li R. et al., 2020). В частности, количество серого вещества, по результатам воксель-ориентированной морфометрии, снижено у носителей аллеля rs17070145*С по сравнению с носителями генотипа rs17070145*ТТ как у лиц зрелого возраста (Li R. et al., 2020), так и у более молодых индивидов (Wang et al., 2013), что, в свою очередь, отражается на улучшении когнитивного функционирования у носителей минорного аллеля Т. Интересно, что у лиц молодого возраста в случае наличия аллеля С, связанного со снижением серого вещества, наблюдается компенсаторный эффект посредством усиления синхронизации между отделами головного мозга, участвующими в регуляции исполнительного контроля (Wang et al., 2013). Полученные нами результаты могут быть объяснены высоким уровнем долговременной потенциации в гиппокампе и связанным с этим значительным уровнем когнитивного функционирования в случае увеличения экспрессии гена *KIBRA* (Heitz et al., 2016), что, возможно, обусловлено наличием аллеля rs17070145*Т. С другой стороны, изученный локус rs17070145 может находиться в неравновесии по сцеплению с другими функциональными вариантами (приводящими к возникновению миссенс-мутаций rs3822660G/Т или M734I, rs3822659T/G или S735A), локализованными в экзоне 15 гена *KIBRA*, которые опосредуют дифференциальное Ca²⁺-зависимое связывание C2-домена белка с фосфатидилинозитолами, участвуя, таким образом, в регуляции клеточных путей (Duning et al., 2013).

Ученые приходят к выводу, что противоречивость опубликованных данных в отношении локуса rs17070145 в гене *KIBRA*, скорее всего, объясняется особенностями когнитивного статуса исследуемой выборки, а также демографическими параметрами, включая возраст (Zhang et al., 2009; Li X. et al., 2019). В этой связи мы проанализировали различные регрессионные модели, которые включали средовые факторы. Одним из интересных результатов, полученных в нашей работе, является эффект табакокурения, который модулирует ассоциацию аллельного варианта в гене *KIBRA* с уровнем пространственного мышления. Другой исследовательской группе также удалось выявить, что меньшее количество постоянных ошибок в когнитивных тестах наблюдалось у лиц с никотиновой зависимостью из европейских популяций, по сравнению

с теми, кто злоупотреблял табакокурением в прошлом, но только при наличии у них аллеля rs17070145*Т в гене *KIBRA* (Zhang et al., 2009). Примечательно, что в нашем исследовании при включении в модель линейной регрессии взаимодействия параметров (генотипа *KIBRA* rs17070145 и «статуса курения») тоже была обнаружена ассоциация минорного аллеля Т с более высокими способностями к мысленному вращению предметов, которая наблюдалась у индивидов, заявивших о табакокурении, по сравнению с теми, кто отрицал у себя наличие такого поведения. Таким образом, предполагается, что никотин оказывает позитивный эффект на когнитивные способности (включая исполнительные функции, внимание) у индивидов с аллелем Т (Zhang et al., 2009). Согласно результатам наших предыдущих работ, никотин может выступать в качестве модулятора генетической ассоциации индивидуальных когнитивных и психологических особенностей в выборке здоровых индивидов (Davydova et al., 2020), что может быть связано с изменением эпигенетического профиля в изученных генах под действием никотина.

Несмотря на то что многочисленные работы свидетельствуют об ассоциации «рискового» аллеля *APOE* ε4 с развитием когнитивного дефицита и болезни Альцгеймера, снижением объема серого вещества в гиппокампе (Porter et al., 2018; Li X. et al., 2019), ухудшением пространственного мышления (Laczo et al., 2020), нами не был идентифицирован основной эффект аллельных вариантов гена *APOE* на формирование особенностей пространственного мышления у психически здоровых индивидов без когнитивных нарушений. Ранее предпринимались попытки оценить совместный эффект аллеля *APOE* ε4 и средовых факторов (табакокурения, физической активности, наличия лишнего веса, уровня образования) на уровень когнитивных характеристик у индивидов 40–79 лет, которые не обнаружили значимых моделей ген-средовых взаимодействий (Rodriguez et al., 2018). Тем не менее проведенный нашей научной группой анализ ген-средовых взаимодействий позволил выявить вовлеченность аллельных вариантов гена *APOE* в развитие пространственного мышления в зависимости от места воспитания индивида (городской/сельской местности). Наилучший уровень пространственных способностей был характерен для индивидов – носителей «благоприятного» аллеля *APOE* ε2, воспитанных в сельской местности, по сравнению с теми, кто провел свое детство в городских условиях. Таким образом, на основании полученных нами данных можно предположить неблагоприятный эффект воспитания в городской местности, который проявляется даже в случае наличия «благоприятного» аллеля *APOE* ε2, связанного с увеличением нейрональной активности (Davis et al., 2020).

В опубликованных данных других научных групп также наблюдалась корреляция между отсутствием когнитивного дефицита в зрелом возрасте и доступом к «озелененным» территориям в детстве, причем этот эффект был характерен для лиц, не имеющих аллель *APOE* ε4 (Cherrie et al., 2018). Интересно, что наличие «озелененной» инфраструктуры в ближайшей доступности оказывало положительное влияние на улучшение памяти и внимания у детей школьного возраста даже за один год (Dadvand et al., 2015), а долговременное проживание в озелененной

местности коррелировало с увеличением объема серого вещества в префронтальной коре головного мозга, объясняя, таким образом, улучшение когнитивных функций (Dadvand et al., 2018). Объяснений такому наблюдению может быть несколько. Во-первых, проживание в урбанизированной местности связано с более высоким содержанием экополлютантов и ксенобиотиков, что приводит к нарушению регуляции различных нейромедиаторных систем мозга (Dadvand et al., 2018). Во-вторых, известно о существовании различий в степени латерализации функций, особенностях речевого развития и протекания зрительно-пространственных процессов в зависимости от проживания в городской/сельской местности в детстве (Поляков, 2008). В частности, для сельской популяции характерно форсированное развитие правополушарных структур мозга, тогда как городские школьники демонстрируют преимущественное развитие функциональных систем левого полушария, что выражается в особенностях их когнитивной деятельности. В-третьих, позитивный эффект воспитания в сельской местности на когнитивные характеристики может быть связан с особенностями питания, причем только в случае отсутствия в геноме «неблагоприятного» *APOE* ε4 аллеля, что было обнаружено ранее другими авторами (Martínez-Lapiscina et al., 2014). С одной стороны, употребление детьми, выросшими в малых населенных пунктах, более экологичных, доступных фермерских продуктов и больший уровень их физической активности (например, помощь старшим членам семьи на приусадебных участках), с другой, могут способствовать «проявлению» положительного эффекта аллеля ε2 на уровень пространственного мышления. В-четвертых, как следствие воспитания в сельской местности, дети могут получить «благоприятный» состав микробиоты кишечника, который, как показали научные результаты последних лет (Mancabelli et al., 2017), оказывает прямое воздействие на работу головного мозга посредством функционирования оси «мозг–микробиом кишечника».

В то же время урбанизация населения сопровождается увеличением риска развития психических и когнитивных нарушений вследствие снижения воздействия макро- и микроорганизмов, приводя к нарушению иммунорегуляции. Это, в свою очередь, может выражаться в увеличенном воспалительном ответе организма на психологические стрессоры, связанном с проживанием в высокотехнологичном обществе по сравнению с малыми территориальными единицами (Rook et al., 2013). Кроме того, влияние места проживания на уровень когнитивного функционирования может быть обусловлено излишним уровнем стресса, характерным для проживания в городской местности и коррелирующим с повышенным уровнем кортизола. В одной из работ сообщалось о наличии взаимодействия между уровнем кортизола и присутствием в геноме «рискового» аллеля *APOE* ε4, что приводило к снижению когнитивного функционирования (Lee et al., 2008).

Таким образом, продемонстрированный нами эффект ген-средовых взаимодействий, оказывающих влияние на особенности развития пространственного мышления, позволяет предположить, что положительный эффект наличия аллеля *APOE* ε2 на когнитивные способности может проявляться только в случае воспитания в малых

населенных пунктах, что, вероятно, оказывает благоприятное воздействие на протекание нейрональных процессов.

Несмотря на возможный эффект эпистатических или аддитивных взаимодействий генов, участвующих в регуляции нейрогенеза и синаптической пластичности (Wang et al., 2019), мы не выявили ни основной, ни эпистатический эффект генов *BDNF*, *NGF*, *NRXN1*, *NRG1*, *SNAP25*, *GRIN2B* в формировании индивидуальных особенностей в пространственных способностях. Другие работы также продемонстрировали отсутствие ассоциации вариантов генов регуляции нейрогенеза (*APOE*, *SORL1*, *BDNF*, *TOMM40*, *KIBRA*, *COMT*) с уровнем пространственных способностей у индивидов 40–60 лет (Korthauer et al., 2018). Согласно нашим предыдущим исследованиям, ряд генов, участвующих в регуляции синаптической пластичности, включая гены *SNAP25*, *NRXN1*, *NRG1*, оказывается вовлеченным в формирование индивидуальных различий в уровне таких когнитивных характеристик, как математические способности (Казанцева и др., 2020) и объем рабочей памяти (Еникеева и др., 2017). Высказанное в настоящей работе предположение об ассоциации аллельных вариантов генов, участвующих в нейрогенезе, в формировании пространственного мышления, не было подтверждено.

Заключение

В ходе междисциплинарного исследования был обнаружен основной эффект гена *KIBRA* на формирование особенностей пространственного мышления у индивидов без когнитивных нарушений, причем наличие табакокурения у респондентов оказывало позитивный модулирующий эффект на улучшение исследованного типа когнитивных способностей у носителей минорного аллеля rs17070145*Т. Следует отметить, что нами был подтвержден «протективный» эффект аллеля *APOE* ε2 на улучшение когнитивного функционирования, который проявлялся только при сочетании такого благоприятного параметра, как воспитание в сельской местности в детстве. Полученные результаты согласуются с ранее высказанными представлениями о связи минорного аллеля rs17070145*Т в гене *KIBRA* с улучшением когнитивных функций и впервые свидетельствуют о вовлеченности данного генетического варианта в развитие особенностей пространственного мышления.

Настоящее исследование имеет ряд преимуществ, включая большой объем выборки одного возраста, коррекцию на половую и этническую принадлежность, наличие «рискового» аллеля гена *APOE* (предусматривающее включение данных параметров в модель множественной линейной регрессии). Анализируемая выборка была собрана до пандемии COVID-19. Это позволило избежать возможного воздействия вируса SARS-CoV-2 на нервную систему и когнитивные функции, что неоднократно было продемонстрировано (Fotuhi et al., 2020).

Список литературы / References

Еникеева Р.Ф., Лобаскова М.М., Казанцева А.В., Романова А.Р., Карунас А.С., Малых С.Б., Хуснутдинова Э.К., Тихомирова Т.Н. Роль генов регуляции синаптической пластичности в формировании индивидуальных различий в объеме рабочей памяти. *Теорет. и эксперимент. психология*. 2017;10(4):6-15.

- [Enikeeva R.F., Lobaskova M.M., Kazantseva A.V., Romanova A.R., Karunas A.A., Malykh S.B., Khusnutdinova E.K., Tikhomirova T.N. The role of synaptic plasticity genes in individual differences in working memory. *Teoreticheskaya i Experimental'naya Psikhologiya = Theoretical and Experimental Psychology*. 2017;10(4):6-15. (in Russian)]
- Казанцева А.В., Еникеева Р.Ф., Романова А.Р., Малых С.Б., Галютдинова С.И., Хуснутдинова Э.К. Взаимосвязь стресс-обусловленного когнитивного функционирования с вариантами генов регуляции синаптической пластичности. *Генетика*. 2020; 56(1):98-106. DOI 10.31857/S0016675820010063.
- [Kazantseva A.V., Enikeeva R.F., Romanova A.R., Malykh S.B., Galyautdinova S.I., Khusnutdinova E.K. Stress-associated cognitive functioning is controlled by variations in synaptic plasticity genes. *Russ. J. Genet.* 2020;56(1):88-95. DOI 10.1134/S10227954 20010068.]
- Поляков В.М. Развитие высших психических процессов в городской и сельской популяциях детей. *Культ.-ист. психология*. 2008;4(1):9-16.
- [Polyakov V.M. Development of higher mental processes in urban and rural children. *Kul'turno-istoricheskaya Psikhologiya = Cultural-Historical Psychology*. 2008;4(1):9-16. (in Russian)]
- Тахирова З.Р., Казанцева А.В., Еникеева Р.Ф., Вартанян Г.А., Солдатова Е.Л., Завьялова И.Ю., Малых А.С., Давыдова Ю.Д., Валиев Р.Р., Нургалиева А.Х., Хамета Я.А., Хуснутдинова Э.К., Малых С.Б. Психогенетика пространственных способностей человека. *Рос. психол. журн.* 2021;18(2):67-93. DOI 10.21702/rpj.2021.2.5.
- [Takhirova Z.R., Kazantseva A.V., Enikeeva R.F., Vartanyan G.A., Soldatova E.L., Zavyalova I.Yu., Malykh A.S., Davydova Yu.D., Valiev R.R., Nurgalieva A.Kh., Khameta Ya.A., Khusnutdinova E.K., Malykh S.B. Psychogenetics of human spatial abilities. *Rossiyskiy Psikhologicheskii Zhurnal = Russian Psychological Journal*. 2021; 18(2):67-93. DOI 10.21702/rpj.2021.2.5. (in Russian)]
- Cherrie M.P.C., Shortt N.K., Mitchell R.J., Taylor A.M., Redmond P., Thompson C.W., Starr J.M., Deary I.J., Pearce J.R. Green space and cognitive ageing: a retrospective life course analysis in the Lothian Birth Cohort 1936. *Soc. Sci. Med.* 2018;196:56-65. DOI 10.1016/j.socscimed.2017.10.038.
- Dadvand P., Nieuwenhuijsen M.J., Esnaola M., Forns J., Basagaña X., Alvarez-Pedrerol M., Rivas I., López-Vicente M., De Castro Pascual M., Su J., Jerrett M., Querol X., Sunyer J. Green spaces and cognitive development in primary schoolchildren. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015;112(26):7937-7942. DOI 10.1073/pnas.1503402112.
- Dadvand P., Pujol J., Macià D., Martínez-Vilavella G., Blanco-Hinojo L., Mortamais M., Alvarez-Pedrerol M., Fenoll R., Esnaola M., Dalmau-Bueno A., López-Vicente M., Basagaña X., Jerrett M., Nieuwenhuijsen M.J., Sunyer J. The association between lifelong greenspace exposure and 3-dimensional brain magnetic resonance imaging in Barcelona schoolchildren. *Environ. Health Perspect.* 2018;126(2):027012. DOI 10.1289/EHP1876.
- Davis A.A., Inman C.E., Wargel Z.M., Dube U., Freeberg B.M., Galluppi A., Haines J.N., Dhavale D.D., Miller R., Choudhury F.A., Sullivan P.M., Cruchaga C., Perlmutter J.S., Ulrich J.D., Benitez B.A., Kotzbauer P.T., Holtzman D.M. APOE genotype regulates pathology and disease progression in synucleinopathy. *Sci. Transl. Med.* 2020;12(529):eaay3069. DOI 10.1126/scitranslmed.aay3069.
- Davydova Yu.D., Kazantseva A.V., Enikeeva R.F., Mustafin R.N., Enikeeva R.F., Lobaskova M.M., Malykh S.B., Gilyazova I.R., Khusnutdinova E.K. The role of oxytocin receptor (*OXT*) gene polymorphisms in the development of aggressive behavior in healthy individuals. *Russ. J. Genet.* 2020;56(9):1129-1138. DOI 10.1134/S1022795420090057.
- Duning K., Wennmann D.O., Bokemeyer A., Reissner C., Werschling H., Thomas C., Buschert J., Guske K., Franke V., Flöel A., Lohmann H., Knecht S., Brand S.M., Pöter M., Rescher U., Missler M., Seelheim P., Pröpfer C., Boeckers T.M., Makuch L.,

- Huganir R., Weide T., Brand E., Pavenstädt H., Kremerskothén J. Common exonic missense variants in the C2 domain of the human *KIBRA* protein modify lipid binding and cognitive performance. *Transl. Psychiatry*. 2013;3(6):e272. DOI 10.1038/tp.2013.49.
- Fotuhi M., Mian A., Meysami S., Raji C.A. Neurobiology of COVID-19. *J. Alzheimers Dis.* 2020;76(1):3-19. DOI 10.3233/JAD-200581.
- Heitz F.D., Farinelli M., Mohanna S., Kahn M., Duning K., Frey M.C., Pavenstädt H., Mansuy I.M. The memory gene *KIBRA* is a bidirectional regulator of synaptic and structural plasticity in the adult brain. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2016;135:100-114. DOI 10.1016/j.nlm.2016.07.028.
- Kazantseva A.V., Davydova Yu.D., Enikeeva R.F., Lobaskova M.M., Mustafin R.N., Malykh S.B., Takhirova Z.R., Khusnutdinova E.K. *AVPR1A* main effect and *OXTR*-by-environment interplay in individual differences in depression level. *Heliyon*. 2020;6(10):e05240. DOI 10.1016/j.heliyon.2020.e05240.
- Korthauer L.E., Awe E., Frahmnd M., Driscoll I. Genetic risk for age-related cognitive impairment does not predict cognitive performance in middle age. *J. Alzheimers Dis.* 2018;64(2):459-471. DOI 10.3233/JAD-171043.
- Laczó J., Cechova K., Parizkova M., Lerch O., Andel R., Matoska V., Kaplan V., Matuskova V., Nedelska Z., Vyhnaek M., Hort J. The combined effect of *APOE* and *BDNF* Val66Met polymorphisms on spatial navigation in older adults. *J. Alzheimers Dis.* 2020;78(4):1473-1492. DOI 10.3233/JAD-200615.
- Lauer J.E., Yhang E., Lourenco S.F. The development of gender differences in spatial reasoning: a meta-analytic review. *Psychol. Bull.* 2019;145(6):537-565. DOI 10.1037/bul0000191.
- Laukka E.J., Köhncke Y., Papenberg G., Fratiglioni L., Bäckman L. Combined genetic influences on episodic memory decline in older adults without dementia. *Neuropsychology*. 2020;34(6):654-666. DOI 10.1037/neu0000637.
- Lee B.K., Glass T.A., Wand G.S., McAtee M.J., Bandeen-Roche K., Bolla K.I., Schwartz B.S. Apolipoprotein E genotype, cortisol, and cognitive function in community-dwelling older adults. *Am. J. Psychiatry*. 2008;165(11):1456-1464. DOI 10.1176/appi.ajp.2008.07091532.
- Li R., Wan W., Li J. *KIBRA* polymorphism modulates gray matter volume to influence cognitive ability in the elderly. *Brain Imaging Behav.* 2020;14(5):1388-1394. DOI 10.1007/s11682-019-00047-1.
- Li X., Hildebrandt A., Sommer W., Wilhelm O., Reuter M., Montag C., Zhou C. Cognitive performance in young *APOE* $\epsilon 4$ carriers: a latent variable approach for assessing the genotype-phenotype relationship. *Behav. Genet.* 2019;49(5):455-468. DOI 10.1007/s10519-019-09961-y.
- Ling J., Huang Y., Zhang L., Wei D., Cheng W. Association of *KIBRA* polymorphism with risk of Alzheimer's disease: evidence based on 20 case-control studies. *Neurosci. Lett.* 2018;662:77-83. DOI 10.1016/j.neulet.2017.08.057.
- Malanchini M., Rimfeld K., Shakeshaft N.G., McMillan A., Schofield K.L., Rodic M., Rossi V., Kovas Y., Dale P.S., Tucker-Drob E.M., Plomin R. Evidence for a unitary structure of spatial cognition beyond general intelligence. *NPJ Sci. Learn.* 2020;5:9. DOI 10.1038/s41539-020-0067-8.
- Mancabelli L., Milani C., Lugli G.A., Turrone F., Ferrario C., van Sinderen D., Ventura M. Meta-analysis of the human gut microbiome from urbanized and pre-agricultural populations. *Environ. Microbiol.* 2017;19(4):1379-1390. DOI 10.1111/1462-2920.13692.
- Martínez-Lapiscina E.H., Galbete C., Corella D., Toledo E., Buil-Cosiales P., Salas-Salvado J., Ros E., Martínez-González M.A. Genotype patterns at *CLU*, *CRI*, *PICALM* and *APOE*, cognition and Mediterranean diet: the PREDIMED-NAVARRA trial. *Genes Nutr.* 2014;9(3):393. DOI 10.1007/s12263-014-0393-7.
- Mustafin R.N., Kazantseva A.V., Enikeeva R.F., Malykh S.B., Khusnutdinova E.K. Longitudinal genetic studies of cognitive characteristics. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(1):87-95. DOI 10.18699/VJ20.599.
- Nagy-Kondor R. Spatial ability: measurement and development. In: Khine M.S. (Ed.) *Visual-Spatial Ability in STEM Education: Transforming research into practice*. Cham: Springer Int. Publ., 2017; 35-58. DOI 10.1007/978-3-319-44385-0_3.
- Papassotiropoulos A., Stephan D.A., Huentelman M.J., Hoernndli F.J., Craig D.W., Pearson J.V., Huynh K.-D., Brunner F., Corneveaux J., Osborne D., Wollmer M.A., Aerni A., Coluccia D., Hänggi J., Mondadori C.R.A., Buchmann A., Reiman E.M., Caselli R.J., Henke K., de Quervain D.J.-F. Common *Kibra* alleles are associated with human memory performance. *Science*. 2006;314:475-478. DOI 10.1126/science.1129837.
- Porter T., Burnham S.C., Doré V., Savage G., Bourgeat P., Begeham K., Milicic L., Ames D., Bush A.I., Maruff P., Masters C.L., Rowe C.C., Rainey-Smith S., Martins R.N., Groth D., Verdile G., Villemagne V.L., Laws S.M. *KIBRA* is associated with accelerated cognitive decline and hippocampal atrophy in *APOE* $\epsilon 4$ -positive cognitively normal adults with high $A\beta$ -amyloid burden. *Sci. Rep.* 2018;8:2034. DOI 10.1038/s41598-018-20513-y.
- Rodriguez F.S., Schroeter M.L., Arélin K., Witte A.V., Baber R., Burkhardt R., Engel C., Löffler M., Thiery J., Villringer A., Luck T., Riedel-Heller S.G. *APOE* $\epsilon 4$ -genotype and lifestyle interaction on cognitive performance: results of the LIFE-Adult-study. *Health Psychol.* 2018;37(2):194-205. DOI 10.1037/hea0000515.
- Rook G.A., Lowry C.A., Raison C.L. Microbial 'Old Friends', immunoregulation and stress resilience. *Evol. Med. Public Health*. 2013; 2013(1):46-64. DOI 10.1093/emph/eot004.
- Schuck N.W., Doeller C.F., Schjeide B.M., Schröder J., Fensch P.A., Bertram L., Li S.C. Aging and *KIBRA*/*WWC1* genotype affect spatial memory processes in a virtual navigation task. *Hippocampus*. 2013;23(10):919-930. DOI 10.1002/hipo.22148.
- Tucker-Drob E.M., Brandmaier A.M., Lindenberger U. Coupled cognitive changes in adulthood: a meta-analysis. *Psychol. Bull.* 2019; 145(3):273-301. DOI 10.1037/bul0000179.
- Wang D., Hu L., Xu X., Ma X., Li Y., Liu Y., Wang Q., Zhuo C. *KIBRA* and *APOE* gene variants affect brain functional network connectivity in healthy older people. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2019;74(11):1725-1733. DOI 10.1093/gerona/glz004.
- Wang D., Liu B., Qin W., Wang J., Zhang Y., Jiang T., Yu C. *KIBRA* gene variants are associated with synchronization within the default-mode and executive control networks. *Neuroimage*. 2013;69:213-222. DOI 10.1016/j.neuroimage.2012.12.022.
- Zhang H., Kranzler H.R., Poling J., Gruen J.R., Gelernter J. Cognitive flexibility is associated with *KIBRA* variant and modulated by recent tobacco use. *Neuropsychopharmacology*. 2009;34(12):2508-2516. DOI 10.1038/npp.2009.80.

ORCID ID

A.V. Kazantseva orcid.org/0000-0002-3744-8058
R.F. Enikeeva orcid.org/0000-0002-4301-5283
Yu.D. Davydova orcid.org/0000-0003-3508-4710
R.N. Mustafin orcid.org/0000-0002-4091-382X

Z.R. Takhirova orcid.org/0000-0003-3609-1971
S.B. Malykh orcid.org/0000-0002-3786-7447
M.M. Lobaskova orcid.org/0000-0003-0318-6480
T.N. Tikhomirova orcid.org/0000-0002-6748-763X
E.K. Khusnutdinova orcid.org/0000-0003-2987-3334

Благодарности. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 17-78-30028) (сбор психологических данных и биологических образцов), мегагранта Правительства РФ (проект № 075-15-2021-595) (статистическая обработка и биоинформатический анализ данных), мегагранта Правительства Республики Башкортостан (генотипирование образцов).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 14.05.2021. После доработки 25.08.2021. Принята к публикации 27.08.2021.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Распространенность полиморфных вариантов генов Н-фиколина (*FCN3*) и маннозосвязывающей лектин-ассоциированной сериновой протеазы-2 (*MASP2*) у коренных популяций российских Арктических территорий

М.В. Смольникова , С.Ю. Терещенко

Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера – обособленное подразделение Федерального исследовательского центра «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», Красноярск, Россия

 smarinv@yandex.ru

Аннотация. Лектины – основные протеины лектинового пути активации системы комплемента, кодируются полиморфными генами, точечные мутации в которых приводят к изменению конформации и экспрессии белка, что в свою очередь отражается на функциональности и способности отвечать на патоген. В настоящем исследовании впервые получены масштабные данные о популяционном распределении частот аллелей генов Н-фиколина *FCN3* rs28357092 и маннозосвязывающей лектин-ассоциированной сериновой протеазы-2 *MASP2* rs72550870 среди коренных народностей российских Арктических территорий (ненцы, долганы, нганасаны, смешанная популяция и русские: общая выборка составила около 1000 новорожденных). Генотипирование осуществлено с использованием ПЦР-РВ. Нами выявлена частота гомозиготного варианта del/del *FCN3* rs28357092, ассоциированного с полным отсутствием наиболее мощного активатора лектинового пути комплемента Н-фиколина: у ненцев 0 %, у долган-нганасан 0.8 %, в то время как среди европеоидов 3.5 % ($p < 0.01$). Анализ распространенности генотипов *MASP2* показал преобладание гомозиготного варианта AA во всех исследованных популяциях, что согласуется с доступными мировыми данными. Гетерозиготный генотип AG rs72550870, ассоциированный со сниженным уровнем протеазы, встречается в единичных случаях у ненцев, долган и нганасан по сравнению с новорожденными европеоидного происхождения г. Красноярска: 0.5 и 3.3 % соответственно. Причем у ненцев был выявлен один носитель AG из 323 обследованных, тогда как у европеоидов – 16 из 242 обследованных новорожденных ($p < 0.001$). Гомозиготный вариант GG, которому сопутствует полное отсутствие протеазы с нарушением связывания MBL и фиколинов, не обнаружен ни у одного из 980 обследованных новорожденных. Дополнительный анализ инфекционной заболеваемости в арктических популяциях позволит выявить фенотипические характеристики, сопряженные с высокой функциональной активностью лектинового пути активации комплемента в роли важнейшего фактора первой линии противоинфекционной защиты, в том числе в отношении новых вирусных заболеваний, таких как COVID-19. Ключевые слова: *FCN3*; *MASP2*; полиморфизм генов; новорожденные; Россия; арктические популяции.

Для цитирования: Смольникова М.В., Терещенко С.Ю. Распространенность полиморфных вариантов генов Н-фиколина (*FCN3*) и маннозосвязывающей лектин-ассоциированной сериновой протеазы-2 (*MASP2*) у коренных популяций российских Арктических территорий. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(8):847-854. DOI 10.18699/VJ21.098

Prevalence of the polymorphic H-ficolin (*FCN3*) genes and mannose-binding lectin-associated serine protease-2 (*MASP2*) in indigenous populations from the Russian Arctic regions

M.V. Smolnikova , S.Yu. Tereshchenko

Scientific Research Institute of Medical Problems of the North – a separate division of the Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center” of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russia

 smarinv@yandex.ru

Abstract. Lectins, being the main proteins of the lectin pathway activating the complement system, are encoded by polymorphic genes, wherein point mutations cause the protein conformation and expression to change, which turns out to have an effect on the functionality and ability to respond to the pathogen. In the current study, large-scale data on the population genotype distribution of the genes for H-ficolin *FCN3* rs28357092 and mannose-binding lectin-associated serine protease *MASP2* rs72550870 among the indigenous peoples of the Russian Arctic regions (Nenets, Dolgans and Nganasans, a mixed population and Russians: a total sample was about 1000 newborns) have been obtained for the first time. Genotyping was carried out using RT-PCR. The frequency of the homozygous variant del/del *FCN3* rs28357092 associated with the total absence of the most powerful activator of the lectin com-

plement pathway, N-ficolin, was revealed; 0 % in the Nenets, 0.8 % in the Dolgans and Nganasans, and 3.5 % among the Russians ($p < 0.01$). Analysis of the prevalence of the *MASP2* genotypes has shown the predominance of the homozygous variant AA in all studied populations, which agrees with the available world data. The heterozygous genotype AG rs72550870 associated with a reduced level of protease was found to occur rarely in the Nenets, Dolgans and Nganasans compared to newborns of Caucasoid origin from Krasnoyarsk: 0.5 % versus 3.3 %, respectively. Moreover, among 323 examined Nenets, one AG carrier was identified, whereas in Russians, 16 out of 242 examined newborns were found to be AG carriers ($p < 0.001$). A homozygous variant (GG) in total absence of protease with impaired binding of both MBL and ficolins was not detected in any of the 980 examined newborns. An additional analysis of infectious morbidity in Arctic populations allows one to find phenotypic characteristics related to a high functional activity of the lectin pathway of complement activation as an most important factor for the first-line of anti-infectious defense, including such new viral diseases as COVID-19.

Key words: *FCN3*; *MASP2*; gene polymorphism; newborns; Russia; Arctic populations.

For citation: Smolnikova M.V., Tereshchenko S.Yu. Prevalence of the polymorphic H-ficolin (*FCN3*) genes and mannose-binding lectin-associated serine protease-2 (*MASP2*) in indigenous populations from the Russian Arctic regions. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(8):847-854. DOI 10.18699/VJ21.098

Введение

Врожденная иммунная система обеспечивает немедленную неспецифическую первую линию защиты посредством гуморальных, клеточных и механических процессов, играя жизненно важную роль при патогенном воздействии (Dunkelberger, Song, 2010). В последние годы в мировой литературе уделяется значительное внимание изучению роли врожденных дефектов системы комплемента (СК) в патогенезе различных заболеваний – от инфекционных до аутоиммунных и кардиометаболических. Так, в документе Европейской ассоциации по изучению иммунодефицитных состояний (European Society for Immunodeficiencies, ESID) от 2020 г., специально посвященном обобщению современного состояния проблемы дефицитов различных компонентов комплемента, утверждается, что на такие врожденные дефекты приходится не менее 5 % от общего числа первичных иммунодефицитов, а многие аспекты их распространенности и патогенеза остаются неизученными (Brodzki et al., 2020).

Плазменные протеины СК взаимодействуют между собой тремя известными путями – лектиновым (наиболее филогенетически древний), альтернативным и классическим. Все три пути комплемента инициируются множеством стимулов независимо друг от друга, и впоследствии протеолитические каскады сводятся к активации основного компонента C3, что приводит к сборке мембрано-атакующего комплекса (Blom et al., 2004). Лектиновый путь (ЛП) может активироваться в отсутствие иммунных комплексов и инициироваться путем связывания молекул суперсемейства паттерн-распознающих рецепторов (лектинов), таких как маннозосвязывающий лектин (MBL), коллектин 11 (CL-K1) или фиколины, с углеводами или ацетилированными остатками, присутствующими на поверхности патогенов или собственных апоптотических/опухолевых клеток (Ali et al., 2012). Циркулирующие MBL, CL-K1 и фиколины образуют комплексы со специфическими сериновыми протеазами (mannose-binding lectin-associated serine protease, MASP).

Помимо активации комплемента, лектины снижают риск инфицирования, стимулируя секрецию интерферона-гамма (IFN- γ), IL-17, IL-6, фактора некроза опухоли-альфа (TNF- α) макрофагами (Ren et al., 2014). У человека описано три вида фиколинов: М-фиколин, кодирующийся геном *FCN1*, L-фиколин (*FCN2*) и Н-фиколин (*FCN3*).

М-фиколин – исключительно тканевая молекула (экспрессируется в легких, моноцитах и селезенке), L-фиколин продуцируется в печени и циркулирует в крови, Н-фиколин экспрессируется в печени и легких. Показано, что в легких в наибольшей степени продуцируется Н-фиколин, а его комплемент-активирующая способность превышает таковую MBL. Фиколин-3 является наиболее распространенной молекулой распознавания лектинового пути. Он высоко экспрессируется в тканях печени и легких, что говорит о его значимости как для активации лектинового пути, так и для защиты легких хозяина (Akaiwa et al., 1999; Hummelshoj et al., 2008). Кроме того, недавно были получены первые свидетельства антимикробной активности фиколина-3 в отношении кишечного комменсальных и условно-патогенных кишечных бактерий *Hafnia alvei* (Michalski et al., 2015). Примечательно, что фиколин-3 устойчив к коллагеназам (тогда как другие фиколины и коллагены нет), и это может отражаться на его антимикробной активности, в том числе в желудочно-кишечном тракте (Hummelshoj et al., 2008).

Описаны различные полиморфные варианты промоторных и структурных регионов генов фиколинов. Ген *FCN3* расположен на хромосоме 1p36.11 и высококонсервативен у человека. Выявлено пять точечных мутаций, ответственных за замены аминокислот, все с частотами аллелей ниже 5 %: p.Leu12Val, p.Leu117fs (известная как +1637delC), p.Thr125Ala, p.Glu166Asp и p.Val287Ala (Hummelshoj et al., 2008). Такой высокий консерватизм гена указывает на то, что фиколин-3 может выполнять решающую функцию в иммунном ответе. Действительно, недостаточность фиколина-3 встречается крайне редко (Thiel, 2007).

Н-фиколин (фиколин-3) – наиболее мощный из известных активаторов лектинового пути комплемента; его сывороточные концентрации значительно превышают концентрации L-фиколина и MBL (Sallenbach et al., 2011). Мутация rs28357092 (+1637delC) в экзоне 5 гена *FCN3* представляет собой мутацию со сдвигом рамки считывания, ведущую к усечению C-концевого конца белка фиколина-3. Она приводит к снижению плазменных уровней Н-фиколина по типу ген-эффект зависимости: гомозиготы с такой делецией демонстрируют полное отсутствие плазменного уровня Н-фиколина, а у гетерозигот выявляются средние уровни протеина (Michalski et al.,

2011). Гомозиготность по +1637delC встречается крайне редко (1–2 %): в литературе описано всего шесть случаев (все страдали тяжелыми инфекциями в раннем детском возрасте). Данные о популяционной частоте гетерозиготного носительства также крайне немногочисленны: в исландской когорте здоровых доноров было выявлено 15 гетерозигот из 483 обследованных (частота составила 1.5 %) (Bjarnadottir et al., 2016).

Помимо MBL и фиколинов, одним из ключевых участников лектинового пути активации комплемента является семейство маннозосвязывающих лектин-ассоциированных сериновых протеаз. В семействе MASP были идентифицированы три протеазы (MASP-1, MASP-2, MASP-3) и два родственных неферментативных белка, MAP19 (sMAP) и MAP44 (MAP-1) (Ricklin et al., 2010). MASP-1 и MASP-2 играют решающую роль в активации лектинового пути. Недавние исследования показали, что MASP-1 может автоматически активироваться и приводить к активации MASP-2 (Degn et al., 2012). MASP-2 также может автоматически активироваться, но в физиологических условиях именно MASP-1 является основным активатором MASP-2 (Héja et al., 2012). MASP-2 – это протеаза, которая расщепляет факторы комплемента C2 и C4, что приводит к активации каскада комплемента с образованием медиаторов воспаления (C3a и C5a), сборке комплекса мембранной атаки (MAC) и опсонизации. С другой стороны, MASP-3, по-видимому, ослабляет активность лектинового пути из-за конкуренции за сайты связывания MASP на распознающих молекулах (Degn et al., 2010). Кроме того, MASP-3 преимущественно образует комплекс с фиколином-3 и, как полагают, оказывает ингибирующее действие на активацию комплемента, опосредованную фиколином-3 (Skjoeedt et al., 2010). Уровни трех MASP были показаны как предикторы инфекции и длительной зависимости от интенсивной терапии у детей в критическом состоянии (Ingels et al., 2014). Среди специфических ферментов, способных активировать как MBL, так и фиколины, наиболее изучена протеаза 2-го типа – MASP-2. Уровни MASP-2 в сыворотке колеблются от 125 до 1150 нг/мл, в среднем 416 нг/мл (Sallenbach et al., 2011). По результатам анализа уровня MASP-2 в плазме у людей из различных этнических групп самый низкий уровень был выявлен у африканцев, за которыми следовали китайцы из Гонконга, индейцы и датчане европеоидной расы (Thiel et al., 2007).

Полиморфный ген *MASP2* расположен на хромосоме 1p36.23-31, имеет 12 экзонов и кодирует два белка, MASP-2 и MAP19. Наиболее значимой мутацией *MASP2* является rs72550870 (p.D120G); она приводит к замене аспарагиновой кислоты на глицин, вследствие чего белок теряет способность активировать комплемент из-за невозможности образовывать комплексы с лектинами, в частности с MBL и фиколинами. Врожденный дефицит MASP-2 обусловлен мутацией rs72550870 в гомозиготном состоянии (GG), характеризуется полным отсутствием сывороточной активности протеазы (Thiel et al., 2009). Всего тринадцать случаев гомозиготного носительства GG rs72550870 было описано в литературе с момента выявления первого случая, зарегистрированного в 2003 г. (Stengaard-Pedersen et al., 2003). Клинические про-

явления снижения/отсутствия активности MASP-2 могут варьировать от полного здоровья до тяжелых инфекций и предрасположенности к онкологическим заболеваниям (Bjarnadottir et al., 2016). После того как появились данные о трех здоровых взрослых с дефицитом MASP-2, гомозиготных по GG в *MASP2* (García-Laorden et al., 2008), клиническая пенетрантность этого дефицита стала сомнительной. Таким образом, ассоциация дефицита MASP-2 (GG rs72550870) с клиническими проявлениями к настоящему времени не определена. Вероятно, в ЛПП участвуют неидентифицированные молекулы и функции, которые могут объяснить, почему дефицит MASP-2 относительно часто встречается у практически здоровых людей (Bjarnadottir et al., 2016). Было высказано предположение, что лектиновый путь активации системы комплемента необязателен или даже избыточен (например, при тяжелом течении COVID) для формирования иммунного ответа у большинства здоровых лиц, а его дефицит клинически значим только в определенных ситуациях, например у недоношенных новорожденных (Matricardi et al., 2020).

Распределения частот генотипов полиморфных генов протеинов лектинового пути СК имеют выраженные популяционные различия. Результаты исследований, проведенных нами ранее (Терещенко, Смольникова, 2020), показывают, что частота высокопродукующего гаплотипа *HYP4* гена *MBL2* составляет 35.4 % у русских новорожденных Восточной Сибири, что соответствует частотам европейских популяций (Голландия – 27 %, Дания – 30 %, Чехия – 33 %), а также европеоидов Бразилии (28–34 %). В то же время у новорожденных Таймырского Долгано-Ненецкого района Красноярского края частота гаплотипа *HYP4* была статистически значимо выше, чем у русских, и составила 64 % для ненцев и 56 % для долган-нганасан, что близко к значениям частот распространения, выявленным для эскимосов (81 %) и североамериканских индейцев (64 %). В аборигенных популяциях как ненцев, так и долган и нганасан Таймырского Долгано-Ненецкого района Красноярского края наша группа обнаружила снижение распространенности генотипа полиморфизма *FCN2* rs7851696, ассоциированного с низкой связывающей способностью L-фиколина к углеводам, по сравнению с европеоидами Восточной Сибири. Результаты этого исследования (Smolnikova et al., 2017) выявили, что ненецкая популяция обладает рядом важных особенностей по сравнению с долганами и нганасанами: более низкая распространенность аллеля Т для полиморфизма rs17549193 и более высокая распространенность аллеля Т для полиморфизма rs7851696 *FCN2*. Мы полагаем, что этот генотип является генетическим маркером высокой функциональной способности L-фиколина в ненецкой популяции. Иными словами, мы показали большую частоту распространенности генотипов, ассоциированных с высокой активностью L-фиколина, в арктических популяциях ненцев и долган с нганасанами в сравнении с европеоидами Восточной Сибири.

Как говорилось выше, данные о популяционной частоте полиморфных вариантов rs28357092 гена *FCN3* немногочисленны. Значительно больше данных о популяционных частотах полиморфизмов rs72550870 гена *MASP2*. В датской когорте частота редкого аллеля G составила 3.9 %,

такая же частота выявлена в исландской выборке взрослых доноров (Bjarnadottir et al., 2016). Интересно, что аллель G вообще не обнаружен в популяциях китайцев Гонконга, африканских замбийцев и коренных американцев Бразилии (Fumagalli et al., 2017).

Результаты вышеупомянутых исследований лежат в основе гипотезы, предполагающей, что эволюция человека продвигалась в направлении накопления генотипов с низкой активностью лектинового пути активации комплемента вследствие широкого распространения некоторых внутриклеточных инфекций, таких как туберкулез и лепра, при которых низкая активность MBL и L-фиколина может оказывать протективный эффект (Verdu et al., 2006; Dunkelberger, Song, 2010). Было высказано предположение, что изолированные арктические популяции Таймырского Долгано-Ненецкого района Красноярского края исторически позже столкнулись с этими инфекциями и потому сохранили сформированную на ранних этапах эволюции человека высокую активность лектинового пути активации комплемента.

Согласно анализу доступных нам литературных данных, в настоящее время популяционные частоты мутаций, ассоциированных с врожденным дефицитом Н-фиколина (rs28357092) и MASP-2 (rs72550870) в российских популяциях и в популяциях коренных народностей российских Арктических территорий, не изучены. Актуальность получения таких данных для российских арктических популяций значительно возрастает, учитывая накапливающиеся доказательства важной роли лектинового пути активации комплемента в отношении вирусных инфекций. Так, например, предполагается важная роль MBL в отношении респираторных вирусных инфекций, в том числе вызываемых новыми коронавирусными инфекциями – SARS и COVID-19 (Matricardi et al., 2020). Роль врожденных дефицитов протеинов ЛПП, в том числе Н-фиколина и MASP-2, в таких клинических ситуациях совершенно не изучена. Принимая во внимание, что инфекции являются основными факторами детской смертности, а лектины – решающими факторами противоинфекционной защиты, можно думать, что дефицит лектинов будет способствовать увеличению смертности в раннем детском возрасте.

Целью данной работы было выявить популяционно-этнические различия распределения аллельных вариантов генов компонентов лектинового пути активации комплемента среди новорожденных коренных популяций Таймырского Долгано-Ненецкого района Красноярского края (ненцев, долган и нганасан) по сравнению с европеоидами г. Красноярска.

Материалы и методы

Для изучения однонуклеотидных полиморфизмов rs28357092 *FCN3* и rs72550870 *MASP2* использованы 980 образцов высохших пятен крови от новорожденных из Таймырского Долгано-Ненецкого района Красноярского края и г. Красноярска, полученные ранее в Красноярском краевом консультативно-диагностическом центре медицинской генетики.

Новорожденные были разделены на четыре группы для изучения этнической специфики полиморфизмов генов лектинового пути системы комплемента: 1) 323 из дере-

вень с преимущественно ненецким населением (ненцы составляют 85 % населения); 2) 138 из деревень с преимущественно долганским и нганасанским населением (долганы и нганасаны составляют 91 % населения); 3) 217 из деревень со смешанным населением с различной комбинацией коренных и смешанных популяций; 4) 302 новорожденных из г. Красноярска, у которых были европейские корни (русские).

Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 № 266. Исследование было одобрено Этическим комитетом Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера (№ 9 от 08.09.2014). Получено письменное информированное согласие на проведение исследования от всех участников.

Для выделения ДНК из пятен крови новорожденных был использован набор реагентов D1Atom DNA Prep («Изоген», Россия). Генотипирование однонуклеотидных полиморфизмов генов компонентов лектинового пути активации комплемента (*FCN3*, *MASP2*) осуществлялось методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с помощью специфических олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченых зондов (TaqMan) (ООО «ДНК-синтез», Россия) по протоколу производителя. Нуклеотидные последовательности аллель-специфических проб для генотипирования полиморфизмов: для rs28357092 *FCN3* F – CCTCGGTGTCCATGTCAC, R – CCACCTTGAGCGGCTGG (флуорофор/аллель – VIC/del, FAM/G); для rs72550870 *MASP2* F – GCAAGG ACACTTTCTACTCGC, R – TCACCTCGGCTGCATAG (флуорофор/аллель – VIC/G, FAM/A).

Соответствие частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга проверено с использованием χ^2 . Сравнения частот генотипов проводили с применением точного двустороннего теста Фишера. Статистически значимые различия были приняты при $p < 0.05$ после коррекции Бонферрони на множественные тесты.

Результаты и обсуждение

Преимуществом нашего подхода к популяционной оценке распространенности иммунодефицитных генотипов медиаторов лектинового пути активации системы комплемента является исследование популяций новорожденных, когда еще не произошло исключения неблагоприятных генетических вариаций, возможного в старшем возрасте в результате клинической реализации генетической предрасположенности.

Частоты генотипов и вариантного аллеля гена Н-фиколина *FCN3* rs28357092 представлены в табл. 1. Анализ распространенности генотипов *FCN3* показал преобладание гомозиготного варианта GG во всех исследованных нами популяциях, что согласуется с доступными мировыми данными.

Вариантный аллель с делецией (del) *FCN3* rs28357092 в гетерозиготном состоянии не встречался ни у одного

Таблица 1. Частоты генотипов *FCN3* rs28357092 у новорожденных различных этнических популяций Таймырского Долгано-Ненецкого района Красноярского края и г. Красноярска, *n* (%)

Генотип	Ненцы (<i>n</i> = 292)	Долганы и нганасаны (<i>n</i> = 129)	Смешанная популяция (<i>n</i> = 203)	Русские (<i>n</i> = 302)	<i>p</i> *
	1	2	3	4	
GG	292 (100.0)	128 (99.2)	199 (98.0)	291 (96.4)	1-3 = 0.02 1-4 < 0.001
G/del	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	–
del/del	0 (0.0)	1 (0.8)	4 (2.0)	10 (3.3)	1-3 = 0.02 1-4 = 0.002
del*	0 (0.0)	0 (0.8)	8 (2.0)	21 (3.5)	1-3 < 0.001 1-4 < 0.001 2-3 = 0.02 2-4 = 0.003

* Указаны только значения $p \leq 0.05$.

Таблица 2. Частоты генотипов *MASP2* rs72550870 у новорожденных различных этнических популяций Таймырского Долгано-Ненецкого района Красноярского края и г. Красноярска, *n* (%)

Генотип	Ненцы (<i>n</i> = 323)	Долганы и нганасаны (<i>n</i> = 138)	Смешанная популяция (<i>n</i> = 217)	Русские (<i>n</i> = 242)	<i>p</i> *
	1	2	3	4	
AA	322 (99.7)	136 (98.6)	213 (98.2)	226 (93.4)	1-4 < 0.001 2-4 = 0.02 3-4 = 0.01
AG	1 (0.3)	2 (1.4)	4 (1.8)	16 (6.6)	1-4 < 0.001 2-4 = 0.02 3-4 = 0.01
GG	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	–
G*	1 (0.2)	2 (0.7)	4 (0.9)	16 (3.3)	1-4 < 0.001 2-4 = 0.03 3-4 = 0.01

* Указаны только значения $p \leq 0.05$.

новорожденного из трех коренных популяций Таймырского Долгано-Ненецкого района и найден только у одного русского из г. Красноярска. Несмотря на то что в литературе описана крайне редкая встречаемость гомозиготного генотипа по этой делеции, в нашей когорте исследованных образцов она встретилась у 10 русских новорожденных (3.3 %), у 4 новорожденных из смешанной популяции (2.0 %) и у одного из группы долган и нганасан (0.8 %). У ненцев ни гомозиготы, ни гетерозиготы по мутантной делеции *FCN3* rs28357092 не выявлены. То есть в общей выборке, составляющей 926 новорожденных, гомозиготы del/del установлены у 15 человек, что составляет 1.6 %. Согласно источнику <http://www.ensembl.org>, частота вариантного аллеля в популяциях мира составляет 1–3 %, причем в азиатских популяциях его частота нулевая. Как указывалось выше, мутация rs28357092 (+1637delC) в гене *FCN3* приводит к снижению плазменных уровней Н-фиколина: гомозиготы с делецией, которые встречаются крайне редко, имеют полное отсутствие плазменного Н-фиколина, а у гетерозигот выявляются средние уровни протеина (Michalski et al., 2011; Bjarnadottir et al., 2016).

Возможно, в других исследованиях гомозиготы не были обнаружены, поскольку обследовались взрослые популяции, что еще раз показывает преимущество нашего подхода для выявления истинных частот генотипов с использованием когорты новорожденных, где еще не произошло выбывание дефицитных вариантов.

Частоты генотипов и вариантного аллеля гена сериновой протеазы *MASP2* rs72550870 представлены в табл. 2. Анализ распространенности генотипов *MASP2* показал преобладание гомозиготного варианта AA во всех исследованных популяциях, что сходится с доступными мировыми данными. Гетерозиготный генотип AG rs72550870 встречается в единичных случаях у ненцев и долган-нганасан по сравнению с новорожденными европеоидного происхождения г. Красноярска. Частота генотипа AG у русских (6.6 %) статистически значимо выше по сравнению с арктическими популяциями (ненцы – 0.3 %, $p < 0.001$; долганы-нганасаны – 1.4 %, $p = 0.02$; смешанная популяция – 1.8 %, $p = 0.01$). Таким образом, гетерозиготный вариант AG присутствует у 16 из 242 русских новорожденных и только у одного из 323 ненцев. Ни в одной

из популяционных групп не обнаружено гомозигот по минорному аллелю G, ассоциированному с отсутствием сворачивочной активности протеазы.

Аллельный вариант G *MASP2* rs72550870 имеет нулевые или крайне низкие частоты в популяциях мира. В европеоидных популяциях частота составляет 4.0 %, в общей американской популяции – 2.0 %, среди азиатских и африканских популяций – нулевая (<http://www.ensembl.org>). В ходе нашего исследования получены данные о распространенности мутантного аллеля G rs72550870 в российских арктических популяциях: 0.5 % среди новорожденных Таймырского Долгано-Ненецкого района Красноярского края ($n = 678$) и 3.3 % среди русских г. Красноярска ($n = 242$).

В двух наиболее информативных исследованиях, проведенных в 2007 и 2009 гг. группой S. Thiel, получены данные о девяти мутациях в гене *MASP2*: частота встречаемости мутантных аллельных вариантов почти для всех полиморфизмов крайне низка. Только в случае мутации rs72550870 происходит изменение структуры белка MASP-2, что ведет к нарушению его связывания в комплекс с MBL и, как следствие, к неспособности активировать систему комплемента. Кроме того, авторы отмечают, что именно у европеоидов вариантный аллель G rs72550870 является основной причиной более низких уровней MASP-2. По результату популяционного анализа сообщается об отсутствии гомозиготного генотипа GG rs72550870 среди взрослых китайцев, африканцев, европеоидов, инуитов Гренландии и бразильцев (Thiel et al., 2007, 2009). Гетерозиготный вариант преобладал у европеоидов из Дании (3.9 %) и инуитов западной Гренландии (где высока примесь европеоидной популяции, как сообщают авторы) (3.7 %), но не встречался в других исследованных популяциях ($p < 0.0001$).

Помимо этого, ученые (Thiel et al., 2009) приводят частоты редкого аллельного варианта, полученные другими исследователями на разных популяциях у здоровых лиц и пациентов с различными заболеваниями. Так, в шведской популяции обнаружено 14 гетерозигот среди 112 пациентов с муковисцидозом (частота 6.3 %) и пять гетерозигот среди 200 здоровых людей (частота 1.3 %). В исследовании пациентов с псориазом и членов их семей 894 человека были протестированы на *MASP2* rs72550870, и в общей сложности было обнаружено 62 гетерозиготы и одна гомозигота, что дало частоту гена 3.6 % (аллель не был связан с псориазом). Гомозиготность зарегистрирована у одного человека в группе из 293 польских детей с респираторными инфекциями и у одного ребенка с муковисцидозом. Недавнее исследование испанской популяции выявило двух гомозиготных из 2008 человек (включая 967 пациентов с пневмонией, 130 пациентов с СКВ, 43 ребенка с рецидивирующими респираторными инфекциями и 868 здоровых людей), но ассоциации заболеваний с вариантным аллелем не было найдено. Отсутствие аллеля G *MASP2* rs72550870 в Китае подтверждается отчетом, в котором изучалось влияние генотипов *MBL2* и *MASP2* на предрасположенность к тяжелому острому респираторному синдрому (SARS). У всех 1757 протестированных азиатов аллель G обнаружен не был. Таким образом, следует сделать вывод, что MBL-дефицит, а

также дефицит других компонентов комплемента (в том числе *MASP2*) сами по себе не приводят к заболеваниям или восприимчивости к инфекциям, а скорее, являются модификаторами, которые могут проявляться клинически, когда нарушаются и другие элементы каскада активации.

Исследование роли врожденных дефектов системы комплемента в патогенезе различных заболеваний очень актуально в связи с тем, что врожденные дефициты компонентов комплемента составляют не менее 5 % от общего числа первичных иммунодефицитов, тогда как аспекты их распространенности и патогенеза остаются неизученными. В нашем исследовании были впервые получены масштабные данные о популяционном распределении генотипов генов Н-фиколина *FCN3* rs28357092 и маннозосвязывающей лектин-ассоциированной сериновой протеазы *MASP2* rs72550870 среди коренных народностей российских Арктических территорий (общая выборка исследованных новорожденных составила 980). Как указывалось выше, популяционные частоты мутаций, ассоциированных с врожденным дефицитом Н-фиколина и MASP-2 в российских популяциях в целом и в популяциях коренных народностей российских Арктических территорий в частности, до сих пор не изучались. При этом ранее выявленные нами особенности генетической регуляции протеинов лектинового пути активации комплемента у новорожденных Таймырского Долгано-Ненецкого района Красноярского края показали, что популяции коренных народов Арктики генетически характеризуются большей активностью как минимум двух различающихся компонентов лектинового пути активации комплемента – MBL и L-фиколина, что говорит о большом тоне лектинового пути активации комплемента в целом (Smolnikova et al., 2017; Терещенко, Смольникова, 2020).

В настоящее время существуют две конкурирующие гипотезы, пытающиеся объяснить высокий уровень популяционного разнообразия генотипов лектинового пути комплемента (Eisen, Osthoff, 2014). Первая из них предполагает защитную роль низкопродуктивных генотипов в отношении некоторых внутриклеточных возбудителей: туберкулеза и лепры, висцерального лейшманиоза, атипичной пневмонии. Высокий уровень лектин-опосредованного фагоцитоза может предрасполагать к более успешному проникновению внутриклеточных возбудителей в цитоплазму клеток хозяина, экранированию патогенов от факторов адаптивного иммунитета и, следовательно, большему риску формирования активного инфекционного процесса. Таким образом, имеющиеся фактические данные позволяют говорить о «двойной патофизиологической роли» лектинового пути активации комплемента: защитной – в отношении внеклеточных возбудителей, особенно у детей раннего возраста, и провоскативной – в отношении некоторых внутриклеточных возбудителей и атеросклероза. Популяционно-генетические последствия такой «двойной роли» могут лежать в основе этнического разнообразия соответствующих генотипов, что представляет собой суть первой упомянутой нами гипотезы, основанной на предположении селекционной выгоды дефицита компонентов лектинового пути активации комплемента для некоторых популяций (Seyfarth et al., 2005; Eisen, Osthoff, 2014). Вторая гипотеза

отрицает наличие какого-либо селекционного давления в отношении генотипов лектинового пути комплемента, объясняя генетическое разнообразие исключительно миграционными процессами и генетическим дрейфом. Впрочем, авторы исследований делают при этом оговорку: «...возможно, стохастические эволюционные факторы стерли большую часть древнего отпечатка, оставленного естественным селекционным отбором; для подтверждения данных требуются статистически более мощные исследования с включением большего числа популяций» (Verdu et al., 2006; Boldt et al., 2010).

Заключение

В данном исследовании мы ожидали и выявили более низкую распространенность генетических маркеров Н-фииколина и MASP-2 дефицитов в популяциях коренных жителей Арктических территорий Красноярского края по сравнению с европеоидами г. Красноярска, что сочетается с генетической предрасположенностью к более высокому уровню функциональной активности L-фииколина по сравнению с европеоидным населением.

Исследование этнически ассоциированного уровня неспецифической противоиной защиты среди коренного населения Таймырского Долгано-Ненецкого района Красноярского края может быть использовано для формирования планов органов практического здравоохранения в отношении профилактики инфекционной заболеваемости и в целях наиболее рационального привлечения трудовых ресурсов для работ в условиях возможной высокой инфекционной нагрузки. Дополнительный анализ инфекционной заболеваемости в арктических популяциях позволит выявить фенотипические характеристики, сопряженные с высокой функциональной активностью лектинового пути активации комплемента в роли важнейшего фактора первой линии противоиной защиты, в том числе в отношении новых вирусных заболеваний, таких как COVID-19. Подобные клиничко-генетические сопоставления чрезвычайно важны для выяснения физиологической роли MBL, фииколинов и MASP-2, а выявленные нами генетические особенности этнически изолированных коренных арктических популяций Красноярского края представляют собой уникальный материал.

Список литературы / References

Терещенко С.Ю., Смольникова М.В. Полиморфизм гена маннозсвязывающего лектина у коренных популяций территорий Арктической зоны Российской Федерации. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(8):868-875. DOI 10.18699/VJ20.685.
[Tereshchenko S.Yu., Smolnikova M.V. The polymorphism of the gene of mannose-binding lectin in indigenous populations of the territories of the Arctic zone of the Russian Federation. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(8):868-875. DOI 10.18699/VJ20.685. (in Russian)]
Akaiwa M., Yae Y., Sugimoto R., Suzuki S.O., Iwaki T., Izuhara K., Hamasaki N. Hakata antigen, a new member of the ficolin/opsonin p35 family, is a novel human lectin secreted into bronchus/alveolus and bile. *J. Histochem. Cytochem.* 1999;47:777-786. DOI 10.1177/002215549904700607.

Ali Y.M., Lynch N.J., Haleem K.S., Fujita T., Endo Y., Hansen S., Holmskov U., Takahashi K., Stahl G.L., Dudler T., Giriya U.V., Wallis R., Kadioglu A., Stover C.M., Andrew P.W., Schwaeble W.J. The lectin pathway of complement activation is a critical component of the innate immune response to pneumococcal infection. *PLoS Pathog.* 2012;8(7):e1002793. DOI 10.1371/journal.ppat.1002793.
Bjarnadottir H., Arnardottir M., Ludviksson B.R. Frequency and distribution of *FCN2* and *FCN3* functional variants among *MBL2* genotypes. *Immunogenetics*. 2016;68(5):315-325. DOI 10.1007/s00251-016-0903-4.
Blom A.M., Villoutreix B.O., Dahlbäck B. Complement inhibitor C4b-binding protein—friend or foe in the innate immune system? *Mol. Immunol.* 2004;40:1333-1346. DOI 10.1016/j.molimm.2003.12.002.
Boldt A.B., Messias-Reason I.J., Meyer D., Schrago C.G., Lang F., Lell B., Dietz K., Krennsner P.G., Petzl-Erler M., Kun J.F. Phylogenetic nomenclature and evolution of mannose-binding lectin (MBL2) haplotypes. *BMC Genetics*. 2010;11(1):38. DOI 10.1186/1471-2156-11-38.
Brodzki N., Frazer-Abel A., Grumach A.S., Kirschfink M., Litzman J., Perez E., Seppänen M.R.J., Sullivan K.E., Jolles S. European Society for Immunodeficiencies (ESID) and European Reference Network for Rare Primary Immunodeficiency, Autoinflammatory and Auto-immune Diseases (ERN RITA) complement guideline: deficiencies, diagnosis, and management. *J. Clin. Immunol.* 2020;40(4):576-591. DOI 10.1007/s10875-020-00754-1.
Degn S.E., Jensen L., Gál P., Dobó J., Holmvad S.H., Jensenius J.C., Thiel S. Biological variations of MASP-3 and MASP4, two splice products of the *MASP1* gene involved in regulation of the complement system. *J. Immunol. Methods*. 2010;361:37-50. DOI 10.1016/j.jim.2010.07.006.
Degn S.E., Jensen L., Hansen A.G., Duman D., Tekin M., Jensenius J.C., Thiel S. Mannan-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 is crucial for lectin pathway activation in human serum, whereas neither MASP-1 nor MASP-3 is required for alternative pathway function. *J. Immunol.* 2012;189:3957-3969. DOI 10.4049/jimmunol.1201736.
Dunkelberger J.R., Song W.-C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* 2010;20:34-50. DOI 10.1038/cr.2009.139.
Eisen D.P., Osthoff M. If there is an evolutionary selection pressure for the high frequency of *MBL2* polymorphisms, what is it? *Clin. Exp. Immunol.* 2014;176(2):165-171. DOI 10.1111/cei.12241.
Fumagalli S., Perego C., Zangari R., De Blasio D., Oggioni M., De Nigris F., Snider F., Garred P., Ferrante A.M., De Simoni M.G. Lectin pathway of complement activation is associated with vulnerability of atherosclerotic plaques. *Front. Immunol.* 2017;8:288. DOI 10.3389/fimmu.2017.00288.
Garcia-Laorden M.I., Sole-Violan J., Rodriguez de Castro F., Aspa J., Briones M.L., Garcia-Saavedra A., Rajas O., Blanquer J., Caballero-Hidalgo A., Marcos-Ramos J.A., Hernandez-Lopez J., Rodriguez-Gallego C. Mannose-binding lectin and mannose-binding lectin-associated serine protease 2 in susceptibility, severity, and outcome of pneumonia in adults. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008;122(2):368-374. DOI 10.1016/j.jaci.2008.05.037.
Héja D., Harmat V., Fodor K., Wilmanns M., Dobó J., Kékesi K.A. Monospecific inhibitors show that both mannan-binding lectin-associated serine protease-1 (MASP-1) and -2 are essential for lectin pathway activation and reveal structural plasticity of MASP-2. *J. Biol. Chem.* 2012;287:20290-20300. DOI 10.1074/jbc.M112.354332.
Hummelshoj T., Fog L.M., Madsen H.O., Sim R.B., Garred P. Comparative study of the human ficolins reveals unique features of ficolin-3 (Hakata antigen). *Mol. Immunol.* 2008;45:1623-1632. DOI 10.1016/j.molimm.2007.10.006.
Ingels C., Vanhorebeek I., Steffensen R., Derese I., Jensen L., Wouters P.J., Hermans G., Thiel S., Berghe G.V. Lectin pathway of complement activation and relation with clinical complications in critically ill children. *Pediatr. Res.* 2014;75:99-108. DOI 10.1038/pr.2013.180.

- Matricardi P.M., Negro R.W.D., Nisin R. The first, holistic immunological model of COVID-19: implications for prevention, diagnosis, and public health measures. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2020;31(5): 454-470. DOI 10.1111/pai.13271.
- Michalski M., Swierzko A.St., Lukasiewicz J., Man-Kupisinska A., Karwaciak I., Przygodzka P., Cedzynski M. Ficolin-3 activity towards the opportunistic pathogen, *Hafnia alvei*. *Immunobiology.* 2015;220:117-123. DOI 10.1016/j.imbio.2014.08.012.
- Michalski M., Szala A., Swierzko A.St., Lukasiewicz J., Maciejewska A., Kilpatrick D.C., Matsushita M., Domzalska-Popadiuk I., Borkowska-Klos M., Sokolowska A., Szczapa J., Lugowski C., Cedzynski M. H-ficolin (ficolin-3) concentrations and *FCN3* gene polymorphism in neonates. *Immunobiology.* 2011;217:730-737. DOI 10.1016/j.imbio.2011.12.004.
- Ren Y., Ding Q., Zhang X. Ficolins and infectious diseases. *Viol. Sin.* 2014;29:25-32. DOI 10.1007/s12250-014-3421-2.
- Ricklin D., Hajishengallis G., Yang K., Lambris J.D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat. Immunol.* 2010;11:785-797. DOI 10.1038/ni.1923.
- Sallenbach S., Thiel S., Aebi C., Otth M., Bigler S., Jensenius J.C., Schlapbach L.J., Ammann R.A. Serum concentrations of lectin-pathway components in healthy neonates, children and adults: mannan-binding lectin (MBL), M-, L-, and H-ficolin, and MBL-associated serine protease-2 (MASP-2). *Pediatr. Allergy Immunol.* 2011; 22:424-430. DOI 10.1111/j.1399-3038.2010.01104.x.
- Seyfarth J., Garred P., Madsen H.O. The 'involution' of mannose-binding lectin. *Hum. Mol. Genet.* 2005;14(19):2859-2869. DOI 10.1093/hmg/ddi318.
- Skjoedt M.-O., Hummelshoj T., Palarasah Y., Honore C., Koch C., Skjodt K., Garred P. A novel mannose-binding lectin/ficolin-associated protein is highly expressed in heart and skeletal muscle tissues and inhibits complement activation. *J. Biol. Chem.* 2010;285:8234-8243. DOI 10.1074/jbc.M109.065805.
- Smolnikova M.V., Freidin M.B., Tereshchenko S.Y. The prevalence of the variants of the L-ficolin gene (*FCN2*) in the arctic populations of East Siberia. *Immunogenetics.* 2017;69(6):409-413. DOI 10.1007/s00251-017-0984-8.
- Stengaard-Pedersen K., Thiel S., Gadjeva M., Møller-Kristensen M., Sørensen R., Jensen L.T., Sjøholm A.G., Fugger L., Jensenius J.C. Inherited deficiency of mannan-binding lectin-associated serine protease 2. *N. Engl. J. Med.* 2003;349(6):554-560. DOI 10.1056/NEJMoa022836.
- Thiel S. Complement activating soluble pattern recognition molecules with collagen-like regions, mannan-binding lectin, ficolins and associated proteins. *Mol. Immunol.* 2007;44:3875-3888. DOI 10.1016/j.molimm.2007.06.005.
- Thiel S., Kolev M., Degn S., Steffensen R., Hansen A.G., Ruseva M., Jensenius J.C. Polymorphisms in mannan-binding lectin (MBL)-associated serine protease 2 affect stability, binding to MBL, and enzymatic activity. *J. Immunol.* 2009;182:2939-2947. DOI 10.4049/jimmunol.0802053.
- Thiel S., Steffensen R., Christensen I.J., Ip W.K., Lau Y.L., Reason I.J., Eiberg H., Gadjeva M., Ruseva M., Jensenius J.C. Deficiency of mannan-binding lectin associated serine protease-2 due to missense polymorphisms. *Genes Immun.* 2007;8:154-163. DOI 10.1038/sj.gene.6364373.
- Verdu P., Barreiro L.B., Patin E., Gessain A., Cassar O., Kidd J.R., Kidd K.K., Behar D.M., Froment A., Heyer E., Sica L., Casanova J.L., Abel L., Quintana-Murci L. Evolutionary insights into the high worldwide prevalence of *MBL2* deficiency alleles. *Hum. Mol. Genet.* 2006;15(17):2650-2658. DOI 10.1093/hmg/ddl193.

ORCID ID

M.V. Smolnikova orcid.org/0000-0001-9984-2029
S.Yu. Tereshchenko orcid.org/0000-0002-1605-7859

Благодарности. Авторы благодарят Максима Фрейдина за консультирование по статистической обработке материала.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 15.06.2021. После доработки 26.08.2021. Принята к публикации 26.08.2021.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Регуляторный потенциал SNP-маркеров генов, ассоциированных с бронхиальной астмой, артериальной гипертензией и их коморбидным фенотипом

И.А. Гончарова , Е.Ю. Брагина, И.Ж. Жалсанова, М.Б. Фрейдин, М.С. Назаренко

Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, Томск, Россия

 irina.goncharova@medgenetics.ru

Аннотация. В работе оценено неравновесие по сцеплению однонуклеотидных вариантов (SNP) генов *TLR4/AL160272.2* (rs1927914, rs1928298, rs7038716, rs7026297, rs7025144) у славян-жителей Западной Сибири. Проведен анализ ассоциаций SNP в области генов *TLR4/AL160272.2* (rs1927914, rs7038716, rs7025144), *SERPINA1* (rs1980616), *ATXN2/BRAP* (rs11065987), *IL2RB* (rs2284033), *NT5C2* (rs11191582), *CARD8* (rs11669386), *ANG/RNASE4* (rs1010461) и *ABTB2/CAT* (rs2022318) при бронхиальной астме (БА), артериальной гипертензии (АГ) и их сочетании. Выполнено *in silico* аннотирование SNP, ассоциированных с данными заболеваниями, в отношении их регуляторного потенциала. В результате у славян-жителей Западной Сибири выявлено сильное неравновесие по сцеплению rs1928298 и rs1927914, а также rs7026297 и rs7038716. Установлено, что к развитию БА предрасполагают аллель G rs1927914 гена *TLR4* и аллель C rs1980616 гена *SERPINA1*. Данные SNP влияют на изменение аффинности транскрипционных факторов семейств Pou и Klf4, а также на экспрессию генов *TLR4* и *SERPINA1* в клетках крови соответственно. Аллель A rs11065987 генов *ATXN2/BRAP*, аллель A rs11669386 гена *CARD8*, аллель G rs2284033 гена *IL2RB* и аллель G rs11191582 гена *NT5C2* ассоциированы с риском развития артериальной гипертензии. Данные варианты изменяют аффинность транскрипционных факторов Hoxa9, Irf, RORalpha1 и HMG-IY, а также экспрессию генов *ALDH2*, *CARD8*, *NT5C2*, *ARL3* и *SFXN2* в клетках крови, сосудах и сердце. Риск развития коморбидного фенотипа БА и АГ ассоциирован с аллелем A rs7038716 и аллелем T rs7025144 генов *TLR4/AL160272.2*, аллелем A – rs1010461 гена *ANG* и аллелем C – rs2022318 генов *ABTB2/CAT*. Варианты rs7038716 и rs7025144 изменяют экспрессию гена *TLR4* в клетках крови, а rs1010461 и rs2022318 – генов *ANG* и *RNASE4*, *CAT* и *ABTB2* в клетках крови, легких, сосудов и сердца. Ключевые слова: бронхиальная астма; артериальная гипертензия; коморбидность; SNP; регуляторный потенциал.

Для цитирования: Гончарова И.А., Брагина Е.Ю., Жалсанова И.Ж., Фрейдин М.Б., Назаренко М.С. Регуляторный потенциал SNP-маркеров генов, ассоциированных с бронхиальной астмой, артериальной гипертензией и их коморбидным фенотипом. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(8):855-863. DOI 10.18699/VJ21.099

Putative regulatory functions of SNPs associated with bronchial asthma, arterial hypertension and their comorbid phenotype

I.A. Goncharova , E.Yu. Bragina, I.Zh. Zhalsanova, M.B. Freidin, M.S. Nazarenko

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

 irina.goncharova@medgenetics.ru

Abstract. Linkage disequilibrium (LD) of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *TLR4/AL160272.2* (rs1927914, rs1928298, rs7038716, rs7026297, rs7025144) was estimated in the Slavs of West Siberia. We further investigated an association of SNPs in *TLR4/AL160272.2* (rs1927914, rs7038716, rs7025144), *SERPINA1* (rs1980616), *ATXN2/BRAP* (rs11065987), *IL2RB* (rs2284033), *NT5C2* (rs11191582), *CARD8* (rs11669386), *ANG/RNASE4* (rs1010461), and *ABTB2/CAT* (rs2022318) genes with bronchial asthma (BA), arterial hypertension (AH) and their comorbidity. Then, the disease-associated SNPs were annotated *in silico* in relation to their potential regulatory functions. Strong LD was detected between rs1928298 and rs1927914, as well as rs7026297 and rs7038716 in the Slavs of West Siberia. It was found that the rs1927914 G allele of the *TLR4* gene and the rs1980616 C allele of the *SERPINA1* gene are associated with the predisposition to BA. These SNPs can affect binding affinity of transcription factors of the Pou and Klf4 families, as well as the expression levels of the *TLR4* and *SERPINA1* genes. The rs11065987 allele A of the *ATXN2/BRAP* genes, the rs11669386 A allele of the *CARD8* gene, the rs2284033 allele G of the *IL2RB* gene, and the rs11191582 allele G of the *NT5C2* gene were associated with the risk of AH. These variants can alter binding affinity of the Hoxa9,

Irf, RORalpha1 and HMG-IY transcription factors, as well as the expression levels of the *ALDH2*, *CARD8*, *NT5C2*, *ARL3*, and *SFXN2* genes in blood cells/vessels/heart, respectively. The risk of developing a comorbid phenotype of AD and AH is associated with the A allele of rs7038716 and the T allele of rs7025144 of the *TLR4/AL160272.2* genes, the A allele of rs1010461 of the *ANG* gene and the C allele of rs2022318 of the *ABTB2/CAT* genes. Variants rs7038716 and rs7025144 can change the expression levels of the *TLR4* gene in blood cells, while rs1010461 and rs2022318 influence the expression levels of the *ANG* and *RNASE4* genes as well as the *CAT* and *ABTB2* genes in blood cells, lungs/vessels/heart.

Key words: bronchial asthma; arterial hypertension; comorbidity; SNP; regulatory functions.

For citation: Goncharova I.A., Bragina E.Yu., Zhalsanova I.Zh., Freidin M.B., Nazarenko M.S. Putative regulatory functions of SNPs associated with bronchial asthma, arterial hypertension and their comorbid phenotype. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(8):855-863. DOI 10.18699/VJ21.099

Введение

К настоящему времени в результате исследований ассоциаций выявлено большое количество генетических вариантов, связанных с риском развития многофакторных заболеваний (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>). Однако переход от установления ассоциации к пониманию механизмов, лежащих в основе заболеваний, – гораздо более сложная задача. Идентификация причинных генетических вариантов в отношении заболевания или сложно наследуемого признака затруднена из-за существующего неравновесия по сцеплению (LD) между вариантами, которое отличается в популяциях разного этнического происхождения.

С другой стороны, для понимания механизмов многофакторных заболеваний важна оценка функциональной значимости генетических вариантов, в том числе аннотация регуляторного потенциала полиморфизмов в отношении изменения функциональной активности генов. Генетические варианты, влияющие на количественные изменения в профиле экспрессии генов (eQTL), или однонуклеотидные полиморфные варианты (SNP), которые имеют статус регуляторных (rSNP) и расположены в активно транскрибируемых регионах ДНК, являются причиной отклонения от оптимальной программы функционирования генов в клетках тканей и органов, что приводит к увеличению риска развития заболеваний (van Arensbergen et al., 2019).

Бронхиальная астма (БА) – широко распространенное гетерогенное заболевание, характеризующееся хроническим воспалением дыхательных путей. Среди пациентов с БА чаще встречаются различные сопутствующие заболевания, включая аллергические – аллергический ринит, дерматит и пищевая аллергия (Weatherburn et al., 2017), и некоторые неаллергические патологические состояния: артериальная гипертензия (АГ), ожирение, сахарный диабет 2-го типа, а также другие метаболические и эндокринные нарушения (Su et al., 2016). Эти заболевания патогенетически связаны с БА и могут модифицировать клинические симптомы и течение патологического процесса у пациентов. Например, пациенты с БА, имеющие сопутствующую АГ, как правило, обладают рядом фенотипических особенностей, включая пожилой возраст, позднее начало БА, высокий индекс массы тела, и характеризуются преимущественно нейтрофильным типом воспаления, реализуемым не через Th-2-лимфоциты (Moore et al., 2014).

С помощью анализа структуры ассоциативной геновой сети и методов приоритизации ранее нами были выбраны гены, наиболее значимые для развития коморбидности

БА и АГ (Saik et al., 2018). В результате анализа ассоциаций SNP выбранных приоритетных генов показано, что с БА связаны rs1928298 и rs1927914, локализованные на расстоянии 19.6 и 1.7 Кб соответственно от 5'-конца гена *TLR4*, а также интронный вариант rs1980616 гена *SERPINA1*. С АГ были ассоциированы rs11065987, расположенный между генами *ATXN2* и *BRAP*, а также интронные варианты rs2284033 гена *IL2RB*, rs11191582 гена *NT5C2* и rs11669386 гена *CARD8*. В то же время с коморбидным фенотипом БА+АГ связаны варианты rs7038716, rs7026297 и rs7025144, локализованные в первом интроне гена *AL160272.2* и на расстоянии 35.6, 33.1 и 9.4 Кб соответственно от 3'-конца гена *TLR4*; интронный вариант rs1010461 генов *ANG*, *RNASE4* и rs2022318, расположенный между генами *ABTB2* и *CAT* (Bragina et al., 2018). Установлены особенности ассоциаций гаплотипов генов *CAT* и *TLR4* с развитием БА и коморбидного фенотипа БА+АГ (Брагина и др., 2019). Однако ранее не было оценено, какие именно аллели данных SNP ассоциированы с заболеваниями, каков возможный молекулярный механизм, объясняющий полученные ассоциации, и обладают ли генетические варианты регуляторным потенциалом в отношении функциональной активности генов. Это и стало целью настоящего исследования.

Материалы и методы

В работе обследованы три группы пациентов: с БА ($n = 145$, 73.1 % женщин, 25.9 % мужчин, возраст 44.89 ± 8.86 лет); с АГ без БА в анамнезе ($n = 144$, 32.6 % женщин, 67.4 % мужчин, возраст 51.27 ± 6.05 лет); с БА и АГ ($n = 146$, 72.6 % женщин, 27.4 % мужчин, возраст 56.32 ± 10.47 лет). Контрольная группа включала индивидов с нормальным уровнем артериального давления и отсутствием клинических проявлений БА ($n = 152$, 73.7 % женщин, 26.3 % мужчин, средний возраст в группе 47.75 ± 9.92 лет). Диагноз «бронхиальная астма» и «артериальная гипертензия» установлен на основании клинического обследования пациентов, согласно общепринятым критериям. По этническому составу все индивиды принадлежат к восточным европейцам (преимущественно славяне).

Подробное описание методов выбора и приоритизации SNP, а также процедуры генотипирования образцов ДНК пациентов с помощью масс-спектрометрии на приборе Sequenom MassARRAY® (США) приведены в статьях (Bragina et al., 2018; Saik et al., 2018; Брагина и др., 2019).

В данной работе оценено неравновесие по сцеплению однонуклеотидных вариантов (SNP) генов *TLR4/AL160272.2* (rs1927914, rs1928298, rs7038716, rs7026297,

rs7025144) у славян-жителей Западной Сибири. Коэффициент неравновесия по сцеплению Левонтина (D') и коэффициент корреляции Пирсона (r^2) оценивали с помощью программного обеспечения HaploView v. 4.2.

Расчет величины отношения шансов (OR) и доверительных интервалов (95 % CI) в отношении риска развития бронхиальной астмы (БА), артериальной гипертензии (АГ) и их сочетания проводили для SNP в области генов *TLR4/AL160272.2* (rs1927914, rs7038716, rs7025144), *SERPINA1* (rs1980616), *ATXN2/BRAP* (rs11065987), *IL2RB* (rs2284033), *NT5C2* (rs11191582), *CARD8* (rs11669386), *ANG/RNASE4* (rs1010461) и *ABTB2/CAT* (rs2022318) с помощью логистической регрессии. В качестве ковариат в регрессионном анализе использовали пол и возраст. Отношение шансов рассчитывали путем экспоненцирования соответствующих регрессионных коэффициентов. Для статистического анализа данных применяли пакеты Stats и Genetics в программной среде R (The R Foundation).

Для оценки регуляторного потенциала SNP, ассоциированных с данными заболеваниями, использовали базы данных: rSNPBase v. 3.1 (<http://rsnp3.psych.ac.cn>), HaploReg v. 4.1 (<https://pubs.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>), RegulomeDB v. 2.0 (<https://www.regulomedb.org/regulome>), GTEx Portal (<https://gtexportal.org/home>), Blood eQTL browser (<https://genenetwork.nl/bloodeqtlbrowser>). Поиск данных о связи изученных генетических вариантов с заболеваниями осуществляли с помощью ресурса DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>).

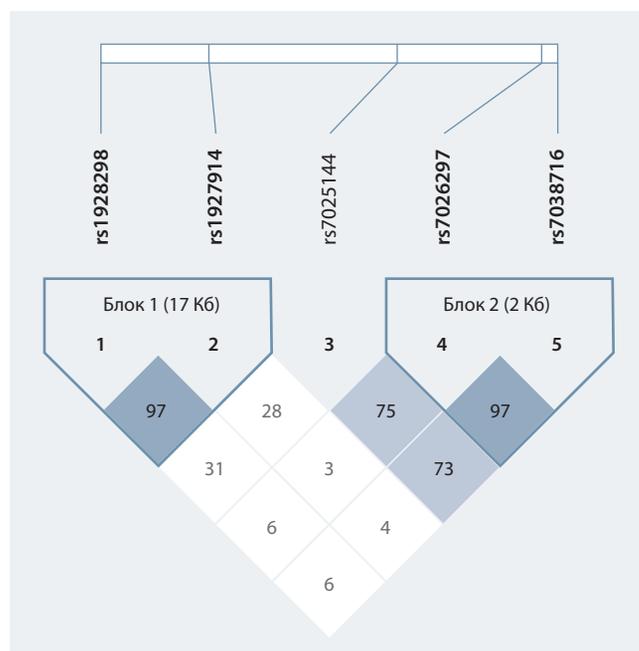
Исследование проведено с использованием биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии» на базе Центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук. Протокол исследования одобрен этическим комитетом НИИ медицинской генетики (Протокол № 2 от 30.05.2016). Для всех участников получены информированные согласия.

Результаты и обсуждение

Анализ сцепления генетических вариантов, расположенных в локусе 9q33.1 (*TLR4/AL160272.2*)

Поскольку пять из числа ассоциированных вариантов – rs1927914, rs1928298, rs7038716, rs7026297 и rs7025144 – расположены в локусе 9q33.1 (*TLR4/AL160272.2*), на первом этапе в группе, включающей всех обследованных лиц ($n = 587$), был проведен анализ сцепления SNP, который показал наличие двух блоков, один из которых включает rs1928298 и rs1927914 ($D = 0.974$; $r^2 = 0.949$) (см. рисунок).

Гаплотипическая структура локуса 9q33.1 (*TLR4/AL160272.2*) у славян-жителей Западной Сибири не отличается от таковой, характерной для европейцев США (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/HighLD?db=core;r=9:117684048-117685048;v=rs1928298;vdb=variation;vf=729411740#373514_tablePanel/).



Гаплотипическая структура локуса 9q33.1 (*TLR4/AL160272.2*), включающего rs1927914, rs1928298, rs7038716, rs7026297 и rs7025144 у славян-жителей Западной Сибири.

Анализ ассоциаций SNP с бронхиальной астмой, артериальной гипертензией и их коморбидным фенотипом

Для расчета OR были выбраны несцепленные между собой варианты (rs1927914, rs7038716) и SNP, показавший слабое сцепление со вторым блоком rs7025144 (см. рисунок). Выявлено, что к развитию БА предрасполагают аллель G rs1927914 гена *TLR4* и аллель C rs1980616 гена *SERPINA1*; к АГ – аллель A rs11065987 (межгенный регион *ATXN2/BRAP*), аллель A rs11669386 гена *CARD8*, аллель G rs2284033 гена *IL2RB* и аллель G rs11191582 гена *NT5C2*; к сочетанной патологии (БА+АГ) – аллель A rs1010461 генов *ANG/RNASE4*, аллель T rs7038716 и аллель T rs7025144 гена *AL160272.2*, аллель C rs2022318 (межгенный регион *ABTB2/CAT*) (табл. 1).

Оценка регуляторного потенциала SNP, ассоциированных с бронхиальной астмой

Регуляторные регионы генома характеризуются присутствием модифицированных гистонов (метилованные – H3K4me1, H3K4me3 и ацетилованные – H3K27ac, H3K9ac), которые являются «метками» активных промоторов и энхансеров в различных клетках, в том числе в клетках крови и органах-мишенях БА и АГ – легких, сосудах, сердце, головном мозге (табл. 2). Так, варианты rs1927914 и rs1980616, ассоциированные с БА, расположены в области промотора гена *TLR4* и энхансера гена *SERPINA1* в клетках крови (моноциты). Кроме того, модификации гистонов в области rs1980616 (*SERPINA1*) регистрируются в других клетках и тканях, в том числе в легких (см. табл. 2).

Генетические варианты могут изменять аффинность транскрипционных факторов (ТФ) и экспрессию регули-

Таблица 1. Генетические варианты, предрасполагающие к развитию БА, АГ и их сочетанию

Патология	Ген; SNP	Аллель, ассоциированный с заболеванием: частота у больных/здоровых, %	OR (95 % CI); p
Бронхиальная астма	<i>TLR4</i> ; rs1927914	G: 35.7/29.1	1.49 (1.02–2.18); 0.0397
	<i>SERPINA1</i> ; rs1980616	C: 83.0/75.7	1.54 (1.01–2.34); 0.0204
Артериальная гипертензия	Межгенный регион <i>ATXN2/BRAP</i> ; rs11065987	A: 63.7/43.6	1.67 (1.15–2.45); 0.0076
	<i>CARD8</i> ; rs11669386	A: 56.4/48.6	1.50 (1.01–2.21); 0.0433
	<i>IL2RB</i> ; rs2284033	G: 50.0/46.0	1.49 (1.03–2.17); 0.0359
	<i>NT5C2</i> ; rs11191582	G: 93.2/88.9	2.07 (1.03–4.16); 0.0419
Бронхиальная астма + артериальная гипертензия (коморбидный фенотип)	<i>ANG</i> , <i>RNASE4</i> ; rs1010461	A: 62.1/50.0	1.71 (1.21–2.42); 0.0024
	<i>AL160272.2</i> ; rs7038716	T: 28.9/20.4	1.74 (1.13–2.68); 0.0113
	<i>AL160272.2</i> ; rs7025144	T: 28.1/21.7	1.60 (1.04–2.48); 0.0343
	Межгенный регион <i>ABTB2/CAT</i> ; rs2022318	C: 50.0/39.2	1.43 (1.01–2.04); 0.0444

руемых генов. Показано, что аллель G rs1927914, расположенного в промоторе гена *TLR4*, разнонаправленно влияет на связывание ТФ семейства Pou (см. табл. 2). Известно, что белки Pou, Oct-1 и Oct-2, связываясь с элементом промотора CLE0, активируют экспрессию гена интерлейкина 5 в клеточной линии PER-117 (Thomas et al., 1999), который, в свою очередь, вызывает воспаление дыхательных путей и рассматривается в качестве мишени для терапии БА (Busse et al., 2019). В другой работе (Aneas et al., 2020) вариант rs1888909, ассоциированный с БА и расположенный на расстоянии 2.3 Кб от 5'-конца гена *IL33*, был связан с экспрессией этого гена в эпителиальных клетках дыхательных путей и уровнем белка в плазме крови через дифференциальную аффинность Oct-1 (*Pou2f1*) с рисковым для данного заболевания аллелем. Не исключено, что похожий механизм связывает аллель G rs1927914, расположенный на расстоянии 1.7 Кб от 5'-конца гена *TLR4*, и БА.

Наличие аллеля C rs1980616 гена *SERPINA1* связано с повышением аффинности ТФ *Klf4*, который участвует в воспалительных реакциях, ремоделировании дыхательных путей и контроле клеточного ответа по Th2-типу (Tussiwand et al., 2015). У мышей в супрессорных клетках миелоидного происхождения и эпителиальных клетках дыхательных путей после воздействия аллергена повышалась экспрессия гена *Klf4* прямо пропорционально тяжести развивающейся аллергической астмы (Nimrong et al., 2017). Среди других изученных в настоящем исследовании вариантов rs1980616 обладает наиболее высоким регуляторным потенциалом – ранг 2b/шкала 0.83 (см. табл. 2).

По данным GTEx Portal и Blood eQTL browser, все изученные SNP являются eQTL-локусами и влияют на экспрессию генов, в пределах нуклеотидной последовательности которых они располагаются, или других близлежащих генов (cis-eQTL), а также таковых, локализованных на значительном удалении (trans-eQTL), в разных тканях. Согласно имеющейся на сегодняшний день информации, rs1927914 и rs1980616, ассоциированные с БА, связаны с изменением экспрессии генов *TLR4* и *SERPINA1* соот-

ветственно. Генотип GG rs1927914 ассоциирован с увеличением экспрессии гена *TLR4* в цельной крови, артериях, миокарде левого желудочка и с понижением экспрессии этого гена в тканях головного мозга (мозжечок), а генотип CC rs1980616 связан с повышением экспрессии гена *SERPINA1* в цельной крови (см. табл. 2).

Вариант rs1927914 (*TLR4*), ассоциированный с БА в нашем исследовании, связан с тяжестью течения БА в популяции Китая (Zhang et al., 2011). Этот вариант входит в блок сцепления из 13 rSNP, из них rs2737190 ассоциирован с развитием хронической обструктивной болезни и туберкулеза легких с разнонаправленным эффектом (<https://www.disgenet.org/browser/2/1/1/rs2737190/>).

В настоящей работе впервые установлена ассоциация rs1980616 гена *SERPINA1* с развитием бронхиальной астмы. Проведенные ранее исследования показали, что хромосомный регион 14q23-q32 ассоциирован с уровнем IgE в крови, гиперреактивностью бронхов и другими признаками аллергического воспаления в разных популяциях (Malerba et al., 2001). Роль белковых продуктов генов семейства серпинов в патогенезе БА неизвестна, однако они могут выполнять защитную функцию, ингибируя эндогенные протеазы, связанные с воспалительным ответом, что заслуживает дальнейшего изучения.

Оценка регуляторного потенциала SNP, ассоциированных с артериальной гипертензией

Модификации гистоновых белков для варианта rs2284033, локализованного в интроне гена *IL2RB*, регистрируются в лейкоцитах периферической крови (T- и NK-клетки), а для rs11191582, локализованного в интроне гена *NT5C2*, – в широком спектре клеток и тканей, включая кровь, легкие, сосуды, сердце, головной мозг (см. табл. 2).

Однонуклеотидные варианты, ассоциированные с АГ, влияют на изменение аффинности транскрипционных факторов. Аллель A rs11065987, локализованного в межгенном регионе *ATXN2/BRAP*, связан со снижением аффинности ТФ Mrg1 и Ноха9 (см. табл. 2). Ранее у больных с АГ в гемопоэтических стволовых клетках CD34+ периферической крови обнаружено снижение экспрессии

Таблица 2. Регуляторный потенциал SNP, ассоциированных с БА, АГ и их сочетанием

SNP ID/локализация в гене/предрасполагающий аллель (патология)	rSNPBase	HaploReg	RegulomeDB	GTE Portal, Blood eQTL browser	DisGeNET	
	Пересечение SNP с регуляторными элементами	Тип регуляции (количество тканей)	Связывание с ТФ (аллель, направление изменения аффинности ТФ)	Ранг*/шкала**	Генотип, направление изменения экспрессии, ген (ткань)	Ассоциации с патологиями всего/БА, АГ
rs1927914/1.7 Кб от 5'-конца (промотор) <i>TLR4/G</i> (БА)	–	МГ(1), ТФ(6)	G↑ <i>Arid5b</i> ; <i>Pou1f1</i> ; <i>Pou2f2_known5</i> ; <i>Pou3f2</i> ; <i>Pou3f3</i> . G↓ <i>Pou2f2_known6,9</i> ; <i>Pou6f1</i>	6/0.0	GG ↑ <i>TLR4</i> (БЦА, ЛЖ, К) и ↓ <i>TLR4</i> (ГМ)	14/БА
rs1980616/интрон <i>SERPINA1/C</i> (БА)	–	МГ(5), DNase (2), ТФ(4), СБ(1)	C↑ <i>Klf4</i> , <i>Pbx3</i> , <i>SP2</i> ; C↓ <i>p300</i>	2b/0.83	CC ↑ <i>SERPINA1</i> (К)	–
rs11065987/ межгенный регион <i>ATXN2</i> и <i>BRAP/A</i> (АГ)	Участок открытого хроматина	МГ(4), DNase (2), ТФ(2)	A↓ <i>Mrg1</i> , <i>Hoxa9</i>	3a/0.60	AA ↓ <i>ALDH2</i> (А); AA ↑ <i>ADAM1B</i> (ПР), <i>NAA25</i> (ГМ), <i>ALDH2</i> (К)	17/–
rs2284033/интрон <i>IL2RB/G</i> (АГ)	ТФ	МГ(1), DNase (2), ТФ(3)	G↓ <i>RORalpha1</i> G↑ <i>RXR</i> , <i>LXR</i>	4/0.61	GG ↓ <i>ELFN2</i> (Л)	7/БА
rs11191582/интрон <i>NT5C2/G</i> (АГ)	Кольцевая РНК	МГ(31), DNase (30), ТФ(2), СБ(1)	G↓ <i>HMG-IY 2</i> , <i>Nanog</i>	1f/0.55	GG ↓ <i>CALHM2</i> (А), <i>MARCKSL1P1</i> (А, Л, К, КА), <i>NT5C2</i> (К); GG ↑ <i>ARL3</i> (Л), <i>SFXN2</i> (Л)	2/–
rs11669386/интрон <i>CARD8/A</i> (АГ)	Кольцевая РНК	ТФ(4)	A↑ <i>Irf</i> , <i>Nkx6-1</i> , <i>Pax-6</i> , <i>Pou3f2</i>	1f/0.22	AA ↑ <i>CCDC114</i> (БЦА, К, Л), <i>CARD8</i> (БЦА, ГМ)	–
rs7038716/интрон <i>AL160272.2/T</i> (БА+АГ)	Длинная некодирующая РНК	ТФ(2)	T↓ <i>Dobox4</i>	7/0.18	TT ↓ <i>TLR4</i> (К)	–
rs7025144/интрон <i>AL160272.2/T</i> (БА+АГ)	–	МГ(9), DNase (5)	–	4/0.61	TT ↓ <i>TLR4</i> (К)	–
rs1010461/интрон <i>ANG, RNASE4/A</i> (БА+АГ)	Кольцевая РНК	DNase (4)	–	1f/0.55	AA ↓ <i>ANG</i> (БЦА, А), AA ↑ <i>RNASE4</i> (ЛЖ, Л, К, ГМ, БЦА), <i>ANG</i> (К)	–
rs2022318/ межгенный регион <i>ABTB2</i> и <i>CAT/C</i> (БА+АГ)	–	МГ(2), ТФ(4)	C↑ <i>HEN1</i> , <i>Zfp691</i> ; C↓ <i>ZNF263</i> , <i>p53</i>	1f/0.22	CC ↓ <i>CAT</i> (А, КА, БЦА, ЛЖ, Л, К), <i>ABTB2</i> (К)	–

Примечание. А – аорта; КА – коронарные артерии; БЦА – большеберцовая артерия; ЛЖ – левый желудочек; К – цельная кровь; ГМ – головной мозг; ПР – предсердие; Л – легкие; МГ – модификации гистонов; DNase – DNase I-гиперчувствительные сайты; ТФ – транскрипционные факторы; СБ – связанные белки. *Ранговая оценка регуляторного потенциала: 1f – eQTL + связывание ТФ/DNase I-гиперчувствительный сайт; 2b – eQTL + связывание ТФ + другие регуляторные элементы + DNase I-гиперчувствительная область; 3a – связывание ТФ + любой мотив ТФ + DNase I-гиперчувствительный сайт; 4 – связывание ТФ + DNase I-гиперчувствительный сайт; 6 – любой мотив ТФ; 7 – другие. ** Чем ближе значение шкалы к единице, тем выше регуляторный потенциал SNP.

гена *HOXA9*, что может быть связано со снижением циркулирующих эндотелиальных клеток-предшественников и нарушением процессов неоваскуляризации и репарации поврежденных сосудов (Pirro et al., 2007).

Аллель А интронного варианта rs11669386 гена *CARD8* влияет на повышение аффинности нескольких ТФ, среди которых факторы семейства *Irf* и *Pou3f2* (см. табл. 2). В экспериментальных исследованиях на модельных животных показано, что регуляторный фактор интерферона 1 (*Irf*) играет ведущую роль в регуляции ремоделирования сердца при перегрузке давлением (Jiang et al., 2014).

Аллель G rs2284033 гена *IL2RB* влияет на снижение аффинности к ТФ *RORalpha1* и повышение к *RXR/LXR* (см. табл. 2). Связи *RORalpha1* и *RXR/LXR* с АГ в доступной научной литературе не обнаружено, однако было показано, что аденовирус-опосредованная сверхэкспрессия *RORalpha1* подавляет TNF-alpha индуцированную экспрессию молекул адгезии VCAM-1 и ICAM-1 в эндотелиальных клетках пупочной вены (Migita et al., 2004). Транскрипционные факторы семейства *LXR/RXR* регулируют воспаление, гомеостаз холестерина, метаболизм липидов и глюкозы. Посредством модуляции компонентов

ренин-ангиотензин-альдостероновой системы LXR/RXR снижают периферическое сосудистое сопротивление и артериальное давление (Cannon et al., 2016).

Аллель G rs11191582 гена *NT5C2* ассоциирован со снижением аффинности к транскрипционным факторам HMG-IY и Nanog (см. табл. 2). Ранее было выявлено, что HMG-IY участвует в формировании структуры хроматина и регуляции транскрипции многих генов. Показано, что изменение уровней HMG-IY влияет на активность промотора и экспрессию гена *IL2* в клеточных линиях человека (Himes et al., 2000). В настоящее время установлена важная роль Т-клеток иммунной системы, а именно активации Th1-лимфоцитов, которые являются продуцентами IL2, в патогенезе артериальной гипертензии. Повышенная продукция IL2, наряду с цитокинами IL1 β , IL6, TNF α и IFN γ , способствует воспалению сосудов и развитию АГ (Schiffrin, 2014).

Генетические варианты, ассоциированные с АГ, являются eQTL-локусами. Показано, что rs11065987 (*ATXN2/BRAP*) – cis- и trans-eQTL-локус, влияет на функциональную активность генов *ALDH2*, *ADAM1B* и *NAA25* в различных клетках и тканях (см. табл. 2). Генотип AA rs11065987 (*ATXN2/BRAP*) ассоциирован со снижением экспрессии гена *ALDH2* в аорте и повышением его экспрессии в лейкоцитах цельной крови, а также с повышением экспрессии гена *ADAM1B* в предсердии сердца, гена *NAA25* в базальных ганглиях. Для некоторых генов и их белковых продуктов ранее установлена связь с развитием сердечно-сосудистых заболеваний и гипертензии. Так, полиморфные варианты гена *BRAP* ассоциированы с риском развития атеросклероза сонных артерий (Liao et al., 2011); белковые продукты генов *ATXN2* и *SH2B3* вовлечены в развитие АГ (Siedlinski et al., 2020); rs671 гена *ALDH2* ассоциирован со снижением риска развития АГ (Mei et al., 2020). Для полиморфного варианта rs11065987 зарегистрирована связь со многими патологическими состояниями, включая уровень липидов в крови (Willer et al., 2013), индекс массы тела (Locke et al., 2015), ишемический инсульт, ишемическую болезнь сердца (Dichgans et al., 2014) и АГ (Levy et al., 2009).

Вариант rs11669386 влияет на функциональную активность гена *CARD8*, SNP которого значимы для формирования подверженности к развитию АГ, аневризмы аорты и инсульту (Zhao et al., 2016). Генотип AA rs11669386 ассоциирован с повышением уровня экспрессии гена *CARD8* в артериях и головном мозге, а также с повышением экспрессии гена *CCDC114* в большеберцовой артерии, легких и цельной крови (см. табл. 2). Белок *CARD8* совместно с *NLRP3* контролирует активность воспалительной каспазы-1 и вовлечен в регуляцию каспаза-1-опосредованной активации *IL1B* в макрофагах мыши, дендритных клетках и макрофагах периферической крови человека (Abdelaziz et al., 2015). Как показано на мышинной модели болезни Кавасаки, каспаза-1 и *IL1B* – важные воспалительные цитокины при развитии поражений коронарных сосудов (Lee et al., 2012).

Вариант rs2284033 оказывает выраженное влияние на экспрессию гена *IL2RB* в лейкоцитах периферической крови (Westra et al., 2013), а генотип GG связан со снижением экспрессии гена *ELFN2* в тканях легких (см.

табл. 2). Ранее была установлена ассоциация rs2284033 с БА, которая, однако, нивелируется при рассмотрении отдельных фенотипов, связанных с возрастом начала заболевания (Moffatt et al., 2010). Кроме этого, данный SNP находится в группе сцепления с 10 rSNP, для одного из которых (rs228953) показана связь с количеством эозинофилов в крови и риском развития БА (Han et al., 2020).

В нашей работе аллель G rs2284033 (*IL2RB*) ассоциирован с риском АГ (см. табл. 1). В настоящее время известна роль иммунной системы и процессов воспаления в патогенезе артериальной гипертензии. Повышенная экспрессия гена *IL2RB* выявлена в лейкоцитах у пациентов с АГ (Huan et al., 2015). Ввиду этого полиморфизм гена *IL2RB* может predispose в совокупности с другими факторами к развитию артериальной гипертензии.

Генотип GG rs11191582 (*NT5C2*) связан с понижением экспрессии генов *CALHM2* и *MARCKSLIP1* в аорте, генов *NT5C2* и *MARCKSLIP1* – в клетках цельной крови и с увеличением экспрессии генов *ARL3* и *SFXN2* – в ткани легкого (см. табл. 2). Белковый продукт гена *CALHM2* модулирует кальциевый гомеостаз, поддержание которого необходимо для выполнения клеточных функций, таких как сокращение, пролиферация, миграция и рост, нарушение которых влияет на развитие сердечно-сосудистых заболеваний. Ранее было показано, что rs11191582 (*NT5C2*) локализуется в одном блоке сцепления с rSNPs (rs11191548, rs11191559, rs11191580, rs11191593, rs12413409 и rs943037), для которых установлена связь с регуляцией артериального давления и развитием ишемической болезни сердца (Matsunaga et al., 2011). В нуклеотидной последовательности гена *ARL3* идентифицированы SNP, находящиеся в разных блоках сцепления и ассоциированные с уровнем артериального давления. Это позволило предположить, что в локусе 10q24.32, где локализованы гены *ARL3* и *SFXN2*, могут находиться многочисленные «причинные» генетические варианты predispose к АГ (Li et al., 2017).

Оценка регуляторного потенциала SNP, ассоциированных с коморбидным фенотипом БА и АГ

Генетические варианты, ассоциированные с фенотипом БА+АГ, располагаются в DNase I гиперчувствительных сайтах (rs1010461, rs7025144) в области энхансеров (rs7025144, rs2022318) и влияют на аффинность TF (rs7038716, rs2022318) (см. табл. 2).

Вариант rs1010461, локализованный в интроне генов *ANG* и *RNASE4*, не изменяет аффинность TF, но показана его связь с функциональной активностью этих генов в клетках крови, артериях, сердце, легких и головном мозге (см. табл. 2). Показано, что генотип AA rs1010461 связан со снижением экспрессии гена *ANG* в большеберцовой артерии и аорте, но повышением уровня экспрессии данного гена в клетках цельной крови. Генотип AA ассоциирован с повышением уровня экспрессии гена рибонуклеазы 4 (*RNASE4*) в лейкоцитах цельной крови, тканях левого желудочка, легких, головного мозга и большеберцовой артерии.

Ген *RNASE4* имеет те же промоторы и экспрессируется совместно с геном ангиогенина (*ANG*). Однако роль *RNASE4* в развитии сердечно-сосудистых и бронхолегоч-

ных заболеваний неизвестна. В свою очередь, ангиогенин является мощным индуктором образования кровеносных сосудов и может быть использован в качестве сывороточного маркера развития сердечно-сосудистых заболеваний (Yu et al., 2018). В период астматического приступа в мокроте пациентов регистрируется повышение фактора роста эндотелия сосудов и ангиогенина, которые в значительной степени снижаются после кортикостероидной терапии (Abdel-Rahman et al., 2006). Возможно, именно лечение БА кортикостероидами может выступать в качестве неблагоприятного фактора для развития последующей артериальной гипертензии у индивидуумов, предрасположенных к этой патологии.

Аллель T rs7038716 (*AL160272.2*) связан со снижением аффинности к ТФ Dobox4. Генотипы TT rs7038716 и TT rs7025144 ассоциированы со снижением функциональной активности гена *TLR4* в лейкоцитах цельной крови (см. табл. 2). В настоящем исследовании с БА ассоциированы аллели и генотипы, приводящие к повышению функциональной активности гена *TLR4*, тогда как с коморбидностью БА и АГ ассоциированы генотипы, связанные с пониженной экспрессией гена *TLR4* в клетках крови. Этот результат требует дальнейшего исследования и объяснения.

Аллель C rs2022318 (*ABTB2/CAT*) связан с повышением аффинности к ТФ HEN1 и Zfp691, но со снижением – ZNF263 и p53. Известно, что в ответ на повреждение ДНК, гипоксию и окислительный стресс для обеспечения клеточной защиты повышается экспрессия p53. Появляются новые данные, подтверждающие защитный эффект P53 при воспалительных процессах в легких. В частности, показано, что дефицит p53 в эндотелиальных клетках сосудов легких связан с тяжелыми респираторными нарушениями (Uddin, Varabutis, 2020). Для ZNF263 продемонстрирована ассоциация с атеросклерозом через регуляцию экспрессии гена *TGFB1*, белковый продукт которого принимает активное участие в патогенезе различных заболеваний (Dhaouadi et al., 2014).

Генотип CC rs2022318 связан со снижением экспрессии гена *ABTB2* в клетках цельной крови и гена каталазы (*CAT*) в тканях аорты, левого желудочка, легких, коронарных артериях и клетках цельной крови (см. табл. 2). Каталаза – важный антиоксидантный фермент, снижение активности которого наблюдается при многих заболеваниях, вызванных окислительным стрессом. Установлена связь SNP, локализованных в промоторе гена каталазы, с развитием кардиометаболических заболеваний (Doğan et al., 2019) и бронхиальной астмы (Taniguchi et al., 2014). Данных о связи полиморфизма гена *ABTB2*, его функциональной активности или белкового продукта с АГ и БА в научной литературе не обнаружено.

Заключение

Таким образом, SNP, ассоциированные с изученными фенотипами, БА, АГ и БА+АГ, являются регуляторными (rSNP), а также eQTL-локусами, локализируются в активно транскрибируемых регионах генома и влияют на функциональную активность различных генов в клетках крови и органах-мишенях заболеваний – легких, сосудах, сердце, головном мозге.

Ассоциация rs1927914 и rs1980616 с БА может быть объяснена за счет влияния аллеля G rs1927914 на изменение аффинности транскрипционных факторов семейства Pou и связи генотипа GG с повышением уровня экспрессии гена *TLR4* в клетках крови; связи аллеля C rs1980616 с повышением аффинности транскрипционного фактора Klf4, участвующего в воспалении, ремоделировании дыхательных путей и контроле ответа клетки по Th2-типу, а также ассоциации генотипа CC с повышением экспрессии гена *SERPINA1* в клетках крови.

В основе ассоциации rs11065987, rs2284033, rs11191582 и rs11669386 с АГ может быть: влияние аллеля A rs11065987 на снижение аффинности транскрипционного фактора Ноха9 и уменьшение пула эндотелиальных клеток-предшественников, что нарушает неоваскуляризацию и репарацию повреждений сосудов, а генотип AA оказывает влияние на изменение экспрессии гена *ALDH2* в клетках крови и сосудах; связь аллеля A rs11669386 с повышением аффинности транскрипционного фактора Irf, который играет ведущую роль в регуляции ремоделирования сердца при перегрузке давлением и фактора Pou3f2, ассоциированного с развитием ремоделирования левого желудочка при АГ; генотип AA ассоциирован с повышением экспрессии гена *CARD8* в сосудах, белковый продукт которого входит в состав инфламасомы и участвует в регуляции воспалительных реакций при различных, в том числе сердечно-сосудистых, заболеваниях; влияние аллеля G rs2284033 на снижение аффинности к ТФ RORalpha1, подавляющего TNF-alpha индуцированную экспрессию молекул адгезии VCAM-1 и ICAM-1 в эндотелиальных клетках и связи генотипа GG rs11191582 с изменением уровня экспрессии генов *NT5C2*, *ARL3* и *SFXN2* в клетках крови, сосудах, сердце.

Ассоциация rs7038716, rs7025144, rs1010461 и rs2022318 с коморбидным фенотипом БА и АГ может быть обусловлена: связью генотипов TT и TT rs7038716 и rs7025144 со снижением функциональной активности гена *TLR4* в клетках крови; связью генотипа AA rs1010461 с изменением экспрессии гена *ANG* в клетках крови и сосудах, белковый продукт которого играет важную роль в патогенезе как АГ, так и БА; влиянием аллеля C rs2022318 на повышение аффинности транскрипционного фактора p53, экспрессия которого увеличивается при воспалительных процессах в легких, и связью генотипа CC со снижением экспрессии гена *CAT* в клетках крови, легких, сосудах и сердце, снижение активности которой наблюдается при заболеваниях, вызванных окислительным стрессом.

Список литературы / References

- Брагина Е.Ю., Гончарова И.А., Фрейдин М.Б., Жалсанова И.Ж., Гомбоева Д.Е., Немеров Е.В., Пузырев В.П. Гаплотипический анализ генов *CAT*, *TLR4* и *IL10* у больных бронхиальной астмой с сопутствующей артериальной гипертензией. *Сиб. науч. мед. журн.* 2019;39(6):55-64. DOI 10.15372/SSMJ20190607.
- [Bragina E.Y., Goncharova I.A., Freidin M.B., Zhalsanova I.Z., Gomboeva D.E., Nemerov E.V., Puzyrev V.P. Analysis of haplotypes of *CAT*, *TLR4*, and *IL10* genes in bronchial asthma patients comorbid with arterial hypertension. *Sibirskiy Nauchnyy Meditsinskiy Zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal.* 2019;39(6): 55-64. DOI 10.15372/SSMJ20190607. (in Russian)]

- Abdel-Rahman A.M., El-Sahrigy S.A., Bakr S.I. A comparative study of two angiogenic factors: vascular endothelial growth factor and angiogenin in induced sputum from asthmatic children in acute attack. *Chest*. 2006;129(2):266-271. DOI 10.1378/chest.129.2.266.
- Abdelaziz D.H.A., Khalil H., Cormet-Boyaka E., Amer A.O. The cooperation between the autophagy machinery and the inflammasome to implement an appropriate innate immune response: do they regulate each other? *Immunol. Rev.* 2015;265(1):194-204. DOI 10.1111/imr.12288.
- Aneas I., Decker D.C., Howard C.L., Sobreira D.R., Sakabe N.J., Blaine K.M., Stein M.M., ... Gomez-Skarmeta J.L., Schoetler N., Ober C., Sperling A.I., Nobrega M.A. Asthma-associated variants induce IL33 differential expression through a novel regulatory region. *bioRxiv*. 2020.09.09.290098. DOI 10.1101/2020.09.09.290098.
- Bragina E.Y., Goncharova I.A., Garaeva A.F., Zhalsanova I.Z., Gomboeva D.E., Freidin M.B., Nemerov E.V., Babovskaya A.A., Karpov A.B., Semenova Y.V., Saik O.V., Ivanisenko V.A., Zolotareva O.I., Hofstaedt R., Dosenko V.E. Molecular relationships between bronchial asthma and hypertension as comorbid diseases. *J. Integr. Bioinform.* 2018;15(4):20180052. DOI 10.1515/jib-2018-0052.
- Busse W.W. Biological treatments for severe asthma: A major advance in asthma care. *Allergol. Int.* 2019;68(2):158-166. DOI 10.1016/j.alit.2019.01.004.
- Cannon M.V., van Gilst W.H., de Boer R.A. Emerging role of liver X receptors in cardiac pathophysiology and heart failure. *Basic Res. Cardiol.* 2016;111(1):3. DOI 10.1007/s00395-015-0520-7.
- Dhaouadi N., Li G.-Y., Feugier P., Gustin M.-P., Dab H., Kacem K., Bricca G., Cerutti C. Computational identification of potential transcriptional regulators of TGF- β 1 in human atherosclerotic arteries. *Genomics*. 2014;103(5-6):357-370. DOI 10.1016/j.ygeno.2014.05.001.
- Dichgans M., Malik R., König I.R., Rosand J., Clarke R., Gretarsdottir S., Thorleifsson G., ... Roberts R., Markus H.S., Samani N.J., Farrall M., Schunkert H., METASTROKE Consortium; CARDIOGRAM Consortium; C4D Consortium; International Stroke Genetics Consortium. Shared genetic susceptibility to ischemic stroke and coronary artery disease: a genome-wide analysis of common variants. *Stroke*. 2014;45(1):24-36. DOI 10.1161/STROKEAHA.113.002707.
- Doğan A., Özsensoy Y., Türker F.S. MnSOD, CAT and GPx-3 genetic polymorphisms in coronary artery disease. *Mol. Biol. Rep.* 2019;46(1):841-845. DOI 10.1007/s11033-018-4539-3.
- Han Y., Jia Q., Jahani P.S., Hurrell B.P., Pan C., Huang P., Gukasyan J., Woodward N.C., Eskin E., Gilliland F.D., Akbari O., Hartiala J.A., Allayee H. Genome-wide analysis highlights contribution of immune system pathways to the genetic architecture of asthma. *Nat. Commun.* 2020;15;11(1):1776. DOI 10.1038/s41467-020-15649-3.
- Himes S.R., Reeves R., Attema J., Nissen M., Li Y., Shannon M.F. The role of high-mobility group I(Y) proteins in expression of IL-2 and T cell proliferation. *J. Immunol.* 2000;164(6):3157-3168. DOI 10.4049/jimmunol.164.6.3157.
- Huan T., Esko T., Peters M.J., Pilling L.C., Schramm K., Schurmann C., Chen B.H., ... Prokisch H., Völker U., van Meurs J.B., Ferrucci L., Levy D. A meta-analysis of gene expression signatures of blood pressure and hypertension. *PLoS Genet.* 2015;11(3):e1005035. DOI 10.1371/journal.pgen.1005035.
- Jiang D.S., Li L., Huang L., Gong J., Xia H., Liu X., Wan N., Wei X., Zhu X., Chen Y., Chen X., Zhang X.D., Li H. Interferon regulatory factor 1 is required for cardiac remodeling in response to pressure overload. *Hypertension*. 2014;64(1):77-86. DOI 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03229.
- Lee Y., Schulte D.J., Shimada K., Chen S., Crother T.R., Chiba N., Fishbein M.C., Lehman T.J., Arditi M. Interleukin-1 β is crucial for the induction of coronary artery inflammation in a mouse model of Kawasaki disease. *Circulation*. 2012;125(12):1542-1550. DOI 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.072769.
- Levy D., Ehret G.B., Rice K., Verwoert G.C., Launer L.J., Dehghan A., Glazer N.L., ... Gudnason V., Larson M.G., Chakravarti A., Psaty B.M., van Duijn C.M. Genome-wide association study of blood pressure and hypertension. *Nat. Genet.* 2009;41(6):677-687. DOI 10.1038/ng.384.
- Li C., Kim Y.K., Dorajoo R., Li H., Lee I.T., Cheng C.Y., He M., ... Wu J.Y., Lin X., Tai E.S., Kim B.J., Kelly T.N. Genome-wide association study meta-analysis of long-term average blood pressure in East Asians. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2017;2:e001527. DOI 10.1161/CIRCGENETICS.116.001527.
- Liao Y.C., Wang Y.S., Guo Y.C., Ozaki K., Tanaka T., Lin H.-F., Chang M.-H., Chen K.-C., Yu M.-L., Sheu S.-H., Juo S.-H. BRAP activates inflammatory cascades and increases the risk for carotid atherosclerosis. *Mol. Med.* 2011;17(9-10):1065-1074. DOI 10.2119/molmed.2011.00043.
- Locke A.E., Kahali B., Berndt S.I., Justice A.E., Pers T.H., Day F.R., Powell C., ... North K.E., Ingelsson E., Hirschhorn J.N., Loos R.J.F., Speliotes E.K. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature*. 2015;518(7538):197-206. DOI 10.1038/nature14177.
- Malerba G., Patuzzo C., Trabetti E., Lauciello M.C., Galavotti R., Pescollidung L., Whalen M.B., Zanoni G., Martinati L.C., Bonner A.L., Pignatti P.F. Chromosome 14 linkage analysis and mutation study of 2 serpin genes in allergic asthmatic families. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001;107(4):654-658. DOI 10.1067/mai.2001.113865.
- Matsunaga H., Ito K., Akiyama M., Takahashi A., Koyama S., Nomura S., Ieki H., ... Murakami Y., Akazawa H., Kubo M., Kamatani Y., Komuro I. Transethnic meta-analysis of genome-wide association studies identifies three new loci and characterizes population-specific differences for coronary artery disease. *Circ. Genom. Precis. Med.* 2020;13(3):e002670. DOI 10.1161/CIRCGEN.119.002670.
- Mei X.F., Hu S.D., Liu P.F., Li F., Zhou X.Y., Zhou Y.F., Chen T. *ALDH2* gene rs671 polymorphism may decrease the risk of essential hypertension. *Int. Heart J.* 2020;61(3):562-570. DOI 10.1536/ihj.19-259.
- Migita H., Satozawa N., Lin J.-H., Morser J., Kawai K. ROR α 1 and ROR α 4 suppress TNF- α -induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in human endothelial cells. *FEBS Lett.* 2004;557(1-3):269-274. DOI 10.1016/s0014-5793(03)01502-3.
- Moffatt M.F., Gut I.G., Demenais F., Strachan D.P., Bouzigon E., Heath S., von Mutius E., Farrall M., Lathrop M., Cookson W., GABRIEL Consortium. A large-scale, consortium-based genome-wide association study of asthma. *N. Engl. J. Med.* 2010;363(13):1211-1221. DOI 10.1056/NEJMoa0906312.
- Moore W.C., Hastie A.T., Li X., Li H., Busse W.W., Jarjour N.N., Wenzel S.E., Peters S.P., Meyers D.A., Bleecker E.R. National Heart, Lung, and Blood Institute's Severe Asthma Research Program. Sputum neutrophil counts are associated with more severe asthma phenotypes using cluster analysis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2014;133(6):1557-63.e5. DOI 10.1016/j.jaci.2013.10.011. Epub 2013 Dec 9.
- Nimpong J.A., Gebregziabher W., Singh U.P., Nagarkatti P., Nagarkatti M., Hodge J., Liu C., Fan D., Ai W. Deficiency of *KLF4* compromises the lung function in an acute mouse model of allergic asthma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017;493(1):598-603. DOI 10.1016/j.bbrc.2017.08.146.
- Pirro M., Schillaci G., Menecali C., Bagaglia F., Paltriccina R., Vauda G., Mannarino M.R., Mannarino E. Reduced number of circulating endothelial progenitors and HOXA9 expression in CD34+ cells of hypertensive patients. *J. Hypertens.* 2007;25(10):2093-2099. DOI 10.1097/HJH.0b013e32828e506d.
- Saik O.V., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Bragina E.Y., Freidin M.B., Goncharova I.A., Dosenko V.E., Zolotareva O.I., Hofstaedt R., Lavrik I.N., Rogaev E.I., Ivanisenko V.A. Novel candidate genes important for asthma and hypertension comorbidity revealed from associative gene networks. *BMC Med. Genomics*. 2018;11(Suppl. 1):15. DOI 10.1186/s12920-018-0331-4.
- Schiffrin E.L. Immune mechanisms in hypertension and vascular injury. *Clin. Sci. (Lond.)*. 2014;126(4):267-274. DOI 10.1042/CS20130407.

- Siedlinski M., Jozefczuk E., Xu X., Teumer A., Evangelou E., Schnabel R.B., Welsh P., Maffia P., Erdmann J., Tomaszewski M., Caulfield M.J., Sattar N., Holmes M.V., Guzik T.J. White blood cells and blood pressure: A Mendelian randomization study. *Circulation*. 2020;141(16):1307-1317. DOI 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.045102.
- Su X., Ren Y., Li M., Zhao X., Kong L., Kang J. Prevalence of comorbidities in asthma and nonasthma patients: a meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(22):e3459. DOI 10.1097/MD.00000000000003459.
- Taniguchi N., Konno S., Isada A., Hattori T., Kimura H., Shimizu K., Maeda Y., Makita H., Hizawa N., Nishimura M. Association of the CAT-262C>T polymorphism with asthma in smokers and the non-emphysematous phenotype of chronic obstructive pulmonary disease. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2014;113(1):31-36.e2. DOI 10.1016/j.anai.2014.04.012.
- Thomas M.A., Mordvinov V.A., Sanderson C.J. The activity of the human interleukin-5 conserved lymphokine element 0 is regulated by octamer factors in human cells. *Eur. J. Biochem.* 1999;265(1):300-307. DOI 10.1046/j.1432-1327.1999.00732.x.
- Tussiwand R., Everts B., Grajales-Reyes G.E., Kretzer N.M., Iwata A., Bagaitkar J., Wu X., Wong R., Anderson D.A., Murphy T.L., Pearce E.J., Murphy K.M. Klf4 expression in conventional dendritic cells is required for T helper 2 cell responses. *Immunity*. 2015;42(5):916-928. DOI 10.1016/j.immuni.2015.04.017.
- Uddin M.A., Barabutis N. P53 in the impaired lungs. *DNA Repair (Amst.)*. 2020;95:102952. DOI 10.1016/j.dnarep.2020.102952.
- van Arensbergen J., Pagie L., FitzPatrick V., de Haas M., Baltissen M., Comoglio F., van der Weide R., Teunissen H., Vösa U., Franke L., de Wit E., Vermeulen M., Bussemaker H., van Steensel B. Systematic identification of human SNPs affecting regulatory element activity. *bioRxiv*. 2018. DOI 10.1101/460402.
- Weatherburn C.J., Guthrie B., Mercer S.W., Morales D.R. Comorbidities in adults with asthma: Population-based cross-sectional analysis of 1.4 million adults in Scotland. *Clin. Exp. Allergy*. 2017;47(10):1246-1252. DOI 10.1111/cea.12971.
- Westra H.J., Peters M.J., Esko T., Yaghootkar H., Schurmann C., Kettunen J., Christiansen M.W., Fairfax B.P., ... Teumer A., Frayling T.M., Metspalu A., van Meurs J.B.J., Franke L. Systematic identification of trans eQTLs as putative drivers of known disease associations. *Nat. Genet.* 2013;45(10):1238-1243. DOI 10.1038/ng.2756.
- Willer C.J., Schmidt E.M., Sengupta S., Peloso G.M., Gustafsson S., Kanoni S., Ganna A., ... Deloukas P., Kathiresan S., Mohlke K.L., Ingelsson E., Abecasis G.R. Global Lipids Genetics Consortium. Discovery and refinement of loci associated with lipid levels. *Nat. Genet.* 2013;45(11):1274-1283. DOI 10.1038/ng.2797.
- Yu D., Cai Y., Zhou W., Sheng J., Xu Z. The potential of angiogenin as a serum biomarker for diseases: systematic review and meta-analysis. *Dis. Markers*. 2018;2018:1984718. DOI 10.1155/2018/1984718.
- Zhang Q., Qian F.H., Zhou L.F., Wei G.Z., Jin G.F., Bai J.L., Yin K.S. Polymorphisms in toll-like receptor 4 gene are associated with asthma severity but not susceptibility in a Chinese Han population. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2011;21(5):370-377.
- Zhao X., Gu C., Yan C., Zhang X., Li Y., Wang L., Ren L., Zhang Y., Peng J., Zhu Z., Han Y. NALP3-inflammasome-related gene polymorphisms in patients with prehypertension and coronary atherosclerosis. *Biomed. Res. Int.* 2016;2016:7395627. DOI 10.1155/2016/7395627.

ORCID ID

I.A. Goncharova orcid.org/0000-0002-9527-7015
E.Yu. Bragina orcid.org/0000-0002-1103-3073
I.Zh. Zhalsanova orcid.org/0000-0001-6848-7749
M.B. Freidin orcid.org/0000-0002-1439-6259
M.S. Nazarenko orcid.org/0000-0002-0673-4094

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ № 075-00603-19-00.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 05.05.2021. После доработки 07.07.2021. Принята к публикации 07.07.2021.

Таксономический состав и биоразнообразие кишечного микробиома пациентов с синдромом раздраженного кишечника, язвенным колитом и бронхиальной астмой

А.Ю. Тикунов¹, А.Н. Швалов², В.В. Морозов¹, И.В. Бабкин¹, Г.В. Селедцова³, И.О. Волошина¹, И.П. Иванова³,
А.В. Бардашева¹, В.В. Морозова¹, В.В. Власов¹, Н.В. Тикунова¹ ✉

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора Российской Федерации, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

³ Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

✉ tikunova@niboch.nsc.ru; arttik@ngs.ru

Аннотация. К настоящему времени показана ассоциация дисбаланса кишечной микробиоты с различными заболеваниями человека, включая не только патологии желудочно-кишечного тракта, но и нарушения иммунной системы. Однако, несмотря на значительный объем накопленных данных, многие ключевые вопросы до сих пор остаются без ответа. Описаны различия в микробных сообществах кишечника в зависимости от возраста больных, типа питания и региона проживания. Учитывая ограниченность данных о составе микробиоты кишечника при язвенном колите (ЯК) и синдроме раздраженного кишечника (СРК) у пациентов из регионов Сибири, а также отсутствие сведений о кишечной микробиоте больных бронхиальной астмой (БА), цель исследования – оценка биоразнообразия кишечного микробиома пациентов с СРК, ЯК и БА в сравнении с таковым здоровых добровольцев (ЗД). Проведена сравнительная оценка биоразнообразия и таксономической структуры микробиома содержимого кишечника пациентов с СРК, ЯК, БА и ЗД, определенных на основании 16S рРНК-последовательностей бактериальных генов. В четырех выборках доминировали последовательности типов Firmicutes и Bacteroidetes. Третьи по встречаемости во всех группах – последовательности типа Proteobacteria, членами которого являются патогенные и условно-патогенные бактерии. Последовательности типа Actinobacteria были в среднем четвертыми по встречаемости. Результаты показали наличие дисбиоза в образцах пациентов по сравнению со здоровыми участниками. Соотношение Firmicutes/Bacteroidetes в выборках СРК и ЯК уменьшилось относительно ЗД, а в группе БА – увеличилось. В образцах пациентов с заболеваниями кишечника (СРК и ЯК) обнаружено увеличение доли последовательностей типа Bacteroidetes и уменьшение доли последовательностей класса Clostridia, а также семейства Ruminococcaceae, но не Erysipelotrichaceae. В выборках СРК, ЯК и БА отмечено достоверно больше в сравнении с ЗД последовательностей Proteobacteria, включая *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, *Parasutterella*, *Halomonas*, *Vibrio*, а также последовательности *Escherichia* и *Shigella*. В кишечном микробиоме взрослых пациентов с БА выявлено уменьшение доли последовательностей *Roseburia*, *Lachnospira*, *Veillonella*, однако доля последовательностей *Faecalibacterium* и *Lactobacillus* была такой же, как и у здоровых участников. Впервые получены данные о существенном увеличении доли последовательностей *Halomonas* и *Vibrio* в кишечном микробиоме пациентов с бронхиальной астмой.

Ключевые слова: микробиом; 16S рРНК-последовательности; язвенный колит; синдром раздраженного кишечника; бронхиальная астма.

Для цитирования: Тикунов А.Ю., Швалов А.Н., Морозов В.В., Бабкин И.В., Селедцова Г.В., Волошина И.О., Иванова И.П., Бардашева А.В., Морозова В.В., Власов В.В., Тикунова Н.В. Таксономический состав и биоразнообразие кишечного микробиома пациентов с синдромом раздраженного кишечника, язвенным колитом и бронхиальной астмой. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(8):864-873. DOI 10.18699/VJ21.100

Taxonomic composition and biodiversity of the gut microbiome from patients with irritable bowel syndrome, ulcerative colitis, and asthma

A.Y. Tikunov¹, A.N. Shvalov², V.V. Morozov¹, I.V. Babkin¹, G.V. Seledtsova³, I.O. Voloshina¹, I.P. Ivanova³, A.V. Bardasheva¹,
V.V. Morozova¹, V.V. Vlasov¹, N.V. Tikunova¹ ✉

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

³ Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

✉ tikunova@niboch.nsc.ru; arttik@ngs.ru

Abstract. To date, the association of an imbalance of the intestinal microbiota with various human diseases, including both diseases of the gastrointestinal tract and disorders of the immune system, has been shown. However, despite the huge amount of accumulated data, many key questions still remain unanswered. Given limited data on the composition of the

gut microbiota in patients with ulcerative colitis (UC) and irritable bowel syndrome (IBS) from different parts of Siberia, as well as the lack of data on the gut microbiota of patients with bronchial asthma (BA), the aim of the study was to assess the biodiversity of the gut microbiota of patients with IBS, UC and BA in comparison with those of healthy volunteers (HV). In this study, a comparative assessment of the biodiversity and taxonomic structure of gut microbiome was conducted based on the sequencing of 16S rRNA genes obtained from fecal samples of patients with IBS, UC, BA and volunteers. Sequences of the Firmicutes and Bacteroidetes types dominated in all samples studied. The third most common in all samples were sequences of the Proteobacteria type, which contains pathogenic and opportunistic bacteria. Sequences of the Actinobacteria type were, on average, the fourth most common. The results showed the presence of dysbiosis in the samples from patients compared to the sample from HVs. The ratio of Firmicutes/Bacteroidetes was lower in the IBS and UC samples than in HV and higher the BA samples. In the samples from patients with intestinal diseases (IBS and UC), an increase in the proportion of sequences of the Bacteroidetes type and a decrease in the proportion of sequences of the Clostridia class, as well as the Ruminococcaceae, but not Erysipelotrichaceae family, were found. The IBS, UC, and BA samples had significantly more Proteobacteria sequences, including *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, *Parasutterella*, *Halomonas*, *Vibrio*, as well as *Escherichia* spp. and *Shigella* spp. In the gut microbiota of adults with BA, a decrease in the proportion of *Roseburia*, *Lachnospira*, *Veillonella* sequences was detected, but the share of *Faecalibacterium* and *Lactobacillus* sequences was the same as in healthy individuals. A significant increase in the proportion of *Halomonas* and *Vibrio* sequences in the gut microbiota in patients with BA has been described for the first time.

Key words: microbiome; 16S rRNA sequences; ulcerative colitis; irritable bowel syndrome; bronchial asthma.

For citation: Tikunov A.Y., Shvalov A.N., Morozov V.V., Babkin I.V., Seledtsova G.V., Voloshina I.O., Ivanova I.P., Bardasheva A.V., Morozova V.V., Vlasov V.V., Tikunova N.V. Taxonomic composition and biodiversity of the gut microbiome from patients with irritable bowel syndrome, ulcerative colitis, and asthma. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(8):864-873. DOI 10.18699/VJ21.100. (in Russian)

Введение

К настоящему времени накоплено достаточно данных о микробных сообществах кишечника человека и показана ассоциация дисбаланса кишечной микробиоты с различными патологическими состояниями, в том числе не только заболеваниями желудочно-кишечного тракта, но и нарушениями иммунной системы (O'Hara, Shanahan, 2006). Однако, несмотря на значительный объем информации, многие ключевые вопросы остаются без ответа. Так, до сих пор неизвестно, являются ли такие заболевания кишечника, как язвенный колит (ЯК) и синдром раздраженного кишечника (СРК), результатом нарушенного иммунного ответа на нормальную микробиоту или служат проявлением нормального иммунного ответа на нарушения в микрофлоре кишечника (Cheng, Fisher, 2017).

Патогенез этих заболеваний также не вполне ясен: вероятно, механизм развития имеет сложную природу и опосредован нарушениями кишечной микробиоты, генетической предрасположенностью и экологическими факторами (Shen et al., 2018). Известно лишь, что при ЯК и СРК снижено биоразнообразие микробиоты кишечника (Machiels et al., 2014; Dubinsky, Braun, 2015). При ЯК отмечено уменьшение количества представителей типов Bacteroidetes и Firmicutes; для последнего зарегистрировано уменьшение встречаемости последовательностей *Roseburia hominis* и *Faecalibacterium prausnitzii* (отряд Clostridia, сем. Lachnospiraceae и Ruminococcaceae соответственно) (Machiels et al., 2014; Тикунов и др., 2020). Особенно заметно снижение *Akkermansia muciniphila* (тип Verrucomicrobia), в норме достигающей 1–5 % всего бактериального сообщества (Manichanh et al., 2012; Vajer et al., 2017). Одновременно в микробиоте пациентов с ЯК увеличено количество представителей Actinomycetes и Proteobacteria, а среди протеобактерий часто выявляют *Helicobacter* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia* spp. и энтероинвазивные *Escherichia coli* (Saebo et al., 2005; Gradel et al., 2009; Sonnenberg, Genta, 2012; Shen et al., 2018; Тикунов

и др., 2020). В случае СРК, как и при ЯК, в микробиоте кишечника количество представителей типа Proteobacteria увеличено, а число представителей Actinomycetes, наоборот, уменьшено (Bennet et al., 2015; Su et al., 2018).

Соотношение основных представителей микробного сообщества кишечника человека, Firmicutes/Bacteroidetes, при СРК может и увеличиваться, и уменьшаться (Tana et al., 2010; Rajilić-Stojanović et al., 2011; Jeffery et al., 2012; Jalanka-Tuovinen et al., 2014; Pozuelo et al., 2015; Tap et al., 2017). Такое несовпадение данных может быть связано как с динамичностью кишечного микробного сообщества у отдельного индивидуума, так и высоким биоразнообразием кишечной микробиоты у людей не только при различном состоянии здоровья, но и в зависимости от возраста, региона проживания и особенностей питания (Fujimura et al., 2010; Qin et al., 2010; Donaldson et al., 2016). В связи с этим изучение ассоциации особенностей микробиоты с различными заболеваниями человека – одно из наиболее актуальных направлений современных биомедицинских исследований.

Учитывая ограниченность данных о составе микробиоты кишечника при ЯК и СРК у пациентов из регионов Сибири, а также отсутствие сведений о кишечной микробиоте больных бронхиальной астмой (БА), цель исследования – оценка 16S рРНК-профилей пациентов с СРК, ЯК и БА в сравнении с таковыми здоровых доноров.

Материалы и методы

В работе использовали образцы фекалий, полученные от восьми пациентов с БА, восьми больных с СРК и 18 пациентов с ЯК. Среди исследуемых женщины составили 47.4 %, мужчины – 52.6 %. Диагнозы «синдром раздраженного кишечника» и «язвенный колит» подтверждали на основании результатов исследования уровня фекального кальпротектина, данных фиброколоноскопии и гистологического исследования биоптатов, взятых из разных отделов толстой и подвздошной кишок. Образцы пациен-

тов, в которых рутинными методами были обнаружены *Clostridium difficile*, не исследовали. Диагноз «атопическая бронхиальная астма» подтверждали на основании общего, биохимического и иммунологического анализов крови и данных сенсibilизации. Также в исследовании использованы восемь образцов здоровых добровольцев без хронических заболеваний и не болевших последние три месяца. Все пациенты и добровольцы отрицали систематическое употребление алкоголя, только три больных мужского пола с СРК употребляли табачные изделия. Все участники исследования в течение как минимум двух недель до забора образцов не принимали антибактериальные препараты. Все пациенты и добровольцы предоставили информированное согласие с проводимым исследованием и анонимной обработкой данных. Исследование одобрено локальным этическим комитетом Автономной некоммерческой организации «Центр новых медицинских технологий в Академгородке».

Выделение суммарной ДНК проводили, как описано ранее (Тикунов и др., 2020). Основные этапы включали осветление 50 мг из каждого образца с последующим применением набора для выделения ДНК из клеток тканей и крови (ООО «БиоЛабМикс», Россия) с добавлением лизоцима для повышения эффективности получения ДНК из грамположительных бактерий. Амплификацию фрагмента гена 16S рРНК, содержащего переменные участки V3 и V4, проводили методом полимеразной цепной реакции с использованием в качестве матрицы полученной ДНК фьюжн-праймеров (NEB-FF 5'-ACACTCTTCCCTACA CGACGCTCTTCCGACTCTACGGGAGGCAGCAG-3', NEB-FR 5'-GTGACTGGAGTTCAGACGTTGTGCTCTTC CGATCTGGACTACCGGGTATCT-3') и высокоточной полимеразы Q5 (New England Biolabs, США). Продукты амплификации очищали электрофоретически в геле из легкоплавкой SeaKem GTG-агарозы (Lonza, США).

Конструирование библиотек выполняли, как описано ранее (Тикунов и др., 2020). Основные этапы включали обогащение полученных ампликонов, введение баркодов и служебных последовательностей с использованием полимеразы Q5 и набора олигонуклеотидов Dual index set (New England Biolabs, США) с последующей очисткой полученных библиотек на магнитных частицах AMPure XP (Beckman Coulter, США). Концентрацию ДНК в библиотекх измеряли с помощью набора Qubit dsDNA HS (Life Technologies, США). По результатам измерений библиотеки объединяли в пул таким образом, чтобы соотношение ДНК-библиотек в пуле было эквимолярным. Секвенирование вели на платформе MiSeq с использованием набора реагентов MiSeq reagent kit v2 2 × 250-cycles (Illumina, США).

Методы анализа данных секвенирования описаны ранее (Тикунов и др., 2020). Предварительно из последовательностей ридов удаляли последовательности адаптеров и проводили фильтрацию ридов по качеству. Полученные риды анализировали с помощью генерации операционных таксономических единиц (OTU) с последующим картированием последовательностей на полученные OTU в пакете программ Usearch-9.2 и использованием классификации ридов алгоритмом Kraken по базе данных известных последовательностей 16S рРНК Silva v.132 (full).

В первом случае OTU генерировали алгоритмом unoise2 с отбраковкой химерных последовательностей и учетом ошибок чтения. Таблицы полученных частот встречаемости OTU обработаны в среде R3.3.3. Во втором случае полученные риды картировали на базу данных 16S рРНК Silva с помощью алгоритма seed-kraken с использованием разреженного *k*-мера со специальной решеткой, позволяющей увеличить специфичность классификации. Индекс Шеннона рассчитывали в пакете программ R; достоверность различий между индексами Шеннона определяли с помощью *t*-теста Хатчесона. Визуализацию результатов анализа библиотек последовательностей методом главных координат PCoA проводили на основе матриц дистанций с применением пакета программ vegan. Для установления достоверности различий между величинами использовали критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Оценка биоразнообразия бактериальных сообществ

На основе ДНК, выделенной из образцов фекалий пациентов и доноров, сконструированы 42 библиотеки фрагментов гена 16S рРНК. Фрагменты содержали переменные участки V3 и V4 гена 16S рРНК – на основе этой последовательности возможна таксономическая классификация большинства бактерий (Chakravorty et al., 2007; Wang, Qian, 2009). Образцы сгруппированы в четыре выборки: БА – 8 образцов больных атопической БА (средний возраст 38.1 года; от 25 до 56 лет), СРК – 8 образцов пациентов с СРК (средний возраст 44.9 года; от 25 до 64 лет), ЯК – 18 образцов пациентов с ЯК (средний возраст 39.6 года; от 25 до 65 лет), здоровые добровольцы (ЗД) – 8 образцов здоровых добровольцев (средний возраст 27.1 года; от 20 до 39 лет). Средний возраст добровольцев в группе ЗД был достоверно ниже в сравнении с группами пациентов с БА, СРК и ЯК ($p \leq 0.01$ во всех случаях); при этом данный показатель в трех выборках больных статистически значимо не различался.

Результаты секвенирования и классификации полученных ридов представлены в табл. 1. Все библиотеки содержали более 100 тыс. ридов, в среднем более 99.6 % ридов таксономически отнесены к определенному типу бактерий. В двух образцах больных БА и одном образце пациента с СРК обнаружены последовательности архей (тип Euryarchaeota).

Альфа-разнообразие бактериальных сообществ в исследуемых группах оценивали с помощью индекса Шеннона – комплексного показателя, учитывающего количество видов и их выровненность. Самым низким индекс Шеннона был для выборки ЯК, самым высоким – для ЗД (рис. 1), хотя различия не имели статистической значимости. Оценка выборок методом главных компонент показала, что наиболее компактно расположены точки, характеризующие библиотеки последовательностей из группы ЗД (рис. 2). Расположение точек, характеризующих библиотеки из выборок пациентов, при меньшем значении индекса Шеннона по сравнению с таковым для ЗД свидетельствует об относительной нестабильности микробиомов у таких больных.

Таблица 1. Результаты таксономической классификации ридов в библиотеках 16S рРНК

Признак		СРК, n = 8	ЯК, n = 18	БА, n = 8	ЗД, n = 8
Количество ридов, N ± δ		149863 ± 13477	138479 ± 16887	142314 ± 13724	129435 ± 12429
Доля ридов, классифицированных до бактериального типа, % ± δ		99.57 ± 0.18	99.66 ± 0.12	99.62 ± 0.11	99.64 ± 0.13
Индекс Шеннона, I ± δ		3.27 ± 0.85	3.05 ± 0.63	3.28 ± 0.72	3.48 ± 0.39
Общее количество бактериальных типов		11, от 7 до 8 в библиотеке	11, от 5 до 9 в библиотеке	11, от 6 до 9 в библиотеке	11, от 5 до 9 в библиотеке
Доля обнаруженных бактериальных типов, %	Firmicutes	53.2	56.1	65.1	70.4
	Bacteroidetes	38.5	31.3	18.5	26.5
	Proteobacteria	5.7	10.0	13.4	1.4
	Actinobacteria	1.0	1.9	0.7	0.7
	Verrucomicrobia	1.0	0.4	1.9	0.5
	Fusobacteria	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
	Tenericutes	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
	Synergistetes	< 0.1	< 0.1	но	< 0.1
	Epsilonbacteraeota	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
	Cyanobacteria	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
	Patescibacteria	< 0.1	< 0.1	< 0.1	но
	Fibrobacteres	но	но	< 0.1	< 0.1
Общее количество бактериальных классов		17, от 13 до 14 в библиотеке	15, от 11 до 15 в библиотеке	16, от 12 до 15 в библиотеке	17, от 10 до 15 в библиотеке
Обнаруженные бактериальные классы, %	Bacilli	0.8	1.5	0.6	0.5
	Clostridia	41.8	46.7	55.8	66.0
	Erysipelotrichia	0.2	0.2	0.2	< 0.1
	Negativicutes	10.2	7.5	8.3	3.7
	Bacteroidia	38.5	31.3	18.5	26.5
	Alphaproteobacteria	1.9	5.4	2.0	0.4
	Deltaproteobacteria	0.2	< 0.1	< 0.1	< 0.1
	Gammaproteobacteria	3.6	4.4	11.2	0.9
	Actinobacteria	0.6	0.6	0.5	0.4
	Coriobacteriia	0.4	1.3	0.3	0.3
	Verrucomicrobia	1.0	0.4	1.9	0.5
	Fusobacteriia	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
	Mollicutes	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
	Synergistia	< 0.1	< 0.1	но	< 0.1
	Campylobacteria	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
	Oxyphotobacteria	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
	Saccharimonadia	< 0.1	< 0.1	< 0.1	но
Fibrobacteria	но	но	< 0.1	< 0.1	

Примечание. Здесь и далее: библиотеки на основе образцов пациентов с симптомом раздраженного кишечника (СРК), бронхиальной астмой (БА), язвенным колитом (ЯК) и здоровых добровольцев (ЗД); но – не обнаружено.

Всего в библиотеках выявлены последовательности 12 типов бактерий (см. табл. 1); последовательности девяти типов присутствовали во всех четырех выборках. Из них последовательности пяти типов (Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria и Fusobacteria) определены во всех библиотеках, а последовательности, относящиеся к типу Verrucomicrobia, обнаружены во всех библиотеках из групп БА и ЗД, при этом в СРК и ЯК

они отсутствовали в одной и четырех библиотеках соответственно. Последовательности представителей типов Tenericutes, Epsilonbacteraeota, Cyanobacteria, Synergistetes, Patescibacteria и Fibrobacteres найдены не во всех библиотеках, а последних трех типов – не во всех выборках. В среднем во всех группах доминировали последовательности Firmicutes (в среднем по выборке > 53 %) и Bacteroidetes (в среднем > 18 %), причем в группе СРК

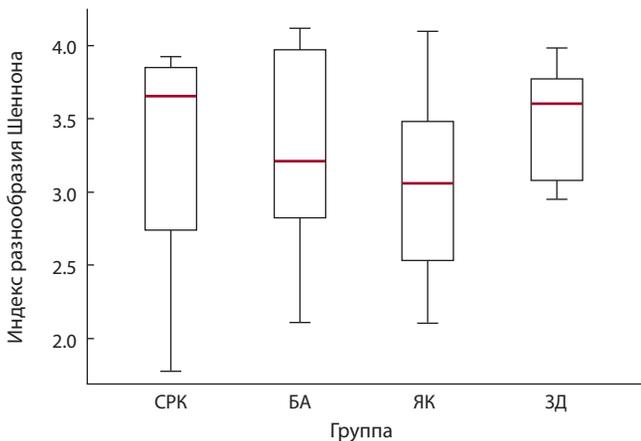


Рис. 1. Индекс Шеннона, отражающий альфа-разнообразие кишечного микробиома в выборках образцов, полученных от участников исследования.

Здесь и на рис. 2, 3: пациенты с синдромом раздраженного кишечника (СРК), бронхиальной астмой (БА), неспецифическим язвенным колитом (ЯК) и здоровые добровольцы (ЗД). Указаны медианные значения и квартили.

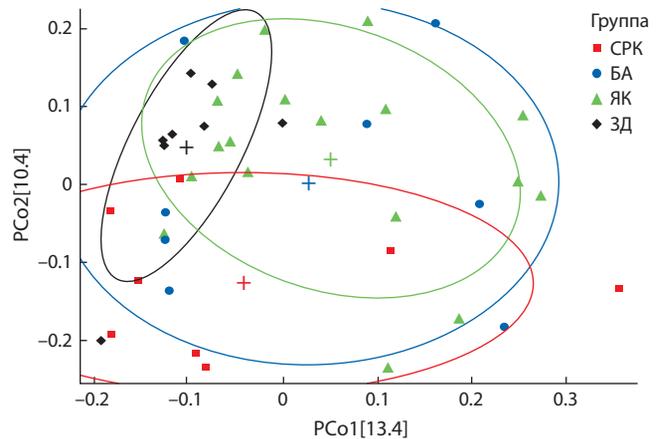


Рис. 2. Визуализация результатов анализа библиотек последовательностей методом главных координат PCoA на основе матриц дистанций.

Кресты обозначают центры областей, занимаемых соответствующими выборками. Оси X и Y отражают значения первой и второй главных координат соответственно.

последовательности *Bacteroidetes* выявлены статистически значимо чаще, чем в БА (в среднем 38.5 против 18.5%; $p \leq 0.05$). Третьими по встречаемости во всех выборках были последовательности *Proteobacteria*. Из табл. 1 видно, что меньше всего таких последовательностей зафиксировано в группе ЗД (1.36 %), в остальных выборках таких последовательностей отмечено существенно больше (СРК – 5.71 %, БА – 13.35 %, ЯК – 10.00 %); статистическая достоверность различий показана даже для групп ЗД и СРК. Последовательности типа *Actinobacteria* были в среднем четвертыми по встречаемости, однако в выборках ЯК и СРК (заболевания кишечника) их встречаемость в среднем превышала таковую для последовательностей *Proteobacteria* в группе ЗД.

Девять из двенадцати обнаруженных бактериальных типов представлены последовательностями единственного класса, включая один доминирующий тип *Bacteroidetes* (класс *Bacteroidia*). Еще один доминирующий тип, *Firmicutes*, был представлен последовательностями четырех классов – *Bacilli*, *Clostridia*, *Erysipelotrichia*, *Negativicutes*, причем во всех выборках доминировали последовательности класса *Clostridia*. Тип *Proteobacteria* содержал последовательности трех классов – *Alphaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria*, у пациентов из этого типа преобладали последовательности последнего класса. Тип *Actinobacteria* включал последовательности двух классов – *Actinobacteria* и *Coriobacteria*. Всего выявлены последовательности 18 классов (см. табл. 1). Встречаемость последовательностей основных порядков показана на рис. 3.

Сравнительный анализ таксономического состава микробных сообществ

Известно, что основными компонентами микробного сообщества кишечника здоровых людей выступают представители типов *Firmicutes* (~70 %), *Bacteroidetes* (~30 %), *Proteobacteria* (<5 %), *Actinobacteria* (<2 %), *Verrucomi-*

crocobia (<1 %) и *Fusobacteria* (<1 %); представители еще 10–12 типов бактерий являются транзитными или встречаются в зависимости от региона проживания человека, его возраста и типа питания (Belizário et al., 2018). Анализ таксономического состава библиотек из выборки ЗД показал соответствие средних значений приведенным показателям (см. табл. 1). Это позволило оценить сдвиг таксономического состава в кишечном микробиоме пациентов с СРК и ЯК (заболевания кишечника) и БА относительно кишечного микробиома здоровых доноров.

Изменение соотношения количества представителей *Firmicutes* и *Bacteroidetes* в микробиоте кишечника может быть одним из индикаторов нарушения состояния микробиоты, при этом сдвиг этого соотношения как в сторону увеличения, так и уменьшения описан при ряде заболеваний (Tana et al., 2010; Rajilić-Stojanović et al., 2011; Jeffery et al., 2012; Jalanka-Tuovinen et al., 2014; Pozuelo et al., 2015; Tap et al., 2017). Соотношения *Firmicutes*/*Bacteroidetes* в группе ЗД составило 2.6, в СРК и ЯК это соотношение существенно уменьшилось (1.4 и 1.8 соответственно), а в выборке БА – увеличилось (3.5) (табл. 2). Полученные данные согласуются с описанным ранее уменьшением встречаемости *Firmicutes* при ЯК (Machiels et al., 2014) и СРК (Jalanka-Tuovinen et al., 2014; Bennet et al., 2015; Pozuelo et al., 2015; Su et al., 2018), однако относительно СРК результаты разнятся и в ряде исследований зарегистрировано увеличение соотношения *Firmicutes*/*Bacteroidetes* (Tana et al., 2010; Rajilić-Stojanović et al., 2011; Jeffery et al., 2012; Tap et al., 2017).

Обнаруженное в данном исследовании уменьшение доли последовательностей, принадлежащих типу *Firmicutes*, в выборках больших относительно группы ЗД наиболее выражено среди пациентов с заболеваниями кишечника. Наибольший вклад в эти различия внесли последовательности класса *Clostridia*, уменьшение доли которых в выборках СРК и ЯК было статистически значимым ($p < 0.01$ и $p < 0.05$ соответственно). Одновременно

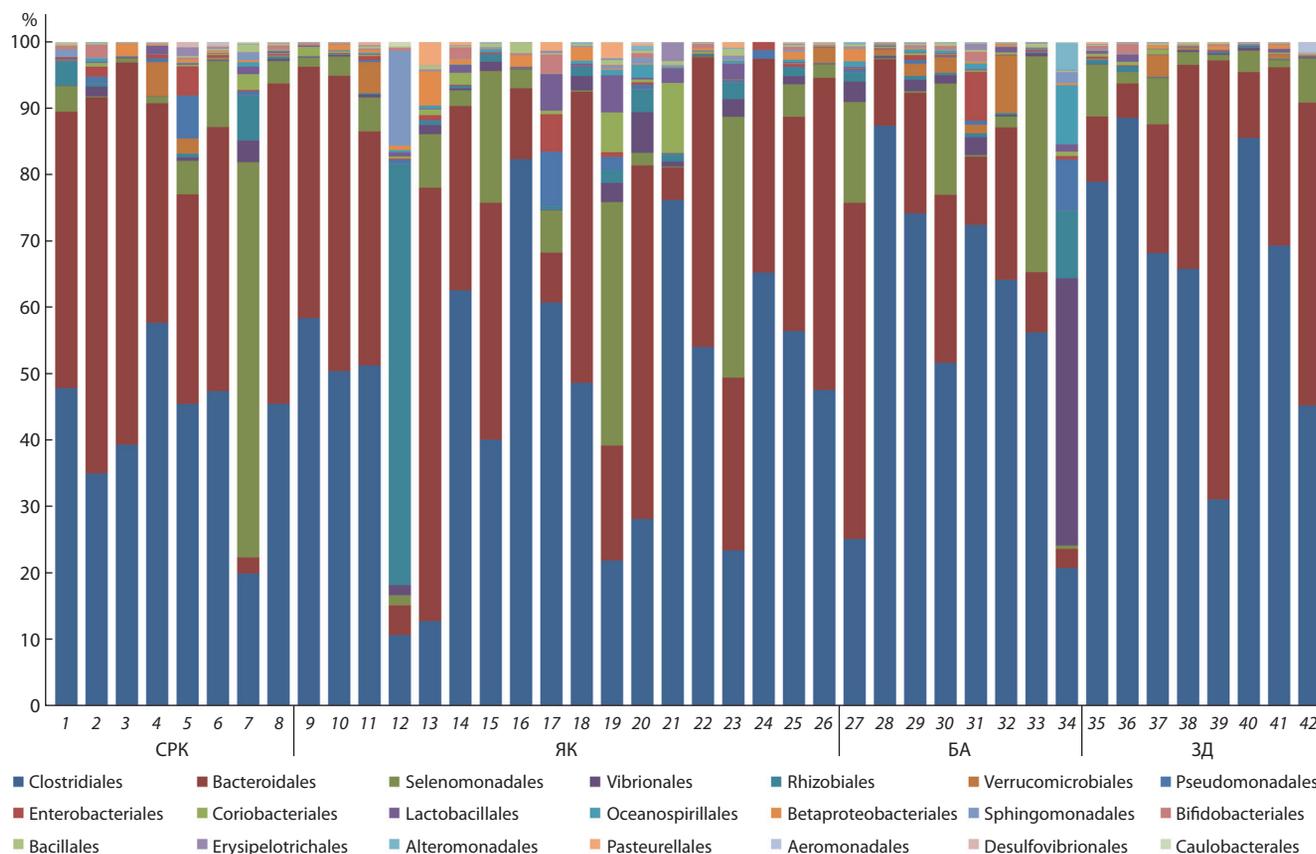


Рис. 3. Классификация операционных таксономических единиц (OTU) на уровне порядков, проведенная на основе базы данных Silva v.132 (full). Образцы 1–8 получены от пациентов с СРК; 9–26 – от больных ЯК; 27–4 – от пациентов с БА; 35–42 – от ЗД. Показаны порядки, представленность которых превышала 0.1 %.

доля последовательностей класса Negativicutes во всех группах больных, наоборот, увеличилась (см. табл. 1). Ранее отмечено, что при СРК уменьшается доля последовательностей семейств Ruminocossaceae и Erysipelotrichaceae, представители которых участвуют в продукции короткоцепочечных жирных кислот (Załęski et al., 2013; Rozuelo et al., 2015).

В данном исследовании также выявлено снижение доли последовательностей Ruminocossaceae как при СРК, так и при ЯК, однако доля последовательностей Erysipelotrichaceae в выборках пациентов с заболеваниями кишечника и БА существенно не изменилась по сравнению с ЗД (см. табл. 2). Среди последовательностей Ruminocossaceae особенно заметно снижение доли последовательностей *Faecalibacterium* spp. в группе СРК относительно ЗД ($p < 0.01$), что соответствует полученным ранее результатам (Rajilić-Stojanović et al., 2011; Rodiño-Janeiro et al., 2018). Кроме этого, следует отметить заметное увеличение доли последовательностей сем. Veillonellaceae среди больных, однако описанное в литературе увеличение доли последовательностей *Veillonella* spp. при СРК (Malinen et al., 2005; Tana et al., 2010; Riggsbee et al., 2012) в нашей работе не определено, хотя при ЯК наблюдалось. Не обнаружено существенных отличий встречаемости во всех исследуемых выборках последовательностей *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. и *Streptococcus* spp., среди которых присутству-

ют патогенные и условно-патогенные виды. Зафиксировано существенное уменьшение доли последовательностей *Roseburia* spp. и *Lachnospira* spp. в группе БА (см. табл. 2). Ранее показано, что *Roseburia* spp. наряду с представителями родов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* является основным продуцентом полиненасыщенных жирных кислот, уменьшение концентрации которых в кишечнике детей раннего возраста ассоциировано с риском развития БА (Chiu et al., 2019; Lee-Sarwar et al., 2020). Снижение числа представителей рода *Lachnospira* связано с увеличением относительного обилия представителей рода *Clostridium*, что, в свою очередь, также ассоциировано с повышением риска развития астмы у детей (Arrieta et al., 2015; Stiemsma et al., 2016; Hufnagl et al., 2020).

В литературе описано уменьшение доли последовательностей, принадлежащих типу Bacteroidetes у пациентов с ЯК (Machiels et al., 2014). В нашем исследовании средняя доля последовательностей этого типа в группах ЯК и СРК, наоборот, несколько увеличилась по сравнению с ЗД (см. табл. 1), причем наиболее значимое увеличение зарегистрировано для последовательностей *Bacteroides* spp. (см. табл. 2). В выборке БА доля последовательностей Bacteroidetes незначительно уменьшилась по сравнению с ЗД, однако встречаемость последовательностей *Bacteroides* spp. в этой группе значимо не изменилась. Следует отметить, что в выборках СРК, ЯК и БА заметно увеличилось соотношение представителей

Таблица 2. Средняя доля последовательностей из разных бактериальных таксонов в библиотеках 16S рРНК, %

Таксон	СРК	ЯК	БА	ЗД
Соотношение	1.4	1.8	3.5	2.6
Firmicutes/Bacteroidetes				
Firmicutes				
сем. Lactobacillaceae	< 0.1	0.1	0.1	< 0.1
<i>Lactobacillus</i> spp.	< 0.1	0.1	< 0.1	< 0.1
сем. Ruminococcaceae	31.5	31.8	43.3	51.4
<i>Faecalibacterium</i> spp.	5.4	18.4	17.0	23.6
сем. Erysipelotrichaceae	0.2	0.3	0.2	< 0.1
сем. Lachnospiraceae	6.3	11.5	7.3	9.9
<i>Roseburia</i> spp.	1.6	2.15	0.5	1.2
<i>Lachnospira</i> spp.	0.1	0.3	< 0.1	0.1
сем. Veillonellaceae	9.2	6.8	8.2	1.4
<i>Veillonella</i> spp.	< 0.1	2.5	< 0.1	0.1
Bacteroidetes				
сем. Prevotellaceae	8.8	4.8	3.2	9.3
сем. Bacteroidaceae	20.7	18.4	10.6	8.9
<i>Bacteroides</i> spp.	20.7	18.4	10.6	8.9
Proteobacteria				
сем. Beijerinckiaceae	0.7	2.0	1.0	0.2
<i>Methylobacterium</i> spp.	0.7	1.9	1.0	0.1
сем. Sphingomonadaceae	0.3	1.0	0.3	< 0.1
<i>Sphingomonas</i> spp.	0.3	0.8	0.2	< 0.1
сем. Burkholderiaceae	0.4	0.8	0.4	0.2
<i>Parasutterella</i> spp.	0.3	0.3	0.3	0.1
сем. Enterobacteriaceae	0.9	0.6	1.2	0.1
<i>Enterobacter</i> spp.	< 0.1	< 0.1	0.2	< 0.1
<i>Escherichia-Shigella</i>	0.6	0.4	0.2	< 0.1
сем. Halomonadaceae	0.2	0.3	1.4	< 0.1
<i>Halomonas</i> spp.	0.2	0.3	1.3	< 0.1
сем. Vibrionaceae	0.7	1.2	6.2	0.2
<i>Vibrio</i> spp.	0.7	1.2	6.2	0.2
Actinobacteria				
сем. Bifidobacteriaceae	0.4	0.5	0.3	0.3
<i>Bifidobacterium</i> spp.	0.4	0.5	0.3	0.3

семейств Bacteroidaceae/Prevotellaceae по сравнению с ЗД (2.4, 3.8, 3.3 против 0.9 соответственно). Обычно доля последовательностей Bacteroidaceae больше у людей, питающихся преимущественно белковой пищей, а доля Prevotellaceae – у людей, отдающих предпочтение растительной пище: жителей средиземноморского региона, Юго-Восточной Азии и у вегетарианцев (Ley, 2016). Доминирующие виды из обоих семейств, обнаруживаемые в кишечной микробиоте человека, способны расщеплять различные растительные полисахариды (Flint et al., 2012), и для объяснения различий в исследуемых выборках необходима видоспецифическая характеристика образцов.

Значительные отличия обнаружены во встречаемости в исследуемых группах последовательностей типа Proteobacteria, ряд представителей которого относятся к патогенным и условно-патогенным бактериям. В выборках СРК, ЯК и БА по сравнению с ЗД вклад таких последовательностей был существенно выше (см. табл. 1), что коррелировало с описанными ранее данными для пациентов с СРК и ЯК (Saebo et al., 2005; Gradel et al., 2009; Sonnenberg, Genta, 2012; Bennet et al., 2015; Shin et al., 2015; Shen et al., 2018). При этом в группах пациентов заметно увеличилась доля последовательностей классов Alphaproteobacteria и Gammaproteobacteria: в частности, обнаружен рост встречаемости последовательностей родов *Methylobacterium* (сем. Beijerinckiaceae), *Sphingomonas* (сем. Sphingomonadaceae), *Parasutterella* (сем. Burkholderiaceae), *Halomonas* и *Vibrio* (сем. Halomonadaceae), а также последовательностей *Escherichia* spp. и *Shigella* spp. В выборке БА обнаружено значимо больше последовательностей рода *Enterobacter* (сем. Enterobacteriaceae). Важно отметить, что некоторые виды вышеперечисленных родов могут вызывать инфекции, особенно у людей со сниженным иммунитетом (Lai et al., 2011; Kovaleva et al., 2014; Baker-Austin et al., 2018; Chen et al., 2018). Более того, доказана ассоциация *Parasutterella*, в частности *P. excrementihominis*, с СРК и воспалительными заболеваниями кишечника (Shin et al., 2015; Chen et al., 2018). У пациентов по сравнению с ЗД не зафиксировано заметного увеличения последовательностей родов протеобактерий, членами которых являются хорошо известные инфекционные агенты: *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia* (все сем. Enterobacteriaceae), *Acinetobacter* (сем. Moraxellaceae), *Pseudomonas* (сем. Pseudomonadaceae) и *Stenotrophomonas* (сем. Xanthomonadaceae). Несмотря на отсутствие заметного повышения доли последовательностей вышеперечисленных родов в группах СРК, ЯК и БА относительно ЗД факт увеличения встречаемости последовательностей Proteobacteria, в частности, Enterobacteriaceae, в исследуемых выборках библиотек от пациентов служит признаком дисбиоза кишечной микрофлоры (Shin et al., 2015).

Доля последовательностей типа Actinobacteria в группах ЯК и СРК в среднем превышала таковую для ЗД (см. табл. 1), однако вклад последовательностей *Bifidobacterium* spp. во всех четырех исследуемых выборках практически не различался (см. табл. 2), что не соответствует результатам, описанным ранее для пациентов с СРК (Malinen et al., 2005; Rajilić-Stojanović et al., 2011; Parkes et al., 2012; Zhuang et al., 2017). *Bifidobacterium* spp. наряду с *Lactobacillus* spp. (сем. Bacilli) способны модулировать состав кишечной микробиоты и влиять на иммунную систему человека путем взаимодействия с рецепторами CD209, экспонированными на поверхности дендритных клеток (Pace et al., 2015). Кроме того, отдельные представители этих родов секретируют бактериоцины – соединения, обладающие бактерицидным эффектом в отношении ряда патогенных бактерий (Angelakis et al., 2013; Rodiño-Janeiro et al., 2018). Отличий во встречаемости последовательностей лактобацилл в исследуемых группах также не обнаружено.

Заключение

В данном пилотном исследовании проведена сравнительная оценка биоразнообразия и таксономической структуры 16S-профилей кишечного микробиома пациентов с СРК, ЯК и БА и здоровых добровольцев. Подтверждены различия между кишечными сообществами бактерий у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника и таковыми у здоровых людей. В ряде случаев полученные нами данные согласуются с результатами аналогичных зарубежных исследований: уменьшение индекса Шеннона, соотношения и обилия представителей Firmicutes/Bacteroidetes и увеличение доли последовательностей Proteobacteria в микробиоме пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника в отличие от здоровых. Вместе с тем по некоторым показателям наши результаты отличаются от опубликованных ранее. Так, у пациентов с СРК и ЯК не уменьшилась доля последовательностей Egysipelotrichaceae, а даже несколько увеличилась (представители этого семейства продуцируют короткоцепочечные жирные кислоты); не отмечено и уменьшение встречаемости лакто- и бифидобактерий (отвечают за продукцию полиненасыщенных жирных кислот). Также нетипично увеличение доли последовательностей Bacteroidetes, в частности *Bacteroides* spp., у больных ЯК и СРК вместо зарегистрированного ранее уменьшения (Machiels et al., 2014; Dubinsky, Braun, 2015); не обнаружен рост доли последовательностей *Veillonella* spp. при СРК. Подобные отличия могут быть объяснены как многократными попытками лечения пациентов, кишечные сообщества которых изучали, так и региональными характеристиками популяции и особенностями питания.

Следует отметить, что ранее мы описывали похожую выборку больных ЯК из Западной Сибири (Тикунов и др., 2020) и в целом данные по долям последовательностей из семейств, принадлежащих типам Firmicutes, Bacteroidetes и Actinobacteria, в обоих исследованиях существенно не различались; лишь доля последовательностей Proteobacteria в предыдущей работе была несколько меньше. Также в настоящем исследовании, в отличие от предыдущего, у пациентов с ЯК не обнаружены последовательности архей. Отсутствие существенных различий между 16S-профилями кишечных микробиомов двух групп больных ЯК свидетельствует об определенных региональных особенностях микробиоты таких пациентов. Вместе с тем в данное пилотное исследование включены лишь по 8, 18 и 8 образцов пациентов с СРК и ЯК и здоровых участников соответственно. Для вывода о том, являются ли обнаруженные тенденции закономерностями, необходимо продолжение исследований с использованием большего количества анализируемых образцов.

При этом ряд результатов исследования бактериальных сообществ пациентов с БА получены впервые. Выполненные до настоящего времени исследования включали изучение микробиоты лишь младенцев и детей постарше с БА, причем большая часть работ посвящена микробиоте дыхательных путей и ротовой полости. Исследования же содержимого кишечника детей с БА в основном сводились к поиску ассоциаций между содержанием определенных соединений и развитием астмы. В нашей работе оценены бактериальные сообщества кишечника взрослых паци-

ентов с БА. В связи с этим нельзя сделать заключение о том, насколько существенно обнаруженное увеличение соотношения Firmicutes/Bacteroidetes в выборке БА относительно ЗД. Ряд выявленных особенностей кишечной микробиоты взрослых с БА согласуются с описанными ранее показателями таковой у больных детей. Так, в кишечной микробиоте взрослых с БА, как и детей, определено уменьшение доли последовательностей *Roseburia* spp., *Lachnospira* spp., *Veillonella* spp., однако доля последовательностей *Faecalibacterium* spp. и *Lactobacillus* spp. у взрослых пациентов, в отличие от детей, была такой же, как и у здоровых. Возможно, недостаточную представленность некоторых, но не всех бактерий в кишечной микробиоте детей с БА с годами компенсирует диета или прием пробиотиков. Также наблюдаемые различия могут быть связаны не с возрастом пациентов, а региональными особенностями питания. Выявленное в данном исследовании существенное превышение доли последовательностей Enterobacteriaceae в выборке БА по сравнению с ЗД закономерно, так как свидетельствует о дисбиозе кишечной микробиоты. Однако отсутствует достоверное объяснение обнаруженного нами значимого превышения доли последовательностей *Halomonas* и *Vibrio* в кишечной микробиоте пациентов с БА по сравнению не только со здоровыми добровольцами, но и больными СРК и ЯК. Важно, что указанные различия не связаны с особенностями питания пациентов с БА, поскольку доля последовательностей *Halomonas* spp. и *Vibrio* spp. у больных атопическим дерматитом, находившихся одновременно с пациентами с БА в том же отделении медицинского учреждения, не отличалась от таковой в группах ЗД, СРК и ЯК. Вышеперечисленные факты свидетельствуют о том, что дисбаланс кишечной микрофлоры, наблюдаемый при БА, ассоциирован с развитием этого заболевания, однако для понимания роли отдельных компонентов микробиоты кишечника в его патогенезе необходимы дальнейшие исследования с включением более объемных выборок.

Список литературы / References

- Тикунов А.Ю., Морозов В.В., Швалов А.Н., Бардашева А.В., Шрайнер Е.В., Максимова О.А., Волошина И.О., Морозова В.В., Власов В.В., Тикунова Н.В. Изменение кишечного микробиома пациентов с язвенным колитом после трансплантации кишечной микробиоты. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020; 24(2):168-175. DOI 10.18699/VJ20.610.
- [Tikunov A.Y., Morozov V.V., Shvalov A.N., Bardasheva A.V., Shrayner E.V., Maksimova O.A., Voloshina I.O., Morozova V.V., Vlasov V.V., Tikunova N.V. Fecal microbiome change in patients with ulcerative colitis after fecal microbiota transplantation. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(2):168-175. DOI 10.18699/VJ20.610. (in Russian)]
- Angelakis E., Merhej V., Raoult D. Related actions of probiotics and antibiotics on gut microbiota and weight modification. *Lancet Infect. Dis.* 2013;13(10):889-899. DOI 10.1016/S1473-3099(13)70179-8.
- Arrieta M.C., Stiemsma L.T., Dimitriu P.A., Thorson L., Russell S., Yurist-Doutsch S., Kuzeljevic B., Gold M.J., Britton H.M., Lefebvre D.L., Subbarao P., Mandhane P., Becker A., McNagny K.M., Sears M.R., Kollmann T. Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma. *Sci. Transl. Med.* 2015; 7(307):307ra152. DOI 10.1126/scitranslmed.aab2271.
- Bajer L., Kverka M., Kostovcik M., Macinga P., Dvorak J., Stehlikova Z., Brezina J., Wohl P., Spicak J., Drastich P. Distinct gut microbiota profiles in patients with primary sclerosing cholangitis and

- ulcerative colitis. *World J. Gastroenterol.* 2017;23(25):4548-4558. DOI 10.3748/wjg.v23.i25.4548.
- Baker-Austin C., Oliver J.D., Alam M., Ali A., Waldor M.K., Qadri F., Martinez-Urtaza J. *Vibrio* spp. infections. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2018;4(1):8. DOI 10.1038/s41572-018-0005-8.
- Bennet S.M., Ohman L., Simren M. Gut microbiota as potential orchestrators of irritable bowel syndrome. *Gut Liver.* 2015;9(3):318-331. DOI 10.5009/gnl14344.
- Belizário J.E., Faintuch J., Garay-Malpartida M. Gut microbiome dysbiosis and immunometabolism: new frontiers for treatment of metabolic diseases. *Mediators Inflamm.* 2018;2018:1-12. DOI 10.1155/2018/2037838.
- Chakravorty S., Helb D., Burday M., Connell N., Alland D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J. Microbiol. Methods.* 2007;69(2):330-339.
- Chen Y.J., Wu H., Wu S.D., Lu N., Wang Y.T., Liu H.N., Dong L., Liu T.T., Shen X.Z. *Parasutterella*, in association with irritable bowel syndrome and intestinal chronic inflammation. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2018;33(11):1844-1852. DOI 10.1111/jgh.14281.
- Cheng Y.W., Fischer M. The present status of fecal microbiota transplantation and its value in the elderly. *Curr. Treat. Options Gastroenterol.* 2017;15(3):349-362. DOI 10.1007/s11938-017-0143-1.
- Chiu C.Y., Cheng M.L., Chiang M.H., Kuo Y.L., Tsai M.H., Chiu C.C., Lin G. Gut microbial-derived butyrate is inversely associated with IgE responses to allergens in childhood asthma. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2019;30(7):689-697. DOI 10.1111/pai.13096.
- Donaldson G.P., Lee S.M., Mazmanian S.K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* 2016;14(1):20-32. DOI 10.1038/nrmicro3552.
- Dubinsky M., Braun J. Diagnostic and prognostic microbial biomarkers in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 2015;149:1265-1274e3. DOI 10.1053/j.gastro.2015.08.006.
- Flint H.J., Scott K.P., Duncan S.H., Louis P., Forano E. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes.* 2012; 3(4):289-306. DOI 10.4161/gmic.19897.
- Fujimura K.E., Slusher N.A., Cabana M.D., Lynch S.V. Role of the gut microbiota in defining human health. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 2010;8(4):435-454. DOI 10.1586/eri.10.14.
- Gradel K.O., Nielsen H.L., Schönheyder H.C., Ejlersen T., Kristensen B., Nielsen H. Increased short- and long-term risk of inflammatory bowel disease after salmonella or campylobacter gastroenteritis. *Gastroenterology.* 2009;137(2):495-501. DOI 10.1053/j.gastro.2009.04.001.
- Hufnagl K., Pali-Schöll I., Roth-Walter F., Jensen-Jarolim E. Dysbiosis of the gut and lung microbiome has a role in asthma. *Semin Immunopathol.* 2020;42(1):75-93. DOI 10.1007/s00281-019-00775-y.
- Jalanka-Tuovinen J., Salojärvi J., Salonen A., Immonen O., Garsed K., Kelly F.M., Zaitoun A., Palva A., Spiller R.C., de Vos W.M. Faecal microbiota composition and host-microbe cross-talk following gastroenteritis and in postinfectious irritable bowel syndrome. *Gut.* 2014;63(11):1737-1745. DOI 10.1136/gutjnl-2013-305994.
- Jeffery I.B., O'Toole P.W., Ohman L., Claesson M.J., Deane J., Quigley E.M., Simrén M. An irritable bowel syndrome subtype defined by species-specific alterations in faecal microbiota. *Gut.* 2012; 61(7):997-1006. DOI 10.1136/gutjnl-2011-301501.
- Kovaleva J., Degener J.E., van der Mei H.C. *Methylobacterium* and its role in health care-associated infection. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(5):1317-1321. DOI 10.1128/JCM.03561-13.
- Lai C.C., Cheng A., Liu W.L., Tan C.K., Huang Y.T., Chung K.P., Lee M.R., Hsueh P.R. Infections caused by unusual *Methylobacterium* species. *J. Clin. Microbiol.* 2011;49(9):3329-3331. DOI 10.1128/JCM.01241-11.
- Lee-Sarwar K.A., Lasky-Su J., Kelly R.S., Litonjua A.A., Weiss S.T. Gut microbial-derived metabolomics of asthma. *Metabolites.* 2020; 10(3):97. DOI 10.3390/metab10030097.
- Ley R.E. Gut microbiota in 2015: *Prevotella* in the gut: choose carefully. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2016;13(2):69-70. DOI 10.1038/nrgastro.2016.4.
- Machiels K., Joossens M., Sabino J., De Preter V., Arijis I., Eeckhaut V., Ballet V., Claes K., Van Immerseel F., Verbeke K., Ferrante M., Verhaegen J., Rutgeerts P., Vermeire S. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut.* 2014; 63(8):1275-1283. DOI 10.1136/gutjnl-2013-304833.
- Malinen E., Rintilä T., Kajander K., Mättö J., Kassinen A., Krogius L., Saarela M., Korpela R., Palva A. Analysis of the fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients and healthy controls with real-time PCR. *Am. J. Gastroenterol.* 2005;100(2):373-382.
- Manichanh C., Borruel N., Casellas F., Guarner F. The gut microbiota in IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2012;9(10):599-608. DOI 10.1038/nrgastro.2012.152.
- O'Hara A.M., Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 2006;7(7):688-693. DOI 10.1038/sj.embor.7400731.
- Pace F., Pace M., Quartarone G. Probiotics in digestive diseases: focus on *Lactobacillus GG*. *Minerva Gastroenterol. Dietol.* 2015;61(4): 273-292.
- Parke G.C., Rayment N.B., Hudspeth B.N., Petrovska L., Lomer M.C., Brostoff J., Whelan K., Sanderson J.D. Distinct microbial populations exist in the mucosa-associated microbiota of sub-groups of irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol. Motil.* 2012;24(1): 31-39. DOI 10.1111/j.1365-2982.2011.01803.x.
- Pozuelo M., Panda S., Santiago A., Mendez S., Accarino A., Santos J., Guarner F., Azpiroz F., Manichanh C. Reduction of butyrate- and methane-producing microorganisms in patients with Irritable Bowel Syndrome. *Sci. Rep.* 2015;5:12693. DOI 10.1038/srep12693.
- Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf K.S., Manichanh C., Nielsen T., Pons N., Levenez F., Yamada T., Mende D.R., Li J., Xu J., Li S., Li D., Cao J., Wang B., Liang H., Zheng H., Xie Y., Tap J., Lepage P., Bertalan M., Batto J.M., Hansen T., Le Paslier D., Linneberg A., Nielsen H.B., Pelletier E., Renault P., Sicheritz-Ponten T., Turner K., Zhu H., Yu C., Li S., Jian M., Zhou Y., Li Y., Zhang X., Li S., Qin N., Yang H., Wang J., Brunak S., Doré J., Guarner F., Kristiansen K., Pedersen O., Parkhill J., Weissenbach J.; MetaHIT Consortium, Bork P., Ehrlich S.D., Wang J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 2010;464(7285):59-65. DOI 10.1038/nature08821.
- Rajilić-Stojanović M., Biagi E., Heilig H.G., Kajander K., Kekkonen R.A., Tims S., de Vos W.M. Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology.* 2011;141(5):1792-1801. DOI 10.1053/j.gastro.2011.07.043 2011.
- Rigsbee L., Agans R., Shankar V., Kenche H., Khamis H.J., Michail S., Paliy O. Quantitative profiling of gut microbiota of children with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 2012;107(11):1740-51. DOI 10.1038/ajg.2012.287.
- Rodiño-Janeiro B.K., Vicario M., Alonso-Cotoner C., Pascua-García R., Santos J. A Review of Microbiota and Irritable Bowel Syndrome: Future in Therapies. *Adv. Ther.* 2018;35(3):289-310. DOI 10.1007/s12325-018-0673-5.
- Saebo A., Vik E., Lange O.J., Matuszkiewicz L. Inflammatory bowel disease associated with *Yersinia enterocolitica* O:3 infection. *Eur. J. Intern. Med.* 2005;16(3):176-182.
- Shen Z.H., Zhu C.X., Quan Y.S., Yang Z.Y., Wu S., Luo W.W., Tan B., Wang X.Y. Relationship between intestinal microbiota and ulcerative colitis: Mechanisms and clinical application of probiotics and fecal microbiota transplantation. *World J. Gastroenterol.* 2018;24(1): 5-14. DOI 10.3748/wjg.v24.i1.5.
- Shin N.R., Whon T.W., Bae J.W. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol.* 2015;33:496-503. DOI 10.1016/j.tibtech.2015.06.011.
- Sonnenberg A., Genta R.M. Low prevalence of *Helicobacter pylori* infection among patients with inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2012;35(4):469-476. DOI 10.1111/j.1365-2036.2011.04969.x.
- Stiemsma L.T., Arrieta M.C., Dimitriu P.A., Cheng J., Thorson L., Lefebvre D.L., Azad M.B., Subbarao P., Mandhane P., Becker A.,

- Sears M.R., Kollmann T.R., Canadian Healthy Infant Longitudinal Development (CHILD) Study Investigators; Mohn W.W., Finlay B.B., Turvey S.E. Shifts in *Lachnospira* and *Clostridium sp.* in the 3-month stool microbiome are associated with preschool age asthma. *Clin. Sci. (Lond)*. 2016;130(23):2199-2207. DOI 10.1042/CS20160349.
- Su T., Rongbei L., Lee A., Long Ya., Du L., Lai S., Chen X., Wang L., Si J., Chung O., Chen S. Altered intestinal microbiota with increased abundance of *Prevotella* is associated with high risk of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Gastroenterol. Research Pract.* 2018;2018:6961783. DOI 10.1155/2018/6961783.
- Tana C., Umesaki Y., Imaoka A., Handa T., Kanazawa M., Fukudo S. Altered profiles of intestinal microbiota and organic acids may be the origin of symptoms in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol. Motil.* 2010;22(5):512-519, e114-5. DOI 10.1111/j.1365-2982.2009.01427.x.
- Tap J., Derrien M., Töroblom H., Brazeilles R., Cools-Portier S., Doré J., Störsrud S., Le Nevé B., Öhman L., Simrén M. Identification of an intestinal microbiota signature associated with severity of irritable bowel syndrome. *Gastroenterol.* 2017;152(1):111-123.e8. DOI 10.1053/j.gastro.2016.09.049.
- Wang Y., Qian P.Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS One.* 2009;4:e7401. DOI 10.1371/journal.pone.0007401.
- Załęski A., Banaszkiwicz A., Walkowiak J. Butyric acid in irritable bowel syndrome. *Prz. Gastroenterol.* 2013;8(6):350-353. DOI 10.5114/pg.2013.39917.
- Zhuang X., Xiong L., Li L., Li M., Chen M. Alterations of gut microbiota in patients with irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2017;32(1):28-38. DOI 10.1111/jgh.13471.

ORCID ID

A.Y. Tikunov orcid.org/0000-0000-0001-5613-5447
A.N. Shvalov orcid.org/0000-0001-6890-1575
I.V. Babkin orcid.org/0000-0001-7158-3774
A.V. Bardasheva orcid.org/0000-0002-3872-4122
V.V. Morozova orcid.org/0000-0002-0869-3476
V.V. Vlasov orcid.org/0000-0003-2845-2992
N.V. Tikunova orcid.org/0000-0002-1687-8278

Благодарности. Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 18-74-00082) и проекта базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН 2013–2020 № АААА-А17-117020210027-9.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 04.05.2020. После доработки 19.02.2021. Принята к публикации 17.03.2021.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Выявление разнообразия микромицетов рода *Fusarium* в агроэкосистемах равнинной части Северного Кавказа для пополнения Государственной коллекции фитопатогенных микроорганизмов ФГБНУ ВНИИФ

Н.С. Жемчужина¹, М.И. Киселева¹, Т.М. Коломиец¹ , И.Б. Аблова², А.П. Глинушкин¹, С.А. Елизарова¹

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии (ВНИИФ), Московская область, Россия

² Национальный центр зерна им. П.П. Лукьяненко, Краснодар, Россия

 lomi1@yandex.ru

Аннотация. С целью предотвращения потерь урожая сельскохозяйственных культур от наиболее опасных и экономически значимых патогенных организмов нужно не только проводить контроль генофонда вирулентности, но и изучать характер изменчивости патогенов, определять потенциальную возможность появления новых генов и рас. Для этого необходимы централизованные коллекции живых культур, характеризующиеся набором стабильных штаммов для обеспечения фитопатологических, иммунологических, селекционных, генетических, токсикологических, паразитологических и других исследований. Государственная коллекция фитопатогенных микроорганизмов Всероссийского научно-исследовательского института фитопатологии – государственный депозитарий фитопатогенных микроорганизмов, непатогенных для человека и сельскохозяйственных животных. В настоящее время она насчитывает более 4500 единиц хранения патогенных для растений штаммов – грибов, оомицетов, бактерий, вирусов, фитоплазм – и ежегодно пополняется. С этой целью было проведено изучение межвидового и внутривидового генетического разнообразия фузариевых грибов в агроэкосистемах Краснодарского края. В 2020 г. Государственная коллекция фитопатогенных микроорганизмов была пополнена штаммами 13 видов грибов рода *Fusarium*, выделенными из тканей растений озимой пшеницы из нескольких районов Краснодарского края. В комплексе фузариевых грибов озимой пшеницы наиболее часто выявляли *Fusarium oxysporum*, *F. culmorum*, *F. lolii*, *F. graminearum*, *F. fujikuroi*, *F. sporotrichioides* и др. Отмечено влияние предшественника озимой пшеницы на частоту выделяемых видов грибов рода *Fusarium*. После серии моноконидиальных клонирований изолятов в коллекцию был отобран 21 штамм грибов разных видов со стабильными морфолого-культуральными признаками и известными патогенными и фитотоксичными свойствами. Патогенная активность у грибов как между видами *Fusarium*, так и в пределах одного вида существенно различалась: от отсутствия признаков влияния споровых суспензий на развитие проростков до полного их угнетения. Фитотоксическая активность в отношении проростков пшеницы варьировала от средней до высокой. Наибольшую опасность для проростков пшеницы представляют виды, обладающие высокой интенсивностью проявления фитотоксической активности, так как они способствуют накоплению опасных фитотоксинов в тканях растений.

Ключевые слова: коллекции микроорганизмов; микромицеты; генетическое разнообразие; озимая пшеница; фитопатогены; *Fusarium*.

Для цитирования: Жемчужина Н.С., Киселева М.И., Коломиец Т.М., Аблова И.Б., Глинушкин А.П., Елизарова С.А. Выявление разнообразия микромицетов рода *Fusarium* в агроэкосистемах равнинной части Северного Кавказа для пополнения Государственной коллекции фитопатогенных микроорганизмов ФГБНУ ВНИИФ. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(8):874-881. DOI 10.18699/VJ21.101

Revealing the diversity of *Fusarium* micromycetes in agroecosystems of the North Caucasus plains for replenishing the State Collection of Phytopathogenic Microorganisms of the All-Russian Scientific Research Institute of a Phytopathology

N.S. Zhemchuzhina¹, M.I. Kiseleva¹, T.M. Kolomiets¹ , I.B. Ablova², A.P. Glinushkin¹, S.A. Elizarova¹

¹ All-Russian Scientific Research Institute of a Phytopathology (ARSRIP), Moscow region, Russia

² National Center of Grain named after P.P. Lukyanenko, Krasnodar, Russia

 lomi1@yandex.ru

Abstract. In order to prevent crop yield losses from the most dangerous and economically important pathogenic organisms, it is necessary not only to monitor the virulence gene pool, but also to study the nature of pathogen variability and determine the potential for the emergence of new genes and races. This requires centralized collections

of fungal cultures characterized by a set of stable strains to provide for phytopathological, immunological, breeding, genetic, toxicological, parasitological and other studies. The State Collection of Phytopathogenic Microorganisms of the ARSRIP is the State Depository of Phytopathogenic microorganisms that are non-pathogenic to humans or farmed animals. Currently, it has more than 4,500 accessions of plant pathogenic strains of fungi, oomycetes, bacteria, viruses, phytoplasmas, and the collection is updated annually. For this purpose, the study of the inter- and intraspecific genetic diversity of genus *Fusarium* was carried out in agricultural systems of the Krasnodar Territory. In 2020, the State Collection of Phytopathogenic Microorganisms was supplemented with 13 strains of *Fusarium* fungi isolated from tissues of winter wheat plants collected in several locations of the Krasnodar region. The complex of *Fusarium* fungi revealed on winter wheat usually included *Fusarium oxysporum*, *F. culmorum*, *F. lolii*, *F. graminearum*, *F. fujikuroi*, *F. sporotrichioides*, etc. The effect of the preceding crop on the frequency of *Fusarium* species isolated from winter wheat was observed. After series cloning of collected isolates, 21 strains of different fungal species characterized by stable morphology traits and known pathogenic and phytotoxic properties were selected for collection replenishment. Significant differences in pathogenic activity were revealed between fungi belonging to either the same or different species; the manifestation of this activity varied from the absence of any effect of spore suspensions on seedling development to a complete inhibition of their growth. The phytotoxic activity towards wheat seedlings varied from medium to high. Species possessing a high intensity of phytotoxic activities are the most dangerous for wheat, since they promote accumulation of dangerous phytotoxins in plant tissues.

Key words: microorganism collections; micromycetes; genetic diversity; winter wheat; plant pathogens; *Fusarium*.

For citation: Zhemchuzhina N.S., Kiseleva M.I., Kolomiets T.M., Ablova I.B., Glinushkin A.P., Elizarova S.A. Revealing the diversity of *Fusarium* micromycetes in agroecosystems of the North Caucasus plains for replenishing the State Collection of Phytopathogenic Microorganisms of the All-Russian Scientific Research Institute of a Phytopathology. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(8):874-881. DOI 10.18699/VJ21.101

Введение

Для успешного решения задач по продовольственной безопасности страны необходимо создание устойчивых к особо опасным болезням сортов. С целью предотвращения потерь урожая сельскохозяйственных культур от наиболее опасных и экономически значимых патогенных организмов необходимо не только проводить контроль генофонда вирулентности, но и изучать характер изменчивости патогенов, определять потенциальную вероятность появления новых генов и рас, возможно, опасных, в разных популяциях. Для этого необходимы централизованные коллекции живых культур, отличающиеся набором стабильных свойств для обеспечения фитопатологических, иммунологических, селекционных, генетических, токсикологических, паразитологических и других исследований. Подобные коллекции фитопатогенных организмов созданы и успешно функционируют в большинстве развитых стран мира.

Государственная коллекция фитопатогенных микроорганизмов Всероссийского научно-исследовательского института фитопатологии (ВНИИФ) представляет собой основной генофонд рас, биотипов, патотипов фитопатогенных грибов, бактерий и вирусов, распространенных на обширной территории Российской Федерации. Подобный генофонд в России создан впервые, до недавнего времени в различных учреждениях и подразделениях института существовали лишь разрозненные рабочие коллекции отдельных видов фитопатогенных микроорганизмов. Коллекции фитопатогенных микроорганизмов ВНИИФ постановлением Правительства РФ «О мерах по сохранению и рациональному использованию коллекций микроорганизмов» от 24.06.1996. № 725-47с присвоено название «Государственная коллекция фитопатогенных микроорганизмов и сортов-идентификаторов (дифференциаторов) патогенных штаммов микроорганизмов» и определен статус Государственного депозитария фитопатогенных микроорганизмов, непатогенных для человека и сельскохозяйственных животных. В настоящее время она на-

считывает более 4500 единиц хранения патогенных для растений штаммов – грибов, оомицетов, бактерий, вирусов, фитоплазм – и ежегодно пополняется. Для этой цели проведено изучение межвидового и внутривидового разнообразия фузариозных грибов в агроэкосистемах Краснодарского края.

Согласно данным литературы, факультативные паразиты из рода *Fusarium* часто отмечаются на озимой пшенице. Эти микромицеты хорошо адаптированы к меняющимся внешним факторам окружающей среды, что обеспечивает их выживание в широком диапазоне погодных условий, а потому они распространены практически повсюду, где культивируется озимая пшеница (Рукавицина, 2008; Чулкина и др., 2009; Торопова и др., 2013). Мониторинг структуры и локализации популяций грибов рода *Fusarium* в экосистемах пшеницы имеет важное практическое значение не только для селекции болезнеустойчивых сортов, но и для повышения эффективности защитных мероприятий, улучшения экологической обстановки на посевах сельскохозяйственных культур.

В последние десятилетия в южных регионах России, где широко возделывается озимая пшеница, отмечается нарастание заболеваний, вызываемых грибами рода *Fusarium* (Жалиева, 2010). Известно, что на пшенице паразитируют 28 видов грибов этого рода. На Северном Кавказе преобладают виды *Fusarium graminearum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. tricinctum*, *F. nivale*. Как правило, они проявляются как возбудители обыкновенной корневой гнили, вызывая ослабление и гибель всходов, снижая потенциал продуктивности пораженных взрослых растений.

В отдельные годы широкое распространение получает фузариоз колоса и зерна, нанося существенный ущерб зернопроизводству. На вегетативных и генеративных органах растений, в зависимости от условий погоды, устойчивости выращиваемых сортов, предшественников пшеницы, агротехники и многих других факторов, видовой состав грибов может быть неоднозначным (Чулкина и др., 2009; Жалиева, 2010).

Оценка разнообразия морфологических признаков грибов *Fusarium* spp., выявление амплитуды их изменчивости, в том числе по уровню патогенности и фитотоксичности, имеет значение для отбора и пополнения коллекции штаммами микромицетов (Booth, 1971; Thrane et al., 2004; Коломиец и др., 2018).

Необходимость сохранения материала штаммов и изолятов *Fusarium* spp. и постоянного отбора образцов для пополнения коллекции объясняется актуальностью проведения научных исследований по разработке методов биологической защиты, для изучения динамики развития и расселения грибов, оценки их патогенной и токсичной активности на растениях-хозяевах. Коллекционный материал нужен также при оценке и отборе образцов пшеницы для селекции на устойчивость к болезни и т. п. (Дубовой и др., 2016; Жемчужина, Elizarova, 2019).

В связи с этим основные задачи при создании коллекции уникальных изолятов *Fusarium* spp. – не только сохранение жизнеспособности спор и их генетической стабильности по морфолого-культуральным признакам в течение длительного времени, но и пополнение фондов новыми изолятами с различным спектром патогенных свойств, а также расширение круга географических территорий отбора изолятов (Гагкаева, Левитин, 2005; Гагкаева и др., 2008).

Для выполнения этих задач образцы зараженных растений, поступающие ежегодно из различных районов страны, подвергаются микологическим исследованиям, и на основании данных анализа материала проводится отбор наиболее патогенных и фитотоксичных образцов в коллекцию. Штаммы и изоляты из рода *Fusarium* занимают важное место в коллекции, которая служит для поддержания штаммов указанных микроорганизмов в жизнеспособном состоянии, сохранения их патогенных свойств и обеспечения инфекционным материалом исследований фитопатологического, иммунологического, селекционного, генетического и токсикологического плана (Kolomiets, Zhemchuzhina, 2018).

Цель наших исследований состояла в оценке видовой и внутривидового разнообразия микромицетов рода *Fusarium* в посевах пшеницы в агроэкосистемах Краснодарского края для отбора и пополнения в 2020 г. Государственной коллекции фитопатогенных микроорганизмов (ГКФМ) штаммами и изолятами грибов, выделенных с корней и листьев нижнего яруса вегетирующих растений озимой пшеницы в нескольких районах Краснодарского края.

Материалы и методы

Материалом для исследований служили растения районированных сортов озимой пшеницы с признаками поражения грибными инфекциями на листьях и корнях. Образцы были отобраны во второй декаде мая 2019 г. на посевах озимой пшеницы по разным предшественникам в Павловском, Кореновском, Усть-Лабинском, Каневском и Приморско-Ахтарском районах Краснодарского края. Образцы содержали по 10–20 растений пшеницы, находящихся в фазе колошения–зернообразования. Все работы выполнены с использованием оборудования ЦКП ГКФМ ФГБНУ ВНИИФ (<http://www.vniif.ru/vniif/page/skr-gkmf/1373>).

Выделение грибов из пораженных растений проводили с использованием 2 % голодного, картофельно-глюкозного и картофельно-морковного агара. Грибы из образцов пшеницы изолировали по стандартной методике (Билай, 1977; Билай, Элланская, 1982). Для этого отмытые водопроводной водой больные растения каждого образца разрезали на фрагменты размером 5–10 мм, стерилизовали в 50 % спирте в течение 20–30 с и в асептических условиях раскладывали на поверхность 2 % картофельно-глюкозного агара в чашки Петри (по 4–6 фрагментов в каждую). Каждый образец был представлен не менее чем 150–200 фрагментами пораженной ткани. Чашки Петри помещали в термостат с температурой 22–24 °С.

Наблюдение за развитием грибов проводили ежедневно. По мере роста колоний грибов делали отсев кусочком мицелия на питательную среду в центр чашки Петри. Чистые культуры грибов просматривали под микроскопом. Виды грибов рода *Fusarium* определяли по основным морфологическим признакам колоний и спор: скорости роста, окраске мицелия и его структуре, пигментации; форме, размерам апикальной и базальной клеток макроконидий, наличию микроконидий. Для оценки размера макроконидий брали средний показатель микрокопирования 300 конидий. В качестве справочной литературы при установлении видовой принадлежности гриба использовали определители (Gerlach, Nirenberg, 1982; Leslie, Summerell, 2006; Dictionary..., 2008; Watanabe, 2010).

Оценку степени споруляции проводили на 14-дневных колониях гриба. При этом результаты споруляции определяли по среднему значению количества спор на чашку при смыве с 10 чашек Петри одного морфотипа. Спорующую способность колоний гриба определяли по стандартной методике путем подсчета спор в камере Горяева (Билай, 1977).

Для отбора в коллекцию штаммов грибов рода *Fusarium*, стабильных по морфолого-культуральным признакам, по общепринятой методике проводили серию моноспоровых клонирований изолятов микромицетов (Билай, 1977; Билай, Элланская, 1982).

Изоляты грибов, выделенные из пораженных образцов пшеницы, помещали на хранение в холодильник при температуре 7–10 °С в биологических пробирках на косяках питательной среды – картофельно-глюкозном агаре (Билай, Элланская, 1982).

Патогенные и токсичные свойства штаммов изучали с помощью метода биопробы на семенах. Патогенность споровых суспензий и фитотоксичность фильтратов культуральных жидкостей (ФКЖ) грибов рода *Fusarium* тестировали на семенах пшеницы (сорт Мироновская 808). О степени патогенности и токсичности штаммов судили по влиянию суспензий конидий и ФКЖ на всхожесть семян пшеницы, развитие ростка и первичных корней проростков. Однако основным показателем считали длину корней.

Определение степени патогенности и токсичности проводили на пятые сутки от начала проращивания семян. Если длина проростков и корней (в мм) в опытном варианте составляла 0–30 % от длины контроля, то это свидетельствовало о сильной патогенной (П) и сильной токсичной (Т) активности гриба; 31–50 % – умеренной пато-

генности (УП) и умеренной токсичности (УТ); 51–70 % – слабой патогенности (СП) и слабой токсичности (СТ); 71–100 % – о непатогенных (НП) и нетоксичных (НТ) свойствах изолята. Длину ростков и первичных корней семян, пророщенных в воде, считали контролем и принимали за 100 %.

Результаты и обсуждение

При проведении микологических исследований опытных образцов отмечено, что грибы рода *Fusarium* имели одни и те же симптомы на органах растений, но отмытые и фламбированные над огнем кусочки тканей разных органов, разложенные во влажные камеры, на третьи-пятые сутки образовывали характерный мицелий и конидии, что позволяло идентифицировать вид микромицета. Изучение в культуре основных микро- и макроморфологических признаков грибов по наличию, форме и размерам макро- и микроконидий (при наличии), скорости роста колонии, окраске и структуре мицелия, проведенное более чем на 400 изолятах грибов, позволило определить следующие 13 видов рода *Fusarium*: *F. oxysporum* Schlecht., *F. culmorum* (Sm.) Sacc., *F. lolii* (Wm. G. Sm.) Sacc., *F. graminearum* Schwabe, *F. moniliforme* J. Sheld. (син. *F. fujikuroi* Nirenberg), *F. sporotrichioides* Swerb., *F. avenaceum* (Fr.) Sacc., *F. poae* (Peck) Wollenw., *F. sambucinum* Fuckel. (син. *F. roseum* Link), *F. acuminatum* Ellis & Everh., *F. equiseti* (Corda) Sacc. (син. *F. gibbosum* Appel & Wollenw.), *F. chlamydosporum* Wollenw. & Reinking, *F. solani* (Mart.) Sacc. (табл. 1).

В комплексе фузариевых грибов озимой пшеницы в Краснодарском крае в 2019 г. наиболее часто (20.1 %) выделяли *F. oxysporum* (Schlecht.) Snyd. et Hans. Гриб отмечен на посевах озимой пшеницы в Усть-Лабинском, Павлов-

ском, Кореновском, Приморско-Ахтарском районах. Несомненно, культура, предшествующая озимой пшенице, оказывала влияние на частоту встречаемости *F. oxysporum*. Так, доля изолятов гриба составила по предшественникам: пшеница – 7.2 %, подсолнечник – 5.5, горох – 4.2, кукуруза – 1.2 %. Часто в чистой культуре вместе с этим видом гриба отмечались *F. avenaceum*, *F. acuminatum*, *F. sambucinum*, а также *Alternaria* spp., бактерии и др.

Второе место по частоте встречаемости занимал *F. culmorum* (Sm.) Sacc. Изоляты гриба были получены с образцов пораженных корней и прикорневой части стебля озимой пшеницы практически во всех обследуемых районах. Доля этого возбудителя в комплексе грибов рода *Fusarium* составила 18.2 %. Наиболее часто *F. culmorum* находили в образцах озимой пшеницы, предшественниками которой являлись пшеница, подсолнечник и горох.

F. lolii (Wm. G. Sm.) Sacc. (телеоморфа *Gibberella cyanea* (Sollm.) Wt., син. *F. heterosporum* Nees.), как правило, выделяли с сильно пораженных гнилью и усохших корней озимой пшеницы, предшественниками которой были пшеница (6.2 %) и подсолнечник (3.5 %).

F. graminearum Schwabe (телеоморфа *G. zeae* (Schwein.) Petch.) был обнаружен на корнях и прикорневых стеблях озимой пшеницы в большинстве районов сбора инфекционного материала, причем гриб выделяли чаще, если предшественниками служили пшеница и кукуруза (5.1 и 5 % соответственно).

F. moniliforme J. Sheld. (телеоморфа *G. moniliformis* Wippland; син. *F. fujikuroi* Nirenberg) – возбудитель розовой плесени и корневой гнили зерновых, обнаружен на листьях, стеблях и корнях озимой пшеницы в Приморско-Ахтарском, Павловском и Каневском районах. Более часто

Таблица 1. Виды рода *Fusarium*, обнаруженные на посевах озимой пшеницы в Краснодарском крае, 2019 г. (в %)

Вид гриба	Предшественник					Частота встречаемости видов
	пшеница	пар	подсолнечник	кукуруза	горох	
<i>F. acuminatum</i>	1.2	0.9	0.7	0	0	2.8
<i>F. avenaceum</i>	1.2	0	0.7	1.2	0.9	3.9
<i>F. chlamydosporum</i>	0.7	0	0.5	0	0	1.2
<i>F. culmorum</i>	5.8	1.2	5.3	2.8	3.5	18.2
<i>F. equiseti</i> (<i>F. gibbosum</i>)	0	0	1.2	0.7	0	1.8
<i>F. graminearum</i>	5.5	1.2	0.5	5.1	0	12.0
<i>F. lolii</i>	6.2	2.8	3.5	2.8	0	15.8
<i>F. moniliforme</i> (<i>F. fujikuroi</i>)	2.1	1.2	2.3	4.2	0	9.7
<i>F. oxysporum</i>	7.2	1.2	5.5	2.3	4.2	20.1
<i>F. poae</i>	1.2	0.7	0.7	0	1.2	3.6
<i>F. sambucinum</i> (<i>F. roseum</i>)	1.2	0.5	1.2	0.5	0	3.2
<i>F. solani</i>	0	0	0.2	0	0.7	0.9
<i>F. sporotrichioides</i>	1.8	1.8	0.9	2.5	0	7.1
Кол-во изолятов, %	33.9	11.3	22.6	21.7	10.4	100
Кол-во изолятов, ед.	147	49	98	94	45	433

гриб выделяли с пшеницы, предшественниками которой были кукуруза (4.2 %), подсолнечник (2.3 %) и пшеница (2.1 %).

F. sporotrichioides Sherb. выделен с пораженных корней, корневой шейки и стеблей озимой пшеницы (7.1 %) из Павловского и Кореновского районов.

Изоляты *F. avenaceum* (Fr.) Sacc. (телеоморфа *G. avenacea* Cook) обнаружены на листьях, приземных частях стеблей и корнях озимой пшеницы из Павловского и Кореновского районов. В комплексе грибов из рода *Fusarium*, выделенных из образцов озимой пшеницы, частота встречаемости *F. avenaceum* составила 3.9 %. Гриб отмечен в образцах озимой пшеницы, предшествующими культурами которых были пшеница и кукуруза.

Вид *F. poae* (Peck) Wollenw. с невысокой частотой (3.6 %) найден в Павловском районе. Чаще изоляты этого вида были отмечены на образцах пшеницы, предшественниками которой были пшеница и горох.

Следует отметить, что в ряде случаев из одного образца пораженной ткани озимой пшеницы идентифицировали по два и более фитопатогенов из рода *Fusarium*. Такой фитопатоген, как *F. acuminatum* Ellis & Verh. (телеоморфа *G. acuminata* Wr.), более чем в половине случаев выявлялись совместно с *F. oxysporum*.

Подобная закономерность отмечена и для *F. sambucinum* Fuckel (телеоморфа *G. pulicaris* (Fr.) Sacc.). Этот гриб, независимо от места локализации на растении (лист, стебель, корень), всегда выделялся вместе с *F. oxysporum*, при этом ему часто сопутствовала бактериальная инфекция.

Изоляты *F. acuminatum* встречались в Усть-Лабинском и Павловском районах с невысокой частотой (2.8 %) в пораженных корнях озимой пшеницы, предшественниками которой были пшеница, пар и подсолнечник.

Изоляты *F. equiseti* (Corda) Sacc. (телеоморфа *G. intricans* Wollenw.; син. *F. gibbosum* Appel & Wollenw. Emend Vilai) были обнаружены в основном на побуревших стеблях озимой пшеницы в Усть-Лабинском и Кореновском районах.

Доля изолятов *F. chlamydosporum* Wollenw. & Reinking в комплексе фузариозных грибов не превышала 1.2 %. Гриб был определен на корнях двух образцов пшеницы из Кореновского района. Наряду с *F. chlamydosporum* на тех же корнях с высокой частотой встречались сапрофитные и патогенные виды грибов.

F. solani (Mart.) Sacc. (телеоморфа *Nectria haematococca* Berk. & Broome) обнаружен в Павловском районе в небольшом количестве на корнях пшеницы.

На основании морфологических признаков полученные изоляты грибов рода *Fusarium* отнесены к 13 таксономическим группам. После серии моноконидиальных клонирований изолятов в коллекцию были отобраны штаммы грибов разных видов со стабильными морфолого-культуральными признаками. При отборе культур гриба в коллекцию особое внимание обращали на характерные для каждого вида макро- и микроморфологические признаки.

Штаммы микромицетов *Fusarium* spp. различались по морфологии и структуре воздушного и реверсного мицелия, размерам и форме макро- и микроконидий, споруляции колоний. Различия между штаммами в пределах одного вида часто отмечали только при изучении мак-

роморфологических признаков – окраски и структуры мицелия, споруляции. При анализе данных микроморфологических признаков, т. е. формы и размера конидий, способа их образования, между штаммами одного вида различия были минимальными.

Из всех таксономических групп *Fusarium* spp., выявленных на посевах озимой пшеницы Северного Кавказа в 2019 г., в коллекцию передан 21 штамм гриба (табл. 2).

Полученный биологический материал *Fusarium* spp. был изучен по степени выраженности патогенных и фитотоксичных свойств. Результаты влияния споровых суспензий и метаболитов фильтратов культуральных жидкостей 21 штамма грибов из рода *Fusarium* на развитие проростков пшеницы сорта Мироновская 808 (всхожесть семян, длина ростка и корней) приведены в табл. 3.

Показано, что штаммы грибов в пределах одного вида различались по степени патогенности и фитотоксичности. Широким внутривидовым разнообразием по этим признакам обладали штаммы *F. oxysporum* (СК-5к, СК-9л, СК-9к) и *F. lolii* (СК-6к-1, СК-6л, СК-6к-5). Среди них встречались разные категории показателей: от патогенных/токсичных до непатогенных/слаботоксичных.

Фитотоксичные и патогенные штаммы *F. culmorum* и *F. graminearum* подавляли развитие проростков сорта Мироновская 808 в сильной степени.

Моноизоляты *F. acuminatum* (СК-13к, СК-16к) оказались непатогенными к проросткам сорта-тестера, но обладали слабой и умеренной фитотоксичностью.

Грибы *F. avenaceum* (СК-7л), *F. equiseti* (СК-8л), *F. poae* (СК-7к, СК-6к-1) и *F. chlamydosporum* (СК-3к) и других характеризовались весьма слабыми патогенными и фитотоксичными свойствами.

Обнаружено, что споровые суспензии изолятов грибов мало влияли на всхожесть семян (80–100 %), но впоследствии оказывали воздействие на развитие проростков: патогенные изоляты грибов тормозили их рост (до 33.3 % – штамм *F. oxysporum* СК-9л) или непатогенные – стимулировали (до 102.3 % – штамм *F. acuminatum* СК-13к). Отмечено более сильное воздействие споровых суспензий на рост и развитие первичных корней (12.6–95.3 %).

Обработка семян ФКЖ штаммами грибов рода *Fusarium* слабо отразилась на их всхожести (63.3–100 %), хотя в дальнейшем интенсивность развития проростков семян значительно замедлялась. Длина проростков под действием ФКЖ штаммов грибов, по сравнению с контролем, составляла 24.4–96.9 %. Средняя длина первичных корней под действием ФКЖ штаммов была 5.7–74.2 %, что позволило группировать изоляты по степени токсичности.

Полученные результаты свидетельствуют о межвидовом и внутривидовом генетическом разнообразии фузариумов из краснодарской популяции по морфологическим, патогенным и фитотоксическим признакам.

Заключение

При анализе полученных данных отмечено влияние предшественника озимой пшеницы, с которой брали опытные образцы, на частоту выделяемых видов грибов рода *Fusarium*. Показано, что патогенная активность у грибов как между видами *Fusarium*, так и в пределах одного вида существенно различается: от отсутствия признаков

Таблица 2. Характеристика штаммов грибов 13 видов рода *Fusarium*, отобранных в ГКФМ ВНИИФ, по макро- и микроморфологическим свойствам

Вид гриба	Шифр штамма	Морфолого-культуральные признаки штаммов грибов 13 видов рода <i>Fusarium</i>		Споруляция, млн/ч. Петри	Размеры макроконидий, мкм			Наличие микроконидий
		Воздушный мицелий	Реверс		продольный	поперечный		
					$X_{\min}-X_{\max}$	HCP ₀₅	$X_{\min}-X_{\max}$	
<i>F. avenaceum</i>	СК-7л	Темно-розовый, слаборазвитый	Бордово-оливковый	195.0 ± 4.6	30.5–85.7	35.7	3.3–6.1	–
<i>F. acuminatum</i>	СК-13к	Бело-розовый, низкий с секторами лизиса	Светло-бурый	210.3 ± 6.8	18.5–22.4	5.7	4.0–5.0	–
	СК-16к	Бело-розовый, ватообразный	Темно-бордовый	195.5 ± 5.2	18.1–22.7	5.9	4.0–5.0	–
<i>F. chlamydosporum</i>	СК-3к	Светло-кремовый, бархатистый, войлочный	Кремовый	45.7 ± 3.2	30.5–40.5	11.1	3.6–4.1	+
<i>F. culmorum</i>	СК-14к-1	Оливково-красный, рыхло-хлопьевидный	Бордовый	201.5 ± 5.8	16.0–48.5	18.5	3.9–6.5	–
	СК-14к-5	Бледно-розовый, пушистый		115.7 ± 2.7	16.7–49.3	21.1	3.8–6.7	–
<i>F. equiseti</i>	СК-8л	Бело-кремовый, невысокий, рыхло-пушистый	Бордовый	195.1 ± 7.8	15.5–70.5	38.8	4.0–4.5	+
<i>F. graminearum</i>	СК-10к-2	Оливково-розовый, хлопьевидно-пушистый	Бордовый	112.0 ± 2.2	21.5–75.0	31.5	4.3–4.5	–
	СК-11к-3		Темно-бордовый	175.5 ± 3.7	23.1–77.7	28.7	4.3–4.5	–
<i>F. lolii</i>	СК-6к-1	Светло-кремовый, пушистый	Светло-кремовый	55.2 ± 3.2	20.5–35.5	13.9	4.0–4.3	–
	СК-6л	Светло-кремовый, войлочный		140.5 ± 4.2	19.7–35.5	15.3	4.0–4.3	–
	СК-6к-5			109.1 ± 8.7	19.1–36.7	14.5	4.1–4.3	–
<i>F. moniliforme</i>	СК-4л	Светло-кремовый до лилового, стелющийся	Светло-бурый	75.3 ± 3.3	23.0–60.5	25.8	3.6–4.0	+
<i>F. oxysporum</i>	СК-5к	Бледно-сиреневый, стелющийся	Светло-бурый	23.3 ± 4.1	28.3–35.2	17.5	3.5–4.5	+
	СК-9л	Белый с лиловыми участками,	Темно-лиловый	110.7 ± 3.4	26.5–37.1	23.1	3.3–4.5	+
	СК-9к	ватообразный	Бледно-лиловый	95.5 ± 2.5	29.4–40.0	12.7	3.2–4.6	+
<i>F. poae</i>	СК-7к	Кремово-розовый, стелющийся	Кремовый	24.7 ± 7.7	17.2–40.5	22.6	3.5–5.5	+
	СК-15к	Оливково-розовый, пушистый	Бордовый	10.5 ± 2.9	17.0–40.1	20.3	3.5–5.5	+
<i>F. sambucinum</i>	СК-5к-1	Светло-кремовый, рыхлый	Кремово-бордовый	70.0 ± 4.3	17.5–24.5	8.2	3.6–4.5	–
<i>F. solani</i>	СК-13к-1	Кремово-розовый, войлочно-пушистый	Бурый	105.1 ± 5.0	21.5–42.5	19.4	3.5–4.9	+
<i>F. sporotrichioides</i>	СК-4к	Бело-розовый, пушистый	Бордовый	150.4 ± 5.8	26.0–45.0	15.1	3.5–5.0	+

Таблица 3. Характеристика штаммов грибов рода *Fusarium* по патогенности споровых суспензий и фитотоксичности культуральной жидкости на проростках пшеницы сорта Мироновская 808 (в % к контролю)

Шифр штамма	Патогенность (споровая суспензия)			Токсичность (культуральная жидкость)				
	Всхожесть семян, %	Длина, % ростка корней		Степень влияния	Всхожесть семян, %	Длина, % ростка корней		Степень влияния
<i>F. avenaceum</i> (Fr.) Sacc.								
СК-7л	96.7	92.3±1.5	63.5±1.4	СП	100.0	96.9±2.1	71.3±2.0	НТ
<i>F. acuminatum</i> Ellis & Everh.								
СК-13к	100.0	102.3±1.9	93.9±2.1	НП	96.7	85.0±3.7	49.2±2.4	УТ
СК-16к	100.0	101.9±3.1	85.7±2.3	НП	100.0	90.6±4.0	61.4±2.5	СТ
<i>F. chlamyosporum</i> Wollenw. & Reinking								
СК-3к	100.0	90.9±1.8	68.9±1.8	СП	96.7	88.8±2.3	48.8±2.2	УТ
<i>F. culmorum</i> (Sm.) Sacc.								
СК-14к-1	86.7	79.5±3.2	29.1±2.5	П	85.5	69.4±5.0	13.0±1.2	Т
СК-14к-5	95.5	84.1±2.6	47.5±3.1	УП	83.3	63.3±1.5	22.3±1.5	Т
<i>F. equiseti</i> (Corda) Sacc.								
СК-8л	100.0	94.4±2.2	87.4±2.1	НП	100.0	87.1±2.5	87.7±2.7	НТ
<i>F. graminearum</i> Schwabe								
СК-10к-2	96.4	38.5±5.2	12.6±5.1	П	63.3	36.2±3.1	5.7±2.3	Т
СК-11к-3	96.7	72.0±5.5	56.7±5.2	УП	70.0	24.4±1.6	10.9±1.2	Т
<i>F. lolii</i> (Wm. G. Sm.) Sacc.								
СК-6к-1	100.0	98.1±2.5	60.8±2.2	СП	100.0	92.2±1.8	44.4±1.7	УТ
СК-6л	100.0	97.2±2.4	64.9±1.6	СП	96.7	84.3±3.8	52.8±2.9	СТ
СК-6к-5	95.5	67.5±4.2	27.±2.7	П	80.0	71.4±5.0	28.6±2.2	Т
<i>F. moniliforme</i> J. Sheld.								
СК-4л	100.0	101.9±3.0	103.9±4.0	НП	100.0	96.2±3.1	65.0±1.6	СТ
<i>F. oxysporum</i> Schlecht.								
СК-5к	100.0	93.1±3.8	67.7±3.0	НП	100.0	39.0±1.7	13.0±1.7	Т
СК-9л	80.0	33.3±3.1	27.7±2.3	П	100.0	79.0±1.8	63.0±1.9	СТ
СК-9к	91.5	64.3±2.4	28.1±1.7	П	100.0	86.7±2.4	61.3±1.7	СТ
<i>F. poae</i> (Peck) Wollenw.								
СК-7к	100.0	101.3±1.8	93.8±2.2	НП	100.0	92.3±2.6	65.4±1.8	СТ
СК-15к	100.0	99.1±2.8	95.3±4.1	НП	100.0	96.9±2.0	74.2±2.9	НТ
<i>F. sambucinum</i> Fuckel								
СК-5к-1	90.0	58.6±5.1	19.5±1.6	П	90.0	83.1±4.1	61.6±2.7	СТ
<i>F. solani</i> (Mart.) Sacc.								
СК-13к-1	100.0	89.1±3.8	90.3±2.1	НП	96.7	84.3±2.8	62.8±1.9	СТ
<i>F. sporotrichioides</i> Swerb.								
СК-4к	100.0	38.5±3.5	14.8±1.9	П	100.0	29.7±1.8	6.3±1.0	Т

Примечание. НП/НТ – непатогенный/нетоксичный; СП/СТ – слабопатогенный/слаботоксичный; УП/УТ – умереннопатогенный/умереннотоксичный; П/Т – патогенный/токсичный.

влияния споровых суспензий на развитие проростков до полного их угнетения. Фитотоксическая активность фузариевых грибов на проростках пшеницы варьировала от средней до высокой. Наибольшую опасность для проростков пшеницы представляют виды, обладающие высокой интенсивностью проявления фитотоксической активности, связанной с тем, что они способствуют накоплению опасных токсинов в тканях растений.

По результатам полученных данных в коллекцию отобраны и помещены штаммы 13 видов рода *Fusarium* из агроценозов равнинной части Северного Кавказа. Все штаммы охарактеризованы по морфологическим, патогенным и фитотоксичным свойствам.

Список литературы / References

Билай В.И. Фузариум. Киев: Наук. думка, 1977.

[Bilay V.I. Fusaria. Kiev: Naukova Dumka Publ., 1977. (in Russian)]

Билай В.И., Элланская И.А. Основные микологические методы в фитопатологии. В: Методы экспериментальной микологии. Киев: Наук. думка, 1982;418-431.

[Bilay V.I., Ellanskaya I.A. Basic mycological methods in plant pathology. In: Methods of Experimental Mycology. Kiev: Naukova Dumka Publ., 1982;418-431. (in Russian)]

Гагкаева Т.Ю., Гаврилова О.П., Левитин М.М. Современное состояние таксономии грибов рода *Fusarium* секции *Sporotrichiella*. *Микология и фитопатология*. 2008;42(3):201-214.

[Gagkaeva T.Yu., Gavrilova O.P., Levitin M.M. Modern taxonomy of fungi from the genus *Fusarium* of the section *Sporotrichiella*. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 2008; 42(3):201-214. (in Russian)]

Гагкаева Т.Ю., Левитин М.М. Современное состояние таксономии грибов комплекса *Gibberella fujikuroi*. *Микология и фитопатология*. 2005;39(6):1-14.

[Gagkaeva T.Yu., Levitin M.M. The current state of the taxonomy of fungi of the *Gibberella fujikuroi* complex. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 2005;39(6):3-14. (in Russian)]

Дубовой В., Жемчужина Н., Елизарова С., Горелов П. Государственная коллекция фитопатогенных микроорганизмов ВНИИФ. *Аналитика*. 2016;1:76-78.

[Dubovoy V., Zhemchuzhina N., Elizarova S., Gorelov P. State collection of phytopathogenic microorganisms from All-Russian research institute of phytopathology. *Analitika = Analytics*. 2016;1: 76-78. (in Russian)]

Жалиева Л.Д. Грибы рода *Fusarium* в агроценозе озимой пшеницы в условиях Краснодарского края. Паразитизм и симбиоз. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2010;1:101.

[Zhalieva L.D. Fungi of the genus *Fusarium* in the agroecosis of winter wheat in the Krasnodar region: Parasitism and symbiosis. *Immunopatologiya, Allergologiya, Infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology*. 2010;1:101. (in Russian)]

Жемчужина Н.С., Елизарова С.А. Использование штаммов Государственной коллекции фитопатогенных микроорганизмов ФГБНУ ВНИИФ в фитопатологических, селекционных и генетических исследованиях. В: Наука, производство, бизнес: современное состояние и пути инновационного развития аграрного сектора на примере Агрохолдинга «Байсерке-Агро»: Сб. тр. междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 70-летию заслуженного деятеля Республики Казахстан Досмухамбетова Темирхана

Мынайдаровича (04-05 апреля 2019 года, Алматы, Казахстан). Алматы: ТОО "Luxe Media Group", 2019;64-66.

[Zhemchuzhina N.S., Elizarova S.A. The use of strains of the State Collection of Phytopathogenic Microorganisms of the All-Russian Research Institute of Phytopathology in phytopathological, breeding, and genetic studies. In: Science, Production, Business: current state and ways of innovative development of the agricultural sector by the example of the Baiserke-Agro Agricultural Holding. Proceedings of the International Scientific and Practical Conference dedicated to the 70th anniversary of the Honored Worker of the Republic of Kazakhstan Temirkhan Dosmukhambetov (April 4-5, 2019, Almaty, Kazakhstan). Almaty: Luxe Media Group Publ., 2019;64-66. (in Russian)]

Коломиец Т.М., Жемчужина Н.С., Панкратова Л.Ф., Александрова А.В., Киселева М.И., Елизарова С.А. Микромитеты Государственной коллекции фитопатогенных микроорганизмов, вызывающие микозы и микотоксикозы человека и животных. *Усп. мед. микологии*. 2018;19:371-372.

[Kolomiets T.M., Zhemchuzhina N.S., Pankratova L.F., Alexandrova A.V., Kiseleva M.I., Elizarova S.A. Micromycetes of the State Collection of phytopathogenic microorganisms causing mycoses and mycotoxicoses in humans and animals. *Uspekhi Meditsinskoy Mikologii = Advances in Medical Mycology*. 2018;19:371-372. (in Russian)]

Рукавицина И.В. Биология и экология альтернариоза, фузариоза и гельминтоспориоза пшеницы. Шортанды, 2008.

[Rukavitsina I.V. Biology and Ecology of Alternariosis, Fusariosis and Helminthosporiosis of Wheat. Shortandy, 2008. (in Russian)]

Торопова Е.Ю., Казакова О.А., Воробьева И.Г., Селюк М.П. Фузариозные корневые гнили зерновых культур в Западной Сибири и Зауралье. *Защита и карантин растений*. 2013;9:23-26.

[Tropova E.Yu., Kazakova O.A., Vorobyeva I.G., Selyuk M.P. Fusarium root rot of grain crops in West Siberia and Transuralia. *Zashchita i Karantin Rasteniy = Plant Protection and Quarantine*. 2013;9:23-26. (in Russian)]

Чулкина В.А., Торопова Е.Ю., Стецов Г.Я. Интегрированная защита растений: фитосанитарные системы и технологии. М.: Колос, 2009.

[Chulkina V.A., Tropicova E.Yu., Stetsov G.Ya. Integrated Plant Protection: Phytosanitary Systems and Technologies. Moscow: Kolos Publ., 2009. (in Russian)]

Booth C. The Genus *Fusarium*. Kew, Surrey, England: Commonwealth Mycological Inst., 1971.

Dictionary of the Fungi. Eds. P.M. Kirk, P.F. Cannon, D.W. Minter, J.A. Stalpers. 10th ed. CAB International, 2008.

Gerlach W., Nirenberg H. The Genus *Fusarium* – a Pictorial Atlas. Mitt. Biol. Bundesans Land-Forstwirtschaft Berlin-Dahlem, 1982.

Kolomiets T., Zhemchuzhina N. Genetic resources of the State Collection of Phytopathogenic Microorganisms of the All-Russian Research Institute of Phytopathology (ARRIP). In: Conf. proc. of XXXVII Annual Meeting of the European Culture Collection Organisation, 13-15 September 2018, Moscow. 2018;45-46.

Leslie J.F., Summerell B.A. The *Fusarium* Laboratory Manual. 2nd ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2006.

Thrane U., Adler A., Clasen P.E. Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae*, and *Fusarium sporotrichioides*. *Int. J. Food Microbiol.* 2004;95:257-266. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12.005.

Watanabe T. Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi. Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species. 3rd ed. New York: CRC Press, 2010.

ORCID ID

T.M. Kolomiets orcid.org/0000-0002-1897-2380
I.B. Ablova orcid.org/0000-0002-3454-9988

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 16.07.2021. После доработки 30.08.2021. Принята к публикации 31.08.2021.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Получение рекомбинантного штамма *Komagataella phaffii* – продуцента протеиназы К из *Tritirachium album*

А.Б. Беклемишев^{1,2}✉, М.Б. Пыхтина^{1,2}, Я.М. Куликов^{1,2}, Т.Н. Горячковская², Д.В. Бочков², С.В. Сергеева²,
А.Р. Васильева², В.П. Романов², Д.С. Новикова³, С.Е. Пельтек²✉

¹ Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск, Россия

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Акционерное общество «Эфирное», г. Алексеевка, Белгородская область, Россия

✉ beklem@niibch.ru; peltek@bionet.nsc.ru

Аннотация. Объектами исследования являлись рекомбинантные штаммы *Komagataella phaffii* K51, несущие интегрированный в их геном гетерологичный ген протеиназы К (PK-w) из *Tritirachium album*, а также препарат рекомбинантной протеиназы К, полученный из этих штаммов. Целью работы было изучение возможности получения рекомбинантных штаммов *K. phaffii* K51, обеспечивающих высокий уровень синтеза функционально активной протеиназы К из *T. album*, и анализ ферментативной активности полученного рекомбинантного энзима. В работе использованы методы компьютерного анализа первичной структуры гена протеиназы К, молекулярно-биологические методы (ПЦР, электрофорез ДНК в агарозных гелях, электрофорез белков в SDS-ПААГ в денатурирующих условиях, спектрофотометрия, методы количественного определения активности протеаз), гено-инженерные методы (методы клонирования и селекции генов в бактериальных клетках *Escherichia coli* str. TOP10 и в митотрофных дрожжах *K. phaffii* str. K51). Спроектирован ген природной протеиназы К (PK-w), оптимизированный для экспрессии в дрожжах *K. phaffii* K51. Осуществлены синтез и клонирование синтезированного гена протеиназы К в составе вектора pPICZα-A в клетках *E. coli* str. TOP10. Ген протеиназы К встроен в векторную плазмиду pPICZα-A таким образом, чтобы на последующем этапе переклонирования в клетках дрожжей обеспечить его эффективную экспрессию под контролем промотора и терминатора гена *AOX1*, а продукт экспрессии клонированного гена содержал сигнальный пептид альфа-фактора *Saccharomyces cerevisiae* для обеспечения секреции белка в культуральную жидкость. Проведено переклонирование рекомбинантной плазмиды (pPICZα-A/PK-w) в клетках дрожжей *K. phaffii* str. K51. Получен рекомбинантный штамм *K. phaffii* K51, несущий синтетический ген протеиназы К и обеспечивающий его экспрессию в дрожжах и секрецию в культуральную среду. Приблизительный выход рекомбинантной протеиназы К после четырех суток культивирования дрожжевых рекомбинантных клонов составил 25 мкг/мл. Полученный препарат рекомбинантной протеазы обладает высокой удельной протеолитической активностью, составляющей ~5000 Ед/мг.

Ключевые слова: протеиназа К; клонирование гена; *Komagataella phaffii*; экспрессия гена; активность фермента.

Для цитирования: Беклемишев А.Б., Пыхтина М.Б., Куликов Я.М., Горячковская Т.Н., Бочков Д.В., Сергеева С.В., Васильева А.Р., Романов В.П., Новикова Д.С., Пельтек С.Е. Получение рекомбинантного штамма *Komagataella phaffii* – продуцента протеиназы К из *Tritirachium album*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(8): 882-888. DOI 10.18699/VJ21.102

Creation of a recombinant *Komagataella phaffii* strain, a producer of proteinase K from *Tritirachium album*

А.Б. Beklemishev^{1,2}✉, М.Б. Pykhtina^{1,2}, Ya.M. Kulikov^{1,2}, T.N. Goryachkovskaya², D.V. Bochkov², S.V. Sergeeva²,
A.R. Vasileva², V.P. Romanov², D.S. Novikova³, S.E. Peltek²✉

¹ Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia

² Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

³ Efirnoe Joint-Stock Company, Alekseyevka, Belgorod region, Russia

✉ beklem@niibch.ru; peltek@bionet.nsc.ru

Abstract. The objects of the study were recombinant clones of *Komagataella phaffii* K51 carrying the heterologous proteinase K (PK-w) gene from *Tritirachium album* integrated into their genome as well as samples of recombinant proteinase K isolated from these clones. The aims of this work were i) to determine whether it is possible to create recombinant *K. phaffii* K51 clones overexpressing functionally active proteinase K from *T. album* and ii) to analyze the enzymatic activity of the resulting recombinant enzyme. The following methods were used: computational analysis of primary structure of the proteinase K gene, molecular biological methods (PCR, electrophoresis of DNA in an agarose gel, electrophoresis of proteins in an SDS polyacrylamide gel under denaturing conditions, spectrophotometry, and quantitative assays of protease activity), and genetic engineering techniques (cloning and selection of genes in bacterial cells *Escherichia coli* TOP10 and in the methylotrophic yeast *K. phaffii* K51). The gene encoding natural proteinase K (PK) was designed and optimized for expression in *K. phaffii* K51. The proteinase K gene was synthesized and cloned

within the plasmid pPICZa-A vector in *E. coli* TOP10 cells. The proteinase K gene was inserted into pPICZa-A in such a way that – at a subsequent stage of transfection into yeast cells – it was efficiently expressed under the control of the promoter and terminator of the *AOX1* gene, and the product of the exogenous gene contained the signal peptide of the *Saccharomyces cerevisiae* α -factor to ensure the protein's secretion into the culture medium. The resultant recombinant plasmid (pPICZa-A/PK-w) was transfected into *K. phaffii* K51 cells. A recombinant *K. phaffii* K51 clone was obtained that carried the synthetic proteinase K gene and ensured its effective expression and secretion into the culture medium. An approximate productivity of the yeast recombinant clones for recombinant proteinase K was 25 $\mu\text{g/mL}$ after 4 days of cultivation. The resulting recombinant protease has a high specific proteolytic activity: $\sim 5,000$ U/mg.

Key words: proteinase K; gene cloning; *Komagataella phaffii*; gene expression; enzymatic activity.

For citation: Beklemishev A.B., Pykhtina M.B., Kulikov Ya.M., Goryachkovskaya T.N., Bochkov D.V., Sergeeva S.V., Vasileva A.R., Romanov V.P., Novikova D.S., Peltek S.E. Creation of a recombinant *Komagataella phaffii* strain, a producer of proteinase K from *Tritirachium album*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(8):882-888. DOI 10.18699/VJ21.102

Введение

Более 70 % ферментов, применяемых в различных областях промышленности, – гидролазы (Kudryavtseva et al., 2008; Yin et al., 2014), причем на долю протеаз приходится свыше 30 % от всего рынка промышленных ферментов (Kulkarni et al., 1999; Gupta et al., 2002; Koga et al., 2014; Singh et al., 2016). Это объясняется их активным использованием в различных областях промышленности, в частности в производстве моющих средств и утилизации отходов, в пищевой, молочной, кожевенной, фармацевтической и текстильной промышленности. Возросшие потребности в получении протеаз обусловлены в последние годы острой необходимостью производства новых пищевых продуктов из отходов сельхозпереработки растительного сырья и переработки мяса и рыбы, а также высококачественных и эффективных моющих средств. В последние три десятилетия в различных областях промышленности, а также в практическом здравоохранении находят широкое применение протеиназы из различных источников (бактерии, бациллы, грибы). Наиболее изучаемая группа протеолитических ферментов – сериновые протеиназы бактерий. Они интенсивно используются в фармацевтической промышленности, тканевой инженерии, системной энзимотерапии (Gupta et al., 2002; Kudryavtseva et al., 2008; Yin et al., 2014).

Препараты, содержащие в своем составе протеиназы, применяются в ряде областей медицины: в хирургии – для лечения трофических язв, абсцессов, флегмон, остеомиелита и других гнойно-воспалительных процессов; в стоматологии – при лечении кариеса, пульпитов, периодонтитов, пародонтоза и его осложнений; в пульмонологии – в качестве муколитического препарата для лечения различных форм пневмоний и бронхитов (ингаляционное введение).

О перспективности применения сериновых протеаз в медицинских целях свидетельствуют исследования многих авторов (Yariswamy et al., 2013; Muthu et al., 2017; Belov et al., 2018; Абатуров, 2020; Осмоловский и др., 2020). В частности, одна из главных проблем, с которой сталкиваются врачи при лечении кожных ран и ожогов у людей с ослабленным иммунитетом, – появление на них биопленки, образованной условно-патогенной микрофлорой (золотистым и эпидермальным стафилококком, микрококком, псевдомонадой), под которую не могут проникнуть антибиотики, вследствие чего заживление ран замедляется.

Для деградации различных компонентов экстрацеллюлярного матрикса биопленок в настоящее время разрабатываются препараты на основе комплекса ферментов: протеаз, в том числе протеиназы К, гликозидаз, дезоксирибонуклеаз (Абатуров, 2020). Одна из перспективных областей применения протеиназ – это создание на их основе тромболитических препаратов. Таким образом, разработка новых эффективных лекарственных препаратов на основе ферментов бактериального происхождения – перспективное направление современной медицины, микробиологии и биотехнологии.

Наибольшее применение имеют термостабильные протеазы, поскольку они, во-первых, характеризуются большей скоростью катализа, во-вторых, обеспечивают защиту реакционной смеси и продуктов энзиматического превращения от микробного загрязнения за счет осуществления ими катализируемых реакций при высоких температурах. В качестве рекомбинантных штаммов – продуцентов термостабильных протеаз – сконструированы как бактериальные, так и дрожжевые штаммы, причем во многих работах показано, что метилотрофные дрожжи *Komagataella phaffii* осуществляют большую продукцию рекомбинантных протеаз, чем бактериальные (Kim et al., 2005; Latiffi et al., 2013; Yu et al., 2014; Ma et al., 2016; Shu et al., 2016; Kangwa et al., 2018; Pereira et al., 2020). Кроме того, продуцируемые дрожжами протеазы, как правило, секретируются в культуральную среду в растворимом функционально активном состоянии (Yang et al., 2016). Особое внимание вызывают протеиназы, проявляющие свою активность в широком диапазоне температур и pH среды.

Несомненный интерес представляет решение задачи получения дрожжевого суперпродуцента протеиназы из *Tritirachium album* (протеиназа К), поскольку эта протеиназа имеет ряд очень важных в практическом отношении достоинств: обладает широкой специфичностью, показывает наибольшую активность при высоких температурах реакции от 37 до 60 °C, активна в широком диапазоне pH (4–12) и не ингибируется ионными и неионными детергентами. Решению вышеназванной проблемы посвящено настоящее исследование.

Материалы и методы

Материалы. Все химические реагенты аналитической чистоты приобретены в Sigma-Aldrich (США) или в АО «Рехахим» (Москва, Россия). Эндонуклеазы рестрикции были

получены в фирме «СибЭнзим» (Новосибирск, Россия), ДНК-лигаза T4 и ДНК-полимераза Phusion – в фирме Thermo Fisher Scientific Inc (США), олигонуклеотиды – в ООО «Биосинтез» (Новосибирск, Россия). Дрожжевой экстракт, бактопептон и триптон производства фирмы Difco использованы для приготовления среды LB для выращивания клеток *Escherichia coli*. Среда для культивирования дрожжей (YPD, VMGY, BMM2, BMM10) готовили, как указано в протоколе производителя EasySelect™ Pichia Expression Kit (Invitrogen, США). Среда – Игла (MEM) («Биолот», Россия), дитиотреитол, йодацетамид (Bio-Rad, США), свиной трипсин (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega, США). Ионообменные смолы DEAE-Sephrose FF и SP Sepharose FF приобретены в фирме GE Healthcare Bioscience (Швеция). Вода, использованная в работе, была деионизирована и автоклавирована.

Штаммы бактерий и дрожжей, плазмидные векторы. Дрожжи *K. phaffii* K51 из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) № Y-4935, *E. coli* str. TOP10 и вектор pPICZα-A получены в фирме Invitrogen Inc. (США).

Буферные растворы и питательные среды. Растворы и буферы готовили с применением деионизированной автоклавированной воды. Клоны *E. coli*, содержащие плазмиду pPICZα-A и ее производные, отбирали на чашках с агаром LB (1 % триптона, 0.5 % дрожжевого экстракта, 0.5 % NaCl, 1.8 % агара, 50 мкг/мл зеоцина) с низким содержанием соли. Дрожжевые клетки выращивали в среде YPD (2 % дрожжевого пептона, 1 % дрожжевого экстракта, 2 % декстрозы). Трансформанты дрожжей выращивали и отбирали на чашках с агаром YPD (2 % агара и различные концентрации зеоцина (500 и 2000 мкг/мл)). Культивирование отобранных клонов дрожжей проводили также в среде VMGY (1 % дрожжевого экстракта, 2 % пептона, 100 мМ фосфат калия, pH 6.0, 1.34 YNB, 4×10^{-5} % биотина и 2 % глицерина). Для индукции промотора гена *AOX1* использовали культивирование клонов последовательно сначала в среде BMM2 (1.34 % YNB, 4×10^{-5} % биотина, 1 % метанола), а затем в среде BMM10 (1.34 % YNB, 4×10^{-5} % биотина, 5 % метанола).

Конструирование рекомбинантной плазмиды pPICZα-A/PK-w. Нуклеотидная последовательность синтетического гена, кодирующего природную протеиназу K (протеаза K; эндопептидаза K; E.C.3.4.21.64) (далее – PK-w), из *T. album*, была сконструирована и оптимизирована для экспрессии в дрожжах *K. phaffii*. Оптимизированный ген протеазы PK-w был синтезирован фирмой GenScript (США). Ген протеазы PK-w был клонирован в составе плазмиды pPICZα-A по сайтам *XhoI* и *XbaI* в клетках *E. coli*.

Полупрепаративная наработка рекомбинантной протеиназы K (PK-w). Генетически модифицированный штамм дрожжей выращивали в 250 мл среды VMGY с 1 % глицерином в литровых колбах на орбитальном шейкере при 250 об/мин в течение 48 ч при 28 °С. Далее проводили индукцию биосинтеза белка 1 % метанолом (каждые сутки по 25 мл 10 % метанола) в течение четырех суток. На четвертые сутки определяли протеолитическую активность в культуральной жидкости.

Концентрацию белка в растворах выявляли тремя методами: а) по поглощению раствора белка при 280 нм с учетом величины экстинкции белка; б) по определению плотности окрашенной полосы белка в геле; в) по Брэдфорду с помощью набора Quick Start™ Bradford 1×Dye Reagent согласно инструкции производителя.

Определение протеазной активности рекомбинантной протеиназы K по казеину. Протеолитическую активность устанавливали методом Кунитца с использованием казеина из коровьего молока (Sigma-Aldrich) в качестве субстрата (Биссвангер, 2010). Для этого 0.4 мл 2 раствора казеина в 10 мМ Трис-НСl буфере (pH 8.0), содержащего 10 мМ CaCl₂, нагревали до 55 °С и вносили в него 0.2 мл раствора фермента в том же буфере. Смесь инкубировали при 55 °С 10 мин, а затем реакцию останавливали добавлением 1 мл 1.2 М трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Раствор сравнения подвергали тем же процедурам, за исключением того, что раствор фермента вносили в раствор казеина после добавления трихлоруксусной кислоты. Образцы центрифугировали 5 мин при 10000 g при 5 °С и определяли поглощение супернатанта при длине волны 275 нм. Одна единица активности соответствует количеству протеазы, приводящей за 1 мин при 55 °С к такому же значению поглощения, как 1 мкмоль тирозина (по калибровочной кривой). Калибровочную кривую строили по тирозину.

Определение протеазной активности в культуральной жидкости по азоказеину. Культуральную жидкость центрифугировали 10 мин, при +4 °С, 10000 g для осаждения клеток. Отбирали супернатант для определения протеазной активности.

Реакционную смесь с 0.5 мл 0.2 % раствора азоказеина в 50 мМ Трис-глициновом буфере (pH 8) и 0.25 мл супернатанта нагревали на водяной бане при 55 °С в течение 40 мин. Реакцию останавливали добавлением 1 мл 1.2 М трихлоруксусной кислоты. Раствор сравнения, содержащий 0.5 мл 0.2 % раствора азоказеина в 50 мМ Трис-глициновом буфере (pH 8) без супернатанта, нагревали на водяной бане при 55 °С в течение 40 мин. Реакцию останавливали добавлением 1 мл 1.2 М трихлоруксусной кислоты. После этого добавляли 0.25 мл супернатанта. Продукт реакции гидролиза азоказеина определяли спектрофотометрически по поглощению на длине волны 440 нм.

Результаты

Проектирование векторной конструкции, предназначенной для экспрессии гена протеиназы K в дрожжах *K. phaffii* K51

Для получения дрожжевого продуцента протеиназы K (протеаза K, эндопептидаза K; E.C.3.4.21.64) ген протеиназы *Tritirachium album* был оптимизирован для экспрессии в мегилотрофных дрожжах *K. phaffii* K51. Аминокислотная последовательность белка-предшественника протеиназы K и схема расположения его доменов представлены на рис. 1.

Синтезированный ген кодировал только препептид и аминокислотную последовательность зрелого белка.

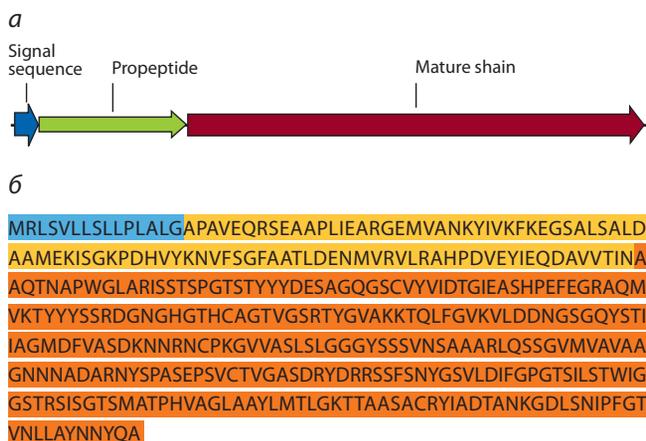


Рис. 1. Схема доменной структуры протеиназы К (а) и аминокислотная последовательность белка-предшественника РК-в (б).

Голубым цветом выделен сигнальный пептид, желтым – препептид (продомен), оранжевым – зрелый белок.

В качестве сигнала секреции фермента использован сигнальный пептид альфа-фактора *Saccharomyces cerevisiae*, кодируемый фрагментом вектора pPICZα-A (данные не представлены).

Клонирование рекомбинантной плазмиды pPICZα-A/PK-w в клетках *E. coli* TOP10

Электрокомпетентные клетки *E. coli* str. TOP10 трансформировали рекомбинантными плазмидами pPICZα-A/PK-w с применением электропоратора (Bio-Rad). Трансформированные клетки инокулировали в 1 мл среды LB и инкубировали при 37 °С в течение 1 ч в орбитальном шейкере при 140 об/мин. Суспензии клеток высевали на чашки Петри с агаризованной средой LB, содержащей 50 мкг/мл зеоцина и инкубировали 16 ч при +37 °С. На всех чашках выросло по 150–200 колоний. По 10 выросших колоний перекальывали на отдельные чашки Петри с агаризованной низкосолевогой средой LB, содержащей 50 мкг/мл зеоцина, и использовали для приготовления термолизатов с целью выявления методом ПЦР колоний, несущих рекомбинантную плазмиду pPICZα-A/PK-w. Полимеразную цепную реакцию осуществляли с помощью пары праймеров, специфичных для областей вектора pPICZα-A, фланкирующих встроенный ген: прямой праймер № 324-AOX1-F, 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3', и обратный праймер № 325-AOX1-R, 5'-GCAAATGGCATCTCTGACATCC-3'. Анализ размеров ампликонов выполняли электрофорезом в 0.8 % агарозном геле, содержащем бромистый этидий. ПЦР-положительные клоны были отобраны для последующей наработки рекомбинантных плазмид для последующего переклонирования их в клетках дрожжей.

Результаты анализа клонов *E. coli* TOP10 методом ПЦР колоний на наличие в них рекомбинантной плазмиды pPICZα-A/PK-w со вставкой гена протеиназы К приведены на рис. 2.

Ампликоны, полученные на двух рекомбинантных плазмидах, содержащих встроенный ген протеиназы К, имеют теоретически ожидаемый размер: ~1626 п. н. (см.

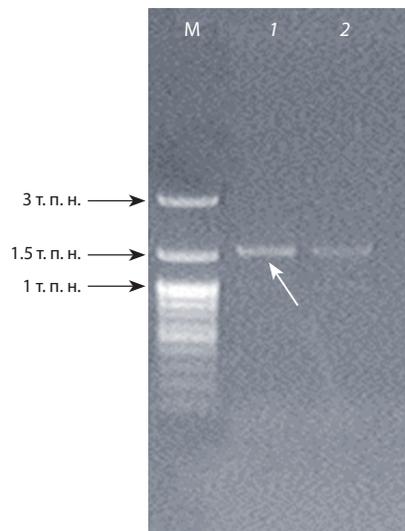


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР, полученных амплификацией участка рекомбинантной плазмиды pPICZα-A/PK-w, содержащей ген протеиназы К.

Стрелкой указан фрагмент ДНК, использованный в дальнейшей работе. Дорожки: М – маркер молекулярных масс ДНК SibEnzyme (100–3000 п. н.); 1 и 2 – ампликоны гена протеиназы К из двух рекомбинантных клонов, содержащих плазмиды со вставкой гена PK-w.

рис. 2). Отобранный клон с рекомбинантной плазмидой pPICZα-A/PK-w со вставкой гена протеиназы К (PK-w), использовали для дальнейших работ, связанных с наработкой плазмиды, ее линейаризации эндонуклеазой рестрикции BstX1 и последующего клонирования в клетках дрожжей *K. phaffii* K51.

Клонирование гена протеиназы К в клетках дрожжей *K. phaffii* K-51 и скрининг трансформантов

На первом этапе осуществляли наработку отобранного клона *E. coli* в 100 мл среды LB с последующим выделением из клеток плазмидной ДНК pPICZα-A/PK-w с помощью набора GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit. Анализ выделенного препарата плазмиды выполняли посредством электрофореза в 0.8 % агарозном геле, окрашенном бромистым этидием.

Концентрацию препарата плазмидной ДНК определяли с применением флуориметра Qubit (Invitrogen). В итоге было получено ~25 мкг очищенной рекомбинантной плазмиды pPICZα-A/PK-w. Приблизительно 5–10 мкг выделенной плазмиды pPICZα-A/PK-w линейаризовали перевариванием рестриктазой BstX1 и использовали для трансформации клеток *K. phaffii* str. K51 электропорацией. По окончании реакции рестрикции проводили фенол-хлороформную экстракцию ДНК с последующим ее осаждением изопропанолом и промывкой 70 % этанолом. Осадки ДНК растворяли в 10 мкл бидистиллированной H₂O, замораживали и хранили при –20 °С. Полноту реакции гидролиза плазмиды контролировали электрофорезом продуктов рестрикции в 0.8 % агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Судя по результатам электрофоретического анализа, основная масса препарата плазмиды была гидролизована эндонуклеазой рестрикции BstX1.

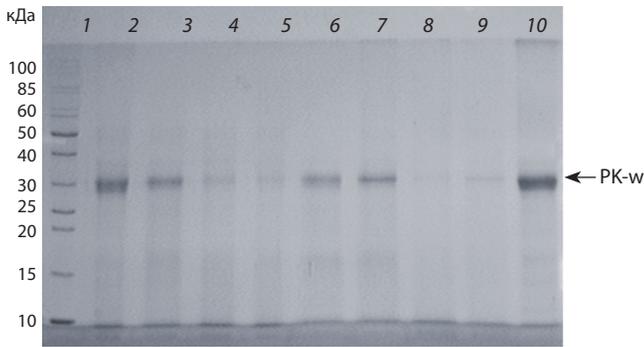


Рис. 3. Электрофореграмма белков, продуцируемых исследуемыми клонами дрожжей, трансформированных плазмидой pPICZαA/PK-w.

Дорожки: 1 – маркер молекулярных масс Thermo Scientific (10–200 кДа); 2–10 – белки, продуцируемые и секретируемые анализируемыми клонами.

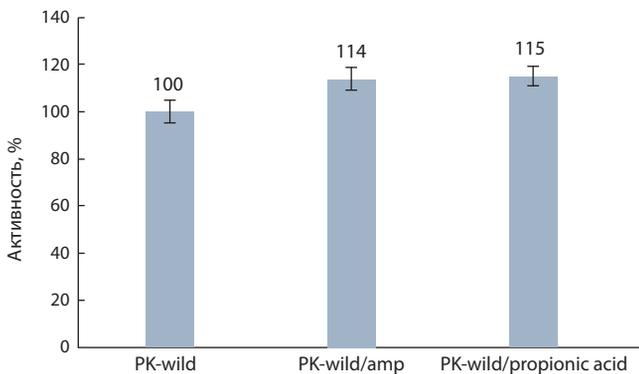


Рис. 4. Протеолитическая активность культуральной жидкости дрожжевого рекомбинантного клона № 10, выращенного в полупрепаративных условиях в присутствии ампициллина (PK-wild/amp), пропионовой кислоты (PK-wild/propionic acid) и без использования антибактериальных агентов (PK-wild). Протеолитическую активность культуральной жидкости без использования антибактериальных агентов (PK-wild) принимали за 100 %.

Для трансформации электрокомпетентных дрожжевых клеток брали по 13–15 мкг плазмидной ДНК, растворенной в 10 мкл бидистиллированной H₂O. Электропорацию осуществляли с помощью электропоратора Gene Pulser Xcell Total System Electroporator (Bio-Rad).

Трансформированные клетки после предварительного выращивания на орбитальном шейкере при 200 об/мин в течение 2 ч при 27 °С в пробирках, содержащих 1 мл среды YPD, высевали на чашки Петри с агаризованной средой YPD, содержащей 500 и 2000 мкг/мл зеоцина. Чашки убирали в термостат на 30 °С на 3–5 сут. На четвертый день после трансформации клеток плазмидой pPICZαA/PK-w на чашках с 500 мкг/мл зеоцина выросло множество отдельных колоний, на чашках с 2000 мкг/мл зеоцина – от 50 до 100 колоний.

Зеоцин-резистентные трансформанты, выросшие на чашках с концентрацией зеоцина 2000 мкг/мл, оценивали на способность синтезировать и секретировать целевой белок с помощью культивирования отобранных клонов в 96-глубоколуночных планшетах (Axugen Scientific). На скрининг брали 20 колоний, которые вносили в лунки

96-глубоколуночных планшетов. Параллельно эти же колонии пересеивали на отдельные чашки Петри с агаризованной средой с той же концентрацией зеоцина в прономерованные участки.

Культивирование отобранных клонов проводили в лунках 96-глубоколуночных планшетов в 300 мкл среды VMGY на орбитальном шейкере при 250 об/мин в течение 48 ч при +28 °С. Затем в каждую лунку вносили по 250 мкл среды VMM2. В следующие три дня в лунки вносили по 50 мкл среды VMM10. На четвертые сутки культуральные жидкости из каждой лунки центрифугировали при 6000 об/мин 5 мин для осаждения клеток и полученные супернатанты анализировали на присутствие целевых белков с помощью SDS-ПААГ.

Образцы для электрофореза готовили следующим образом: к супернатантам добавляли 10 ТХУ для концентрации белков. Белковые преципитаты промывали ацетоном, ресуспендировали в в однократном Трис-глициновом буфере, вносили 4-кратный денатурирующий буфер, кипятили и затем разделяли белки в 12.5 % геле. По результатам электрофореза отбирали культуральные жидкости клонов, продуцирующих максимальные количества белков с молекулярными массами, соответствующими молекулярной массе природной протеиназы К, ~30 кДа, для определения в них содержания рекомбинантной протеиназы К и оценки ее ферментативной активности. Результаты электрофоретического анализа белков, продуцируемых и секретируемых рекомбинантными клонами дрожжей, представлены на рис. 3.

Все позитивные клоны продуцируют мажорный белок с молекулярной массой ~29–30 кДа, которая соответствует молекулярной массе зрелой протеиназы К ~30 кДа (рис. 4). По результатам электрофореза для дальнейших работ был отобран клон № 10, продуцирующий наибольшее количество рекомбинантного белка с молекулярной массой ~29–30 кДа. Выход рекомбинантной протеазы PK-w после 4 сут культивирования дрожжевого рекомбинантного клона № 10 в планшете составил 25 мкг/мл.

Для контроля бактериальной контаминации при наработке препаративных количеств рекомбинантного использована пропионовая кислота. На рис. 4 показано, что применение пропионовой кислоты в концентрации 0.025 % сопоставимо с использованием ампициллина в концентрации 0.2 мг/мл.

Микроскопический анализ культур не выявил присутствия бактерий, однако использование ампициллина и пропионовой кислоты несколько увеличивает наработку целевого продукта.

Дрожжевой рекомбинантный клон № 10 был использован для полупрепаративной наработки ферментного препарата.

Определение протеазной активности рекомбинантного белка, продуцируемого клоном № 10

Исследованный препарат рекомбинантного белка с молекулярной массой ~29–30 кДа обладал высокой удельной протеолитической активностью, составляющей ~5000 Ед/мг. Этот результат свидетельствует о том, что анализируемый рекомбинантный белок является протеиназой К (PK-w).

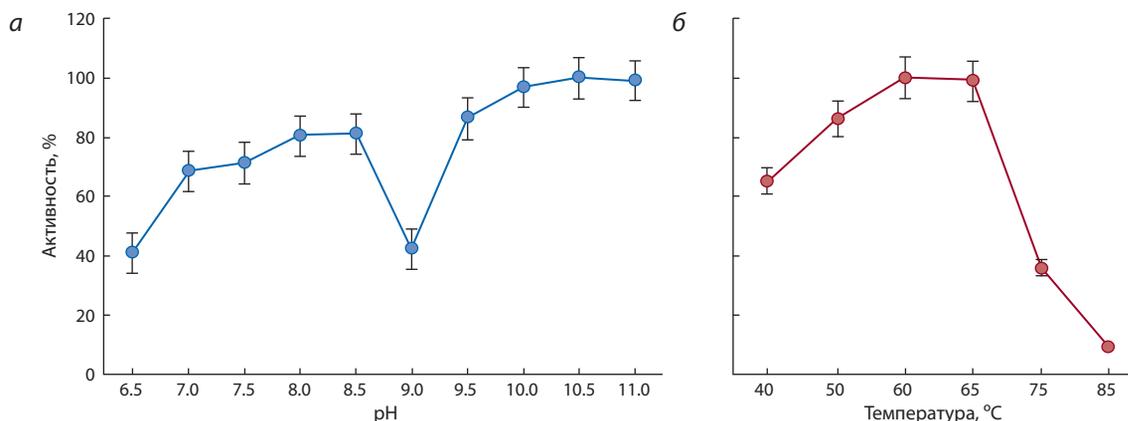


Рис. 5. Зависимость активности рекомбинантной протеиназы К от pH и температуры.

Изучена зависимость активности полученной рекомбинантной протеиназы К от величины pH среды и температуры проведения реакции (рис. 5). Оптимум ферментативной активности рекомбинантной протеиназы К находится в области pH 10–11, хотя фермент активен и при pH от 9.5 до 6.5 (см. рис. 5, а). Резкое падение активности наблюдается при pH 9.0, а также от 4.0 и ниже. Диапазон оптимальных температур для проявления протеазной активности рекомбинантного фермента лежит в области от 40 до 65 °C (см. рис. 5, б).

Хроматографическая очистка полученной рекомбинантной протеиназы К

Все операции проводили при температуре, не превышающей 5 °C. Культуральную жидкость, наработанную рекомбинантным клоном № 10, отделяли центрифугированием в течение 25 мин при 4000 об/мин. Супернатант очищали от низкомолекулярных примесей и концентрировали в 20 раз методом ультрафильтрации с использованием центрифужных концентраторов.

Очистку фермента от примесных белков осуществляли методом ионообменной хроматографии на анионите – DEAE-Sepharose 6HF. Элюцию проводили 0.05 М раствором хлорида натрия в 50 мМ Трис-НСl буфере (pH 7.2). Фракции, где была обнаружена протеолитическая активность, объединяли, концентрировали с использованием центрифужных концентраторов и либо лиофильно сушили, либо хранили в морозильной камере холодильника в 50 % глицерине.

Очищенный рекомбинантный белок анализировали электрофорезом в 12.5 % SDS-ПААГ (рис. 6). Рекомбинантный белок представлен на геле одной мажорной полосой с размером в области ~26.5–27.0 кДа (см. рис. 6). Каких-либо примесных белков на геле нет. Активность очищенного белка составила 49800 Ед/мг по азоказеину и 5000 Ед/мг по казеину. Таким образом, получен высокоочищенный препарат рекомбинантной протеиназы К.

Закключение

Осуществлены проектирование и оптимизация нуклеотидной последовательности, кодирующей пробелок природной протеиназы К (PK-w) из *T. album* для обеспечения

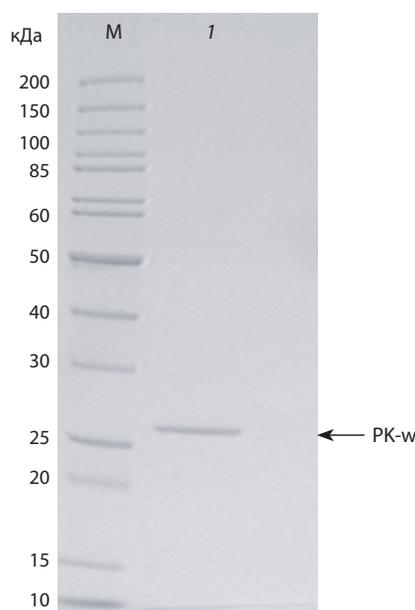


Рис. 6. Электрофореграмма препарата очищенного рекомбинантного белка, продуцируемого дрожжевым клоном № 10.

Электрофорез проводили в 12.5 % SDS-ПААГ. Дорожки: М – маркер молекулярных масс Thermo Scientific (10–200 кДа); 1 – хроматографически очищенный рекомбинантный белок.

ее эффективной экспрессии в клетках дрожжей *K. phaffii*. Синтезированный ген протеиназы К был клонирован в составе вектора pPICZα-A в клетках *E. coli* str. TOP10, а затем переклонирован в клетках дрожжей *K. phaffii* str. K51.

Получен рекомбинантный клон *K. phaffii* K51, несущий ген рекомбинантной протеиназы К и обеспечивающий его экспрессию в дрожжах, в культуральную среду. Нароботан образец рекомбинантной протеиназы К. Определена протеазная активность препарата рекомбинантной протеиназы К (PK-w) с использованием в качестве субстратов казеина и азоказеина. Препарат фермента обладает высокой удельной протеолитической активностью, составляющей ~5000 Ед/мг. Оптимум ферментативной активности рекомбинантной протеиназы К находится в области pH 10–11 и температуре от 40 до 65 °C.

Список литературы / References

- Абатуров А.Е. Протеазы, деградирующие биопленочный матрикс. *Здоровье ребенка*. 2020;15(3):187-194. DOI 10.22141/2224-0551.15.3.2020.204554.
[Abaturov A.E. Proteases that degrade the biofilm matrix. *Zdorov'ye Rebenka = Child's Health*. 2020;15(3):187-194. DOI 10.22141/2224-0551.15.3.2020.204554. (in Russian)]
- Биссвангер Х. Практическая энзимология. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2010;154-156.
[Bisswanger H. Practical Enzymology. Moscow: Binom Publ., 2010;154-156. (in Russian)]
- Осмоловский А.А., Орехова А.В., Конти Э., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. Получение и стабильность комплексного препарата протеиназ *Aspergillus ochraceus* L-1 с фибринолитической и антикоагулянтной активностью. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология*. 2020;75(3):158-163.
[Osmolovsky A.A., Orekhova A.V., Konti E., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Production and stability of the proteinase complex from *Aspergillus ochraceus* L-1 with fibrinolytic and anticoagulant activity. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*. 2020;75(3):130-135.]
- Belov A.A., Vaniushenkova A.A., Dosadina E.E., Khanafina A.A. New textile dressings based on biodegradable polymers containing proteinases for wounds and burns treatment. *Wounds and Wound Infections. The prof. B.M. Kostyuchenok Journal*. 2018;5(1):16-26. DOI 10.25199/2408-9613-2018-5-1-16-26. (in Russian)
- Gupta R., Beg Q., Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2002;59(1):15-32. DOI 10.1007/s00253-002-0975-y.
- Kangwa M., Salgado J.A.G., Fernandez-Lahore H.M. Identification and characterization of N-glycosylation site on a *Mucor circinelloides* aspartic protease expressed in *Pichia pastoris*: effect on secretion, activity and thermo-stability. *AMB Express*. 2018;8(1):157. DOI 10.1186/s13568-018-0691-3.
- Kim T., Lei X.G. Expression and characterization of a thermostable serine protease (TfpA) from *Thermomonospora fusca* YX in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2005;68(3):355-359. DOI 10.1007/s00253-005-1911-8.
- Koga Y., Tanaka S.-I., Sakudo A., Tobiume M., Aranishi M., Hirata A., Takano K., Ikuta K., Kanaya S. Proteolysis of abnormal prion protein with a thermostable protease from *Thermococcus kodakarensis* KOD1. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2014;98(5):2113-2120. DOI 10.1007/s00253-013-5091-7.
- Kudryavtseva O., Dunaevsky Y., Kamzolkina O., Belozersky M. Fungal proteolytic enzymes: features of the extracellular proteases of xylophilic basidiomycetes. *Microbiology*. 2008;77(6):643-653. DOI 10.1134/S0026261708060015.
- Kulkarni N., Shendye A., Rao M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol. Rev*. 1999;23(4):411-456. DOI 10.1111/j.1574-6976.1999.tb00407.x.
- Latiffi A.A., Salleh A.B., Rahman R.N., Oslan S.N., Basri M. Secretory expression of thermostable alkaline protease from *Bacillus stearo-thermophilus* FI by using native signal peptide and α -factor secretion signal in *Pichia pastoris*. *Genes Genet. Syst*. 2013;88(2):85-91. DOI 10.1266/ggs.88.85.
- Ma X., Liu Y., Li Q., Liu L., Yi L., Ma L., Zhai C. Expression, purification and identification of a thermolysin-like protease, neutral protease I, from *Aspergillus oryzae* with the *Pichia pastoris* expression system. *Protein Expr. Purif*. 2016;128:52-59. DOI 10.1016/j.pep.2016.08.008.
- Muthu S., Gopal V.B., Soundararajan S., Nattarayan K., Narayan K.S., Lakshmiathan M., Malairaj S., Perumal P. Antibacterial serine protease from *Wrightia tinctoria*: Purification and characterization. *Plant Physiol. Biochem*. 2017;112:161-172. DOI 10.1016/j.plaphy.2017.01.003.
- Pereira W.E.S., da Silva R.R., de Amo G.S., Ruller R., Kishi L.T., Boscolo M., Gomes E., da Silva R. A collagenolytic aspartic protease from *Thermomucor indicae-seudaticae* expressed in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Appl. Biochem. Biotechnol*. 2020;191(3):1258-1270. DOI 10.1007/s12010-020-03292-z.
- Shu M., Shen W., Yang S., Wang X., Wang F., Wang Y., Ma L. High-level expression and characterization of a novel serine protease in *Pichia pastoris* by multi-copy integration. *Enzyme Microb. Technol*. 2016;92:56-66. DOI 10.1016/j.enzmictec.2016.06.007.
- Singh R., Kumar M., Mittal A., Mehta P.K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*. 2016;6(2):174. DOI 10.1007/s13205-016-0485-8.
- Yang H., Zhai C., Yu X., Li Z., Tang W., Liu Y., Ma X., Zhong X., Li G., Ma L. High-level expression of proteinase K from *Tritirachium album* limber in *Pichia pastoris* using multi-copy expression strains. *Protein Expr. Purif*. 2016;122:38-44. DOI 10.1016/j.pep.2016.02.006.
- Yariswamy M., Shivaprasad H.V., Joshi V., Nanjaraj Urs A.N., Nataraju A., Vishwanath B.S. Topical application of serine proteases from *Wrightia tinctoria* R. Br. (Apocyanaceae) latex augments healing of experimentally induced excision wound in mice. *J. Ethnopharmacol*. 2013;149(1):377-383. DOI 10.1016/j.jep.2013.06.056.
- Yin C., Zheng L., Chen L., Tan Q., Shang X., Ma A. Cloning, expression, and characterization of a milk-clotting aspartic protease gene (*Po-Asp*) from *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Biochem. Biotechnol*. 2014;172(4):2119-2131. DOI 10.1007/s12010-013-0674-4.
- Yu X., Wang X., Zhong X., Tang W., Zhai C., Chen W., Ma L. Expression of the thermostable carboxypeptidase Taq gene in *Pichia pastoris* GS115. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2014;30(11):1791-1795.

ORCID ID

A.B. Beklemishev orcid.org/0000-0001-9732-1246
M.B. Pykhtina orcid.org/0000-0002-7808-9274
Ya.M. Kulikov orcid.org/0000-0001-6916-6875

T.N. Goryachkovskaya orcid.org/0000-0002-7445-0608
D.V. Bochkov orcid.org/0000-0002-0764-5800
S.E. Peltek orcid.org/0000-0002-7122-2546

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках реализации комплексного проекта по теме «Создание высокотехнологического производства высококачественных растительных пищевых белков» (Соглашение о предоставлении из федерального бюджета субсидии на развитие кооперации государственного научного учреждения и организации реального сектора экономики в целях реализации комплексного проекта по созданию высокотехнологического производства № 075-11-2020-036 от 15.12.2020) в рамках Постановления Правительства РФ от 9 апреля 2010 г. № 218 на базе ИЦиГ СО РАН. Работа частично выполнена на оборудовании Центра коллективного пользования «Протеомный анализ» Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины (Новосибирск, Россия).
Авторы выражают благодарность А.С. Розанову, с.н.с. лаборатории биотехнологии ИЦиГ СО РАН, за предоставленный штамм дрожжей *Komagataella phaffii* K51.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 16.11.2021. После доработки 29.11.2021. Принята к публикации 29.11.2021.

CLARITY and Light-Sheet microscopy sample preparation in application to human cerebral organoids

T.A. Shnaider , I.E. Pristyazhnyuk

Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

 shnayder@bionet.nsc.ru

Abstract. Cerebral organoids are three-dimensional cell-culture systems that represent a unique experimental model reconstructing early events of human neurogenesis *in vitro* in health and various pathologies. The most commonly used approach to studying the morphological parameters of organoids is immunohistochemical analysis; therefore, the three-dimensional cytoarchitecture of organoids, such as neural networks or asymmetric internal organization, is difficult to reconstruct using routine approaches. Immunohistochemical analysis of biological objects is a universal method in biological research. One of the key stages of this method is the production of cryo- or paraffin serial sections of samples, which is a very laborious and time-consuming process. In addition, slices represent only a tiny part of the object under study; three-dimensional reconstruction from the obtained serial images is an extremely complex process and often requires expensive special programs for image processing. Unfortunately, staining and microscopic examination of samples are difficult due to their low permeability and a high level of autofluorescence. Tissue cleaning technologies combined with Light-Sheet microscopy allows these challenges to be overcome. CLARITY is one of the tissue preparation techniques that makes it possible to obtain opaque biological objects transparent while maintaining the integrity of their internal structures. This method is based on a special sample preparation, during which lipids are removed from cells and replaced with hydrogel compounds such as acrylamide, while proteins and nucleic acids remain intact. CLARITY provides researchers with a unique opportunity to study three-dimensional biological structures while preserving their internal organization, including whole animals or embryos, individual organs and artificially grown organoids, in particular cerebral organoids. This protocol summarizes an optimization of CLARITY conditions for human brain organoids and the preparation of Light-Sheet microscopy samples.

Key words: cerebral organoids; CLARITY; Light-Sheet microscopy; immunohistochemistry; tissue clearing; tissue imaging.

For citation: Shnaider T.A., Pristyazhnyuk I.E. CLARITY and Light-Sheet microscopy sample preparation in application to human cerebral organoids. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(8):889-895. DOI 10.18699/VJ21.103

CLARITY и Light-Sheet микроскопия применительно к органоидам головного мозга человека

Т.А. Шнайдер , И.Е. Пристяжнюк

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

 shnayder@bionet.nsc.ru

Аннотация. Церебральные органоиды – это трехмерные системы культивирования клеток, представляющие собой уникальную экспериментальную модель, которая позволяет реконструировать ранние события нейрогенеза человека *in vitro* в норме и при различных патологиях. На сегодняшний день для изучения морфологических параметров органоидов чаще всего применяют иммуногистохимический анализ. В связи с этим аспекты трехмерной цитоархитектуры органоидов, такие как нейронные сети или асимметричная внутренняя организация, трудно реконструировать при использовании рутинных подходов. Иммуногистохимический анализ биологических объектов является универсальным методом в биологических исследованиях. Один из ключевых этапов данного подхода – изготовление крио- или парафиновых серийных срезов образцов. Это очень трудоемкий и времязатратный процесс. Кроме того, срезы представляют собой лишь небольшую часть исследуемого объекта, а трехмерная реконструкция из полученных серийных изображений является крайне сложной процедурой и часто требует специальных дорогостоящих программ для обработки изображений. К сожалению, окрашивание и микроскопирование целых образцов затруднено из-за их низкой проницаемости и высокого уровня autofluorescences. Технологии очистки тканей в сочетании с Light-Sheet микроскопией дают возможность преодолеть эти проблемы при работе. CLARITY – это одна из технологий подготовки тканей, позволяющая сделать непрозрачные биологические объекты прозрачными с сохранением целостности их внутренней структуры. Метод основан на специальной пробоподготовке, во

время которой из клеток удаляются липиды и заменяются гидрогелевыми соединениями, такими как акрил-амид; при этом белки и нуклеиновые кислоты остаются интактными. Технология CLARITY предоставляет исследователям уникальную возможность изучать объемные биологические структуры с сохранением их внутренней организации, включая целых животных или эмбрионы, отдельные органы и искусственно выращенные органоиды, в частности церебральные. Данный протокол обобщает оптимизацию условий CLARITY для органоидов головного мозга человека и особенности подготовки образцов Light-Sheet микроскопии.

Ключевые слова: церебральные органоиды; CLARITY; Light-Sheet микроскопия; иммуногистохимия; очистка тканей.

Introduction

Biological tissues and organs present a complex three-dimensional structure. Due to their opacity and high level of autofluorescence, three-dimensional reconstruction of such objects is an extremely laborious, but necessary process. To date, a number of protocols (more than a dozen) have been developed for making tissue transparent: SeeDB (Ke et al., 2013), ScaleA2 (Hama et al., 2011), uDISCO (Pan et al., 2016), CLARITY (Chung, Deisseroth, 2013), CUBIC (Susaki et al., 2015) and others. In general, all protocols can be divided into three groups, depending on the chemicals used for tissue clearance: organic solvents (hydrophobic reagent)-based protocols (BABB, 3DISCO, ECI method), hydrophilic reagent-based protocols (ClearT, Scale, FUnGI, Fructoseglycerol, CUBIC and other) and hydrogel-tissue chemistry-based protocol (CLARITY, SWITCH and SHIELD) (Ueda et al., 2020; Susaki, Takasato, 2021). Some of them have different advantages like quality and speed of clearing or simplicity of the procedure. But on the other hand, some of the protocols involve using toxic and corrosive chemicals that require special objectives to avoid damage to the microscope or require other special equipment. Most of these protocols have been developed to clarify entire organs or their big fragments.

Recently, a new method of artificial mini-organ or organoids generation from induced pluripotent stem cells (iPSC) was developed (Lancaster et al., 2013) and now many different types of organoids have already been produced (brain, lung, liver, intestine, pancreas, kidney and others). Organoids are widely used both to recreate the three-dimensional architecture and functional activity of the original organs during normal embryonic development and at various disorders and to test the biological activity of various drugs, chemical and biological agents. Usually, organoids are opaque, which makes investigating them rather difficult. For this purpose, it is advisable to use the combination of tissue clearing and 3D imaging technologies. However, it is important to select the clarifying technology that would match organoids size and fragility as much as possible and would produce sufficient resolution for investigation of tiny structures.

Various techniques have been used for organoid tissue clearing and several studies have compared different clarifying methods which could be applied to mini-organs (Susaki, Takasato, 2021). Some techniques, such as the hydrophilic clearing protocols (ClearT2 and ScaleS) are most acceptable for clearing small spheroids such as neurospheres (Boutin, Hoffman-Kim, 2015) or cancer cell spheroids (Boutin et al., 2018). Others, such as RapiClear, Fructoseglycerol and FUnGI, also using hydrophilic components, are designed and optimized for handling small and fragile, predominantly hollow organoid structures such as intestinal organoids. It should

be noted that these protocols are very convenient and take only three days without application of harmful chemicals (Dekkers et al., 2019; van Ineveld et al., 2020). For complex and dense brain organoids, stronger clearing protocols including delipidation procedure are usually used (Susaki, Takasato, 2021). Applying organic solvent-based methods like 2Eci (2nd generation Ethyl cinnamate-based clearing method) (Masselink et al., 2019; Goranci-Buzhala et al., 2020) or BABB method for midbrain organoids (Renner H. et al., 2020) can get a relatively quick (within a few days) result. However, most of the organic components used in these protocols are quite toxic (for example, a mixture of benzyl alcohol and benzyl benzoate in BABB method (Renner H. et al., 2020)).

The use of hydrogel-tissue chemistry sometimes provides more opportunities for preserving the structure of organoids and increasing the optical resolution of tiny objects. That is due to the tissue hydrogel scaffold preparation by cross-linking hydrogel monomers to native biomolecules (Gradinaru et al., 2018). The creation of such a polymer frame in the brain organoids allows combining these protocols with additional procedures with sodium dodecyl sulfate and physical electrophoresis, as well as with high-resolution imaging of Expansion Microscopy with a general microscopy setup (Wassie et al., 2019; Susaki, Takasato, 2021).

Thus, it is quite important to choose the most optimal and effective tissue clearing technique for samples, especially for such complex objects as cerebral organoids.

One of the most convenient and lab-friendly techniques is CLARITY (Clear Lipid-exchanged Acrylamide-hybridized Rigid Imaging/Immunostaining/*In situ* hybridization-compatible Tissue-hYdrogel). CLARITY was developed in 2013 for obtaining high-resolution information from complex 3D structures, such as the whole mouse brain (Chung, Deisseroth, 2013). Application of this technique enabled to obtain intact-tissue imaging of long-range projections, local circuit wiring, cellular relationships, subcellular structures, protein complexes, and neurotransmitters. CLARITY protocol includes replacing lipids with hydrophilic polymers (acrylamide and bis-acrylamide), which help to stabilize tissue but make it optically transparent and permeable. It is very important that molecules like nucleic acids and proteins stuck in the hydrogel keep their structures and locations. Thus, CLARITY allows combining tissue clearing techniques with immunostaining and *in situ* hybridization and explores the internal structure of large three-dimensional objects without damaging their integrity. There is only one article in which CLARITY technique was used for cerebral organoid clarifying (Sakaguchi et al., 2019), but without a detailed description. Thus, the aim of our work was optimization of CLARITY protocol in application to cerebral organoids and detailed description of samples preparation for Light-Sheet microscopy.

Materials and methods

Reagents

1. Acrylamide (PanReac AppliChem, catalogue number: A1090).
2. Agarose D1, low EEO (Life science products, catalogue number: 1932.0025).
3. Bisacrylamide (PanReac AppliChem, catalogue number: A3636).
4. Boric acid (PanReac AppliChem, catalogue number: A2940).
5. ddH₂O.
6. Glue (Henkel, catalogue number: 2340344).
7. Parafilm M (Pechiney Plastic Packaging Company, catalogue number: PM 996).
8. Paraformaldehyde (PFA) (Sigma Aldrich, catalogue number: 158127).
9. Phosphate buffer saline (PBS) (VWR Life Science AMRESCO, catalogue number: Am-E404-100).
10. Sodium azide (Sigma Aldrich, catalogue number: S8032).
11. Sodium dodecyl sulfate (PanReac AppliChem, catalogue number: A1112).
12. Triton X-100 (VWR Life Science AMRESCO, catalogue number: Am-O694-0.1).
13. VA044 (Wako, catalogue number: 011-19365).
14. Serological pipets 5, 10, 25 ml (Corning, catalogue number: 4050, 4100, 4250).
15. 1-ml syringe (B. Braun, catalogue number: 9161635S).
16. 2 ml tube (Eppendorf, catalogue number: 0030120094).
17. 5 ml tube (Axygen, catalogue number: SCT-5ML-S).
18. Glass bottle 100 and 500 ml (Rasotherm, catalogue number: 95206001 and 95206003).
19. Syringe filter, 0.22 μm (TTP, catalogue number: 99722).
20. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma Aldrich, catalogue number: D-9542).
21. Antibodies (Table 1).

Table 1. Primary and secondary antibodies used in the protocol

Antibodies	Producer	Catalogue number	Host	Dilution
anti-CTIP2	Abcam	ab18465	Rat	1:100
anti-bTubb3	Covance	MMS-435P	Mouse	1:200
Anti-Rat IgG (Alexa Fluor® 488 conjugated)	Jackson ImmunoResearch	712-545-150	Donkey	1:200
Anti-Mouse IgG (Alexa Fluor® 488 conjugated)	Jackson ImmunoResearch	715-545-150	Donkey	1:200

Equipment

1. Light-Sheet Z1 microscope (Zeiss).
2. Orbital shaker (Biosan, catalogue number: OS-20).
3. Roller shaker (Selecta, catalogue number: 7001723).
4. pH meter (OHAUS, catalogue number: 00000032755).
5. Magnetic stirrer (Biosan, catalogue number: MSH-300i).
6. Standard microwave.
7. Thermometer.
8. Forceps.
9. Chemical spoons.

10. Fume hood.
11. Icebox.

Software

1. ImageJ (NIH, <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>)
2. ZEN (Zeiss, <https://www.zeiss.com/>)

Procedure

Fixation of human cerebral organoid

Note: For any manipulation with organoids, use cut 1 ml tips or wide orifice 1 ml tips to protect samples from damage.

1. Transfer cerebral organoids in 5-ml tubes and wash with 1X PBS solution 2 times.
2. Replace 1X PBS solution with freshly prepared 4 % PFA solution.
3. Place the tubes on the roller/orbital shaker and incubate at room temperature for 2–3 h.
4. Wash samples 3 times with 1X PBS solution for 30 min.

Note: At this step, cerebral organoids can be kept at +4 °C in 1X PBS solution. For keeping more than 1 week, we recommend adding sodium azide to a final concentration of 0.01 % to prevent sample contamination with bacteria and fungi.

Hydrogel embedding

1. Precool all solutions, equipment, and samples on ice to prevent premature polymerization of the hydrogel solution.
Note: If you use a frozen aliquot of hydrogel solutions, thaw the vial on ice in a fridge overnight. After thawing, gently mix and check for the absence of precipitation.
2. Fill the 2-ml tube with the hydrogel solution and transfer cerebral organoids in the tube having previously gently removed leftovers of the PBS with a paper towel.
Note: 2-ml tube format is acceptable for 1–3 organoids. For a large number of organoids, we recommend using a bigger tube.
3. Incubate the samples in the hydrogel solution at +4 °C at the lowest speed of roller/orbital shaker for 24 h.
4. Refill the tube with fresh hydrogel solution and incubate at +37 °C for 4 h.

Note: Fill the tube with hydrogel solution completely. Oxygen inhibits hydrogel polymerization, thus all bubbles should be removed. Additionally, we recommend covering the tube with Parafilm to prevent air access.

5. Very gently extract the samples from the polymerized hydrogel by carefully rolling samples on a paper towel.
6. Transfer the samples into the 5-ml tube and wash with Clearing Solution 4 times at room temperature for 24 h.

Passive clearing

1. Change Clearing Solution every 2 days and incubate at +37 °C with agitation. Continue clearing until samples become transparent.

Note: We strongly recommend using +37 °C for lipid removal. Room temperature slows this process down to several months! Note: The time of tissue clearing depends on the size of organoids. Cerebral organoids ≤0.5 cm become transparent during ~2 weeks, for organoids ≥0.5 cm it can take up to 3 weeks.

2. Wash samples in PBST for 48 h. Change solution 2–3 times per day.

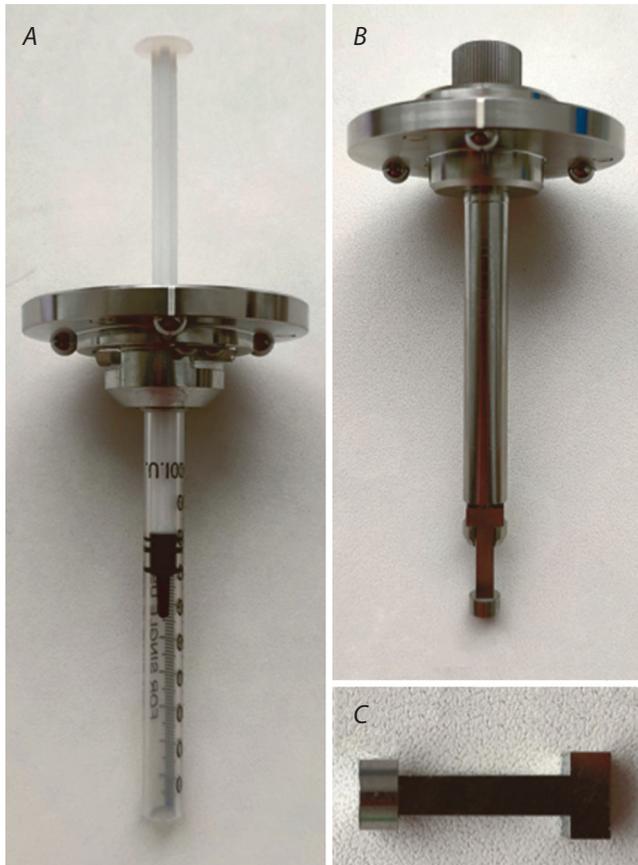


Fig. 1. A, ready-to-use sample holder with 1-ml syringe for agarose embedded samples; B, sample holder for hanging samples; C, the bar for sample sticking.

Staining

1. Incubate samples with primary antibodies in PBST at room temperature on a shaker for 3 days.
2. Wash samples with PBST for 2 days, changing PBST every 4 h.
3. Incubate with secondary antibodies and DAPI at room temperature for 2 days.
4. Wash samples with PBSR for 2 days, changing PBST every 4 h.

Note: Antibody consumption for staining of CLARITY samples is very high. We recommend reducing the volume to the minimum at which the samples in the tube are completely covered with the staining buffer with constant stirring on an orbital or roller shaker.

Note: For larger organoids, we recommend extending each staining step by at least 1 day.

Sample preparation for Light-Sheet microscopy

Organoid sizes can vary greatly. Therefore, we recommend using a different fixation method for Light-Sheet microscopy depending on the size.

Agarose embedding samples (for smaller samples)

Note: Use the agarose with a low melting point temperature only.

Note: The percentage of agarose solutions depends on the size of the organoid. For larger organoids, use 1.5 % agarose solution.

1. Prepare the 1-ml syringe by cutting off the top (Fig. 1, A).
2. Weigh the required amount of agarose (at the rate of 1 g per 100 ml) and dissolve in 1X PBS or ddH₂O. Prepare agarose solution by melting in the microwave. Usually, for a 1-ml syringe, 1.5 ml of agarose is enough.
3. Pour the hot agarose solution into a 12-well plate or any other laboratory glassware or plasticware. When agarose solution cools down to +40 °C, transfer samples and gently mix. Put the samples in agarose solution into the 1-ml syringe.
4. Assemble the 1-ml syringe with a sample holder (see Fig. 1, A).
5. Proceed to Light-Sheet microscopy.

Note: Fill the microscope chamber with ddH₂O or 1X PBS. No great differences were observed between the two solutions.

Agarose-free or hanging samples (for bigger samples)

1. Glue the sample to the bar (see Fig. 1, B, C). The area of adhesion can be increased by attaching a small piece of filter paper. Keep samples in ddH₂O or 1X PBS before placing them into the microscope chamber.
2. Proceed to Light-Sheet microscopy.

Note: It is imperative to check and rinse the rod and sample holder for glue residues. If there are any, we strongly recommend that you soak in soapy water and mechanically remove any glue residue.

Recipes

Note: Most solutions and reagents from this protocol are toxic and biohazardous. Do not forget about your safety and work in protective laboratory clothing and only under a fume hood!

10X PBS solution

To prepare a 10X stock solution, dissolve 10 tablets of PBS in 100 ml of ddH₂O.

PFA solutions

- 16 % PFA stock solution

To prepare stock solution, dissolve 16 g of PFA in 80 ml of 1X PBS using a magnetic stirrer. Adjust pH to 7.4–7.5 and add 1X PBS up to 100 ml. Filter the solution through a 0.40 µm filter and aliquote into 5 ml tubes. Keep stock solution at +4 °C for short storage (up to 2 weeks) or at –20 °C for long storage.

- 4 % PFA working solution

To prepare 4 % PFA working solution, dilute stock solution with 1X PBS.

Hydrogel solution

Note: All solutions and equipment have to be pre-cooled to prevent premature polymerization of hydrogel solution.

1. Mix all components on ice according to Table 2.
2. Aliquote hydrogel solution and keep at –20 °C for long storage or use freshly prepared solution.

Table 2. Hydrogel solution composition

Component	Stock	Quantity	Final concentration
Acrylamide	40 %	10 ml	4 %
Bisacrylamide	2 %	1.25 ml	0.025 %
PBS	×10	10 ml	×1
ddH ₂ O	–	78.5 ml	–
VA-044	–	0.25 g	0.25 %

Clearing solution

1. Mix all components on ice according to Table 3.
2. Keep the solution in a glass bottle at room temperature.

Table 3. Clearing solution composition

Component	Quantity	Final concentration
Sodium dodecyl sulfate	40 g	4 %
Boric acid	12.366 g	200 mM
Sodium hydroxide	–	to pH 8.5
ddH ₂ O	1000 ml	–

PBST

1. Add Triton-X100 to the final concentration of 0.1 % using a magnetic stirrer.
2. Keep the solution in a glass bottle at room temperature.

Results

Human cerebral organoids were generated according to a protocol from Lancaster et al. (2013) with small modifications. 2- and 3-month-old cerebral organoids were used for tissue clearing protocol. At this stage, there are dense spheres more than 2 mm in diameter (Fig. 2, A). We noted that the time of tissue clearing depends on the size of organoids. Cerebral organoids ≤ 0.5 cm become transparent during ~ 2 weeks, for organoids ≥ 0.5 cm up to 3 weeks. This time may vary from sample to sample, however, continue cleaning until the samples become transparent (see Fig. 2, B, C).

For immunostaining we chose two proteins with different subcellular localisation such as nuclear CTIP2 (Fig. 3, A) and cytoplasmic bTubb3 (see Fig. 3, C). We did not find a significant difference between penetration of antibodies into different



Fig. 2. A, intact cerebral organoid before CLARITY; B, hydrogel embedded cerebral organoid before tissue clearing; C, cerebral organoids after 2 weeks of tissue clearing.

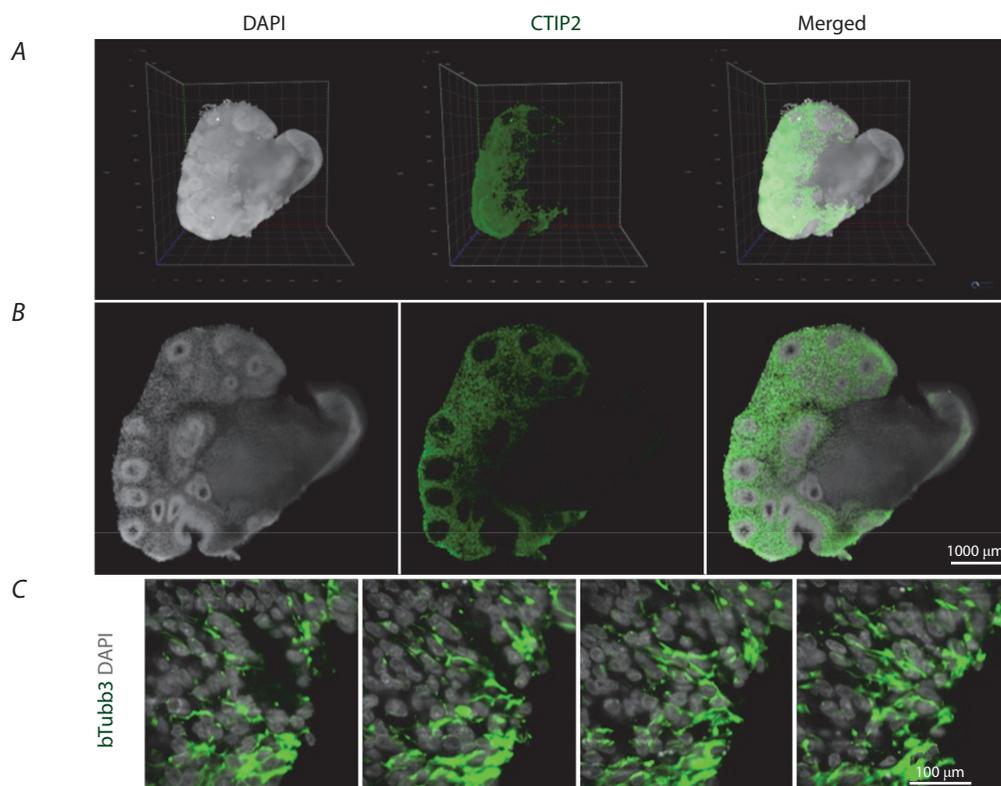


Fig. 3. Light-Sheet imaging of a cerebral organoid after CLARITY: A, 3D reconstructed cerebral organoid, 5 \times , NA 0.16, water immersion; B, optical section of the middle part of the cerebral organoid, 5 \times , NA 0.16, water immersion; C, optical sections of a small part of the cerebral organoid, 10 \times , NA 0.5, water immersion.

cellular compartments. In both cases, we observed specific staining throughout the entire thickness of the organoid (see Fig. 3, B).

Conclusions

Cerebral organoids are a unique novel technology that allows the reconstruction of early human neurogenesis. The outstanding feature of this *in vitro* system is the reproduction of the three-dimensional organization of the human embryonic brain. Standard histological methods of analysis do not allow reconstructing the internal structure of the cerebral organoids and result in information loss. The tissue clearing technique helps to overcome these limitations, allowing to recreate a three-dimensional model of cerebral organoids and explore their fine organization without internal structure destruction. This is especially important for the investigation of brain organoids since they contain a dense network of long processes of nerve cells, which is very difficult to study by serial sections (Dodt et al., 2007).

Based on the various tissue clearance techniques analysis, we settled on the use of hydrogel-tissue chemistry as a clearing agent. Generally hydrophobic and hydrophilic reagent-based protocols are applied to the investigation of spheroids or hollow organoids such as intestinal organoids (Susaki, Takasato, 2021), while hydrogel reagents are used for the clarifying of human iPSC-derived retinal organoids (Cora et al., 2019) and iPSC-derived cerebral organoids (Renner M. et al., 2017; Sakaguchi et al., 2019; Albanese et al., 2020). Hydrogel-tissue chemistry-based protocols maximize the preservation of the internal structure of organoids and allow to achieve high optical resolution and low background at fluorescent microscopy.

Currently, there are at least three known hydrogel-tissue chemistry-based methods that use different delipidation and dehydration chemicals: SWITCH (Glutaraldehyde cross-linking (Delipidation) Diatrizoic acid N-methyl-D-glucamine Iodixanol (dehydration)), SHIELD (Polyepoxy cross-linking (Delipidation), Diatrizoic acid N-methyl-D-glucamine Iodixanol (dehydration)) and CLARITY (Hydrogel embedding (Delipidation), Histodenz™ Glycerol (dehydration)) (Susaki, Takasato, 2021; Yu et al., 2021). Therefore in our choice of a suitable technique, we also focused on the availability of the appropriate reagents, the simplicity of the protocol and the lack of need for special equipment.

Of course, a significant disadvantage of CLARITY technique is the relatively long tissue clearance procedure (approximately three weeks for 90-days cerebral organoids), but this obstacle is compensated by a quite simple protocol. To our knowledge, there is a single report in which the CLARITY technique was used for cerebral organoid clarifying (Sakaguchi et al., 2019); however, a detailed description of this technique applied to brain organoids has not been previously performed. For the first time, we make a detailed description of the human cerebral organoid samples preparation for investigation of CLARITY-treated samples for Light-Sheet microscopy.

References

Albanese A., Swaney J.M., Yun D.H., Evans N.B., Antonucci J.M., Velasco S., Sohn C.H., Arlotta P., Gehrke L., Chung K. Multiscale 3D phenotyping of human cerebral organoids. *Sci. Rep.* 2020;10(1):

21487. DOI 10.1038/s41598-020-78130-7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33293587>.
- Boutin M.E., Hoffman-Kim D. Application and assessment of optical clearing methods for imaging of tissue-engineered neural stem cell spheres. *Tissue Eng. Part C Methods.* 2015;21(3):292-302. DOI 10.1089/ten.TEC.2014.0296. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25128373>.
- Boutin M.E., Voss T.C., Titus S.A., Cruz-Gutierrez K., Michael S., Ferrer M. A high-throughput imaging and nuclear segmentation analysis protocol for cleared 3D culture models. *Sci. Rep.* 2018;8(1):11135. DOI 10.1038/s41598-018-29169-0. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30042482>.
- Chung K., Deisseroth K. CLARITY for mapping the nervous system. *Nat. Methods.* 2013;10(6):508-513. DOI 10.1038/nmeth.2481. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23722210>.
- Cora V., Haderspeck J., Antkowiak L., Mattheus U., Neckel P.H., Mack A.F., Bolz S., Ueffing M., Pashkovskaia N., Achberger K., Liebau S.A. Cleared view on retinal organoids. *Cells.* 2019;8(5):391. DOI 10.3390/cells8050391. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31035373>.
- Dekkers J.F., Alieva M., Wellens L.M., Ariese H.C.R., Jamieson P.R., Vonk A.M., Amatgalim G.D., Hu H., Oost K.C., Snippert H.J.G., Beekman J.M., Wehrens E.J., Visvader J.E., Clevers H., Rios A.C. High-resolution 3D imaging of fixed and cleared organoids. *Nat. Protoc.* 2019;14(6):1756-1771. DOI 10.1038/s41596-019-0160-8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31053799>.
- Dodt H.U., Leischner U., Schierloh A., Jährling N., Mauch C.P., Deininger K., Deussing J.M., Eder M., Ziegglänsberger W., Becker K. Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nat. Methods.* 2007;4(4):331-336. DOI 10.1038/nmeth1036. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17384643>.
- Goranci-Buzhala G., Mariappan A., Gabriel E., Ramani A., Ricci-Vitiani L., Buccarelli M., D'Alessandris Q.G., Pallini R., Gopalakrishnan J. Rapid and efficient invasion assay of glioblastoma in human brain organoids. *Cell Rep.* 2020;31(10):107738. DOI 10.1016/j.celrep.2020.107738. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32521263>.
- Gradinaru V., Treweek J., Overton K., Deisseroth K. Hydrogel-tissue chemistry: principles and applications. *Annu. Rev. Biophys.* 2018;47:355-376. DOI 10.1146/annurev-biophys-070317-032905. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29792820>.
- Hama H., Kurokawa H., Kawano H., Ando R., Shimogori T., Noda H., Fukami K., Sakaue-Sawano A., Miyawaki A. Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat. Neurosci.* 2011;14(11):1481-1488. DOI 10.1038/nn.2928. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21878933>.
- Ke M.T., Fujimoto S., Imai T. SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nat. Neurosci.* 2013;16(8):1154-1161. DOI 10.1038/nn.3447. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23792946>.
- Lancaster M.A., Renner M., Martin C.A., Wenzel D., Bicknell L.S., Hurler M.E., Homfray T., Penninger J.M., Jackson A.P., Knoblich J.A. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature.* 2013;501(7467):373-379. DOI 10.1038/nature12517. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23995685>.
- Masselink W., Reumann D., Murawala P., Pasierbek P., Taniguchi Y., Bonnay F., Meixner K., Knoblich J.A., Tanaka E.M. Broad applicability of a streamlined ethyl cinnamate-based clearing procedure. *Development.* 2019;146(3):dev166884. DOI 10.1242/dev.166884. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30665888>.
- Pan C., Cai R., Quacquarelli F.P., Ghasemigharagoz A., Loubopoulos A., Matryba P., Plesnila N., Dichgans M., Hellal F., Ertürk A. Shrinkage-mediated imaging of entire organs and organisms using uDISCO. *Nat. Methods.* 2016;13(10):859-867. DOI 10.1038/nmeth.3964. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27548807>.
- Renner H., Grabos M., Becker K.J., Kagermeier T.E., Wu J., Otto M., Peischard S., Zeuschner D., TsyTsyura Y., Disse P., Klingauf J., Leidel S.A., Seebohm G., Schöler H.R., Bruder J.M. A fully auto-

- mated high-throughput workflow for 3D-based chemical screening in human midbrain organoids. *Elife*. 2020;9:e52904. DOI 10.7554/eLife.52904. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33138918>.
- Renner M., Lancaster M.A., Bian S., Choi H., Ku T., Peer A., Chung K., Knoblich J.A. Self-organized developmental patterning and differentiation in cerebral organoids. *EMBO J*. 2017;36(10):1316-1329. DOI 10.15252/embj.201694700. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28283582>.
- Sakaguchi H., Ozaki Y., Ashida T., Matsubara T., Oishi N., Kihara S., Takahashi J. Self-organized synchronous calcium transients in a cultured human neural network derived from cerebral organoids. *Stem Cell Reports*. 2019;13(3):458-473. DOI 10.1016/j.stemcr.2019.05.029. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31257131>.
- Susaki E.A., Tainaka K., Perrin D., Yukinaga H., Kuno A., Ueda H.R. Advanced CUBIC protocols for whole-brain and whole-body clearing and imaging. *Nat. Protoc*. 2015;10(11):1709-1727. DOI 10.1038/nprot.2015.085. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26448360>.
- Susaki E.A., Takasato M. Perspective: extending the utility of three-dimensional organoids by tissue clearing technologies. *Front. Cell Dev. Biol*. 2021;9:679226. DOI 10.3389/fcell.2021.679226. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34195197>.
- Ueda H.R., Dodt H.U., Osten P., Economo M.N., Chandrashekar J., Keller P.J. Whole-brain profiling of cells and circuits in mammals by tissue clearing and light-sheet microscopy. *Neuron*. 2020;106(3):369-387. DOI 10.1016/j.neuron.2020.03.004. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32380050>.
- van Ineveld R.L., Ariese H.C.R., Wehrens E.J., Dekkers J.F., Rios A.C. Single-cell resolution three-dimensional imaging of intact organoids. *J. Vis. Exp*. 2020;160:e60709. DOI 10.3791/60709. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32568249>.
- Wassie A.T., Zhao Y., Boyden E.S. Expansion microscopy: principles and uses in biological research. *Nat. Methods*. 2019;16(1):33-41. DOI 10.1038/s41592-018-0219-4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30573813>.
- Yu T., Zhu J., Li D., Zhu D. Physical and chemical mechanisms of tissue optical clearing. *iScience*. 2021;24(3):102178. DOI 10.1016/j.isci. 2021.102178. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33718830>.

ORCID ID

I.E. Pristyazhnuk orcid.org/0000-0003-0226-4213

Acknowledgements. We thank the Microscopic Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences for granting access to microscopic equipment. This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant No. 19-29-04067) and by Budget Project (No. 0259-2021-0016).

Ethics. Written informed consent was obtained from the patient. The study was approved by the Scientific Ethics Committee of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (protocol No. 131 from 01.10.2019).

Conflict of interest. The authors declare no competing financial interests.

Received April 11, 2021. Revised October 4, 2021. Accepted October 11, 2021.

Алфавитный указатель авторов статей, опубликованных в журнале в 2021 г.

- Абакарова А.А. 2, 224
Абдуллаев Р.А. 5, 528
Аблова И.Б. 6, 638; 8, 874
Авидзба М.А. 8, 797
Айба В.Ш. 8, 797
Айтназаров Р.Б. 8, 831
Алазнели И.Д. 8, 822
Аливердиева Д.А. 2, 224
Алпатыева Н.В. 5, 528
Андорная Д.В. 1, 82
Андропова Н.В. 4, 414
Анисимова И.Н. 5, 528
Ангонцева Е.В. 5, 573
Апарина В.А. 7, 740
Апасов И.В. 4, 394
Артемьева А.М. 4, 442; 5, 514
Архипов С.А. 3, 310
Астахова Т.Н. 5, 593
Афанасенко О.С. 3, 269, 337
Афонников Д.А. 1, 64; 3, 251, 269
- Бабкин И.В. 2, 234; 8, 864
Багаутдинова З.З. 1, 39
Бадаева Е.Д. 7, 770
Базарон Б.З. 5, 486
Базовкина Д.В. 5, 593
Балеев Д.Н. 4, 433
Баранова О.А. 7, 713, 723
Бардашева А.В. 2, 234; 8, 864
Баричева Е.М. 3, 292
Баташева Б.А. 5, 528
Батов А.С. 6, 677
Баттулин Н.Р. 3, 331
Бауэр Т.В. 2, 139
Башур Д.С. 6, 652
Бебякина И.В. 7, 770
Беклемишев А.Б. 8, 882
Белокопытова П.С. 6, 607
Бердников Р.В. 8, 812
Березиков Е.В. 1, 101, 108
Беспалова Л.А. 6, 638
Бибишев В.А. 7, 770
Бикчурина Т.И. 6, 661
Блинов А.Г. 1, 108
Блохина Н.В. 5, 486
Бовин А.Д. 5, 502
Богачева Н.В. 1, 125
Бойко Н.И. 7, 740
Болдаков Д.М. 7, 770
Болоболова Е.У. 3, 292
Бондарь Н.П. 5, 573
Борисова Н.В. 5, 593
Бородин П.М. 6, 661
Бочков Д.В. 8, 882
- Брагина Е.Ю. 8, 855
Брагина М.К. 1, 57
Бугрова В.В. 4, 367
Бытjak Д.С. 1, 125
- Вавилова В.Ю. 1, 108
Васильева А.Р. 8, 882
Васильева С.А. 5, 472
Васильченко Е.Н. 4, 394
Васылык И.А. 7, 693
Вдовина Н.В. 2, 202
Вилонов С.Д. 4, 381
Вишнякова А.В. 3, 276
Вишнякова М.А. 6, 620
Власов В.В. 8, 864
Власова Е.В. 6, 620
Воевода М.И. 3, 301
Волкова Н.А. 6, 661
Володин В.А. 7, 693
Волошина И.О. 8, 864
Волынкин В.А. 7, 693
Воронина А.В. 3, 276
- Гавриленко Т.А. 3, 337
Гаврилова О.П. 7, 732
Гагкаева Т.Ю. 7, 732
Гайнуллин Н.Р. 7, 723
Ганчева М.С. 7, 746
Генаев М.А. 1, 71
Глинушкин А.П. 8, 874
Голубева Т.С. 3, 251
Гончаров Н.П. 1, 71; 4, 361, 448
Гончарова И.А. 8, 855
Горбунова А.О. 7, 754
Гордеева Е.И. 2, 178
Гориславец С.М. 7, 693
Горячковская Т.Н. 8, 882
Григолова Т.Р. 3, 276
Гридина М.М. 6, 607
Грищенко И.В. 1, 117
Грунтенко Н.Е. 5, 465
Гультяева Е.И. 6, 638
Гуреева Ю.А. 6, 677
Гурина А.А. 7, 746
- Давоян Р.О. 7, 770
Давоян Э.Р. 7, 770
Давыдова Ю.Д. 8, 839
Деменков П.С. 5, 580
Демулин Я.Н. 4, 388
Денисова Е.И. 6, 669
Додуева И.Е. 7, 746
Долгих Е.А. 5, 502
Донских Е.И. 8, 812

- Дорогова Н.В. 3, 292
Дружин А.Е. 7, 713
Дьяченко Е.А. 5, 492
- Евдокименко С.Н.** 4, 414
Егоров Е.А. 4, 408
Егорова Г.П. 6, 620
Елизарова С.А. 8, 874
Ениксева Р.Ф. 8, 839
Еремина М.А. 5, 465
Ермолаев В.И. 6, 652
Ефремов Я.Р. 6, 647
- Жалсанова И.Ж.** 8, 855
Жемчужина Н.С. 8, 874
Жиравковская Е.В. 2, 234
Журавлев А.В. 5, 472
- Заварзин Е.А. 1, 71
Завьялов Е.Л. 3, 310
Запорожец В.И. 6, 652
Захаров Г.А. 5, 472
Зацепина О.Г. 5, 472
Зверева О.А. 4, 442
Зинченко А.Н. 7, 770
Зотиков В.И. 4, 381
Зубанова Ю.С. 7, 770
Зубко О.Н. 3, 276
Зубкова А.Е. 3, 292
Зудова О.В. 3, 276
- Иванисенко В.А.** 5, 552, 580
Иванисенко Т.В. 5, 580
Иванова И.П. 8, 864
Иванова Ю.Н. 7, 701
Игнатъева Е.В. 1, 18
Ильницкая Е.Т. 8, 797
Искакова Г.А. 2, 157
Исламмагомедова Э.А. 2, 224
Исмагулова Г.А. 2, 157
Ищенко И.Ю. 3, 310
- Кабанихин С.И.** 1, 82
Кабанов А.С. 2, 139
Кабашов А.Д. 7, 732
Кавай-оол У.Н. 5, 593
Казак А.А. 5, 543
Казанцев Ф.В. 3, 318
Казанцева А.В. 8, 839
Калашникова Д.А. 3, 344
Каледин А.П. 8, 822
Калымбетова Т.В. 2, 234
Каминская А.Н. 5, 472
Камионская А.М. 5, 492
Каракотов С.Д. 4, 394
Карпенко Л.И. 5, 562
Карпова А.Г. 5, 593
Карпычев И.В. 2, 147
Келина А.В. 4, 414
Кельбин В.Н. 7, 740
Киселева М.И. 8, 874
- Климова Н.В. 2, 208
Князев С.П. 6, 652
Коваленко Н.М. 7, 723
Коврижных В.В. 1, 39
Кожемякина Р.В. 2, 208
Кожемяков А.П. 7, 754
Кокшарова Г.С. 6, 607
Колесникова Е.О. 8, 812
Коломиец Т.М. 8, 874
Комышев Е.Г. 1, 71
Кораблев А.Н. 3, 331
Королев М.А. 3, 310
Коростышевская А.М. 1, 117
Коротких И.Н. 4, 433
Коршунова Е.В. 6, 652
Косолапов В.М. 4, 361, 401
Костенко С.И. 4, 401
Котенко С.Ц. 2, 224
Котляр В.К. 8, 797
Кочетов А.В. 2, 164; 3, 251, 269, 337; 6, 677
Кочиева Е.З. 5, 492
Крахмалёва М.С. 4, 367
Кретъен С.О. 2, 234
Криворотько О.И. 1, 82
Кручинина Ю.В. 1, 71
Крюков А.А. 7, 754
Кудряшова Т.Р. 7, 754
Кузьмин О.Г. 5, 543
Кузьмина Т.И. 6, 613
Куликов И.М. 4, 414
Куликов Я.М. 8, 882
Кулян Р.В. 4, 420
Курина А.Б. 5, 514
Кустова Д.В. 5, 502
Кушниренко И.Ю. 5, 543
- Лактионов П.П.** 3, 344
Лапочкина И.Ф. 7, 723
Ларкин Д.М. 2, 190
Лахова Т.Н. 3, 318
Лашин С.А. 1, 46; 3, 318; 5, 593
Лебедева Т.В. 5, 528
Левицкий В.Г. 1, 7
Лепянен И.В. 5, 502
Летягин А.Ю. 3, 310
Лихенко И.Е. 5, 543
Лиховской В.В. 7, 693
Лобаскова М.М. 8, 839
Логвиненко И.И. 3, 301
Логвиненко Н.И. 3, 301
Лосев М.Р. 7, 746
Лоскутов И.Г. 7, 732
Лубянов А.А. 7, 754
Лукомец В.М. 4, 388
Лутова Л.А. 7, 746
Луцай Е.А. 7, 693
Ляпунова О.А. 3, 260
- Макаркина М.В.** 8, 797
Макарова Е.Н. 6, 669
Макеева В.М. 8, 822

- Максимова Ю.В. 1, 117
Малахова Н.П. 2, 157
Маликов У.М. 7, 754
Малиновская Л.П. 6, 661
Малых С.Б. 8, 839
Мальцева Э.Р. 2, 157
Мамедов Р.З. 4, 367
Маркова А.С. 7, 732
Марченкова Л.А. 7, 723
Матросова Е.А. 1, 18
Матушкин Ю.Г. 1, 46; 3, 318
Медведева А.В. 5, 472
Меньшанов П.Н. 5, 465
Меркулова Т.И. 1, 7
Меркульева Ю.А. 5, 562
Мизина П.Г. 4, 433
Миков Д.С. 7, 770
Митрошина О.В. 7, 723
Михайлова С.В. 3, 301
Мичурина С.В. 3, 310
Мишакова Т.М. 8, 831
Мищенко А.М. 5, 552
Мищенко Е.Л. 5, 552
Монахос С.Г. 3, 276
Моргунов А.И. 5, 543
Морозов А.И. 4, 433
Морозов В.В. 8, 864
Морозова В.В. 2, 234; 8, 864
Мунгалов Р.В. 6, 607
Мустафин З.С. 1, 39, 46
Мустафин Р.Н. 8, 839
- Назаренко М.С.** 8, 855
Найзабаева Д.А. 2, 157
Налбандян А.А. 4, 394
Нгок Х.Б. 2, 147
Нежданова А.В. 5, 492
Никитин С.В. 6, 652
Никитина Е.А. 5, 472
Николаев С.В. 1, 64
Новикова Д.С. 8, 882
Нурисламов А.Р. 6, 607
- Орина А.С.** 7, 732
Остапчук А.М. 8, 822
Ощепкова Е.А. 5, 580
- Павлова О.А.** 5, 502
Павлова О.В. 7, 723
Паулиш А.А. 1, 71
Пельтек С.Е. 1, 125; 6, 647; 8, 882
Перфильев Р.Н. 7, 761
Першина Е.Г. 1, 125
Першина Л.А. 2, 171
Петровский Е.Д. 1, 117
Подгаецкий М.А. 4, 414
Полубоярова Т.В. 6, 647
Полюшкевич Л.О. 7, 746
Потокина Е.К. 7, 693
Потоцкая И.В. 5, 543
Пристяжнюк И.Е. 6, 607; 8, 889
- Приходько А.Ю. 1, 71
Пронозин А.Ю. 1, 57, 71; 3, 269
Проскурякова А.А. 6, 652
Прохошин Н.М. 1, 71
Пшеничникова Т.А. 8, 805
Пшеничникова Л.М. 5, 534
Пыхтина М.Б. 8, 882
Пьянков С.А. 2, 139
- Радченко Е.Е.** 5, 528
Ралдугина Г.Н. 2, 147
Рекославская Н.И. 7, 787
Рисованная В.И. 7, 693
Розанов А.С. 1, 125
Розанова И.В. 6, 677
Розенфрид К.К. 7, 701
Романов В.П. 8, 882
Романов С.Е. 3, 344
Рудометов А.П. 5, 562
Рыбаченко Н.А. 7, 693
Рымарева Ю.М. 1, 117
Рындин А.В. 4, 420
Ряполова А.В. 1, 125
- Савватеева-Попова Е.В.** 5, 472
Савелов А.А. 1, 117
Савин Т.В. 5, 543
Савинкова М.М. 6, 669
Савостьянов А.Н. 5, 593
Сазонов Ф.Ф. 4, 414
Салина Е.А. 1, 57; 7, 740, 761
Сальников П.А. 6, 607
Саляев Р.К. 7, 787
Сандухадзе Б.И. 4, 367
Сапрыгин А.Е. 5, 593
Сафонова А.Д. 6, 677
Селедцова Г.В. 8, 864
Сергеев А.А. 2, 139
Сергеева С.В. 8, 882
Серова И.А. 3, 331
Сибикеев С.Н. 7, 713
Сидельников Н.И. 4, 433
Силкова О.Г. 7, 701
Синеговская В.Т. 4, 374
Синицына А.А. 3, 276
Синицына О.И. 2, 164; 3, 251
Скиба Ю.А. 2, 157
Сколотнева Е.С. 7, 701, 740
Слепченко Н.А. 4, 420
Слободчикова А.Ю. 6, 661
Слугина М.А. 5, 492
Смирнов А.В. 3, 331
Смирнова О.Г. 8, 805
Смольникова М.В. 8, 847
Смууров А.В. 8, 822
Снегин Э.А. 8, 822
Соловьева А.Е. 5, 514
Соматич П. 6, 607
Сосновская М.И. 1, 82
Стасюк А.И. 6, 631; 7, 701
Степанов И.В. 8, 797

Стёпочкин П.И. 6, 631
Столбиков А.С. 7, 787
Супрун И.И. 8, 797
Сухарева Е.В. 2, 216

Таможников С.С. 5, 593
Тахирова З.Р. 8, 839
Тезекбаева Б.К. 2, 157
Терещенко С.Ю. 8, 847
Тикунов А.Ю. 8, 864
Тикунова Н.В. 2, 234; 8, 864
Титова Ю.А. 6, 638
Тихомирова Т.Н. 8, 839
Тихонова М.А. 2, 178
Тишаква К.В. 6, 661
Токмаков С.В. 8, 797
Токмачева Е.В. 5, 472
Торгашева А.А. 6, 661
Торгунаков Н.Ю. 6, 661
Тоцкий И.В. 6, 677
Трифонов В.А. 6, 652
Трубачеева Н.В. 2, 171
Трунова М.В. 4, 388
Тулупов А.А. 1, 117
Тумаева Т.А. 4, 414

Уколова И.В. 7, 778
Урбанович Е.А. 1, 64
Устьянцев К.В. 1, 101, 108

Федорова Е.В. 3, 292
Федулова Т.П. 4, 394
Фишман В.С. 6, 607
Флис П. 5, 543
Фоменко Н.В. 2, 234
Фотев Ю.В. 4, 442
Фрейдин М.Б. 8, 855
Фролова Т.С. 2, 164

Хабарова А.А. 6, 607
Халилова Э.А. 2, 224
Хамируев Т.Н. 5, 486
Хлебодарова Т.М. 1, 92
Хлесткина Е.К. 2, 178; 6, 677
Хоанг Т.Ж. 2, 147
Храброва Л.А. 5, 486
Храпалова И.А. 5, 514
Худокормова Ж.Н. 6, 638
Хуснутдинова Э.К. 8, 839

Цепилов Я.А. 6, 661
Цуканов А.В. 1, 7

Чадаева И.В. 2, 208
Черенко В.А. 2, 164
Черных Н.А. 2, 224
Чернявских В.И. 4, 401
Чикаев А.Н. 5, 562
Чистякова И.В. 6, 613
Чудинов В.А. 5, 543
Чурсин А.С. 5, 543

Шайдаюк Е.Л. 6, 638
Шаманин В.П. 5, 543; 7, 740
Шатохин К.С. 3, 284; 6, 652
Шацкая Н.В. 3, 269
Швалов А.Н. 8, 864
Шелаева Т.В. 5, 543
Шепелев С.С. 5, 543
Шеховцов С.В. 1, 125; 6, 647
Шитик Е.М. 1, 117
Шихевич С.Г. 2, 208
Шишкина О.Д. 5, 465
Шишова М.Ф. 7, 754
Шмаков Н.А. 1, 30; 3, 251
Шмидт Ю.Д. 6, 652
Шнайдер Т.А. 3, 331; 8, 889
Шоева О.Ю. 2, 178
Шорина А.Р. 1, 117

Щелкунов С.Н. 2, 139
Щенникова А.В. 5, 492
Щербакова Л.В. 3, 301
Щербань А.Б. 7, 761

Юдин Н.С. 2, 190; 8, 831
Юдина Р.С. 2, 178
Юдкин Д.В. 1, 117
Юнусова А.М. 3, 331
Юрков А.П. 7, 754
Юрченко А.А. 2, 190
Юрьева И.Б. 2, 202

Яковлева Д.Р. 6, 638
Якубицкий С.Н. 2, 139
Яхин О.И. 7, 754

Прием статей через электронную редакцию на сайте <http://vavilov.elpub.ru/index.php/jour>
Предварительно нужно зарегистрироваться как автору, затем в правом верхнем углу страницы выбрать «Отправить рукопись». После завершения загрузки материалов обязательно выбрать опцию «Отправить письмо», в этом случае редакция автоматически будет уведомлена о получении новой рукописи.

«Вавиловский журнал генетики и селекции»/“Vavilov Journal of Genetics and Breeding”
до 2011 г. выходил под названием «Информационный вестник ВОГиС»/
“The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists”.

Регистрационное свидетельство ПИ № ФС77-45870 выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций 20 июля 2011 г.

«Вавиловский журнал генетики и селекции» включен ВАК Минобрнауки России в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, Российский индекс научного цитирования, ВИНТИ, базы данных Emerging Sources Citation Index (Web of Science), Zoological Record (Web of Science), Scopus, PubMed Central, Ebsco, DOAJ, Ulrich’s Periodicals Directory, Google Scholar, Russian Science Citation Index на платформе Web of Science, каталог научных ресурсов открытого доступа ROAD.

Открытый доступ к полным текстам:
на сайте ИЦиГ СО РАН – bionet.nsc.ru/vogis/
платформе Elpub – vavilov.elpub.ru/index.php/jour
платформе Научной электронной библиотеки – elibrary.ru/title_about.asp?id=32440
PubMed Central, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/3805/>

Подписку на «Вавиловский журнал генетики и селекции» можно оформить в любом почтовом отделении России. Индекс издания 42153 по каталогу «Пресса России».

При перепечатке материалов ссылка на журнал обязательна.

✉ e-mail: vavilov_journal@bionet.nsc.ru

Издатель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук»,
проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.

Адрес редакции: проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.

Секретарь по организационным вопросам С.В. Зубова. Тел.: (383)3634977.

Издание подготовлено информационно-издательским отделом ИЦиГ СО РАН. Тел.: (383)3634963*5218.

Начальник отдела: Т.Ф. Чалкова. Редакторы: В.Д. Ахметова, И.Ю. Ануфриева. Дизайн: А.В. Харкевич.

Компьютерная графика и верстка: Т.Б. Коняхина, О.Н. Савватеева.

.....
Подписано в печать 21.12.2021. Выход в свет 24.12.2021. Формат 60 × 84 1/8. Усл. печ. л. 12.55.

Уч.-изд. л. 13.5. Тираж 150 экз. (1-й завод 1–50 экз.) Заказ № 92. Цена свободная.

.....
Отпечатано в Сибирском отделении РАН, Морской проспект, 2, Новосибирск, 630090.

