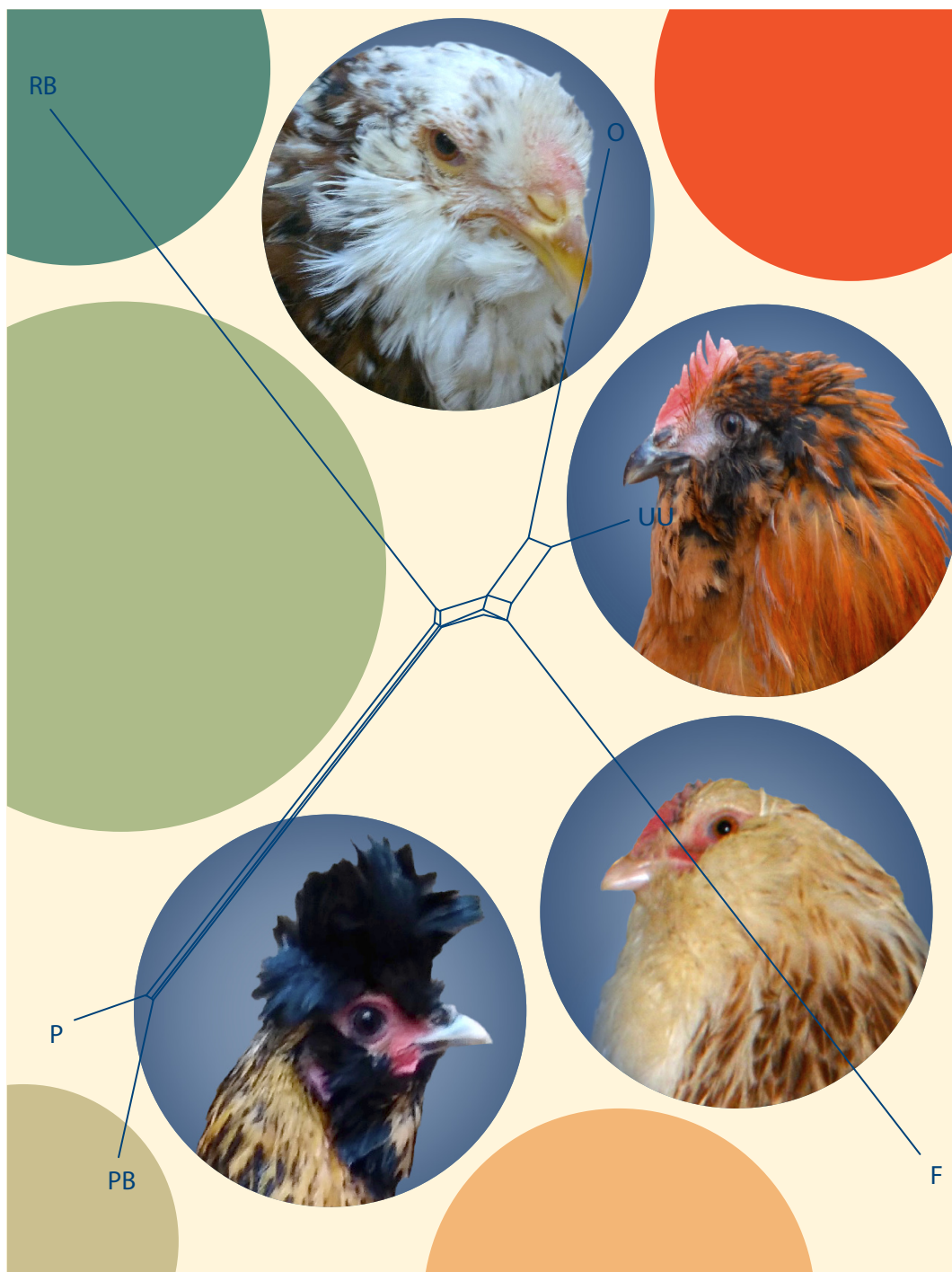


ВАВИЛОВСКИЙ

ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

2024 • 28 • 1



Материалы конференции «Устойчивость растений и микроорганизмов к неблагоприятным факторам среды», Иркутск / Генетика растений / Генетика человека / Генетика животных

vavilov.ejpub.ru
vavilov.fcg.ru
vavilov_journal@biomet.nsc.ru



Сетевое издание

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.

Периодичность 8 выпусков в год

DOI 10.18699/vjgb-24-01

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 – академик 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 – академик 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)

Online edition

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

VAVILOVSKII ZHURNAL GENETIKI I SELEKTSII

*Founded in 1997**Published 8 times annually*

DOI 10.18699/vjgb-24-01

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*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, 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. Bepalova*, 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*, Full 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

Материалы конференции
«Устойчивость растений и микроорганизмов
к неблагоприятным факторам среды», Иркутск

- 5 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Репродуктивные взаимоотношения между представителями таксонов, морфологически близких к *Elymus caninus* (Poaceae: Triticeae). *Е.В. Шабанова, А.В. Агафонов, О.В. Дорогина*
- 15 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Регуляторные эффекты (р)ppGpp и индола на синтез цАМФ в клетках *Escherichia coli*. *Н.М. Кашеварова, Е.А. Хаова, А.Г. Ткаченко*
- 24 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Регуляторные эффекты полиаминов и индола на экспрессию факторов гипернатрии рибосом у *Escherichia coli* на уровне трансляции. *Е.А. Хаова, А.Г. Ткаченко*
- 33 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Экспрессия генов транспортеров ауксина в волокнах льна (*Linum usitatissimum*) при гравитответе. *Н.Н. Ибрагимова, Н.Е. Мокшина*
- 44 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Аскорбат-глутатионовый цикл в проростках пшеницы и риса при аноксии и последующей реаэрации. *В.В. Емельянов, Е.Г. Приказюк, В.В. Ласточкин, О.М. Арешева, Т.В. Чиркова*
- 55 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Морфологический и молекулярный анализ сортов роз из садовых групп грандифлора и розы Кордеса. *С.С. Юданова, О.В. Дорогина, О.Ю. Васильева*

Генетика растений

- 63 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Проявление селекционно-ценных признаков в потомстве мутанта сорго, несущего генетическую конструкцию для РНК-сайленсинга гена γ -кафирина. *Л.А. Эльконин, Н.В. Борисенко, Т.Е. Пылаев, О.А. Кенжегулов, С.Х. Сарсенова, Н.Ю. Селиванов, В.М. Панин*
- 74 **МЕТОДЫ И ПРОТОКОЛЫ**
Halo-RPD: в поисках мишеней РНК-связывающих белков растений. *А.О. Шамустакимова*

Генетика человека

- 80 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Ассоциации SAG-полиморфизма гена андрогенового рецептора с уровнем стероидных гормонов и антропометрическими показателями у мужчин: роль этнического фактора. *Л.В. Осадчук, Г.В. Васильев, А.В. Осадчук*
- 90 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Генетическая история коряков и эвенов Магаданской области по данным о полиморфизме Y-хромосомы. *Б.А. Малярчук, М.В. Деренко*

Генетика животных

- 98 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Универсальная панель STR-локусов для исследования полиморфизма вида *Canis lupus* и криминалистической идентификации собаки и волка. *А.Е. Гребенчук, И.С. Цыбовский*
- 108 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Сравнительные особенности геномного разнообразия кур *Gallus gallus domesticus* с декоративным фенотипом оперения «баки и борода». *Н.В. Деметьева, Ю.С. Щербаков, А.Е. Рябова, А.Б. Вахрамеев, А.В. Макарова, О.А. Николаева, А.П. Дысин, А.И. Азовцева, Н.Р. Рейнбах, О.В. Митрофанова*
- 117 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Ассоциация трех однонуклеотидных полиморфизмов в гене *LPIN1* с показателями молочной продуктивности у коров ярославской породы. *А.В. Игошин, Т.М. Мишакова, Р.Б. Айтназаров, А.В. Ильина, Д.М. Ларкин, Н.С. Юдин*

Proceedings of the conference
“Resistance of plants and microorganisms
to adverse environmental factors”, Irkutsk

- 5 ORIGINAL ARTICLE
Reproductive relationships between taxa morphologically close to *Elymus caninus* (Poaceae: Triticeae). E.V. Shabanova, A.V. Agafonov, O.V. Dorogina
- 15 ORIGINAL ARTICLE
The regulatory effects of (p)ppGpp and indole on cAMP synthesis in *Escherichia coli* cells. N.M. Kashevarova, E.A. Khaova, A.G. Tkachenko
- 24 ORIGINAL ARTICLE
Effects of polyamines and indole on the expression of ribosome hibernation factors in *Escherichia coli* at the translational level. E.A. Khaova, A.G. Tkachenko
- 33 ORIGINAL ARTICLE
Expression of auxin transporter genes in flax (*Linum usitatissimum*) fibers during gravity response. N.N. Ibragimova, N.E. Mokshina
- 44 ORIGINAL ARTICLE
Ascorbate-glutathione cycle in wheat and rice seedlings under anoxia and subsequent reoxygenation. V.V. Yemelyanov, E.G. Prikaziuk, V.V. Lastochkin, O.M. Aresheva, T.V. Chirkova
- 55 ORIGINAL ARTICLE
Morphological and molecular analysis of rose cultivars from the Grandiflora and Kordesii garden groups. S.S. Yudanov, O.V. Dorogina, O.Yu. Vasilyeva

Plant genetics

- 63 ORIGINAL ARTICLE
Manifestation of agronomically valuable traits in the progeny of a sorghum mutant carrying the genetic construct for RNA silencing of the γ -kafirin gene. L.A. Elkonin, N.V. Borisenko, T.E. Pylaev, O.A. Kenzhegulov, S.Kh. Sarsenova, N.Yu. Selivanov, V.M. Panin
- 74 METHODS AND PROTOCOLS
Halo-RPD: searching for RNA-binding protein targets in plants. A.O. Shamustakimova

Human genetics

- 80 ORIGINAL ARTICLE
Associations of CAG repeat polymorphism in the androgen receptor gene with steroid hormone levels and anthropometrics among men: the role of the ethnic factor. L.V. Osadchuk, G.V. Vasiliev, A.V. Osadchuk
- 90 ORIGINAL ARTICLE
Genetic history of the Koryaks and Evens of the Magadan region based on Y chromosome polymorphism data. B.A. Malyarchuk, M.V. Derenko


Animal genetics

- 98 ORIGINAL ARTICLE
A universal panel of STR loci for the study of polymorphism of the species *Canis lupus* and forensic identification of dog and wolf. A.E. Hrebianchuk, I.S. Tsybovsky
- 108 ORIGINAL ARTICLE
Comparative peculiarities of genomic diversity in *Gallus gallus domesticus* chickens with decorative plumage: the muffs and beard phenotype. N.V. Dementieva, Y.S. Shcherbakov, A.E. Ryabova, A.B. Vakhrameev, A.V. Makarova, O.A. Nikolaeva, A.P. Dysin, A.I. Azovtseva, N.R. Reinbah, O.V. Mitrofanova
- 117 ORIGINAL ARTICLE
Association of three single nucleotide polymorphisms in the *LPIN1* gene with milk production traits in cows of the Yaroslavl breed. A.V. Igoshin, T.M. Mishakova, R.B. Aitnazarov, A.V. Ilina, D.M. Larkin, N.S. Yudin

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

Репродуктивные взаимоотношения между представителями таксонов, морфологически близких к *Elymus caninus* (Poaceae: Triticeae)

Е.В. Шабанова , А.В. Агафонов, О.В. Дорогина

Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
 ekobozeva87@mail.ru

Аннотация. Проведено гибридологическое изучение биотипов видов, близких к *Elymus caninus*: *E. prokudinii*, *E. viridiglumis*, *E. goloskokovii*, а также ряда морфологически отклоняющихся биотипов с территории России и Казахстана. Была поставлена задача изучить уровни репродуктивных взаимоотношений и степени интегрированности видов *E. goloskokovii*, *E. prokudinii* и *E. viridiglumis* в комплекс *E. caninus*. Значения семенной фертильности природных родительских биотипов оценены нами в пределах 60–90 %. Среди комбинаций скрещивания в F_1 наивысшая завязываемость семян выявлена у гибридов, образованных родительскими парами из близких местообитаний, независимо от таксономической принадлежности биотипов. Наивысшие величины фертильности (55.6 и 46.1 %) обнаружены в комбинациях с участием видов *E. caninus*, *E. viridiglumis* и *E. goloskokovii*. Сделан вывод, что биотипы названных видов, включенные в половую гибридизацию, образуют единый рекомбинационный генпул, внутри которого наблюдаются незначительные различия по репродуктивной совместимости. Показан характер наследования диагностических признаков нижних цветковых чешуй «наличие трихом» и «длина остей» по дигенному и моногенному типу соответственно. Высокая семенная фертильность созданных гибридов и наличие в поколении F_2 промежуточных форм по различным признакам свидетельствуют о возможности межвидовой интрогрессии при совместном произрастании видов в природных популяциях. Таким образом, оценка наследования диагностических признаков позволяет классифицировать *E. goloskokovii*, *E. prokudinii* и *E. viridiglumis* как внутривидовые таксоны *E. caninus* s. l. Получены данные о морфологических и репродуктивных свойствах межвидовых гибридов с участием вида *E. mutabilis* как возможного донора при видообразовании таксонов, близких к *E. caninus*. В комбинациях скрещивания *E. caninus* × *E. mutabilis* и *E. mutabilis* × *E. caninus* отмечены более низкие значения семенной фертильности гибридов в поколениях F_1 и F_2 по сравнению с гибридами между видами *E. caninus*, *E. goloskokovii*, *E. prokudinii* и *E. viridiglumis*. Тем не менее на основе хорологического и морфологического критериев нами сделан вывод о видовой самостоятельности *E. caninus* и *E. mutabilis*.

Ключевые слова: видообразование; гибридизация; признак; наследование; таксономия; *Elymus*; Poaceae.

Для цитирования: Шабанова Е.В., Агафонов А.В., Дорогина О.В. Репродуктивные взаимоотношения между представителями таксонов, морфологически близких к *Elymus caninus* (Poaceae: Triticeae). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(1):5-14. DOI 10.18699/vjgb-24-02

Reproductive relationships between taxa morphologically close to *Elymus caninus* (Poaceae: Triticeae)

E.V. Shabanova , A.V. Agafonov, O.V. Dorogina

Central Siberian Botanical Garden of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
 ekobozeva87@mail.ru

Abstract. A hybridological study of biotypes of species close to *Elymus caninus*: *E. prokudinii*, *E. viridiglumis*, *E. goloskokovii*, as well as a number of morphologically deviant biotypes in Russia and Kazakhstan, was carried out. The objectives were to study the levels of reproductive relationships and the degree of integration of the species *E. goloskokovii*, *E. prokudinii*, and *E. viridiglumis* into the *E. caninus* complex. Our estimates of the seed fertility of natural parental biotypes were within 60–90 %. Among the combinations of crossing in F_1 , the highest seed setting was found in the hybrids formed by parental pairs from close habitats, regardless of the taxonomic rank of biotypes. The highest fertility values (55.6 and 46.1 %) were found in combinations involving *E. caninus*, *E. viridiglumis* and *E. goloskokovii*. It has been concluded that the biotypes of these species included in sexual hybridization form a single recombination gene pool, within which slight differences in reproductive compatibility are observed. The nature of the inheritance of the diagnostic features of lemmas “presence of trichomes” and “length of awns”, according to the digenic and monogenic type, respectively, is shown. The high seed fertility of the created hybrids and the presence of intermediate forms in the F_2 generation according to distinctive features indicate the possibility of interspecific introgression when species grow together in natural populations. Thus, the assessment of the inheritance of diagnostic characters makes it possible to classify *E. goloskokovii*, *E. prokudinii*, and *E. viridiglumis* as intraspecific taxa of

E. caninus s. l. Data were obtained on the morphological and reproductive properties of interspecific hybrids with the participation of the species *E. mutabilis* as a possible donor in the speciation of taxa close to *E. caninus*. In cross combinations of *E. caninus* × *E. mutabilis* and *E. mutabilis* × *E. caninus*, lower values of seed fertility of hybrids in the F₁ and F₂ generations were noted compared to hybrids between the species *E. caninus*, *E. goloskokovii*, *E. prokudinii* and *E. viridiglumis*. Nevertheless, on the basis of chorological and morphological criteria, we concluded that *E. caninus* and *E. mutabilis* are independent species.

Key words: speciation; hybridization; inheritance; taxonomy; *Elymus*; Poaceae.

For citation: Shabanova E.V., Agafonov A.V., Dorogina O.V. Reproductive relationships between taxa morphologically close to *Elymus caninus* (Poaceae: Triticeae). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(1):5-14. DOI 10.18699/vjgb-24-02

Введение

Дикорастущие злаки трибы Triticeae Dumort. (сем. Poaceae Varn.) представляют большой интерес для исследователей как возможные доноры ценных признаков для основных хлебных культур – пшеницы, ячменя и ржи. Потенциальные возможности использования диких сородичей пшеницы для обогащения селекционного материала новыми наследственными качествами впервые были очерчены Н.И. Вавиловым (1931), а впоследствии описаны в концепции первичных, вторичных и третичных генпулов (Harlan, De Wet, 1971). Аналогичная система генпулов, предложенная для ячменя и ржи (von Bothmer et al., 1992), включает в себя некоторые виды многолетних трав.

Род *Elymus* L. – самый крупный род трибы, относящийся к третичному генпулу, объединяет аллополиплоидные виды многолетних трав с различной геномной конституцией. Факультативное самоопыление, способствующее выщеплению спонтанных мутаций и закреплению последствий интрогрессивной гибридизации, ускоряет процессы формообразования и одновременно осложняет систематизацию природных популяций. В продолжающейся микроэволюционной дифференциации рода наиболее актуальными для изучения являются филогенетические взаимоотношения между таксонами.

Elymus caninus (L.) L. – вид с геномом StStHH (Dewey, 1968) и обширным ареалом, охватывающим всю Европу от Исландии и Средиземного моря до Уральских гор, почти всю палеарктическую часть Сибири, а также некоторые районы Средней Азии (Цвелёв, 1976; Hultén, Fries, 1986). В Северной Европе *E. caninus* распространен повсеместно в Швеции и Дании, несколько реже в Норвегии и Финляндии. В Сибири встречается практически во всех районах западнее оз. Байкал (Пешкова, 1990). Принимая во внимание широкое распространение *E. caninus* и его высокую адаптивность к факторам среды, можно изначально предположить заметное варьирование морфологических признаков внутри вида. Тем не менее *E. caninus* характеризуется невысокой морфологической изменчивостью по сравнению с другими видами рода *Elymus*. Главная причина, по нашему мнению, заключается в том, что некоторые природные морфотипы с отклоняющимися признаками были описаны как самостоятельные виды. При этом, с одной стороны, в большинстве случаев не приводилось каких-либо доказательств филогенетической обособленности новых видов, а с другой – эти виды не рассматривались в качестве составной части *E. caninus*, поскольку выходили за пределы его узкой изменчивости. На территории России и Казахстана к таким видам следует отнести *E. viridiglumis* (Nevski) Czer., *E. prokudinii*

(Seregin) Tzvelev (Цвелёв, Пробатова, 2019) и *E. goloskokovii* Kotuch. (Котухов, 2004).

Вид *E. goloskokovii* был описан из Западного Алтая (хр. Ивановский) с указанием его широкого распространения в пределах юго-западной части этих гор (Котухов, 2004). В протологе отмечено, что *E. goloskokovii* является устойчивым фертильным гибридогенным видом, вероятно, произошедшим от гибридизации *E. fibrosus* (Schrenk) Tzvelev и *E. trachycaulis* (Link) Gould et Shinners при возможном участии *E. mutabilis* (Drob.) Tzvelev. От широко распространенного *E. caninus* вид *E. goloskokovii* отличается главным образом короткими (до 4 мм) остями нижних цветковых чешуй (НЦЧ).

Elymus viridiglumis описан в 1934 г. по сборам С.А. Невского с Южного Урала как *Roegneria viridiglumis* Nevski. Определенная путаница в хронологии описания вида вызвана тем, что латинский протолог вида опубликован в Трудах Ботанического института АН СССР «Флора и систематика высших растений», датированных 1936 г. (Невский, 1936), а базисным и русскоязычным описанием вида приведены в 1934 г. (Невский, 1934). Вид распространен на территории Урала и Западной Сибири, морфологически отличается от *E. caninus* волосистыми или длинно-шиповатыми НЦЧ. Небольшие популяции были найдены и в Восточном Казахстане.

Elymus prokudinii – эндемик субальпийских лугов лесного пояса Центрального и Восточного Кавказа, описан в 1965 г. как *Roegneria prokudinii* Seregin (Середин, 1965) по сборам Р.А. Еленевского. Вид морфологически схож с *E. viridiglumis* и отличается от него только узким эндемичным ареалом по географическому критерию.

К настоящему времени накоплено много сведений о том, что единый рекомбинационный генпул *E. caninus* как вида образован не только типичными особями, но и большим числом морфологически отклоняющихся биотипов (МОБ), не соответствующих диагнозу вида (Герус, Агафонов, 2006; Агафонов, 2011). В частности, нами получены свидетельства того, что интрогрессивные взаимоотношения между *E. caninus* и *E. mutabilis* приводят к разнообразию переходных межвидовых форм (Агафонов, 2013). Тем не менее до сих пор остался ряд вопросов и возникли новые проблемы с позиций репродуктивной биологии и таксономии этого обширного комплекса.

Одним из важнейших критериев родственности живых организмов является способность давать жизнеспособное потомство при скрещивании, что обусловлено сбалансированной рекомбинацией генетического материала при смене поколений. Изучение внутри- и межвидовой скрещиваемости биотипов дает возможность моделировать

процессы гибридизации и интрогрессии, происходящие внутри рода *Elymus*. Результаты, полученные от скрещивания биотипов из близких или отдаленных популяций, позволяют прояснить вопросы внутривидовой организации, очертить генетический пул и спрогнозировать возможный ход дальнейших путей видообразования. Уровни скрещиваемости биотипов (*Cs*, *sexual compatibility* – репродуктивная совместимость) и фертильность образовавшихся гибридов находятся под жестким генотипическим контролем и, соответственно, отражают филогенетические связи исходных таксонов (Agafonov et al., 2001).

С целью получения дополнительных данных проведена работа по созданию и изучению гибридов F_1 – F_2 между выборочными биотипами разных таксонов видового ранга, морфологически близких к *E. caninus* s. l. Были поставлены задачи изучить уровни репродуктивной совместимости биотипов и степени интегрированности описанных ранее видов *E. goloskokovii*, *E. prokudinii* и *E. viridiglumis* в комплекс *E. caninus*, а также дополнить данные о морфологических и репродуктивных свойствах межвидовых гибридов *E. caninus* × *E. mutabilis*.

Материалы и методы

По данным Г.А. Пешковой (1990), к основным диагностическим признакам *Elymus caninus* относятся следующие:

- 1) листовые пластинки (ЛП) сверху с рассеянными длинными волосками;
- 2) НЦЧ по спинке голые, крайне редко с одиночными шипиками в верхней части;
- 3) НЦЧ с прямой остью, равной чешуе или длиннее;
- 4) членики колосковой оси (ЧКО) волосистые.

Кроме типичного морфотипа *E. caninus* GAT-9210 и МОБ, в гибридизации использовали образцы вышеназванных видов в восьми комбинациях скрещивания.

Признаки, по которым различаются типичные особи *E. caninus* и *E. mutabilis*: длинные (до 25 мм) – короткие (до 6 мм) ости НЦЧ; гладкие – шиповатые НЦЧ; соотношение длин колосковых чешуй (КЧ) и прилежащих НЦЧ ($k = L_{\text{КЧ}}/L_{\text{НЦЧ}}$) составляет ориентировочно 0.5–0.6 и 0.7–0.8. К последнему признаку необходимо присоединить наличие мембран по краям КЧ, которые утончаются при увеличении значения k (тип *mutabilis*), и наоборот, как правило, становятся шире при уменьшении значения k (тип *caninus*). Этот признак не всегда однозначно идентифицируется у большинства фенотипов из-за наличия в природных популяциях спектра промежуточных фенотипов. Местонахождения образцов *E. mutabilis* и видов, близких к *E. caninus*, приведены в табл. 1.

Под термином «образец» мы понимаем семена, собранные с индивидуального растения в природных условиях (один образец = семена одного растения); термином

Таблица 1. Локализация образцов, близких к *E. caninus*, и их морфологические особенности, отклоняющиеся от типичных (тип.) морфотипов *E. caninus*

Таксон Код образца	Место и автор сбора	Морфологические особенности
<i>E. caninus</i> тип. GAT-9210	Респ. Алтай, сев. побереж. оз. Телецкое, окр. пос. Артыбаш, alt. 460 м N 51°47.674', E 87°16.446' (В. Макашов)	НЦЧ гладкие, ЛП сверху редковолосистые, ЧКО волосистые
<i>E. caninus</i> МОБ AKL-0703	Алтайский край, Благовещенский р-н, 14 км ССЗ пос. Благовещенка, караганник, alt. 98 м N 52°55.19', E 79°46.22' (Н. Лацинский)	НЦЧ длинноволосистые, ЛП голые
<i>E. caninus</i> МОБ SON-9904	Респ. Хакасия, Зап. Саян, Таштыпский р-н, 252 км автотрассы Абаза–Ак-Довурак, пойма р. Она, alt. 713 м N 52°10.772', E 89°51.907' (А. Агафонов)	НЦЧ коротковолосистые, ости НЦЧ до 12 мм
<i>E. caninus</i> МОБ OSE-1427	Респ. Сев. Осетия–Алания, Ирафский р-н, окр. пос. Стур-Дигора, зап. склон хребта Б. Кавказа, дол. прав. притока р. Урух, alt. 1996 м N 42°52.898', E 43°35.959' (С. Асбаганов)	ЧКО мелкошиповатые
<i>E. caninus</i> МОБ BAI-0401	Респ. Бурятия, Прибайкальский р-н, окр. пгт Горячинск, бер. оз. Байкал, граница смешанного леса, alt. 457 м N 52°58.588', E 108°16.335' (Д. Герус, А. Агафонов)	Верхние поверхности ЛП голые
<i>E. viridiglumis</i> EK-1418	Респ. Казахстан, Восточно-Казахстанская обл., хр. Ивановский, южн. макросклон, окр. пос. Березовка, alt. 1202 м N 50°07.623', E 83°49.210' (Д. Герус)	НЦЧ коротко-шиповатые
<i>E. viridiglumis</i> BEL-1404	Алтайский край, Смоленский р-н, окр. пос. Белокуриха, лесная тропа вдоль склона горы, alt. 287 м N 51°58.847', E 84°57.697' (А. Агафонов, М. Агафонова)	Коротковолосистые НЦЧ
<i>E. goloskokovii</i> TUV-9936	Респ. Тува, Тоджинский р-н, дол. р. Бий-Хем, Тос-Булуksкие мели (Д. Шауло)	Ости НЦЧ до 3 мм
<i>E. goloskokovii</i> EK-1513	Респ. Казахстан, Восточно-Казахстанская обл., хр. Ивановский, сев. макросклон, окр. пос. Поперечное, alt. 1202 м N 50°21.128', E 83°53.527' (Д. Герус)	Ости НЦЧ до 4 мм
<i>E. prokudinii</i> TEB-1806	Респ. Карачаево-Черкесия, Карачаевский р-н, Тебердинский гос. биосферный заповедник, вост. склон г. Малая Хатипара, высокотравный луг, alt. 2020 м N 43°26.508', E 41°42.693' (С. Асбаганов, А. Агафонов)	НЦЧ коротковолосистые
<i>E. mutabilis</i> тип. BAI-0402	Респ. Бурятия, Прибайкальский р-н, окр. пгт Горячинск, бер. оз. Байкал, граница смешанного леса, alt. 457 м N 52°58.588', E 108°16.335' (Д. Герус, А. Агафонов)	Ости НЦЧ до 4 мм, НЦЧ шиповатые
<i>E. mutabilis</i> тип. ACH-8932	Респ. Алтай, Онгудайский р-н, перевал Чеке-Таман, обочина старой грунтовой дороги, alt. 1216 м N 50°38.367', E 86°18.166' (А. Агафонов)	Ости НЦЧ до 2 мм, НЦЧ шиповатые

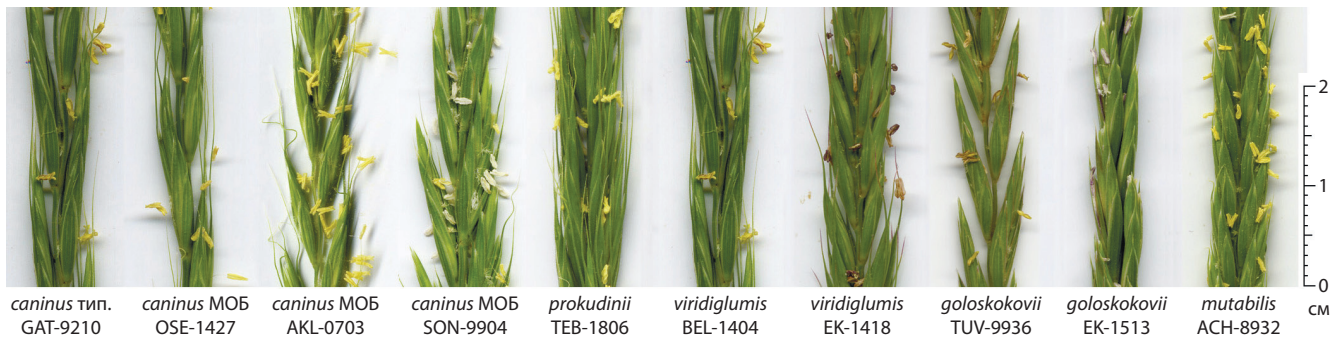


Рис. 1. Фрагменты цветущих колосьев образцов таксонов, близких к *E. caninus*, взятых в гибридизацию.

«биотип» мы называем конкретные растения, выращенные из семян образцов.

Фрагменты цветущих колосьев некоторых биотипов видов, близких к *E. caninus*, показаны на рис. 1. Характерный для всех таксонов хазмогамный тип цветения не препятствует преимущественному самоопылению растений, поскольку поддерживается одновременным созреванием мужских и женских гаметофитов, а также отсутствием генетических систем самонесовместимости (на рис. 1 видны лопнувшие пыльники).

Кроме диагностического признака «длина остей НЦЧ», у включенных в гибридизацию биотипов выявлена вариабельность по ряду вторичных признаков, присущих конкретным таксонам и географическим расам: относительная длина КЧ, опушение ЛП, цвет пыльников, плотность колоса, габитус и высота растений.

Поскольку для изучения репродуктивной совместимости мы использовали семена дикорастущих растений, собранные из разных точек ареалов видов, где их морфометрические признаки во многом зависят от средовых факторов, необходимо было исключить модификацию таксономических признаков. Для этого растения выращивали в выравненных условиях экспериментального участка ЦСБС СО РАН и только после определяли их таксономическую принадлежность. При выборе родительских особей подбирали формы с различающимися признаками: растения с голыми НЦЧ скрещивали с растениями, имеющими на НЦЧ трихомы; растения с короткими остями НЦЧ скрещивали с растениями с длинными остями НЦЧ и т. п. В скрещиваниях участвовало по одному растению каждого образца.

Процедуры по созданию половых гибридов проведены по экспресс-методике (Lu et al., 1990), предполагающей предварительную подготовку колоса и опыление каждого пестика вручную. Одним из преимуществ этой методики являются стимуляция естественного раскрытия цветков и одновременное удаление еще не лопнувших пыльников. Опыление каждого из нескольких раскрывшихся эмаскулированных цветков проводится только что лопнувшим пыльником отцовского растения, что минимизирует риск попадания собственной или чужеродной пыльцы. Применение данной методики при достаточной обработке дает более надежные результаты, поскольку не требует предварительной эмаскуляции нежных незрелых цветков и ведет к повышению эффективности гибридизации.

При используемой технике гибридизации были опылены от 2 до 4 цветков в колосе, остальные цветки заранее были удалены. В результате завязывалось от 1 до 3 гибридных зерен, которые проращивали в чашке Петри. Далее проростки высаживали в горшки и выращивали в климокамере до прегенеративной фазы, после чего растения высаживали на экспериментальный участок в открытый грунт.

Идентификацию гибридов проводили по наличию признаков отцовского растения. Оценка семенной фертильности (СФ) растений в поколениях F_1 – F_2 и уровней половой совместимости биотипов (Cs) была выполнена согласно разработанным нами принципам (Agafonov, 1994; Agafonov, Salomon, 2002). Семенную фертильность растений определяли как процентное соотношение выпленных зерновок к общему числу цветков в колосе. При этом регистрировали показатели не менее чем с трех хорошо развитых колосьев, из которых учитывалось наивысшее (максимальное) значение СФ.

Модели репродуктивных отношений в F_1 по уровням скрещиваемости в системе генпулов оценивали по шкале совместимости для рекомбинационного генпула (РГП), или α -уровня совместимости биотипов:

- α -уровень в целом – рекомбинационный генпул. Четкая граница между уровнями α_1 (свободная рекомбинация) и α_2 (ограниченная рекомбинация) в большинстве случаев отсутствует. Главным критерием принадлежности родительских биотипов к одному общему или к разным РГП выступает показатель семенной фертильности гибридов в поколениях F_1 – F_2 ;
- α_1 -уровень – генпул со свободной рекомбинацией. Мейоз нормальный. Расщепление признаков в F_2 протекает согласно общим законам цитогенетики;
- α_2 -уровень – генпул с ограниченной рекомбинацией. Мейоз протекает с теми или иными нарушениями. Расщепление качественных признаков в F_2 может иметь отклонения от законов Менделя. Самоопыление обесценивает уровень фертильности (половой репродукции) во всех последующих поколениях.

Уровни половой совместимости отражают микроэволюционную дифференциацию геномов, которая и определяет снижение СФ половых гибридов (Agafonov, Salomon, 2002). Границы между уровнями половой совместимости несколько условны, так как результаты исследований зависят от случайного выбора и числа проанализированных

гибридов, а также от условий произрастания в определенный летний сезон или в условиях климокамеры.

Соответствие типа наследования морфологических признаков (наличие трихом на НЦЧ и длины остей НЦЧ) растений F_2 законам Менделя (моногенному и дигенному) проверяли с помощью критерия Пирсона (χ^2) (Pearson, 1900).

Расщепление признака длины остей НЦЧ у растений F_2 анализировали по максимальному значению длины остей среди колосьев каждой особи.

Результаты

Было проведено восемь межвидовых скрещиваний (табл. 2). Между близкими к *E. caninus* видами осуществлены скрещивания в шести комбинациях: *E. caninus* × *E. prokudinii* (две комбинации), *E. caninus* × *E. viridiglumis*, *E. goloskokovii* × *E. caninus*, *E. caninus* × *E. goloskokovii*, *E. goloskokovii* × *E. viridiglumis*. Между биотипами видов *E. caninus* и *E. mutabilis* – две комбинации скрещивания. В каждой из комбинаций получено от 1 до 3 гибридных зерен.

Изучался характер наследования морфологических признаков в небольших выборках поколения F_2 . Хотя объемы выборок были невелики, они позволили оценить степень дискретности признака по фенотипическим классам и характер их наследования (табл. 3 и 4).

В полученном расщеплении F_2 для выборок с наибольшим числом растений двух комбинаций скрещивания *E. goloskokovii* × *E. caninus* и *E. caninus* × *E. goloskokovii* был рассчитан критерий Пирсона (χ^2) и сделана оценка уровня критерия значимости (P) (см. табл. 4).

Данные о СФ и расщеплении морфологических признаков у гибридов между *E. caninus* и *E. mutabilis* в поколении F_2 приведены в табл. 5 и 6.

Обсуждение

Результаты исследования показали, что включенные в гибридизацию биотипы, близкие по морфологии к базовому виду *E. caninus* (см. табл. 2, № 1–6), образуют единый рекомбинационный генпул, внутри которого наблюдаются незначительные различия по репродуктивной совместимости. Обращает на себя внимание небольшое,

но отчетливое снижение величин СФ у гибридов F_1 по сравнению с материнскими растениями. Это означает, что все взятые в гибридизацию МОБ принадлежат обширному генфонду *E. caninus*, но прошли определенный микроэволюционный путь в направлении дивергенции.

Значения СФ природных биотипов были оценены нами в пределах 60–90 %. Максимальные значения СФ растений F_1 среди близких к *E. caninus* видов (см. табл. 2, № 1–5) находились в диапазоне 24.4–55.6 %, за исключением комбинации скрещивания *E. caninus* × *E. viridiglumis* (см. табл. 2, № 6), у которой СФ была очень низкой и по этой причине максимальное значение СФ не могло быть приведено. В этой комбинации из семи колосьев (общее число колосьев у двух растений F_1) фертильными оказались только 10 семян, из них лишь шесть смогли вырасти до генеративной стадии и дать потомство в F_2 . В комбинациях скрещивания между видами *E. caninus* и *E. mutabilis* (см. табл. 2, № 7, 8), где было получено по одному растению F_1 , максимальное значение СФ находилось в диапазоне 3.2–6.6 %.

Наивысшими значениями СФ в F_1 обладали гибридные растения, образованные родительскими парами из дистанционно близких местообитаний (см. табл. 2): комбинация 4 с пограничной территории Республики Хакасия и Республики Тыва (*E. caninus* SON-9904 × *E. goloskokovii* TUV-9936) – 55.6 % и комбинация 2 из Северо-Восточного Казахстана (*E. goloskokovii* ЕК-1513 × *E. viridiglumis* ЕК-1418) – 46.1 %. Относительно высокой СФ характеризовалась также комбинация 5 с Северного Кавказа (*E. caninus* OSE-1427 × *E. prokudinii* ТЕВ-1806) – 39.7 %. Этот факт подтверждает наше предположение об общем микроэволюционном пути разных таксонов в пределах конкретной территории (Агафонов, 2011). При этом две межвидовые комбинации (7 и 8), образованные *E. caninus* и *E. mutabilis*, показали значения СФ в поколении F_1 значительно ниже (6.6 и 3.2 %), чем другие комбинации (1–5).

Значения семенной фертильности в F_2 в целом представляют собой диапазон изменчивости в пределах, обусловленных степенью филогенетической близости родительских биотипов. Во всех комбинациях скрещивания наблюдалось повышение значений СФ в F_2 (см. табл. 2), что связано с нормализацией генетической рекомбинации

Таблица 2. Максимальные значения семенной фертильности гибридов F_1 и F_2 (%) и уровни половой совместимости (Cs) биотипов среди таксонов, близких к *E. caninus*, и в комбинациях скрещивания *E. caninus* × *E. mutabilis*

№ п/п	Комбинация скрещивания	N_{F_1}	F_1 (max)	N_{F_2}	F_2 (max)	Уровень Cs
1	<i>caninus</i> МОБ AKL-0703 × <i>prokudinii</i> ТЕВ-1806	2	24.4	18	88.8	α_1
2	<i>goloskokovii</i> ЕК-1513 × <i>viridiglumis</i> ЕК-1418	1	46.1	15	77.1	α_1
3	<i>goloskokovii</i> ЕК-1513 × <i>caninus</i> МОБ SON-9904	3	29.6	125	91.3	α_1
4	<i>caninus</i> МОБ SON-9904 × <i>goloskokovii</i> TUV-9936	2	55.6	82	63.6	α_1
5	<i>caninus</i> МОБ OSE-1427 × <i>prokudinii</i> ТЕВ-1806	1	39.7	16	79.4	α_1
6	<i>caninus</i> МОБ OSE-1427 × <i>viridiglumis</i> BEL-1404	2	10/7*	6	79.0	α_2
7	<i>caninus</i> GAT-9210 × <i>mutabilis</i> АСН-8932	1	6.6	13	54.6	α_2
8	<i>mutabilis</i> БАИ-0402 × <i>caninus</i> БАИ-0401	1	3.2	14	28.6	α_2

Примечание. N_{F_1} и N_{F_2} – число проанализированных растений в F_1 и F_2 соответственно.

* Соотношение числа выполненных семян к числу колосьев с двух растений F_1 .

Таблица 3. Результаты расщепления признаков в поколении F₂ в малых выборках

Комбинация скрещивания	Признак	Проявление признака	Число растений	Всего растений в F ₂
<i>caninus</i> AKL-0703 × <i>prokudinii</i> ТЕВ-1806	Опушение ЛП	Голые	6	18
		Волосистые	12	
<i>goloskokovii</i> ЕК-1513 × <i>viridiglumis</i> ЕК-1418	Трихомы на НЦЧ	Гладкие	4	15
		Шиповатые	11	
	Длина остей НЦЧ	1–3 мм	4	
		5–8 мм	8	
<i>caninus</i> OSE-1427 × <i>prokudinii</i> ТЕВ-1806	Трихомы на НЦЧ	Гладкие	5	16
		Коротковолосистые	11	
	Опушение ЛП	Голые	1	
		Волосистые	15	
	Трихомы на ЧКО	Коротко-шиповатые	4	
		Волосистые	12	
<i>caninus</i> OSE-1427 × <i>viridiglumis</i> ВЕЛ-1404	Трихомы на НЦЧ	Голые	4	6
		Шиповатые	2	
	Опушение ЛП	Голые	5	
		Коротковолосистые	1	
	Трихомы на ЧКО	Коротко-шиповатые	3	
		Волосистые	3	
<i>caninus</i> GAT-9210 × <i>mutabilis</i> АСН-8932	Трихомы на НЦЧ	Гладкие	2	13
		Коротко-шиповатые	3	
		Шиповатые	8	
	Опушение ЛП	Голые	2	
		Волосистые	11	
	Длина остей НЦЧ	1–4 мм	7	
		6–8 мм	1	
		10–12 мм	2	
		18 мм	1	
		19–22 мм	2	
Соотношение длин КЧ к НЦЧ	0.5–0.6	1		
	0.6–0.7	8		
	0.7–0.8	3		
	0.8–0.9	1		
<i>mutabilis</i> ВАИ-0402 × <i>caninus</i> ВАИ-0401	Трихомы на НЦЧ	Гладкие	3	14
		Коротко-шиповатые	7	
		Длинно-шиповатые	4	
	Опушение ЛП	Голые	6	
		Волосистые	8	
	Длина остей НЦЧ	1–3 мм	5	
		4–6 мм	3	
		7–8 мм	4	
		18–20 мм	2	
	Соотношение длин КЧ к НЦЧ	0.5–0.6	7	
0.7–0.8		3		
0.8–0.9		4		

согласно принципу РГП. Уровни половой совместимости биотипов почти во всех вариантах скрещивания (кроме двух с участием *E. mutabilis* и варианта б) соответствуют свободной генетической рекомбинации (α_1). Возможность скрещиваемости и восстановления семенной продуктивности в течение нескольких поколений указывает

на наличие у родительских форм гомологичной части генома. Такую гибридизацию можно рассматривать как естественное семенное размножение двух различающихся форм одного вида.

Исходя из представленных результатов гибридизации сделан вывод, что характер наследования признаков при

Таблица 4. Результаты расщепления признаков в поколении F₂ в двух наибольших выборках

Комбинация скрещивания	Признак	Проявление признака	Численность особей*		χ ² , P
			p	q	
<i>goloskokovii</i> EK-1513 × <i>caninus</i> SON-9904	Наличие трихом на НЦЧ 1:15	Без трихом	8	7.8125	χ ² = 0.0048 (0.95 > P > 0.90)
		Шиповатые, щетинистые и коротковолосистые	117	117.1875	
Всего 125 растений F ₂	Длина остей НЦЧ 1:2:1	1–4 мм	34	31.25	χ ² = 8.856 (0.01 > P > 0.025)
		6–9 мм	74	62.5	
		10–12 мм	17	31.25	
<i>caninus</i> SON-9904 × <i>goloskokovii</i> TUV-9936	Наличие трихом на НЦЧ 1:15	Без трихом	7	5.125	χ ² = 0.732 (0.90 > P > 0.10)
		Шиповатые, щетинистые и коротковолосистые	75	76.875	
Всего 82 растения F ₂	Длина остей НЦЧ 1:2:1	1–3 мм	17	20.5	χ ² = 3.15 (0.90 > P > 0.10)
		6–9 мм	49	41.0	
		10–12 мм	16	20.5	

* Численность особей: p – фактическая, q – ожидаемая.

Таблица 5. Основные морфологические признаки и семенная фертильность в выборке F₂ гибрида *E. caninus* GAT-9210 × *E. mutabilis* ACH-8932

№ п/п	ЛП сверху	$k = L_{кч}/L_{нцч}$	Опушение НЦЧ	Длина остей НЦЧ, мм	СФ, %
1	Волосистые	0.7–0.8	Шиповатые	4	3.4
2	Волосистые	0.6–0.7	Коротко-шиповатые	22	37.5
3	Волосистые	0.6–0.7	Коротко-шиповатые	4	5.5
4	Волосистые	0.6–0.7	Шиповатые	6	0
5	Волосистые	0.7–0.8	Шиповатые	4	39.7
6	Волосистые	0.8–0.9	Шиповатые	12	4.8
7	Голые	0.6–0.7	Гладкие	3	10.7
8	Волосистые	0.6–0.7	Шиповатые	22	54.6
9	Волосистые	0.5–0.6	Шиповатые	3	3.6
10	Волосистые	0.6–0.7	Шиповатые	12	12/5
11	Волосистые	0.7–0.8	Шиповатые	4	14.2
12	Волосистые	0.6–0.7	Коротко-шиповатые	18	3.2
13	Голые	0.6–0.7	Гладкие	3	33.8
Средняя СФ					16.2

Таблица 6. Основные морфологические признаки и семенная фертильность в выборке F₂ гибрида *E. mutabilis* BAI-0402 × *E. caninus* BAI-0401

№ п/п	ЛП сверху	$k = L_{кч}/L_{нцч}$	Опушение НЦЧ	Длина остей НЦЧ, мм	СФ, %
1	Голые	0.5–0.6	Шиповатые	3	12.2
2	Голые	0.5–0.6	Шиповатые	8	24.5
3	Редковолосистые	0.5–0.6	Гладкие	3	9.4
4	Редковолосистые	0.7–0.8	Гладкие	20	7.0
5	Редковолосистые	0.8–0.9	Длинно-шиповатые	6	5.2
6	Волосистые	0.5–0.6	Шиповатые	8	0
7	Голые	0.5–0.6	Шиповатые	6	7.8
8	Редковолосистые	0.5–0.6	Шиповатые	8	13.4
9	Голые	0.7–0.8	Длинно-шиповатые	6	2.0
10	Редковолосистые	0.8–0.9	Шиповатые	3	19.7
11	Голые	0.8–0.9	Шиповатые	3	28.6
12	Длинноволосистые	0.7–0.8	Длинно-шиповатые	3	3.6
13	Голые	0.8–0.9	Гладкие	8	0
14	Редковолосистые	0.5–0.6	Длинно-шиповатые	20	21.4
Средняя СФ					11.0

расщеплении гибридов в F_2 у самоопыляющихся таксонов зависит от родительских генотипов, которые могут различаться числом локусов и аллелей (одним или более), образующих общий генофонд таксона. В данных комбинациях скрещивания характер наследования признака «наличие трихом на НЦЧ» определили по дигенному типу, тогда как наследование признака «длина остей» – по моногенному типу с неполным доминированием. По признаку «наличие трихом на НЦЧ» распределение фенотипов по классам позволило предположить расщепление 1:15, что соответствует дигенному наследованию. Критерий значимости P в некоторых случаях был низким, что может объясняться недостаточным числом растений F_2 , формирующих выборку. Однако по расщеплению фенотипов ориентировочно можно предположить тип наследования диагностических признаков.

Ранее нами были проведены экспедиционные сборы видов, близких к *E. caninus*, на территории Республик Алтай и Тыва, Кавказа, Восточного Казахстана. Образцы были изучены в эксперименте. Приведем краткий обзор наиболее значимых для этой статьи результатов. Поскольку небольшие популяции *E. viridiglumis* встречаются в Восточном Казахстане, мы предположили возможные пути образования вида на этой территории (Агафонов, 2013). Нельзя не согласиться с комментарием о том, что по признакам колоса некоторые биотипы *E. viridiglumis* имеют сходство с *E. komarovii* (Цвелёв, Пробатова, 2019), тем не менее экспериментально была показана генетическая обособленность этих двух видов (Агафонов и др., 2017). Сходный с *E. goloskokovii* по морфологии колоса таксон с укороченными НЦЧ был описан с территории Северной Европы как *E. caninus* var. *muticus* (Holmb.) Karlsson. Живой материал этого таксона изучен нами в эксперименте (Герус, Агафонов, 2006), и сделан вывод, что данная разновидность имеет полифилетическое гибридное происхождение.

ISSR-анализ с привлечением широкого набора образцов видов, морфологически сходных с *E. caninus*, из разных местонахождений в пределах России показал, что *E. viridiglumis*, *E. prokudinii* и *E. goloskokovii* представляют собой группы особей, филогенетически также близких к *E. caninus* (Shabanova et al., 2020). Подтвердилось предположение о полифилетическом происхождении *E. viridiglumis* как результате микроэволюционных процессов в популяциях *E. caninus* s. l., возможно, с участием *E. mutabilis*. Для кавказского эндемика *E. prokudinii* и казахстанского эндемика *E. goloskokovii* тоже предполагается происхождение в результате интрогрессии или спонтанного мутагенеза, т. е. проявления природного внутривидового полиморфизма *E. caninus*. Отдаленность *E. fibrosus* от всех таксонов, филогенетически близких к *E. caninus*, поставила под сомнение предположение о происхождении *E. goloskokovii* в результате гибридизации *E. fibrosus* и *E. trachycaulis*, особенно учитывая заносное североамериканское происхождение последнего (Агафонов, Баум, 2000). Принимая во внимание наши ранние исследования видов, близких к *E. caninus* (Агафонов, 2011), сделан вывод, что таксоны *E. viridiglumis*, *E. prokudinii* и *E. goloskokovii* не являются филогенетически обособленными и должны быть переведены во внутривидовой ранг *E. caninus* s. l.

Репродуктивные отношения между *Elymus caninus* и *E. mutabilis*

Особым характером репродуктивных взаимоотношений обладают типичные морфотипы *E. caninus* и *E. mutabilis*. Ранее мы затрагивали тему влияния *E. mutabilis* на видообразование в Восточном Казахстане (Герус, Агафонов, 2006), в том числе в сравнении с данными по внутривидовой варибельности *E. caninus* (Агафонов, 2011). У некоторых гибридов *E. caninus* × *E. caninus* была обнаружена более низкая совместимость, чем у гибридов *E. caninus* × *E. mutabilis*.

Образцы родительских биотипов *E. caninus* и *E. mutabilis* в целом имели типичные для этих видов признаки, различия были только между биотипами *E. caninus* по опушению верхних поверхностей ЛП: редковолосистые поверхности отмечены у родительского биотипа GAT-9210, голые ЛП идентифицированы у биотипа BAI-0401. Ниже приведены краткие характеристики гибридных выборок F_2 в двух комбинациях скрещивания.

***Elymus caninus* GAT-9210 × *E. mutabilis* ACH-8932.** В выращенной выборке F_2 численностью 13 особей (см. табл. 5) было отмечено только одно абсолютно стерильное растение (4). Наивысшее значение СФ составило 54.6 % (растение 8). Это значение было несколько ниже, чем во всех комбинациях с участием таксонов, близких к *E. caninus* (см. табл. 2). По набору морфологических признаков две особи (2 и 8) были рекомбинантными (*E. caninus* – волосистые ЛП и длинные ости; *E. mutabilis* – шиповатые НЦЧ, короткие ости) и соответствовали диагнозу *E. viridiglumis* (см. табл. 5). Этот факт подтверждает наше предположение о полифилетическом происхождении названного таксона. По признаку наличия трихом на НЦЧ четко идентифицировались только две особи с гладкими чешуями (7 и 13), остальные 11 особей были шиповатыми в большей или меньшей степени.

По диагностическому признаку «длина остей НЦЧ» нами определены морфотипы с шестью значениями от 3 мм (морфотип *E. mutabilis*) до 22 мм (морфотип *E. caninus*). Вероятно, большое число фенотипов по данному признаку может объясняться тем, что каждый аллель вносит аддитивный вклад в формирование признака длины остей. И чем больше разница по длине остей у родительских форм, тем больше диапазон изменчивости в потомстве. У двух растений F_2 (7 и 13) обнаружены голые поверхности ЛП, что может свидетельствовать о небольшом числе аллелей, по которым различались родительские особи. В таком случае при расщеплении в F_2 по одному аллелю больше вероятность получить две особи с рецессивными гомозиготами на выборку 13 растений (1 из 4), чем при двух аллелях (1 из 16). В целом верхние поверхности ЛП у обоих видов могут варьировать от голых до густоволосистых, что наводит на предположение о дигенном или даже полигенном контроле этого признака.

***Elymus mutabilis* BAI-0402 × *E. caninus* BAI-0401.** Выборка F_2 в данной комбинации представлена 14 особями со средним значением СФ = 11.0 % (см. табл. 6), что является наименьшей величиной среди всех изученных выборок. При этом максимальное значение СФ в F_2 (28.6 %) тоже было наименьшим по сравнению с другими выборками (см. табл. 2). Отмечено шесть особей с абсолютно голыми

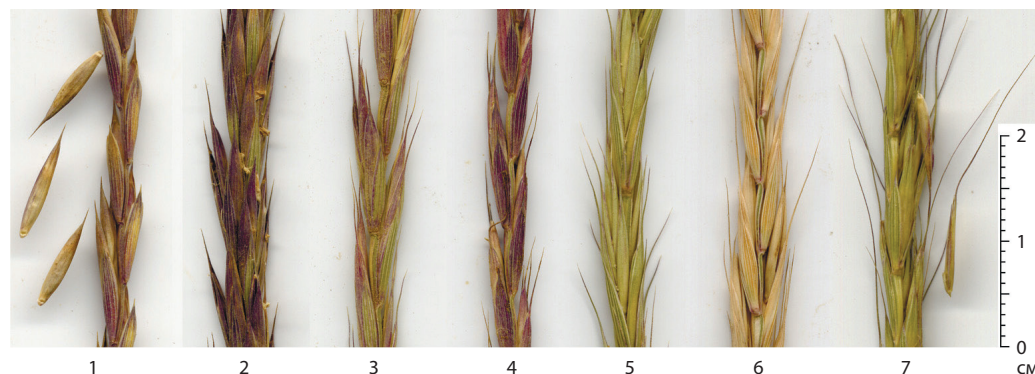


Рис. 2. Фрагменты колосьев природных образцов из Хакасии. Изменчивость по признаку длины остей НЦЧ в смешанных популяциях *E. mutabilis* и *E. caninus*.

1 – типичный *E. mutabilis*; 7 – типичный *E. caninus*; 2–6 – промежуточные морфотипы.

ми ЛП (см. табл. 3 и 6). Одновременно три особи с голыми и гладкими НЦЧ (морфотип *E. caninus*) различались по длине остей НЦЧ (см. табл. 6). То есть произошло выщепление потенциально новых таксонов, если следовать традиционным методам классификации. Несмотря на факт полной стерильности особи 13, две другие (3 и 4) обладали хотя и пониженной, но вполне достаточной семенной фертильностью (9.4 и 7.0 %) для собственного воспроизводства и закрепления в следующих поколениях.

В незначительной части перекрывающегося ареала *E. caninus* и *E. mutabilis* в пределах горных районов Республики Хакасия (Красноярский край) нами найдены биотипы с крайними и всеми промежуточными значениями признака длины остей НЦЧ (рис. 2). Это явление можно объяснить только актами взаимной интрогрессии между двумя видами, а также множественным аллелизмом генов, контролирующих данный признак. Существование механизма интрогрессии подтверждается значениями СФ у межвидовых гибридов (см. табл. 5 и 6).

Созданные нами гибриды в комбинациях *E. caninus* × *E. mutabilis* имели пониженную семенную фертильность на уровне α_2 . Такой уровень СФ, безусловно, снижает конкурентную способность в естественных условиях, но вероятность образования потомков и их закрепления в популяциях достаточно высока. В целом увеличение СФ у гибридов *E. caninus* × *E. mutabilis* до нормального уровня уже в поколении F_2 подтверждает возможность достаточно легкого обмена генетическим материалом между видами. Это означает, что некоторые спонтанные гибриды в естественных условиях имеют шансы для существования в следующих поколениях, при этом увеличивая общее популяционное биоразнообразие, как было показано ранее (Sun et al., 1999).

Заключение

Таким образом, на основе показателей скрещиваемости и расщепления признаков среди таксонов, близких к широко распространенному виду *E. caninus*, получена интегральная оценка родственных связей между биотипами. Из результатов исследования следует целесообразность таксономической ревизии. По нашему мнению, таксоны, признанные в настоящее время как самостоя-

тельные (независимые) виды *E. prokudinii*, *E. viridiglumis* и *E. goloskokovii*, в связи с их полифилетическим происхождением необходимо перевести во внутривидовой ранг в составе полиморфного вида *Elymus caninus* s. l. Главным подтверждением филогенетического единства этих таксонов являются высокие значения семенной фертильности уже в первом поколении гибридов и одноступенчатая рекомбинация диагностических признаков (репродуктивная совместимость) на уровне α_1 .

По результатам хорологического анализа и гибридизации выборочных биотипов *E. mutabilis* и *E. caninus* сделан вывод о том, что *E. mutabilis* является самостоятельным видом с широчайшим ареалом в Северном полушарии и с высокой внутривидовой вариабельностью по всем признакам.

Список литературы / References

- Агафонов А.В. Общая структура рекомбинационного генопула *Elymus caninus* (Triticeae: Poaceae) по данным скрещиваемости и оценки наследования некоторых морфологических признаков, используемых в таксономии. *Растит. мир Азиатской России*. 2011;2(8):61-70
- [Agafonov A.V. The general structure of the recombination gene pool of *Elymus caninus* (Triticeae: Poaceae) according to the data on interbreeding and the assessment of the inheritance of some morphological characters used in taxonomy. *Rastitelnyj Mir Aziatskoj Rossii = Flora and Vegetation of Asian Russia*. 2011;2(8):61-70 (in Russian)]
- Агафонов А.В. Единый рекомбинационный генопул *Elymus caninus* и *E. mutabilis* (Triticeae: Poaceae) по данным скрещиваемости и природной вариабельности: таксономические последствия. В: Сб. материалов Всерос. конф. «Растительный мир Северной Азии: проблемы изучения и сохранения биоразнообразия». Новосибирск, 1–3 окт. 2013 г. Новосибирск: ЦСБС СО РАН, 2013;3-5
- [Agafonov A.V. The single recombination gene pool of *Elymus caninus* and *E. mutabilis* (Triticeae: Poaceae) according to interbreeding and natural variability: taxonomic implications. In: Proceedings of the All-Russia Conference “The Flora of North Asia: Issues of Studying and Preserving Biodiversity”. Novosibirsk, October 1–3, 2013. Novosibirsk: Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of the RAS, 2013;3-5 (in Russian)]
- Агафонов А.В., Баум Б.Р. Индивидуальная изменчивость и репродуктивные свойства половых гибридов внутри комплекса *Elymus trachycaulus* (Poaceae: Triticeae) и близких таксонов. 1. По-

- лиморфизм запасных белков эндосперма у биотипов Северной Америки и Евразии. *Turczaninowia*. 2000;3(1):63-75
[Agafonov A.V., Baum B.R. Individual variability and reproductive properties of sexual hybrids within the *Elymus trachycaulus* (Poaceae: Triticeae) complex and related taxa. 1. Polymorphism of endosperm storage proteins in North American and Eurasian biotypes. *Turczaninowia*. 2000;3(1):63-75 (in Russian)]
- Агафонов А.В., Асбаганов С.В., Емцева М.В., Кобозева Е.В. Проявления сетчатой микроразвитости в смешанных популяциях *Elymus uralensis*, *E. viridiglumis*, *E. mutabilis* и *E. caninus* (Poaceae) на Южном Урале по данным ISSR-анализа. В: Материалы VI Междунар. науч. конф. «Проблемы изучения растительного покрова Сибири». Томск, 24–26 окт. 2017 г. Томск: Изд. дом ТГУ, 2017;143-145. DOI 10.17223/9785946216371/46
[Agafonov A.V., Asbaganov S.V., Emtseva M.V., Kobozeva E.V. Reticulate microevolution in mixed populations *Elymus uralensis*, *E. viridiglumis*, *E. mutabilis*, and *E. caninus* (Poaceae) in Southern Urals according to ISSR-analysis. In: Proceedings of the 6th Int. Sci. Conf. “Issues of Studying the Vegetation Cover of Siberia”. Tomsk, October 24–26, 2017. Tomsk: Publ. House of the Tomsk State University, 2017;143-145. DOI 10.17223/9785946216371/46 (in Russian)]
- Вавилов Н.И. Линнеевский вид как система. *Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции*. 1931;26(3):109-134
[Vavilov N.I. Linnean species as a system. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Seleksii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 1931;26(3):109-134 (in Russian)]
- Герус Д.Е., Агафонов А.В. Биосистематический анализ происхождения некоторых таксонов и морфологически отклоняющихся форм, близких к *Elymus caninus* и *E. mutabilis*. *Сиб. ботан. вестн.: электрон. журн.* 2006;1(1):65-74
[Gerus D.E., Agafonov A.V. Biosystematic analysis of the origin of some taxa and morphologically deviating forms closely related to *Elymus caninus* and *E. mutabilis*. *Siberian Botanical Bulletin: electronic journal*. 2006;1(1):65-74 (in Russian)]
- Котухов Ю.А. Новые виды злаков (Poaceae) из Западного Алтая. *Turczaninowia*. 2004;7(4):8-10
[Kotukhov Yu.A. New species of cereals (Poaceae) from Western Altai. *Turczaninowia*. 2004;7(4):8-10 (in Russian)]
- Невский С.А. Род 196. Рэгнерия – *Roegneria* C. Koch. В: Флора СССР. Т. 2. Злаки. Ленинград: АН СССР, 1934;599-627
[Nevsky S.A. Genus 196. *Roegneria* C. Koch. In: Flora of the USSR. Vol. 2. Cereals. Leningrad: USSR Academy of Sciences, 1934;599-627 (in Russian)]
- Невский С.А. Перечень злаков из триб Lolieae, Nardeae, Lepturageae и Hordeae флоры СССР. В: Флора и систематика высших растений. Вып. 2. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1936;33-90
[Nevsky S.A. List of cereals from the tribes Lolieae, Nardeae, Lepturageae, and Hordeae of the USSR flora. In: Flora and Systematics of Higher Plants. Iss. 2. Moscow–Leningrad: Publ. House of the USSR Academy of Sciences, 1936;33-90 (in Russian)]
- Пешкова Г.А. *Elymus* L. – Пырейник. В: Флора Сибири. Т. 2. Новосибирск: Наука, 1990;17-32
[Peshkova G.A. *Elymus* L. – Couch Grass. In: Flora of Siberia. Vol. 2. Novosibirsk: Nauka Publ., 1990;17-32 (in Russian)]
- Середин Р.М. Новый вид рода *Roegneria* C. Koch с Северного Кавказа. *Новости систематики высш. растений*. 1965;2:55-57
[Seredin R.M. A new species of the genus *Roegneria* C. Koch from the North Caucasus. *Novosti Systematiki Vysshykh Rasteniy = Novitates Systematicae Plantarum Vascularium*. 1965;2:55-57 (in Russian)]
- Цвелёв Н.Н. Злаки СССР. Л.: Наука, 1976
[Tsvelev N.N. Cereals of the USSR. Leningrad: Nauka Publ., 1976 (in Russian)]
- Цвелёв Н.Н., Пробатова Н.С. Злаки России. М., 2019
[Tsvelev N.N., Probatova N.S. Cereals of Russia. Moscow, 2019 (in Russian)]
- Agafonov A.V. The principle of recombination gene pools (RGP) and introgression gene pools (IGP) in the biosystematic treatment of *Elymus* species. In: Proc. of the 2nd Int. Triticeae Symp. Logan, Utah, USA, 20–24 June, 1994. Logan, 1994;254-260
- Agafonov A.V., Salomon B. Genepools among SH genome *Elymus* species in boreal Eurasia. In: Triticeae IV. Consejeria de Agricultura y Pesca. Spain, Sevilla, 2002;37-41
- Agafonov A.V., Baum B.R., Bailey L.G., Agafonova O.V. Differentiation in the *Elymus dahuricus* complex (Poaceae): evidence from grain proteins, DNA, and crossability. *Hereditas*. 2001;135(2-3): 277-289. DOI 10.1111/j.1601-5223.2001.00277.x
- Dewey D.R. Synthetic *Agropyron-Elymus* hybrids: *Elymus canadensis* × *Agropyron caninum*, *A. trachycaulum* and *A. striatum*. *Am. J. Bot.* 1968;55(10):1133-1139. DOI 10.2307/2440735
- Harlan J.R., de Wet J.M.J. Toward a rational classification of cultivator plants. *Taxon*. 1971;20(4):509-517. DOI 10.2307/1218252
- Hultén E., Fries M. Atlas of North European Vascular Plant, North of the Tropic of Cancer. Lubrecht & Cramer Ltd., 1986
- Lu B.-R., Salomon B., von Bothmer R. Cytogenetic studies of progeny from the intergeneric crosses *Elymus* × *Hordeum* and *Elymus* × *Secale*. *Genome*. 1990;33(3):425-432. DOI 10.1139/g90-064
- Pearson K. On the criterion that a given system of deviations from the probable in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling. *Lond. Edinb. Dublin Philos. Mag. J. Sci.* 1900;50(302):157-175. DOI 10.1080/14786440009463897
- Shabanova (Kobozeva) E., Emtseva M., Agafonov A., Lu B.-R. Assessment of the variability of *Elymus caninus* (Poaceae) and closely related taxa from Russia and Kazakhstan using ISSR markers. *BIO Web Conf.* 2020;24:00076. DOI 10.1051/bioconf/20202400076
- Sun G.-L., Diaz O., Salomon B., von Bothmer R. Genetic diversity in *Elymus caninus* as revealed by isozyme RAPD and microsatellite markers. *Genome*. 1999;42(3):420-431
- von Bothmer R., Seberg O., Jacobsen N. Genetic resources in the Triticeae. *Hereditas*. 1992;116(1):141-150. DOI 10.1111/j.1601-5223.1992.tb00814.x

ORCID

E.V. Shabanova (Kobozeva) orcid.org/0000-0002-6566-9325
A.V. Agafonov orcid.org/0000-0002-1403-5867
O.V. Dorogina orcid.org/0000-0001-5729-3594

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ЦСБС СО РАН (регистрационный номер АААА-А21-121011290025-2) и при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации по Соглашению № 075-15-2021-1056 между БИН РАН и Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, а также по Соглашению № ЕП/29-10-21-4 между БИН РАН и ЦСБС СО РАН. Используются материалы биоресурсных научных коллекций ЦСБС СО РАН УрГУ № 440534 и УрГУ № 440537 (Гербарии NS, NSK). Авторы выражают благодарность инженеру М.В. Емцевой за помощь в проведении гибридологических исследований.


Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 08.06.2023. После доработки 30.08.2023. Принята к публикации 06.10.2023.

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

Регуляторные эффекты (p)ppGpp и индола на синтез цАМФ в клетках *Escherichia coli*

Н.М. Кашеварова , Е.А. Хаова, А.Г. Ткаченко

Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, Россия
 nkashev@mail.ru

Аннотация. Адаптивный ответ бактерий на стрессорное воздействие условий среды формируется за счет изменения генно-экспрессионного профиля клетки посредством функционирования регуляторных сетей. Сигналами в них выступают естественные метаболиты клетки, в частности индол, а также вторичные мессенджеры (p)ppGpp и цАМФ, взаимное влияние которых недостаточно изучено и представляет собой цель данного исследования. Родительский штамм *E. coli* BW25141 ((p)ppGpp⁺) и нокаут BW25141Δ*relA*Δ*spoT* ((p)ppGpp⁰), не способный синтезировать (p)ppGpp, культивировали на среде M9 с различным содержанием глюкозы (5.6 и 22.2 мМ), в присутствии триптофана в качестве субстрата для синтеза индола и в его отсутствие. Содержание глюкозы измеряли глюкозооксидазным методом, уровень индола – при помощи ВЭЖХ, концентрацию цАМФ – методом ELISA. Начало возрастания исходно низкого внутриклеточного содержания цАМФ совпадало с исчерпанием глюкозы в среде. Максимальный уровень накопления цАМФ в клетках был пропорционален концентрации исходно добавленной глюкозы. При этом (p)ppGpp⁰ мутант демонстрировал снижение максимального уровня цАМФ по сравнению с (p)ppGpp⁺ родителем, наиболее выраженное на среде с 22.2 мМ глюкозы. Таким образом, (p)ppGpp положительно регулирует образование цАМФ. Известно, что промотор триптофаназного оперона, ответственного за биосинтез индола, находится под положительным контролем механизма катаболической репрессии. Поэтому в клетках (p)ppGpp⁺ штамма в условиях низкой скорости спонтанного образования индола на бестриптофановой среде значительно усиливался его синтез в ответ на возрастание уровня цАМФ при исчерпании глюкозы, чего не наблюдалось у (p)ppGpp⁰ мутанта с пониженным накоплением цАМФ. При добавке триптофана оба штамма демонстрировали высокую продукцию индола, что сопровождалось снижением уровня накопления цАМФ по сравнению с бестриптофановым контролем. Таким образом, (p)ppGpp при исчерпании глюкозы положительно регулирует накопление цАМФ и индола, который, в свою очередь, снижает образование цАМФ.

Ключевые слова: *Escherichia coli*; сигнальные молекулы; цАМФ; (p)ppGpp; индол; глюкоза; триптофан.

Для цитирования: Кашеварова Н.М., Хаова Е.А., Ткаченко А.Г. Регуляторные эффекты (p)ppGpp и индола на синтез цАМФ в клетках *Escherichia coli*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2024;28(1):15-23. DOI 10.18699/VJGB-24-03

The regulatory effects of (p)ppGpp and indole on cAMP synthesis in *Escherichia coli* cells

N.M. Kashevarova , E.A. Khaova, A.G. Tkachenko

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia
 nkashev@mail.ru

Abstract. Bacterial stress adaptive response is formed due to changes in the cell gene expression profile in response to alterations in environmental conditions through the functioning of regulatory networks. The mutual influence of network signaling molecules represented by cells' natural metabolites, including indole and second messengers (p)ppGpp and cAMP, is hitherto not well understood, being the aim of this study. *E. coli* parent strain BW25141 ((p)ppGpp⁺) and deletion knockout BW25141Δ*relA*Δ*spoT* which is unable to synthesize (p)ppGpp ((p)ppGpp⁰) were cultivated in M9 medium supplemented with different glucose concentrations (5.6 and 22.2 mM) in the presence of tryptophan as a substrate for indole synthesis and in its absence. The glucose content was determined with the glucose oxidase method; the indole content, by means of HPLC; and the cAMP concentration, by ELISA. The onset of an increase in initially low intracellular cAMP content coincided with the depletion of glucose in the medium. Maximum cAMP accumulation in the cells was proportional to the concentration of initially added glucose. At the same time, the (p)ppGpp⁰ mutant showed a decrease in maximum cAMP levels compared to the (p)ppGpp⁺ parent, which was the most pronounced in the medium with 22.2 mM glucose. So, (p)ppGpp was able to positively regulate cAMP formation. The promoter of the tryptophanase operon responsible for indole biosynthesis is known to be under the positive control of catabolic repression. Therefore, in the cells of the (p)ppGpp⁺ strain grown in the tryptophan-free medium that were characterized by a low rate of spontaneous indole formation, its synthesis significantly increased in response to the rising cAMP level just after glucose depletion. However, this was not observed in the (p)ppGpp⁰ mutant cells with

reduced cAMP accumulation. When tryptophan was added to the medium, both of these strains demonstrated high indole production, which was accompanied by a decrease in cAMP accumulation compared to the tryptophan-free control. Thus, under glucose depletion, (p)ppGpp can positively regulate the accumulation of both cAMP and indole, while the latter, in its turn, has a negative effect on cAMP formation.

Key words: *Escherichia coli*; signaling molecules; cAMP; (p)ppGpp; indole; glucose; tryptophan.

For citation: Kashevarova N.M., Khaova E.A., Tkachenko A.G. The regulatory effects of (p)ppGpp and indole on cAMP synthesis in *Escherichia coli* cells. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024; 28(1):15-23. DOI 10.18699/VJGB-24-03

Введение

В основе адаптации бактерий к стрессовым воздействиям лежит тонкая перестройка регуляторных сетей вследствие изменения генной экспрессии и активности ферментов. При этом регуляторными сигналами в них являются продукты метаболизма бактериальных клеток, такие как индол, вторичные мессенджеры (p)ppGpp и цАМФ. Взаимодействие метаболических путей этих сигнальных молекул обеспечивает адаптацию бактерий к различным изменениям среды обитания, что представляет большой научный интерес.

Первыми среди известных к настоящему времени нуклеотидных вторичных мессенджеров наиболее подробно были изучены цАМФ (3',5'-циклический аденозинмонофосфат) и (p)ppGpp (гуанозинтетра(пента)фосфат) на модельном организме *Escherichia coli*. Они действуют как внутриклеточные «вторичные» сигналы, передавая информацию о реальном микроокружении бактериальных клеток путем преобразования внеклеточных «первичных» сигналов в каскад внутриклеточных физиологических изменений, необходимых для обеспечения важных биологических функций (Hengge et al., 2019).

цАМФ синтезируется ферментом аденилатциклазой, кодируемой геном *suvaA* и катализирующей реакцию циклизации аденозинтрифосфата (АТФ) с образованием цАМФ и неорганического пирофосфата (Botsford, Hartman, 1992), и расщепляется с образованием АМФ с помощью фосфодиэстераз *CpdA* (Imamura et al., 1996) и *DosP* (Yoshimura-Suzuki et al., 2005). Глобальный регулятор цАМФ играет важную роль во многих биологических процессах, в том числе в регуляции роста, дифференцировки и общего метаболизма клеток, клеточного деления, голодания, анаэробноза, метаболизма углерода, стрессовых реакций (Gosset et al., 2004), в осморегуляции (Balsalobre et al., 2006), кворум-сенсинге (Zhou et al., 2008). Как показал транскриптомный анализ, более 200 оперонов находятся под прямым или опосредованным контролем цАМФ (Gutierrez-Ríos et al., 2007). цАМФ в комплексе с CRP белком (cAMP receptor protein) (Rickenberg, 1974) регулирует транскрипцию нескольких сотен генов, часть из которых вовлечена в процессы катаболизма (Botsford, Hartman, 1992), и участвует во множественных регуляторных сетях.

Другой хорошо известный вторичный мессенджер (p)ppGpp индуцирует один из главных адаптивных механизмов бактерий – стринджен-ответ (Potrykus, Cashel, 2008; Haurlyliuk et al., 2015), влияя на различные аспекты бактериальной физиологии, такие как персистенция, вирулентность, биопленкообразование и другие (Dalebroux et al., 2010; Maisonneuve, Gerdes, 2014). Поскольку алармон

(p)ppGpp является глобальным регулятором, под контролем которого находится экспрессия около 1400 генов (Traxler et al., 2008), его основная функция – регуляция роста и выживания бактериальных клеток в ответ на дефицит питательных веществ и различные стрессовые воздействия (Hengge et al., 2019). Повышенные уровни (p)ppGpp тормозят рост бактерий, ингибируя продукцию РНК, ДНК и белков (Mechold et al., 2013). У *E. coli* уровень (p)ppGpp в клетках определяется балансом двух алармонсинтетаз из семейства RSH (RelA/SpoT homologue) белков – RelA только с синтезирующей активностью и бифункционального фермента SpoT, который проявляет как синтетазную, так и (p)ppGpp-гидролазную активность. Синтетаза RelA активируется при связывании с рибосомами при аминокислотном голодании, когда незаряженные тРНК связываются с А-сайтом рибосомы. SpoT-зависимое накопление (p)ppGpp в бактериальных клетках происходит при недостатке источников углерода, жирных кислот, железа, азота, фосфатов, окислительном стрессе и т. д. (Arenz et al., 2016). (p)ppGpp в клетках *E. coli* регулирует генную транскрипцию посредством изменения активности РНК-полимеразы за счет прямого взаимодействия с ферментом или опосредованно, снижая клеточный пул гуанозинтрифосфата (ГТФ) и, соответственно, соотношение АТФ/ГТФ в результате расходования ГТФ для синтеза (p)ppGpp (Dalebroux, Swanson, 2012; Haurlyliuk et al., 2015).

В передаче сигналов изменения условий бактериального микроокружения также принимает участие индол, сигнальная молекула стационарно растущих бактериальных клеток. Продукция индола клетками *E. coli*, открытая в начале XX в., использовалась в качестве диагностического маркера для дифференцировки *E. coli* от других кишечных бактерий. К настоящему времени известно, что способность синтезировать индол широко распространена среди микроорганизмов. Он вырабатывается не менее чем 27 различными родами бактерий, способных продуцировать фермент триптофаназу TnaA, которая расщепляет триптофан с образованием индола, пирувата и аммония (Lee et al., 2007). Импорт индола в клетку осуществляет главным образом пермеаза Mtr (Yanofsky et al., 1991), а экспортируется он из клетки преимущественно с участием помпы множественного лекарственного выброса AcrEF (Kawamura-Sato et al., 1999). У *E. coli* индол регулирует такие важные клеточные процессы, как биопленкообразование (Lee et al., 2007), персистенцию (Kwan et al., 2015), развитие множественной лекарственной устойчивости (Hirakawa et al., 2005), изменение стабильности плазмид (Chant, Summers, 2007), подвижности (Bansal et al., 2007), а также способность выживания в смешанных бактериальных культурах (Chu et al., 2012).

Регуляторные сети, в состав которых входят сигнальные молекулы цАМФ, (p)ppGpp и индол, воспринимающие эндогенные и экзогенные физико-химические сигналы окружающей среды и запускающие каскад биохимических реакций, которые приводят к изменению генно-экспрессионного профиля клеток с последующими перестройками метаболизма, тесно взаимодействуют в бактериальных клетках. Одним из регуляторов синтеза индола является цАМФ, который в составе цАМФ-CRP-комплекса положительно регулирует транскрипцию триптофанового оперона, ответственного за синтез индола (Stewart, Yanofsky, 1985). Ранее нами показано, что образование индола у *E. coli* зависит от алармона (p)ppGpp (Кашеварова и др., 2022). Снижение уровня цАМФ в результате расщепления фосфодиестеразами снижает продукцию индола, повышая персистенцию (Kwan et al., 2015). В то же время в работе других исследователей было показано, что экзогенная добавка цАМФ, при участии цАМФ-CRP регуляторного комплекса, контролирующего экспрессию RelA, стимулировала экспрессию RelA, увеличивая продукцию алармона (p)ppGpp, что приводило к повышению персистенции. При этом активность цАМФ-CRP-комплекса и цАМФ-CRP-контролируемая экспрессия RelA возрастала при исчерпании глюкозы как в нормальных, так и персистентных клетках (Amato et al., 2013). Таким образом, регуляторные сигналы цАМФ и индол (Kwan et al., 2015), наряду с (p)ppGpp (Wood et al., 2013), участвуют во множественных путях формирования персистенции.

Цель нашего исследования – изучить влияние (p)ppGpp и индола на образование цАМФ в условиях исчерпания углеродного субстрата глюкозы.

Материалы и методы

Исследованные штаммы и условия культивирования.

Объектами исследования служили родительский штамм *E. coli* BW25141 (WT, (p)ppGpp⁺) (Datsenko, Wanner, 2000) и мутант BW25141Δ*relA*Δ*spoT*((p)ppGpp⁰) (лабораторная коллекция). Культуры, хранившиеся на скошенном агаре Luria–Bertani (LB) (Sigma, США), высевали на пробирки с 5 мл жидкой среды LB (Sigma, США). Через 5 ч клетки пересеивали на колбы Эрленмейера с минимальной средой M9 (50 мл), содержащей 5.6 мМ (0.1 %) или 22.2 мМ (0.4 %) глюкозы, и культивировали в термостатируемом шейкере (GFL 1092, Германия) при +37 °С с перемешиванием при 120 об/мин в течение 18 ч. Ночные культуры разводили в 50 мл свежей среды M9 с соответствующими концентрациями глюкозы до оптической плотности $OP_{600} = 0.2$, в часть колб добавляли триптофан (2 мМ) (AppliChem, Германия), оставляя другие в качестве контрольных, и далее культивировали при тех же условиях в течение 168 ч. Оптическую плотность культур измеряли по величине абсорбции при 600 нм на спектрофотометре UV-1650PC (Shimadzu, Япония).

Генетическое конструирование. Делеционный мутант BW25141Δ*relA*Δ*spoT* сконструирован с использованием системы сайт-специфической рекомбинации FLP/FRT по методу Дащенко–Ваннера (Datsenko, Wanner, 2000).

Содержание глюкозы в среде определяли глюкозооксидазным методом с использованием набора Глюкоза-Витал («Витал Девелопмент Корпорэйшн», Россия). Пробы

объемом 5 мкл отбирали в экспоненциальной фазе каждый час, далее – раз в сутки и инкубировали с 1 мл реагента при комнатной температуре в течение 15 мин. При окислении глюкозы кислородом воздуха под действием глюкозооксидазы образуется эквивалентное количество перекиси водорода, которая под действием пероксидазы окисляет хромогенные субстраты с образованием окрашенного продукта, интенсивность окраски которого, пропорциональную концентрации глюкозы в образце, измеряли фотометрически при 510 нм на спектрофотометре UV-1650PC (Shimadzu, Япония).

Определение индола. Концентрацию индола в среде измеряли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (Kim et al., 2013), с небольшими модификациями, на хроматографе LC-20A со спектрофотометрическим детектором SPD-M20A (Shimadzu, Япония), колонкой Luna C18 (250×4.6 мм, 5 мкм), предколонкой SecurityGuard C18 (4×3 мм) (Phenomenex, США). Для определения внеклеточного индола пробы отбирали каждые 2 ч в экспоненциальной фазе, в стационарной культуре – раз в сутки. Клетки осаждали центрифугированием. Образцы супернатанта в объеме 20 мкл анализировали при скорости потока мобильной фазы (смесь ацетонитрила («Криохром», Россия) и уксусной кислоты в соотношении 1:1) 1 мл/мин и +25 °С с детектированием при длине волны 280 нм. Для расчета содержания индола в образце использовали метод внешнего стандарта на основании предварительно построенной калибровочной кривой.

Измерение концентрации цАМФ. Количественное определение внутриклеточной концентрации цАМФ проводили методом конкурентного иммуноферментного анализа (ELISA). 1.5 мл исследуемой культуры центрифугировали при 12000 об/мин при +4 °С в течение 5 мин. Осадок ресуспендировали в 300 мкл 0.1N HCl, выдерживали 5 мин при +95 °С с последующим разрушением клеток на ультразвуковом дезинтеграторе CPX-130 (Cole-Parmer, США), используя шуп диаметром 6 мм (три цикла длительностью 30 с при амплитуде 40 %). Остатки клеток осаждали центрифугированием 15 мин, в полученном супернатанте после нейтрализации его 2M Na₂CO₃ определяли концентрацию цАМФ согласно методике производителя (RayBio® cAMP Enzyme Immunoassay). Эксперименты проводили не менее чем с двумя независимыми культурами. Полученные данные нормализованы на внутриклеточный объем по абсолютно сухой биомассе клеток.

Статистическую обработку результатов выполняли в пакете стандартных программ Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США). На графиках представлены средние значения ± стандартная ошибка среднего. Оценка статистической значимости различий средних произведена с использованием *t*-критерия Стьюдента ($p \leq 0.05$).

Результаты

В данной работе исследована динамика исчерпания глюкозы и образования цАМФ и индола в периодических культурах штамма дикого типа *E. coli* BW25141 и полученного на его основе делеционного мутанта Δ*relA*Δ*spoT* при культивировании на минеральной среде M9 с различным содержанием исходно добавленной глюкозы (5.6 и

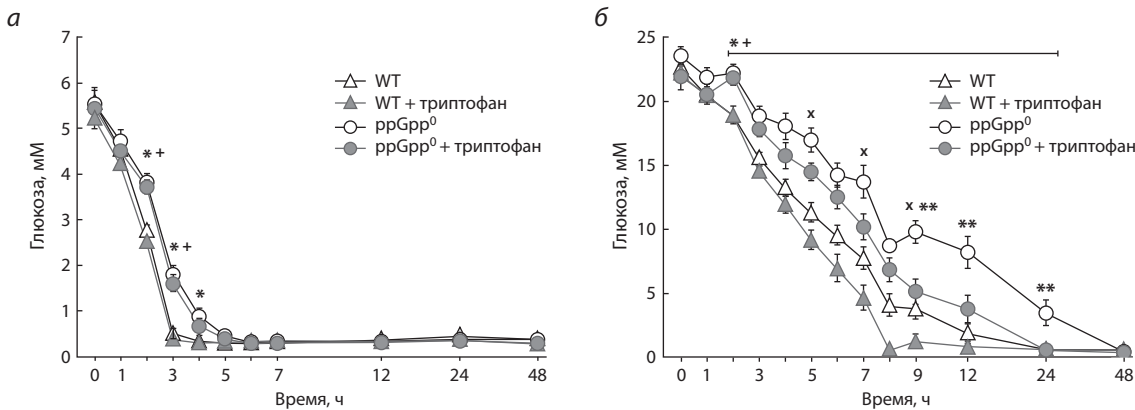


Рис. 1. Динамика исчерпания глюкозы в культурах родительского штамма (WT) и (p)ppGpp⁰ мутанта при росте в среде без триптофана и с добавкой 2 мМ триптофана при содержании 5.6 мМ (а) и 22.2 мМ глюкозы (б).

* Статистически значимое отличие (p)ppGpp⁰ мутанта от (p)ppGpp⁺ штамма в среде без триптофана; + статистически значимое отличие (p)ppGpp⁰ мутанта от (p)ppGpp⁺ штамма в условиях добавки 2 мМ триптофана; x статистически значимое отличие (p)ppGpp⁺ штамма с добавкой 2 мМ триптофана от (p)ppGpp⁺ штамма в бестриптофановой среде; ** статистически значимое отличие (p)ppGpp⁰ мутанта в среде с 2 мМ триптофана от (p)ppGpp⁰ мутанта в бестриптофановой среде ($p \leq 0.05$).

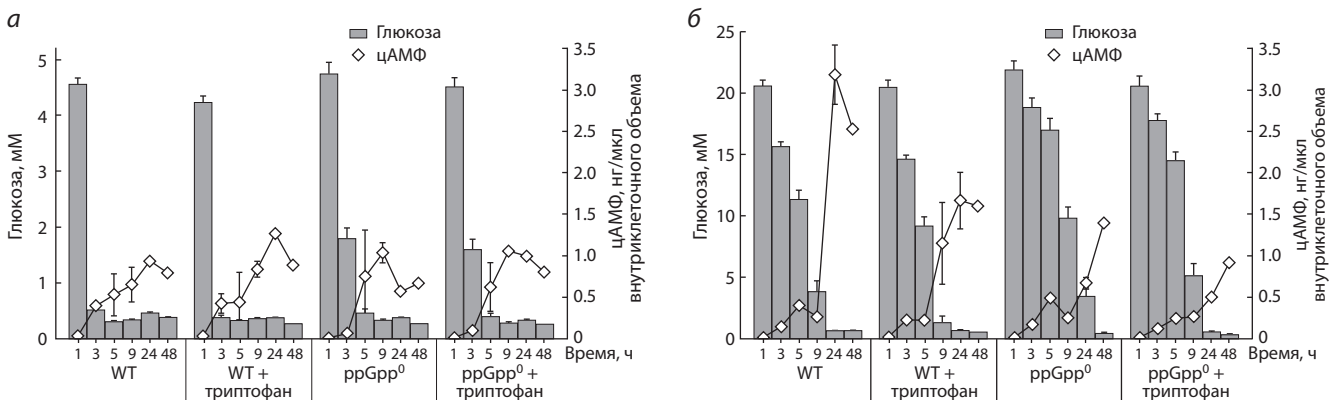


Рис. 2. Потребление глюкозы (гистограмма/столбцы) и образование цАМФ (график/ромбы) в культурах родительского штамма и (p)ppGpp⁰ мутанта в среде без триптофана и с добавкой 2 мМ триптофана при содержании 5.6 мМ (а) и 22.2 мМ глюкозы (б).

22.2 мМ). Сверхпродукцию индола воспроизводили путем экзогенной добавки аминокислоты триптофана – предшественника синтеза индола – в концентрации 2 мМ с целью выяснения его эффекта на активность метаболических процессов, в частности скорость потребления углеродного субстрата (глюкозы) и синтез цАМФ.

При исследовании потребления глюкозы в периодических культурах изучаемых штаммов установлено, что в условиях внесения изначально низкой концентрации глюкозы (5.6 мМ) исчерпание субстрата в клетках обоих штаммов происходило в первые часы культивирования (рис. 1, а). При этом в культуре родительского штамма глюкоза расходовалась полностью через 3 ч роста, тогда как отсутствие (p)ppGpp в клетках мутантного штамма *E. coli* приводило к замедлению исчерпания субстрата на 2 ч по сравнению со штаммом дикого типа. В то же время присутствие триптофана в среде не оказывало эффекта в обоих случаях.

При высоком исходном содержании глюкозы (22.2 мМ) в родительском штамме глюкоза заканчивалась спустя 12 ч после переноса клеток в свежую питательную среду

(см. рис. 1, б). Двойная $\Delta relA \Delta spoT$ мутация, так же как и в условиях добавки 5.6 мМ глюкозы, приводила к замедлению исчерпания субстрата более чем на 24 ч. Однако присутствие триптофана в среде вызывало ускорение потребления глюкозы более чем на 4 ч в родительском штамме и на 24 ч в (p)ppGpp⁰ мутанте.

Начало возрастания исходно низкого внутриклеточного уровня цАМФ совпадало с исчерпанием глюкозы в среде. В культурах, растущих в среде с 5.6 мМ глюкозы, увеличение концентрации цАМФ происходило раньше, чем при 22.2 мМ глюкозы (рис. 2). В среде с низким содержанием глюкозы (см. рис. 2, а) (p)ppGpp⁺ штамм показал быстрое исчерпание глюкозы в интервале 1–3 ч, что сопровождалось активным накоплением цАМФ. Однако двойная делеция приводила к более резкому увеличению уровня цАМФ начиная с 5 ч, чего не наблюдалось в среде с 22.2 мМ глюкозы. К концу наблюдаемого периода первых суток культивирования (9 ч роста) более высокие значения накопления цАМФ продемонстрировал мутант при 5.6 мМ глюкозы, что примерно в два раза превышало уровень цАМФ при 22.2 мМ глюкозы.

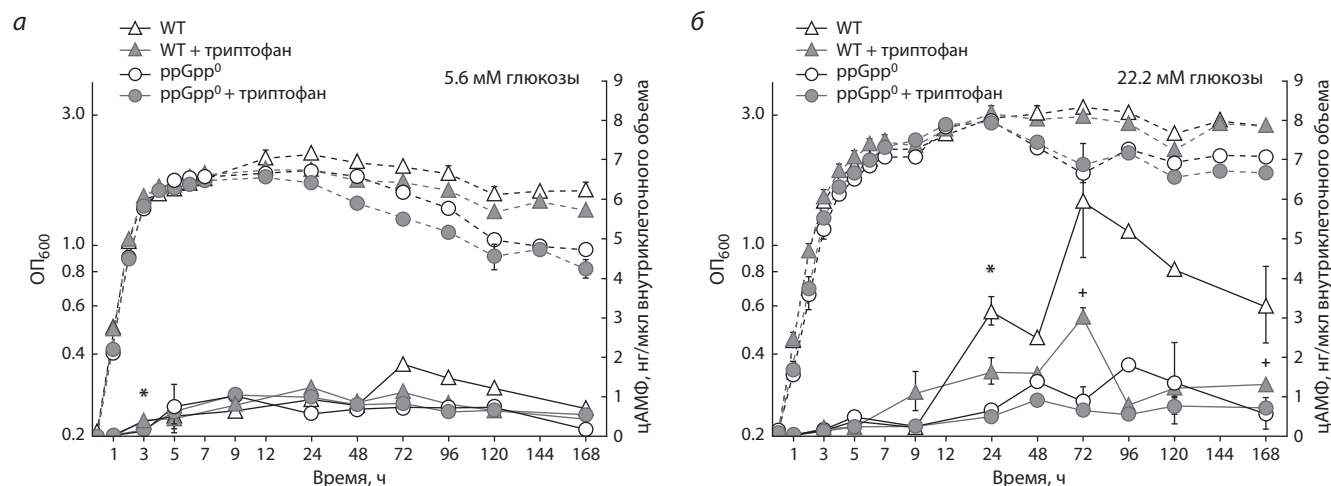


Рис. 3. Кривые роста (штриховые линии) и образование цАМФ (сплошные линии) в культурах родительского и мутантного штаммов при росте в среде без триптофана (незалитые значки) и с добавкой 2 мМ триптофана (залитые значки) при содержании в среде 5.6 мМ (а) и 22.2 мМ глюкозы (б).

* Статистически значимое отличие (p)ppGpp⁰ мутанта от (p)ppGpp⁺ штамма в среде без триптофана; + статистически значимое отличие (p)ppGpp⁰ мутанта от (p)ppGpp⁺ штамма в условиях добавки 2 мМ триптофана.

В стационарных культурах высокая концентрация исходно добавленной глюкозы (22.2 мМ) в среде приводила к более высокому уровню синтеза цАМФ, чем в условиях добавки 5.6 мМ глюкозы. В случае делеционного мутанта эти различия были менее выражены (рис. 3).

Максимальные значения накопления цАМФ в клетках были пропорциональны концентрации добавленной глюкозы. Следует отметить, что (p)ppGpp⁰ нокаут демонстрировал снижение максимального уровня цАМФ по сравнению с WT штаммом, наиболее выраженное на среде с 22.2 мМ глюкозы. Максимум накопления цАМФ при 5.6 мМ глюкозы в мутантном штамме достигался к 9 ч культивирования с последующим снижением, тогда как в (p)ppGpp⁺ родителе – на 72 ч (без триптофана) и 24 ч (с триптофаном) (см. рис. 3, а). В условиях добавки 22.2 мМ глюкозы максимальные значения цАМФ отмечены на 72 ч роста в WT штамме как в бестриптофановой среде, так и в присутствии предшественника индола (см. рис. 3, б). В то же время в (p)ppGpp⁰ нокауте уровень цАМФ на протяжении всего периода культивирования изменялся незначительно, особенно в среде с добавкой триптофана, и был до 6 раз ниже в сравнении с WT штаммом. Таким образом, отсутствие (p)ppGpp в клетках приводило к снижению образования цАМФ.

Ранее нами было показано, что эффект (p)ppGpp, сигнальной молекулы стринджен-ответа, в регуляции продукции индола клетками *E. coli* зависит от содержания глюкозы в среде культивирования (Кашеварова и др., 2022). Таким образом, (p)ppGpp положительно регулирует синтез индола в условиях спонтанного образования этого метаболита при 22.2 мМ глюкозы на бестриптофановой среде, чего не происходило при 5.6 мМ глюкозы. При экзогенной добавке 2 мМ триптофана (p)ppGpp-зависимая продукция индола наблюдалась при обеих изученных концентрациях глюкозы с более выраженным эффектом при высоком содержании углеродного субстрата. Однако лимитирование глюкозы в момент начала культивирова-

ния (5.6 мМ глюкозы) приводило к возрастанию скорости накопления индола и сокращению времени достижения его максимальных значений (рис. 4).

При исследовании эффекта сверхпродукции индола на синтез цАМФ в зависимости от содержания углеродного субстрата установлено, что добавка аминокислоты триптофана, вызывающая накопление индола в среде до 2.2–2.9 мМ (см. рис. 4, в, г), не оказывала значимого эффекта на внутриклеточную концентрацию цАМФ в изученных штаммах при исследованных концентрациях глюкозы, за исключением (p)ppGpp⁺ штамма при содержании 22.2 мМ глюкозы, когда наблюдалось снижение уровня цАМФ до 4 раз в условиях внесения триптофана в сравнении с бестриптофановым контролем (рис. 5).

Обсуждение

Бактерии, подвергаясь различным стрессовым факторам, таким как голодание, температурный, кислотный, окислительный стресс и т. д., развили эффективные механизмы стрессовых ответов для адаптации к неблагоприятным условиям. Стрессовые ответы индуцируются сигнальными молекулами, запускающими цепочку реакций, приводящих к изменению генной экспрессии и перестройке метаболизма бактериальных клеток, что позволяет им выживать при неблагоприятных воздействиях.

В представленной работе изучено взаимное влияние сигнальных молекул (p)ppGpp, цАМФ и индола при исчерпании глюкозы в среде культивирования. Глюкоза – предпочтительный источник углерода и энергии для клеток *E. coli*, у которых сформировалась сложная регуляторная сеть, координирующая генную экспрессию, транспорт и активность ферментов в ответ на присутствие этого субстрата (Gutierrez-Rios et al., 2007). Углеродное голодание вызывает общий стрессовый ответ, регулируемый механизмом катаболитной репрессии и (p)ppGpp-опосредованным стринджен-ответом. У *E. coli* гены, контролируемые белком-регулятором катаболитной ре-

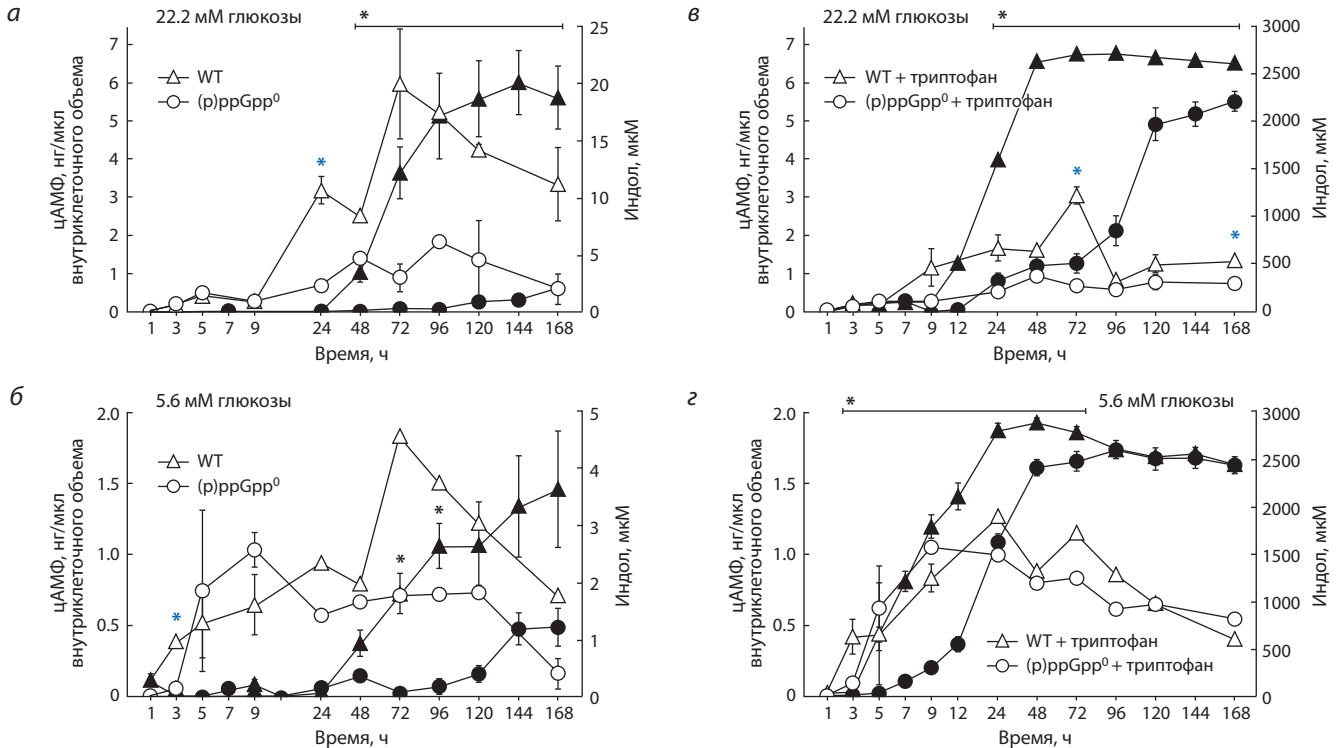


Рис. 4. Продукция индола (залитые значки) и образование цАМФ (незалитые значки) в культурах родительского штамма WT и (p)ppGpp⁰ нокаута при росте в среде без триптофана (а, б) и с добавкой 2 мМ триптофана (в, з) при содержании 22.2 мМ (а, в) и 5.6 мМ глюкозы (б, з).

* Статистически значимое отличие (p)ppGpp⁰ мутанта от (p)ppGpp⁺ штамма по продукции индола и цАМФ (черный и голубой цвет соответственно) ($p \leq 0.05$).

прессии CRP, являются RelA-зависимыми, что указывает на то, что (p)ppGpp выполняет функцию глобального регулятора при углеродном голодании (Traxler et al., 2006). Это демонстрирует взаимодействие механизмов катаболической репрессии и стринджен-ответа. В недавнем исследовании с помощью флуоресцентной спектроскопии было показано, что (p)ppGpp способен связываться с CRP белком с высокой аффинностью, а результаты молекулярного докинга позволили предположить, что (p)ppGpp может отрицательно регулировать активность этого белка. Таким образом, экспрессия CRP-контролируемых генов модулируется (p)ppGpp в результате его связывания с CRP при стрессе голодания (Duysak et al., 2021).

В бактериальных клетках внутриклеточные уровни цАМФ зависят от многих факторов и определяются, прежде всего, соотношением активности ферментов аденилатциклазы и фосфодиэстераз. Сигнальная молекула цАМФ входит в состав цАМФ-CRP-комплекса, который контролируется углеводами фосфоэнолпируватфосфотрансферазной системы (Deutscher et al., 2006) и, в свою очередь, регулирует катаболическую репрессию углерода (Botsford, Harman, 1992), при которой присутствие глюкозы в ростовой среде подавляет экспрессию ферментов, катализирующих метаболизм других источников углерода, снижая уровни как CRP белка, так и цАМФ (Ishizuka et al., 1994). У *E. coli* уровни клеточного цАМФ обратны пропорциональны источнику углерода, что приводит к низким концентрациям в присутствии легко метаболизируемого источника углерода (глюкозы). Помимо катаболизма уг-

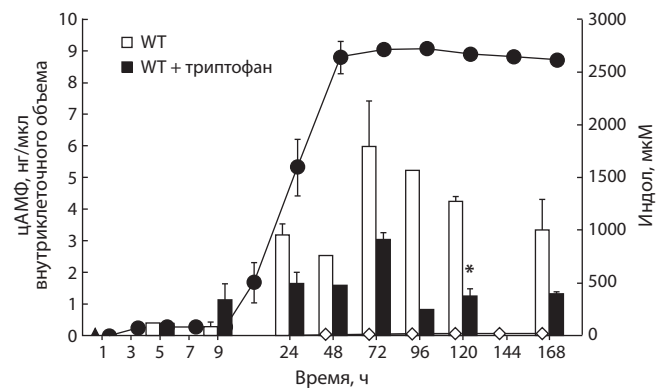


Рис. 5. Продукция индола (график) и образование цАМФ (гистограмма/столбцы) в культуре родительского штамма при росте в среде без триптофана (ромбы/белые столбцы) и с добавкой 2 мМ триптофана (кружки/черные столбцы) при содержании 22.2 мМ глюкозы.

* Статистически значимое отличие (p)ppGpp⁺ штамма с добавкой 2 мМ триптофана от (p)ppGpp⁺ штамма в бестриптофановой среде ($p \leq 0.05$).

лерода, под контролем цАМФ-CRP-регулона находятся важные клеточные функции, связанные со стрессовым ответом, делением клеток и метаболизмом аминокислот, включая ген триптофаназы *tnaA*, ответственной за продукцию из аминокислоты триптофана одного из метаболитов *E. coli* – индола (Isaacs et al., 1994).

В настоящей работе изучена зависимость динамики синтеза цАМФ и индола от присутствия (p)ppGpp и со-

держания глюкозы в среде культивирования. В экспериментах использовались две концентрации глюкозы – 5.6 и 22.2 мМ, которые позиционировались нами как низкое и высокое содержание глюкозы соответственно. В условиях добавки триптофана при исчерпании глюкозы в среде происходит переключение метаболизма бактериальных клеток на утилизацию этого субстрата, который клетки *E. coli* способны использовать в качестве единственного источника углерода и азота за счет действия индуцибельного фермента триптофаназы, расщепляющей триптофан с образованием индола (Yanofsky et al., 1991).

Нами показано, что отсутствие (p)ppGpp в клетках снижает их способность расщеплять глюкозу. Этот эффект был наиболее выраженным при высоком содержании глюкозы в среде (22.2 мМ). В данных условиях ускорение исчерпания глюкозы отмечалось в среде, содержащей триптофан (см. рис. 1). Способность бактериальных клеток продуцировать (p)ppGpp играет важную роль в метаболизме глюкозы как для грамположительных, так и для грамотрицательных бактерий (Oh et al., 2015). При адаптации бактерий к глюкозному голоданию, помимо классического стринджен-ответа, при котором происходит торможение роста и ингибирование синтеза макромолекул, формируется расширенный адаптивный ответ, включающий ингибирование гликолиза и метаболические переходы, опосредованные с помощью механизма каталитической репрессии (Zhang et al., 2016). Согласно нашим экспериментам, исчерпание глюкозы в среде сопровождалось увеличением исходно низкого внутриклеточного содержания цАМФ. Максимальный уровень накопления цАМФ в клетках был пропорционален концентрации исходно добавленного субстрата. При содержании 5.6 мМ глюкозы возрастание уровня цАМФ происходило раньше, чем при 22.2 мМ глюкозы (см. рис. 2). При этом максимальные значения внутриклеточной концентрации цАМФ за 168-часовой период наблюдений достигались уже в первые сутки культивирования в (p)ppGpp⁰ мутанте и на 24-м часу в родительском штамме с добавкой триптофана. В то же время в бестриптофановой культуре (p)ppGpp⁺ штамма максимум наблюдался на 72-м часу культивирования (см. рис. 3, а), как и в условиях добавки 22.2 мМ глюкозы в среде (см. рис. 3, б). При высоком содержании глюкозы уровень цАМФ был выше у родительского штамма в сравнении с делеционным мутантом как в бестриптофановой среде, так и в присутствии этой аминокислоты (см. рис. 3, б). Таким образом, отсутствие (p)ppGpp в клетках приводило к снижению образования цАМФ, что позволяет сделать вывод о положительной регуляции процесса синтеза цАМФ в клетках *E. coli* при участии (p)ppGpp.

Вторичный мессенджер (p)ppGpp модулирует экспрессию генов в ответ на различные стрессовые воздействия у разных видов бактерий (Irving, Corrigan, 2018) и является ключевым регулятором стринджен-ответа. Это один из важнейших защитных механизмов при адаптации бактерий, который индуцируется, прежде всего, при стрессе голодания (Traxler et al., 2006, 2008). У грамотрицательных бактерий (p)ppGpp регулирует инициацию транскрипции путем непосредственного связывания с РНК-полимеразой. Стимулирующий или ингибирующий эффект (p)ppGpp

на транскрипцию зависит от структуры дискриминаторных последовательностей (с преобладанием АТ- или GC-оснований) (Sanchez-Vazquez et al., 2019). Кроме того, (p)ppGpp может напрямую связываться с белками, изменяя их каталитическую активность. Так, в работе (Ro et al., 2021) было показано, что (p)ppGpp способствует ацетилированию CRP белка, который в составе цАМФ-CRP-комплекса играет ключевую роль в регуляции генной экспрессии *E. coli*. Однако при этом не наблюдалось существенных различий ни в уровнях цАМФ, ни в экспрессии аденилатциклазы *cytA*, ответственной за продукцию цАМФ, между полноценным штаммом и мутантом с делецией одной алармонсинтетазы *ΔrelA*.

Полученные нами результаты демонстрируют влияние (p)ppGpp на уровень цАМФ, который проявляется в возрастании концентрации цАМФ в (p)ppGpp⁺ штамме по сравнению с мутантным штаммом с двойной делецией *ΔrelAΔspoT* в 2.8 и 6 раз при содержании 5.6 и 22.2 мМ глюкозы соответственно во временных точках максимального различия, что приходится на 72 ч культивирования в бестриптофановой среде (см. рис. 3). Подобный эффект (p)ppGpp на уровень цАМФ наблюдался и в условиях избыточного накопления индола, но только при высоком (22.2 мМ) исходном содержании глюкозы (см. рис. 3, б), тогда как при лимитировании глюкозы различия в концентрации цАМФ между WT и нокаутом исчезали (см. рис. 3, а). Вероятно, отсутствие эффекта (p)ppGpp на уровень цАМФ (Ro et al., 2021) можно объяснить активностью фермента SpoT-синтетазы, приводящей к накоплению (p)ppGpp, в то время как в наших экспериментах двойная делеция *ΔrelAΔspoT* обеспечивала полное отсутствие сигнальной молекулы стринджен-ответа. Интересно, что присутствие (p)ppGpp в клетках вызывало ускорение начала синтеза цАМФ в условиях лимитирования глюкозы (5.6 мМ исходного содержания), что демонстрировалось на 3 ч культивирования статистически значимым 4-кратным увеличением концентрации цАМФ в (p)ppGpp⁺ штамме по сравнению с мутантом в бестриптофановой среде. Однако в последующие две точки отбора проб – 5 и 9 ч культивирования – (p)ppGpp⁰ нокаут превосходил родительский штамм в уровне выработки цАМФ (см. рис. 4, б), что наблюдалось также в условиях добавки триптофана (см. рис. 4, в).

В данном исследовании нами показано, что (p)ppGpp вовлечен в регуляцию продукции цАМФ, как и в биосинтез индола. Известно, что триптофаназный оперон *tnaCAB*, ответственный за образование индола, положительно регулируется цАМФ-CRP-зависимым механизмом каталитической репрессии и индуцируется на транскрипционном уровне при исчерпании углеводов и переходе клеток в стационарную фазу (Stewart, Yanofsky, 1985). Этим объясняется наблюдаемое на бестриптофановой среде повышение уровня цАМФ до 1.8 и 6 нг/мкл при 5.6 и 22.2 мМ глюкозы соответственно (см. рис. 3). Возрастание цАМФ сопровождалось значительным увеличением (до 10 раз) образования индола в условиях добавки 22.2 мМ глюкозы, что характерно только для родительского штамма, но не для мутанта (см. рис. 4, а). Таким образом, можно сделать вывод, что алармон (p)ppGpp положительно регулирует процесс образования индола наравне с механизмом ката-

болитной репрессии. Как видно из рис. 4, а, б, внутриклеточная концентрация цАМФ в бестриптофановой среде снижается в $\Delta relA\Delta spoT$ мутанте в сравнении с (p)ppGpp⁺ штаммом в 6 и 3 раза в среде с 22.2 и 5.6 мМ глюкозы соответственно. Это указывает на положительную роль (p)ppGpp как в регуляции синтеза цАМФ, так и в продукции индола. В условиях добавки триптофана оба штамма при обеих исследованных концентрациях глюкозы демонстрировали высокую продукцию индола (см. рис. 4, в, з). Возрастание образования индола происходило по времени культивирования раньше при 5.6 мМ глюкозы, что может быть связано с более ранним образованием цАМФ в клетках. При этом мутант тоже демонстрировал задержку по времени в накоплении индола, более выраженную в условиях добавки 22.2 мМ глюкозы (см. рис. 4, в). Таким образом, продукция индола у *E. coli* находится под положительным контролем вторичных мессенджеров (p)ppGpp и цАМФ в условиях лимита субстрата.

Представленные нами данные показывают, что уровень цАМФ в клетках *E. coli* в некоторой степени зависит от содержания индола в среде. Наличие в среде субстрата для синтеза индола триптофана приводит к сверхпродукции индола в культурах обоих штаммов. Однако снижение концентрации цАМФ, более выраженное в условиях добавки 22.2 мМ глюкозы, наблюдается только в родительском штамме (см. рис. 5), тогда как в культуре $\Delta relA\Delta spoT$ нокаута высокая продукция индола не оказывала значимого эффекта на уровень цАМФ.

Полученные результаты демонстрируют, что отсутствие алармона (p)ppGpp в клетках *E. coli* приводило к снижению образования цАМФ и замедлению метаболизма глюкозы. Возрастание уровня цАМФ в ответ на исчерпание глюкозы сопровождалось синтезом индола с выраженным снижением его накопления в (p)ppGpp⁰ мутанте в сравнении с родительским штаммом как в бестриптофановой среде, так и при добавке триптофана. В клетках (p)ppGpp⁺ штамма в условиях низкой скорости спонтанного образования индола на бестриптофановой среде значительно усиливался его синтез в ответ на возрастание уровня цАМФ при исчерпании глюкозы, чего не наблюдалось у (p)ppGpp⁰ мутанта с пониженным накоплением цАМФ. Это указывает на положительную роль (p)ppGpp в регуляции процесса образования индола, контролируемого механизмом катаболитной репрессии при участии цАМФ. В условиях внесения триптофана оба штамма демонстрировали высокую продукцию индола, что сопровождалось снижением уровня накопления цАМФ в сравнении с бестриптофановым контролем и было наиболее выражено в (p)ppGpp⁺ штамме при 22.2 мМ глюкозы. Таким образом, алармон (p)ppGpp в условиях лимитирования глюкозы положительно регулирует накопление цАМФ и индола, который, в свою очередь, снижает образование цАМФ.

Заключение

Выживание бактерий в непрерывно изменяющихся условиях среды обусловлено сформировавшейся в ходе эволюционного процесса сложнейшей системой взаимодействующих многочисленных регуляторных сетей, контролирующих разнообразные физиологические функции бактерий при различных стрессовых воздействиях. В на-

шей работе рассмотрено взаимодействие сигнальных молекул цАМФ, (p)ppGpp и индола в условиях лимитирования субстрата и показано, что (p)ppGpp действует как положительный регулятор метаболизма глюкозы, синтеза цАМФ и продукции индола. Внутриклеточный уровень накопления цАМФ зависит как от обеспеченности среды углеродным субстратом, так и от алармона стриндгент-ответа (p)ppGpp. Отсутствие (p)ppGpp в клетках снижает их способность продуцировать индол в условиях низкой скорости его спонтанного образования на бестриптофановой среде и замедляет скорость его накопления в среде в присутствии триптофана. Биосинтез индола у *E. coli* положительно регулируется сигнальными молекулами (p)ppGpp и цАМФ в условиях лимита субстрата. Это позволяет сделать вывод, что (p)ppGpp-зависимая продукция индола опосредуется через изменение уровня цАМФ в клетках. Полученные результаты демонстрируют модуляторный эффект (p)ppGpp в экспрессии генов триптофанозного оперона, регулируемого цАМФ-CRP-зависимым механизмом катаболитной репрессии, снятие которой индуцируется при исчерпании глюкозы.

Список литературы / References

- Кашеварова Н.М., Ахова А.В., Хаова Е.А., Ткаченко А.Г. Роль алармона (p)ppGpp в регуляции образования индола клетками *Escherichia coli* в зависимости от содержания глюкозы. *Acta Biomedica Scientifica*. 2022;7(3):162-168. DOI 10.29413/ABS.2022-7.3.17
- [Kashevarova N.M., Akhova A.V., Khaova E.A., Tkachenko A.G. Role of alarmone (p)ppGpp in the regulation of indole formation depending on glucose content in *Escherichia coli*. *Acta Biomedica Scientifica*. 2022;7(3):162-168. DOI 10.29413/ABS.2022-7.3.17 (in Russian)]
- Amato S.M., Orman M.A., Brynildsen M.P. Metabolic control of persister formation in *Escherichia coli*. *Mol. Cell*. 2013;50(4):475-487. DOI 10.1016/j.molcel.2013.04.002
- Arenz S., Abdelshahid M., Sohnen D., Payoe R., Starosta A.L., Berninghausen O., Haurlyuk V., Beckmann R., Wilson D.N. The stringent factor RelA adopts an open conformation on the ribosome to stimulate ppGpp synthesis. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(13):6471-6481. DOI 10.1093/nar/gkw470
- Balsalobre C., Johansson J., Uhlin B.E. Cyclic AMP-dependent osmoregulation of *crp* gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. 2006;188(16):5935-5944. DOI 10.1128/JB.00235-06
- Bansal T., Englert D., Lee J., Hegde M., Wood T.K., Jayaraman A. Differential effects of epinephrine, norepinephrine, and indole on *Escherichia coli* O157: H7 chemotaxis, colonization, and gene expression. *Infect. Immun*. 2007;75(9):4597-4607. DOI 10.1128/IAI.00630-07
- Botsford J.L., Harman J.G. Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol. Rev*. 1992;56(1):100-122. DOI 10.1128/mr.56.1.100-122.1992
- Chant E.L., Summers D.K. Indole signalling contributes to the stable maintenance of *Escherichia coli* multicopy plasmids. *Mol. Microbiol*. 2007;63(1):35-43. DOI 10.1111/j.1365-2958.2006.05481.x
- Chu W., Zere T.R., Weber M.M., Wood T.K., Whiteley M., Hidalgo-Romano B., Valenzuela E.J., McLean R.J.C. Indole production promotes *Escherichia coli* mixed-culture growth with *Pseudomonas aeruginosa* by inhibiting quorum signaling. *Appl. Environ. Microbiol*. 2012;78(2):411-419. DOI 10.1128/AEM.06396-11
- Dalebroux Z.D., Svensson S.L., Gaynor E.C., Swanson M.S. ppGpp conjures bacterial virulence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 2010;74(2):171-199. DOI 10.1128/MMBR.00046-09
- Dalebroux Z.D., Swanson M.S. ppGpp: magic beyond RNA polymerase. *Nat. Rev. Microbiol*. 2012;10(3):203-212. DOI 10.1038/nrmicro2720

- Datsenko K.A., Wanner B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000;97(12):6640-6645. DOI 10.1073/pnas.120163297
- Deutscher J., Francke C., Postma P.W. How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2006;70(4):939-1031. DOI 10.1128/MMBR.00024-06
- Duysak T., Tran T.T., Afzal A.R., Jung C. Fluorescence spectroscopic analysis of ppGpp binding to cAMP receptor protein and histone-like nucleoid structuring protein. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(15):7871. DOI 10.3390/ijms22157871
- Gosset G., Zhang Z., Nayyar S., Cuevas W.A., Saier M.H. Transcriptome analysis of Crp-dependent catabolite control of gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2004;186(11):3516-3524. DOI 10.1128/JB.186.11.3516-3524.2004
- Gutierrez-Ríos R.M., Freyre-Gonzalez J.A., Resendis O., Collado-Vides J., Saier M., Gosset G. Identification of regulatory network topological units coordinating the genome-wide transcriptional response to glucose in *Escherichia coli*. *BMC Microbiol.* 2007;7:53. DOI 10.1186/1471-2180-7-53
- Haurlyuk V., Atkinson G.S., Murakami K.S., Tenson T., Gerdes K. Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015;13(5):298-309. DOI 10.1038/nrmicro3448
- Hengge R., Häussler S., Pruteanu M., Stülke J., Tschowri N., Turgay K. Recent advances and current trends in nucleotide second messenger signaling in bacteria. *J. Mol. Biol.* 2019;431(5):908-927. DOI 10.1016/j.jmb.2019.01.014
- Hirakawa H., Inazumi Y., Masaki T., Hirata T., Yamaguchi A. Indole induces the expression of multidrug exporter genes in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 2005;55(4):1113-1126. DOI 10.1111/j.1365-2958.2004.04449
- Imamura R., Yamanaka K., Ogura T., Hiraga S., Fujita N., Ishihama A., Niki H. Identification of the *cpdA* gene encoding cyclic 3',5'-adenosine monophosphate phosphodiesterase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 1996;271(41):25423-25429. DOI 10.1074/jbc.271.41.25423
- Irving S.E., Corrigan R.M. Triggering the stringent response: signals responsible for activating (p)ppGpp synthesis in bacteria. *Microbiology*. 2018;164(3):268-276. DOI 10.1099/mic.0.000621
- Isaacs H., Chao D., Yanofsky C., Saier M.H. Mechanism of catabolite repression of tryptophanase synthesis in *Escherichia coli*. *Microbiology*. 1994;140(8):2125-2134. DOI 10.1099/13500872-140-8-2125
- Ishizuka H., Hanamura A., Inada T., Aiba H. Mechanism of the down-regulation of cAMP receptor protein by glucose in *Escherichia coli*: role of autoregulation of the *crp* gene. *EMBO J.* 1994;13(13):3077-3082. DOI 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06606.x
- Kawamura-Sato K., Shibayama K., Horii T., Iimura Y., Arakawa Y., Ohta M. Role of multiple efflux pumps in *Escherichia coli* in indole expulsion. *FEMS Microbiol. Lett.* 1999;179(2):345-352. DOI 10.1016/S0378-1097(99)00433-4
- Kim D., Sitepu I.R., Hashidokoa Y. Induction of biofilm formation in the betaproteobacterium *Burkholderia unamae* CK43B exposed to exogenous indole and gallic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013;79(16):4845-4852. DOI 10.1128/AEM.01209-13
- Kwan B.W., Osbourne D.O., Hu Y., Benedik M.J., Wood T.K. Phosphodiesterase DosP increases persistence by reducing cAMP which reduces the signal indole. *Biotechnol. Bioeng.* 2015;112(3):588-600. DOI 10.1002/bit.25456
- Lee J., Jayaraman A., Wood T.K. Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA. *BMC Microbiol.* 2007;7:42. DOI 10.1186/1471-2180-7-42
- Maisonneuve E., Gerdes K. Molecular mechanisms underlying bacterial persisters. *Cell*. 2014;157(3):539-548. DOI 10.1016/j.cell.2014.02.050
- Mechold U., Potrykus K., Murphy H., Murakami K.S., Cashel M. Differential regulation by ppGpp versus pppGpp in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(12):6175-6189. DOI 10.1093/nar/gkt302
- Oh Y.T., Lee K., Bari W., Raskin D.M., Yoon S.S. (p)ppGpp, a small nucleotide regulator, directs the metabolic fate of glucose in *Vibrio cholera*. *J. Biol. Chem.* 2015;290(21):13178-13190. DOI 10.1074/jbc.M115.640466
- Potrykus K., Cashel M. (p)ppGpp: still magical? *Annu. Rev. Microbiol.* 2008;62:35-51. DOI 10.1146/annurev.micro.62.081307.162903
- Rickenberg H.V. Cyclic AMP in prokaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.* 1974;28:353-369. DOI 10.1146/annurev.mi.28.100174.002033
- Ro C., Cashel M., Fernández-Col L. The secondary messenger ppGpp interferes with cAMP-CRP regulon by promoting CRP acetylation in *Escherichia coli*. *PLoS One*. 2021;16(10):e0259067. DOI 10.1371/journal.pone.0259067
- Sanchez-Vazquez P., Dewey C.N., Kitten N., Ross W., Gourse R.L. Genome-wide effects on *Escherichia coli* transcription from ppGpp binding to its two sites on RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2019;116(17):8310-8319. DOI 10.1073/pnas.1819682116
- Stewart V., Yanofsky C. Evidence for transcription antitermination control of tryptophanase operon expression in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 1985;164(2):731-740. DOI 10.1128/jb.164.2.731-740.1985
- Traxler M.F., Chang D.E., Conway T. Guanosine 3',5'-bispyrophosphate coordinates global gene expression during glucose-lactose diauxie in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006;103(7):2374-2379. DOI 10.1073/pnas.0510995103
- Traxler M.F., Summers S.M., Nguyen H., Zacharia V.M., Smith J.T., Conway T. The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 2008;68(5):1128-1148. DOI 10.1111/j.1365-2958.2008.06229.x
- Wood T.K., Knabel S.J., Kwan B.W. Bacterial persister cell formation and dormancy. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013;79(23):7116-7121. DOI 10.1128/AEM.02636-13
- Yanofsky C., Horn V., Gollnick P. Physiological studies of tryptophan transport and tryptophanase operon induction in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1991;173(19):6009-6017. DOI 10.1128/jb.173.19.6009-6017.1991
- Yoshimura-Suzuki T., Sagami I., Yokota N., Kurokawa H., Shimizu T. DOS(Ec), a heme-regulated phosphodiesterase, plays an important role in the regulation of the cyclic AMP level in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2005;187(19):6678-6682. DOI 10.1128/JB.187.19.6678-6682.2005
- Zhang T., Zhu J., Wei S., Luo Q., Li L., Li S., Tucker A., Shao H., Zhou R. The roles of RelA/(p)ppGpp in glucose-starvation induced adaptive response in the zoonotic *Streptococcus suis*. *Sci. Rep.* 2016;6:27169. DOI 10.1038/srep27169
- Zhou X., Meng X., Sun B. An EAL domain protein and cyclic AMP contribute to the interaction between the two quorum sensing systems in *Escherichia coli*. *Cell Res.* 2008;18(9):937-948. DOI 10.1038/cr.2008.67

ORCID

N.M. Kashevarova orcid.org/0000-0003-3751-8156
E.A. Khaova orcid.org/0000-0003-4457-2652
A.G. Tkachenko orcid.org/0000-0002-8631-8583

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (124020500028-4).


Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 14.07.2023. После доработки 13.11.2023. Принята к публикации 15.11.2023.

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

Регуляторные эффекты полиаминов и индола на экспрессию факторов гибернации рибосом у *Escherichia coli* на уровне трансляции

Е.А. Хаова , А.Г. Ткаченко


Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, Россия
 akkuzina-elena510@mail.ru

Аннотация. Полиамины и индол – регуляторные молекулы, которые участвуют в адаптации к стрессу у бактерий, включая регуляцию генной экспрессии. Гены, трансляция которых находится под регуляторным влиянием полиаминов, составляют полиаминовый модулон. Ранее нами показано, что полиамины стимулируют транскрипцию генов, кодирующих факторы гибернации рибосом RMF, RaiA, SRA, EttA, RsfS у *Escherichia coli*, а эффект индола ограничивался лишь двумя из них – *raiA* и *rmf*. Факторы гибернации рибосом обратимо ингибируют трансляцию в условиях стресса с целью экономии клеточных ресурсов, играя ключевую роль в выживании бактерий, в том числе при воздействии антибиотиков. Данная работа посвящена изучению влияния индола на экспрессию генов *raiA* и *rmf* на трансляционном уровне, а также регуляторных эффектов полиаминов путресцина, кадаверина и спермидина на трансляцию генов *rmf*, *raiA*, *sra*, *ettA*, *rsfS*. Проанализировав первичные структуры мРНК, а также полученные с помощью программы RNAfold модели вторичных структур мРНК, мы установили, что все исследуемые гены имеют специфические признаки полиаминового модулона. Для изучения влияния полиаминов и индола на трансляцию исследуемых генов были сконструированы трансляционные репортерные *lacZ*-слияния с использованием pRS552/λRS45 системы. Согласно полученным результатам, полиамины стимулируют экспрессию «стационарно-фазных» генов *rmf*, *raiA*, *sra*, но не оказывают влияния на трансляцию генов *ettA* и *rsfS*, наибольшая экспрессия которых наблюдается в экспоненциальной фазе роста. Стимулирующий эффект специфичен для различных полиаминов и во всех случаях наблюдается в стационарной фазе, когда клетки подвержены множественному стрессорному воздействию. Кроме того, полученные данные демонстрируют значительный ингибирующий эффект индола на экспрессию *raiA* и *rmf* на уровне трансляции, несмотря на его стимулирующее действие на транскрипцию данных генов, что может являться признаком функционирования посттранскрипционного механизма их регуляции. Ключевые слова: полиамины; полиаминовый модулон; индол; факторы гибернации рибосом; репортерные генные слияния; генная экспрессия; адаптация к стрессу.

Для цитирования: Хаова Е.А., Ткаченко А.Г. Регуляторные эффекты полиаминов и индола на экспрессию факторов гибернации рибосом у *Escherichia coli* на уровне трансляции. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(1):24-32. DOI 10.18699/vjgb-24-04

Effects of polyamines and indole on the expression of ribosome hibernation factors in *Escherichia coli* at the translational level

Е.А. Khaova , A.G. Tkachenko

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia
 akkuzina-elena510@mail.ru

Abstract. Polyamines and indole are small regulatory molecules that are involved in the adaptation to stress in bacteria, including the regulation of gene expression. Genes, the translation of which is under the regulatory effects of polyamines, form the polyamine modulon. Previously, we showed that polyamines upregulated the transcription of genes encoding the ribosome hibernation factors RMF, RaiA, SRA, EttA and RsfS in *Escherichia coli*. At the same time, indole affected the expression at the transcriptional level of only the *raiA* and *rmf* genes. Ribosome hibernation factors reversibly inhibit translation under stress conditions, including exposure to antibiotics, to avoid resource waste and to conserve ribosomes for a quick restoration of their functions when favorable conditions occur. In this work, we have studied the influence of indole on the expression of the *raiA* and *rmf* genes at the translational level and regulatory effects of the polyamines putrescine, cadaverine and spermidine on the translation of the *rmf*, *raiA*, *sra*, *ettA* and *rsfS* genes. We have analyzed the mRNA primary structures of the studied genes and the predicted mRNA secondary structures obtained by using the RNAfold program for the availability of polyamine modulon

features. We have found that all of the studied genes contain specific features typical of the polyamine modulon. Furthermore, to investigate the influence of polyamines and indole on the translation of the studied genes, we have constructed the translational reporter *lacZ*-fusions by using the pRS552/ARS45 system. According to the results obtained, polyamines upregulated the expression of the *rmf*, *raiA* and *sra* genes, the highest expression of which was observed at the stationary phase, but did not affect the translation of the *ettA* and *rsfS* genes, the highest expression of which took place during the exponential phase. The stimulatory effects were polyamine-specific and observed at the stationary phase, when bacteria are under multiple stresses. In addition, the data obtained demonstrated that indole significantly inhibited translation of the *raiA* and *rmf* genes, despite the stimulatory effect on their transcription. This can suggest the activity of a posttranscriptional regulatory mechanism of indole on gene expression. Key words: polyamines; polyamine modulon; indole; ribosome hibernation factors; reporter gene fusions; gene expression; adaptation to stress.

For citation: Khaova E.A., Tkachenko A.G. Effects of polyamines and indole on the expression of ribosome hibernation factors in *Escherichia coli* at the translational level. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(1):24-32. DOI 10.18699/vjgb-24-04

Введение

Как полиамины, так и индол, будучи нормальными метаболитами бактерий, участвуют во множестве клеточных процессов, включая адаптацию к стрессам, антибиотикоустойчивость, биопленкообразование, quorum sensing, бактериальную персистенцию (Rhee et al., 2007; Shah, Swiatlo, 2008; Tkachenko et al., 2012, 2014; Gaimster et al., 2014; Lee et al., 2015; Miller-Fleming et al., 2015; Michael, 2018; Kim et al., 2020; Zarkan et al., 2020; Lang et al., 2021). Биогенные полиамины представляют собой алифатические поликатионы, которые синтезируются из аминокислот и присутствуют в клетках всех групп живых организмов. Бактериями преимущественно продуцируются путресцин, кадаверин и спермидин (Tabor C.W., Tabor H., 1985; Michael, 2016). В свою очередь индол – это гетероциклическое ароматическое соединение, продукт расщепления аминокислоты триптофана, который продуцируется многими видами бактерий (Zarkan et al., 2020).

Одним из путей реализации регуляторных эффектов данных метаболитов является модуляция генной экспрессии (Igarashi, Kashiwagi, 2006, 2018; Kusano et al., 2008; Shah, Swiatlo, 2008; Miller-Fleming et al., 2015; Zarkan et al., 2020; Lang et al., 2021). В клетке полиамины присутствуют в основном в виде комплексов с РНК, в том числе с мРНК. Совокупность генов, экспрессия которых стимулируется полиаминами на трансляционном уровне, принято обозначать термином «полиаминовый модулон» (Igarashi, Kashiwagi, 2006, 2018). В то же время есть данные, что полиамины, как и индол, могут действовать также на других уровнях генной экспрессии (Miller-Fleming et al., 2015; Lang et al., 2021; Хаова и др., 2022). При этом сигнальные молекулы способны формировать единые регуляторные сети, реализующие адаптивный ответ на множественные стрессы (Ткаченко, 2012). В последние годы в литературе появляются данные о взаимном влиянии индола и полиаминов в метаболизме *Escherichia coli*. В частности, экзогенный индол способен повышать внутриклеточное содержание путресцина и спермидина, а добавка полиамина спермина, синтезируемого главным образом эукариотами, может увеличивать содержание индола в среде (Нестерова и др., 2021). Функционирование регуляторных сетей направлено на оптимизацию реакции бактериальных клеток на изменения условий внешней среды (Ткаченко, 2012). Известно, что полиамины и индол оказывают множество различных эффектов на клеточные

процессы, однако их молекулярные мишени и механизм действия остаются не до конца изученными (Rhee et al., 2007; Kusano et al., 2008; Shah, Swiatlo, 2008; Lee et al., 2015; Miller-Fleming et al., 2015; Michael, 2018; Zarkan et al., 2020).

Ранее нами исследовано влияние полиаминов и индола на экспрессию ряда генов, ответственных за адаптацию к стрессу у *E. coli*, на транскрипционном уровне; среди них гены *rmf*, *raiA*, *sra*, *ettA*, *rsfS*, кодирующие факторы гибернации рибосом (Хаова и др., 2022). Функция данных факторов заключается в обратимом ингибировании рибосом в условиях истощения питательных веществ и других стрессов в целях экономии ресурсов клетки и консервации рибосом для быстрого восстановления их функционирования при наступлении благоприятных условий. При этом действие факторов гибернации рибосом может быть связано с переходом бактериальной клетки в дормантное, т. е. метаболически неактивное состояние, характеризующееся отсутствием роста и деления (Prossliner et al., 2018; Trösch, Willmund, 2019; Усачев и др., 2020).

С дормантностью тесно связано формирование персистенции. Персистеры – это малочисленная субпопуляция бактериальных клеток, которые находятся в дормантном состоянии, что дает им возможность переживать воздействие летальных доз антибиотиков ввиду отсутствия ростовых процессов как мишеней для атаки. Такая форма устойчивости к антибиотикам, в отличие от антибиотикорезистентности, имеет фенотипическую природу и зависит от множества связанных друг с другом факторов. После снятия воздействия антибиотика персистерные клетки могут возобновлять рост, благодаря чему являются одной из причин рецидивов инфекционных заболеваний (Lewis, 2010; Zhang, 2014; Balaban et al., 2019). Кроме того, персистеры, способные мутировать и переживать воздействие высоких концентраций антибиотиков, могут служить «резервуаром» для возникновения резистентных мутантов (Zhang, 2014; Ткаченко, 2018). Хотя молекулярно-генетические механизмы персистенции до сих пор мало изучены, в последнее время активно разрабатывается модель формирования персистеров как результат функционирования факторов гибернации рибосом (Song, Wood, 2020). Кроме того, опубликованы данные, указывающие на участие в персистенции полиаминов и индола (Tkachenko et al., 2014, 2017; Zarkan et al., 2020; Lang et al., 2021). Можно предположить вовлеченность последних в формирование

Таблица 1. Штаммы *E. coli*, использованные в работе

Штамм <i>E. coli</i>	Генотип	Источник
BW25141	F-, Δ(<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB-3</i>), Δ(<i>phoBphoR</i>)580, λ- <i>galU</i> 95, Δ <i>uidA3::pir+</i> , <i>recA1</i> , <i>endA9</i> (<i>del-ins</i> :: <i>FRT</i> , <i>rph1</i> , Δ(<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR514</i>	Datsenko, Wanner, 2000
BW25141 <i>rmf::lacZ</i>	Как BW25141, но λRS45 <i>rmf39::lacZ</i> (<i>Hyb</i>)	Данная работа
BW25141 <i>raiA::lacZ</i>	Как BW25141, но λRS45 <i>raiA174::lacZ</i> (<i>Hyb</i>)	
BW25141 <i>sra::lacZ</i>	Как BW25141, но λRS45 <i>sra102::lacZ</i> (<i>Hyb</i>)	
BW25141 <i>ettA::lacZ</i>	Как BW25141, но λRS45 <i>ettA663::lacZ</i> (<i>Hyb</i>)	
BW25141 <i>rsfS::lacZ</i>	Как BW25141, но λRS45 <i>rsfS81::lacZ</i> (<i>Hyb</i>)	

персистенции посредством модуляции экспрессии факторов гибернации рибосом. Это обусловлено способностью полиаминов стимулировать транскрипцию генов *rmf*, *raiA*, *sra*, *ettA*, *rsfS*, кодирующих факторы гибернации рибосом, тогда как индол участвует в повышении экспрессии двух из них, *raiA* и *rmf* (Хаова и др., 2022).

Известно, что факторы гибернации рибосом имеют различные механизмы действия. Если RMF (альтернативные названия фактора – Res, RimF) совместно с другим фактором HPF (альтернативное название – YhbH) формирует неактивные 100S димеры рибосом, то RaiA (альтернативные названия – YfiA, pY, Urf1) связывает и блокирует активные центры 70S рибосом, SRA (альтернативные названия – RpsV, Protein D) ингибирует трансляцию, взаимодействуя с 30S субъединицей, EttA (альтернативное название – YjjK) инактивирует рибосомы в ответ на низкий уровень АТФ в клетке, а RsfA (альтернативные названия фактора – YbeB, RsfA) препятствует взаимодействию большой и малой рибосомальных субъединиц (Prossliner et al., 2018).

Целью данной работы было изучение влияния индола на экспрессию генов *raiA* и *rmf* на трансляционном уровне, а также регуляторных эффектов полиаминов путресцина, кадаверина и спермидина на трансляцию генов *rmf*, *raiA*, *sra*, *ettA* и *rsfS*.

Материалы и методы

Штаммы и условия культивирования. Штаммы *E. coli*, использованные в работе, представлены в табл. 1. Клетки культивировали в термостатируемом шейкере GFL-1092 (GFL) при температуре +37 °C с перемешиванием при 120 об/мин на богатой среде LB (Sigma) или на синтетической минеральной среде M9 (+0.4 % глюкозы), с добавлением канамицина, 25 мкг/мл (AppliChem), и/или ампициллина, 50 мкг/мл (AppliChem), при необходимости. Для рутинного культивирования клеток и при генетическом конструировании использовали среду LB.

В экспериментах по изучению генной экспрессии клетки штаммов, несущих *lacZ*-слияния, культивировали на среде M9 (+0.4 % глюкозы). В качестве экзогенных добавок полиаминов, произведенных на 2 ч культивирования, использовали гидрохлориды путресцина, кадаверина и спермидина (Sigma) в концентрациях, указанных на рисунках. Добавку триптофана (AppliChem) в концентрации 2 мМ производили, как описано ранее (Хаова и др., 2022).

Конструирование трансляционных *lacZ*-слияний.

Штаммы BW25141, несущие в хромосоме *lacZ*-слияние, получены с использованием генетических векторов pRS552 и λRS45 (Simons et al., 1987). Праймеры, примененные в работе, приведены в табл. 2. Поиск нуклеотидных последовательностей для подбора праймеров производили в базах данных GenBank и EcoCyc (Keseler et al., 2021). Выравнивание подобранных праймеров осуществляли, используя ресурс Primer-Blast.

Вектор pRS552 содержит два уникальных сайта рестрикции EcoRI и BamHI, по которым производилось молекулярное клонирование. Исключением стало слияние *raiA::lacZ*, которое получено при клонировании только по одному сайту BamHI, поскольку в промоторе гена *raiA* нативно присутствует сайт рестрикции EcoRI; при этом плазмида pRS552 была обработана ферментом щелочной фосфатазой. Из плазмиды pRS552 репортерные слияния перенесены в хромосому штамма BW25141 с помощью фага λRS45 посредством гомологической рекомбинации. Репортерные слияния в хромосоме штаммов присутствуют в виде единичной копии в составе профага.

Промежуточные и окончательные генетические конструкции верифицированы при помощи ПЦР и секвенированы. Секвенирование проводили на базе компании «Евроген» (Москва, Россия). При анализе результатов секвенирования выравнивание нуклеотидных последовательностей выполняли с помощью ресурса Blastn. Все

Таблица 2. Праймеры, использованные для конструирования трансляционных *lacZ*-слияний

Ген	Последовательность праймеров
<i>rmf</i>	5'-CGAATTCGGTATGTTGCCTGAG-3' 5'-GTGGATCCTGTGCCCGTTC-3'
<i>raiA</i>	5'-ATAATCGGATCCCGTTTGGTCCGTATT-3' 5'-ACCAGAGGATCCTTAGGTGTATTGAT-3'
<i>sra</i>	5'-ATGGATTGGAATCTTGTCTCT-3' 5'-GGTTGGATCCTTTACTACGCT-3'
<i>ettA</i>	5'-TTTTGAATTCTACTGCGAGGGTGAT-3' 5'-CGGGATCCAGGAAGTAACGGT-3'
<i>rsfS</i>	5'-ATATTGAATTCGTCAGCCATCAGGGTGTA-3' 5'-TTGGGATCCACGCTAAGGCGATG-3'

использованные ферменты произведены Thermo Fisher Scientific.

Активность β-галактозидазы. Генную экспрессию детектировали посредством измерения активности β-галактозидазы методом Миллера (Miller, 1972).

Предсказание вторичных структур мРНК осуществляли при помощи программы RNAfold (Lorenz et al., 2011).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета стандартных программ Statistica for Windows 5.0 (StatSoft Inc., 1995). На рисунках приведены средние значения из серии однотипных независимых экспериментов (не менее 3), вертикальными отрезками обозначены величины среднеквадратического отклонения.

Результаты

Полиамины участвуют во множестве клеточных процессов, в том числе посредством регуляции генной экспрессии. Гены, экспрессия которых стимулируется полиаминами на трансляционном уровне, объединяют в структуру «полиаминовый модулон». Выделяют различные механизмы, благодаря которым полиамины способны модулировать генную экспрессию на трансляционном уровне, и, соответственно, специфические особенности в структуре мРНК, характерные для таких генов. Полиамины преимущественно действуют на стадии инициации трансляции. Во-первых, данные метаболиты способствуют инициации трансляции генов, в структуре мРНК которых содержится минорный, неэффективный старт-кодон. Во-вторых, полиамины стимулируют протекание инициации трансляции генов, в структуре мРНК которых необычно большое расстояние между последовательностью Шайна–Дальгарно и старт-кодоном. За счет введения изгиба мРНК в данной области полиамины способны сокращать это расстояние (Igarashi, Kashiwagi, 2006, 2018). В-третьих, полиамины способны оказывать релаксирующее действие на вторич-

ные “bulged-out” (выбухающие) структуры, которые, располагаясь между последовательностью Шайна–Дальгарно и старт-кодоном, препятствуют инициации трансляции (Lightfoot, Hall, 2014).

Нами проанализированы структуры мРНК генов *rmf*, *raiA*, *sra*, *ettA*, *rsfS* с точки зрения наличия специфических особенностей, характерных для генов полиаминового модулона, с использованием баз данных GenBank и EcoСyc (Keseler et al., 2021) и сведений литературы, а также полученных моделей вторичных структур мРНК с помощью программы RNAfold (Lorenz et al., 2011). Согласно (Sakamoto et al., 2020), для *rmf* мРНК характерно необычно большое расстояние между последовательностью Шайна–Дальгарно и старт-кодоном и наличие “bulged-out” структуры в этой области. Однако информация об остальных генах гибернации рибосом в литературе отсутствует. Анализ первичной структуры мРНК генов показал, что *ettA* мРНК и *rsfS* мРНК содержат минорные старт-кодоны GUG и UUG соответственно. Полученные модели вторичных структур мРНК показали, что для двух генов, *raiA* и *sra*, “bulged-out” структура может с высокой вероятностью встречаться в интересующей области (рис. 1). Модель вторичной структуры *raiA* мРНК демонстрирует наличие “bulged-out”-структуры на расстоянии 3 нуклеотидов до старт-кодона. Согласно модели вторичной структуры *sra* мРНК, часть последовательности Шайна–Дальгарно входит в состав “bulged-out” структуры. Таким образом, исследуемые гены имеют потенциальные признаки полиаминового модулона.

С помощью полученных нами генно-инженерных штаммов, несущих *lacZ*-слияния, было исследовано влияние добавок полиаминов путресцина, кадаверина и спермидина в различных концентрациях на экспрессию генов *rmf*, *raiA*, *sra*, *ettA*, *rsfS* на трансляционном уровне. Результаты исследования демонстрируют, что экспрессия гена *rmf* значительно стимулируется путресцином в кон-

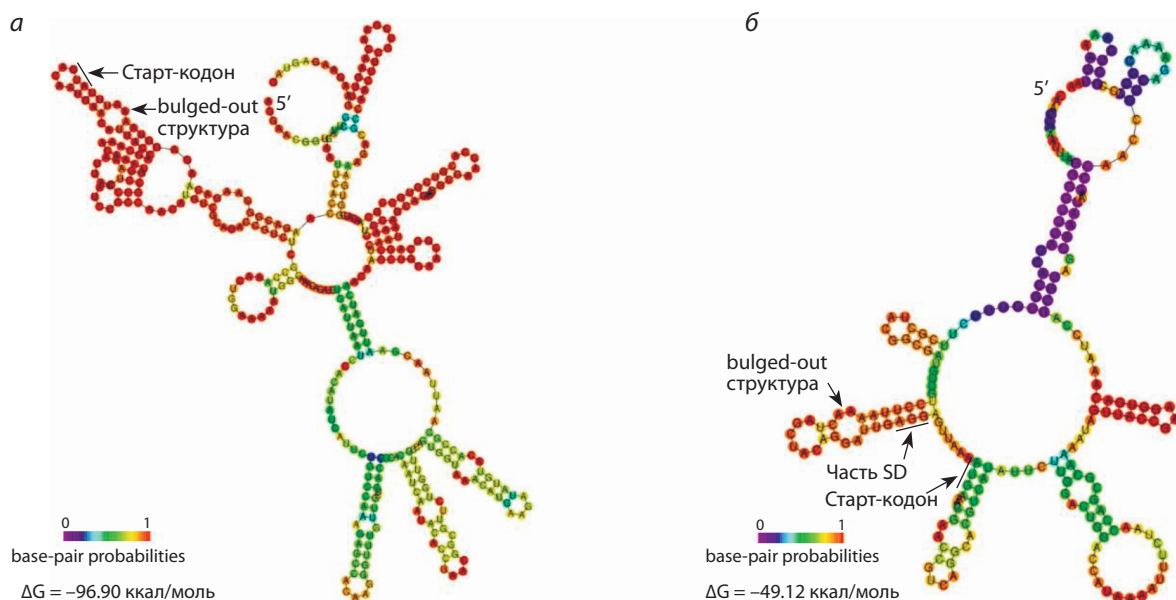


Рис. 1. Модели вторичных структур мРНК генов *raiA* (а) и *sra* (б), полученных с помощью программы RNAfold (Lorenz et al., 2011). SD – последовательность Шайна–Дальгарно.

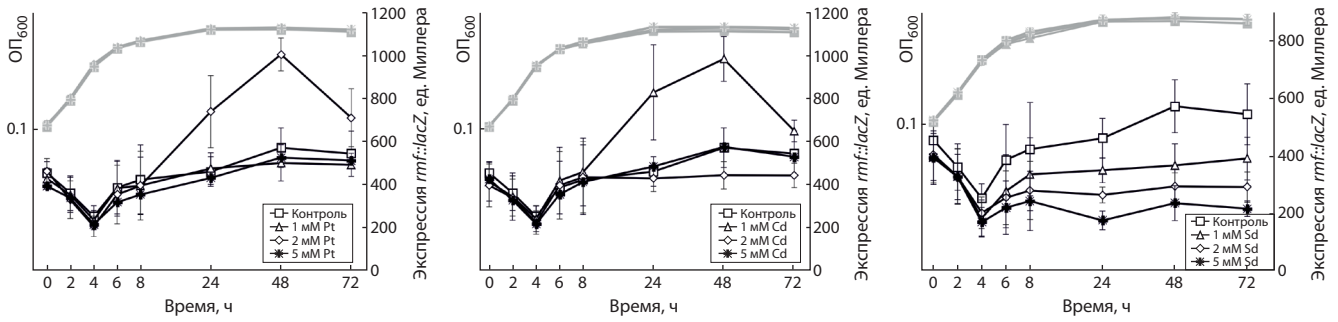


Рис. 2. Влияние добавок путресцина, кадаверина и спермидина в различных концентрациях на экспрессию гена *rnf* на трансляционном уровне.

Здесь и далее: линии черного цвета – экспрессия, серого – оптическая плотность; Pt – путресцин, Cd – кадаверин, Sd – спермидин; OP₆₀₀ – оптическая плотность при 600 нм.

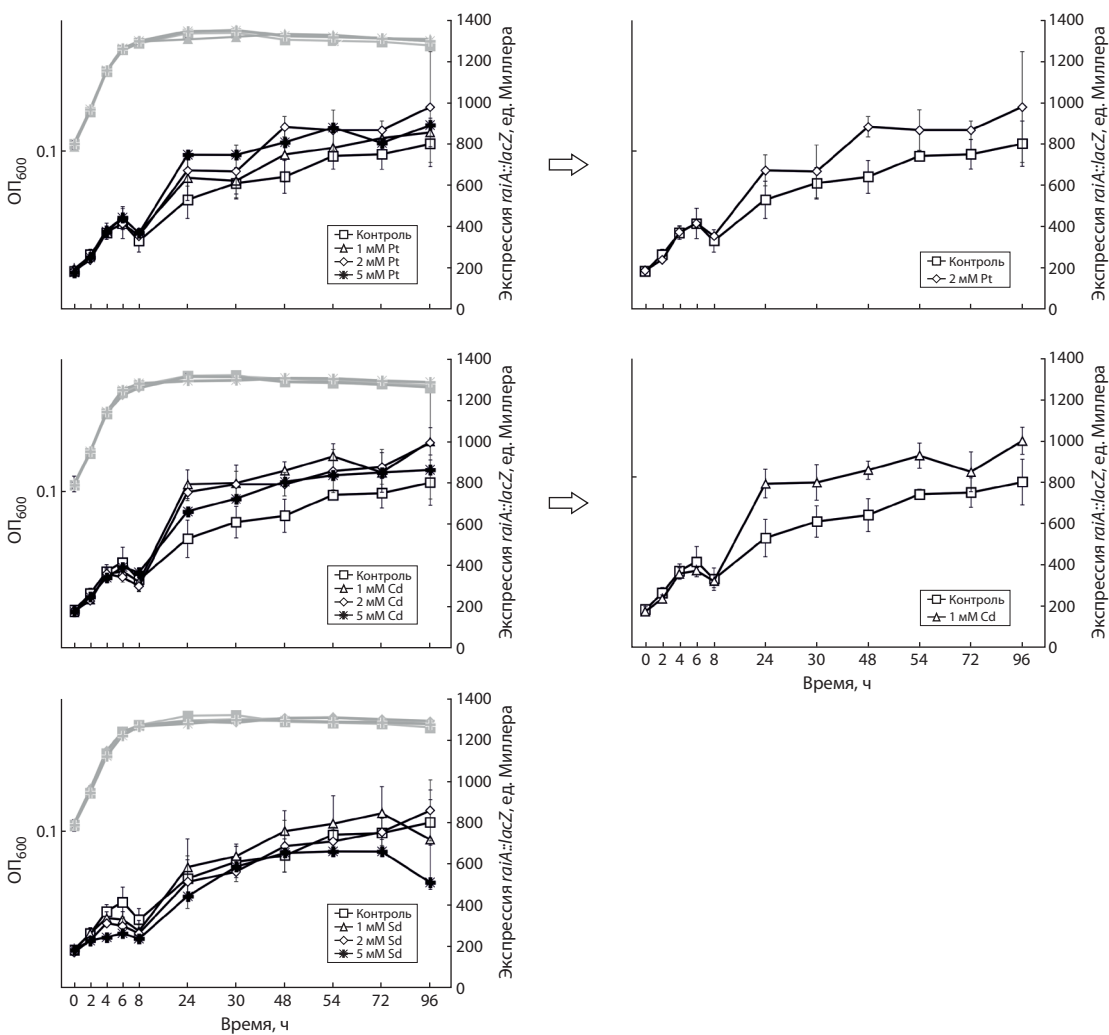


Рис. 3. Влияние добавок путресцина, кадаверина и спермидина в различных концентрациях на экспрессию гена *raiA* на трансляционном уровне.

центрации 2 мМ и кадаверином в концентрации 1 мМ (рис. 2). Наибольший стимулирующий эффект наблюдается на 48 ч культивирования в стационарной фазе. Напротив, спермидин ингибирует экспрессию *rnf* пропорционально концентрации добавленного полиамина. Нативная экспрессия гена *rnf* без добавок держится на стабильно высоком уровне в течение стационарной фазы.

Согласно результатам исследования, экспрессия гена *raiA* находится на низком уровне в ходе экспоненциального роста и возрастает в стационарной фазе (рис. 3). Добавки путресцина в концентрации 2 мМ и кадаверина в концентрации 1 мМ лишь незначительно повышают экспрессию *raiA* в стационарной фазе, тогда как спермидин не оказывает видимого влияния.

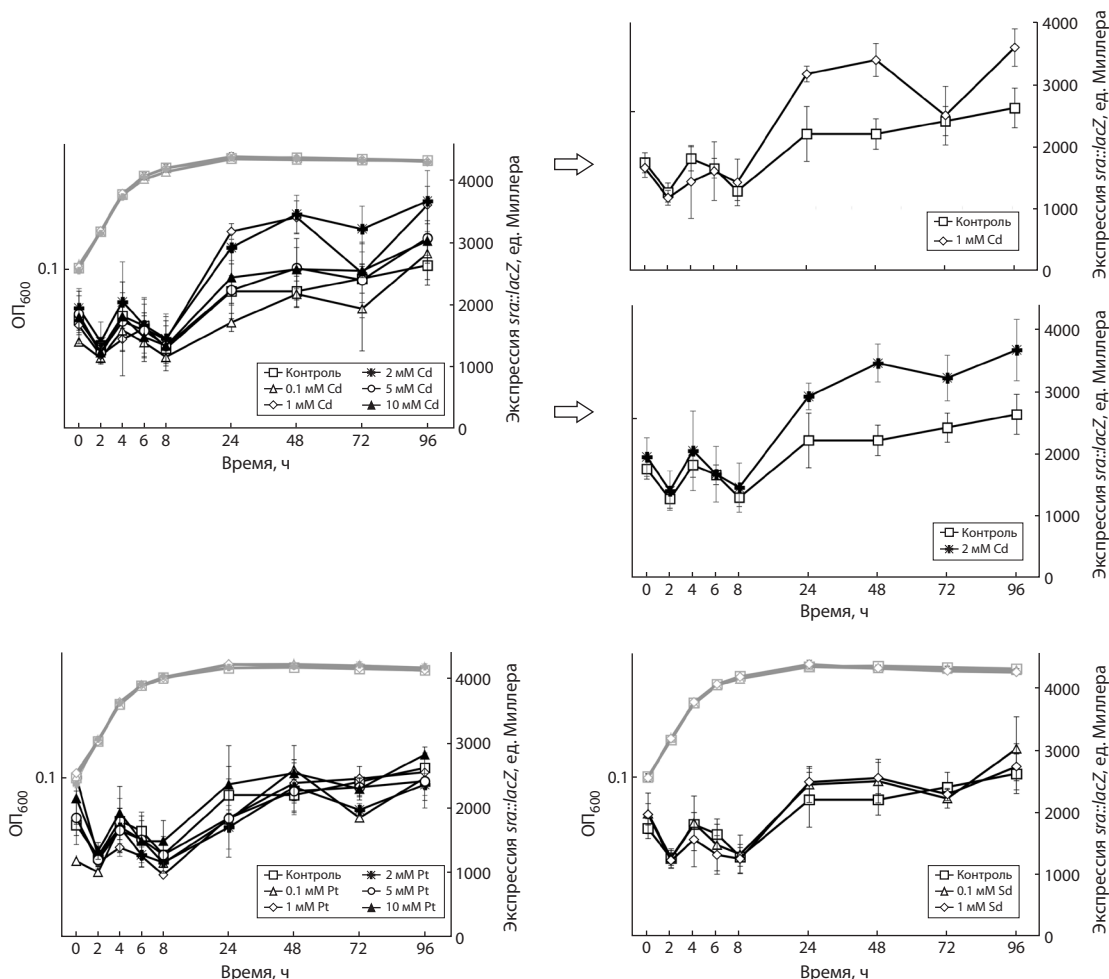


Рис. 4. Влияние добавок путресцина, кадаверина и спермидина в различных концентрациях на экспрессию гена *sra* на трансляционном уровне.

Экспрессия гена *sra* также находится на постоянно высоком уровне в стационарной фазе (рис. 4). Его экспрессию в значительной степени повышает добавка кадаверина в концентрациях 1 и 2 мМ. При этом максимальный эффект наблюдается в стационарной фазе на 48 ч культивирования. Добавки путресцина и спермидина не влияли на экспрессию *sra*.

В отличие от остальных генов, наибольшая экспрессия генов *ettA* и *rsfS* наблюдается в экспоненциальной фазе роста (рис. 5). Максимальная экспрессия у *ettA* приходится на 4 ч культивирования, а у *rsfS* – на 1–3 ч. Добавки полиаминов не оказывали влияния на экспрессию данных генов.

Ранее нами показано, что экзогенная добавка 2 мМ триптофана на 0 ч культивирования эквивалентно конвертируется в индол на 24 ч. Содержание индола в течение 7 ч детектировалось на низком уровне, сходном с контролем, и резко возрастало на 24 ч (Хаова и др., 2022), что связано с RpoS-зависимым характером экспрессии триптофаназы TnaA, катализирующей образование индола из триптофана (Li, Young, 2013; Gaimster et al., 2014). В данных условиях была изучена экспрессия ряда генов, ответственных за адаптацию к стрессу у *E. coli*, на транскрипционном уровне. Только у двух из них, *raiA* и *rmf*,

экспрессия возрастала в ответ на повышение уровня индола (Хаова и др., 2022). В связи с этим мы исследовали влияние индола на экспрессию данных генов при тех же условиях на трансляционном уровне (рис. 6). Полученные результаты демонстрируют, что несмотря на стимулирующий эффект на уровне транскрипции, экспрессия обоих генов на трансляционном уровне существенно снижалась при повышении содержания индола, начиная с 24 ч культивирования.

Обсуждение

Функции факторов гибернации рибосом состоят в обратимом ингибировании такого ресурсоемкого процесса, как трансляция, в условиях голодания по источникам питания и воздействия других стрессов. Известно, что данные факторы находятся под контролем мастер-регуляторов (p)rrpGpp, RpoS, CRP-cAMP, ответственных за адаптацию бактерий к множественному стрессорному воздействию в стационарной фазе. В связи с этим факторы гибернации рибосом функционируют главным образом в этот период. Однако в ходе экспоненциального роста ими также поддерживается базовый уровень неактивных рибосом (Prossliner et al., 2018). Результаты исследования показывают, что наибольшая экспрессия генов *rmf*, *raiA* и *sra* наблюдается

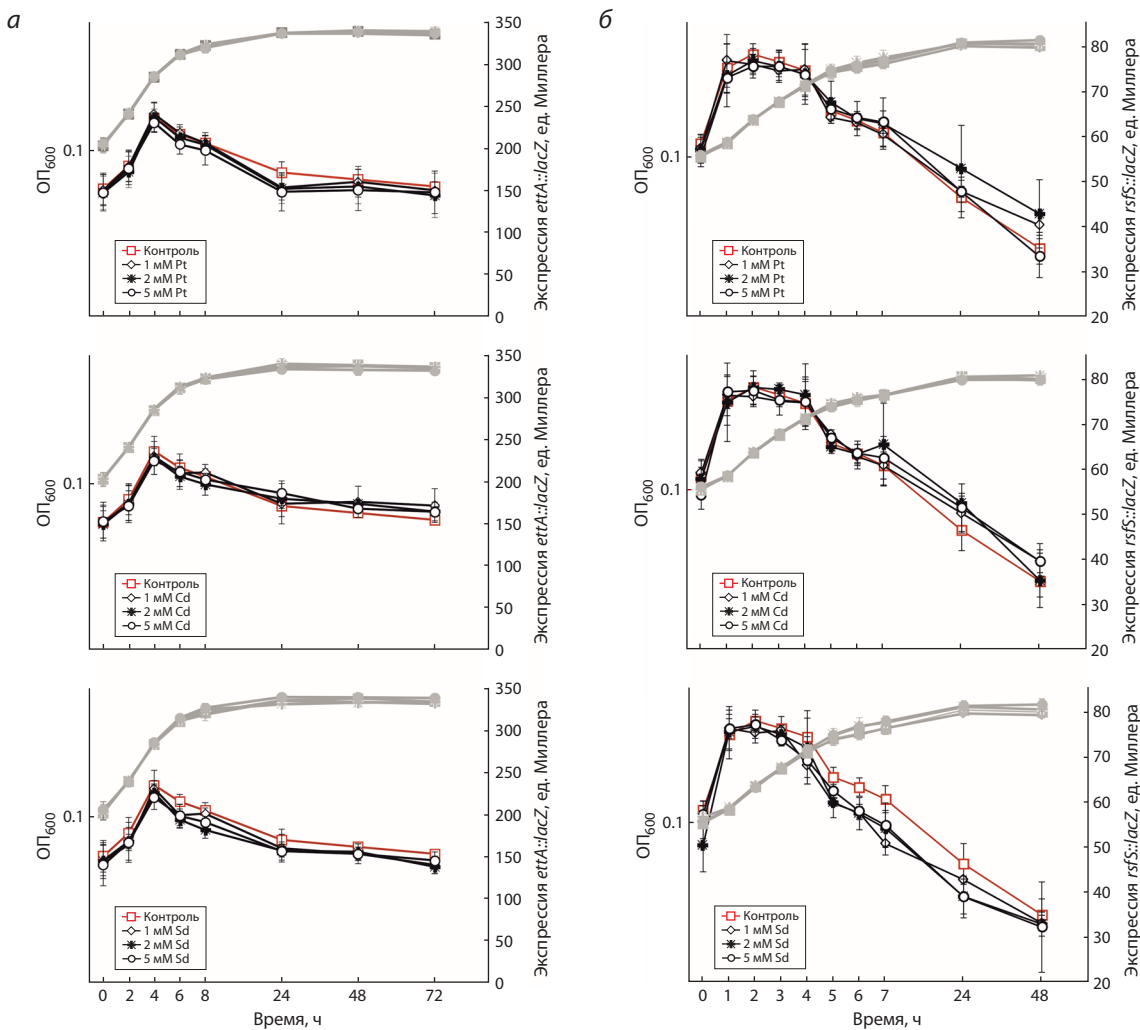


Рис. 5. Влияние добавок путресцина, кадаверина и спермидина в различных концентрациях на экспрессию гена *ettA* (а) и *rsfS* (б) на трансляционном уровне.

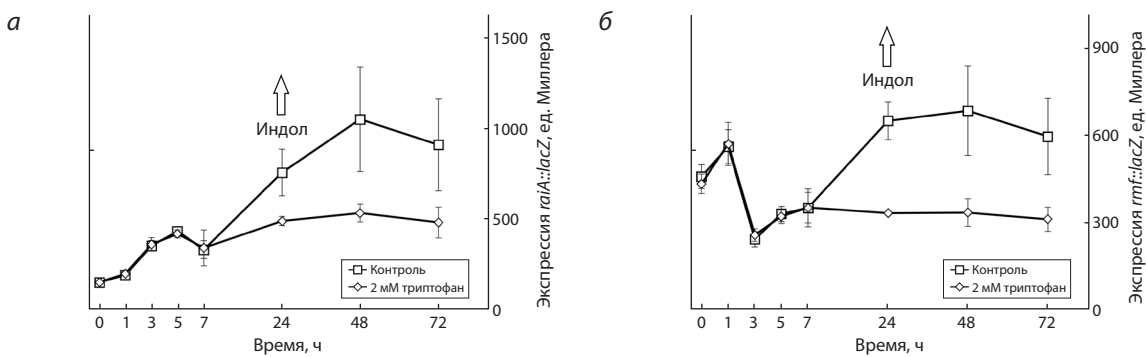


Рис. 6. Влияние индола на экспрессию генов *raiA* (а) и *rmf* (б) на трансляционном уровне.

именно в стационарной фазе (табл. 3). Напротив, гены *ettA* и *rsfS* демонстрируют максимальную экспрессию в ходе экспоненциального роста. При этом полиамины влияют на экспрессию «стационарно-фазных» генов *rmf*, *raiA* и *sra*, но не *ettA* и *rsfS*. Во всех случаях стимулирующий эффект полиаминов наблюдается также в стационарной фазе. То есть полиамины могут индуцировать экспрессию ряда ге-

нов, ответственных за адаптацию к стрессу, в том числе *rmf*, *raiA* и *sra*, формируя адаптивное состояние клетки к стационарной фазе. Кроме того, стимулирующий эффект специфичен по типу полиамина: экспрессия каждого гена зависит от определенных полиаминов. Вместе с тем путресцин и кадаверин преимущественно положительно модулировали генную экспрессию.

Таблица 3. Эффекты полиаминов на экспрессию генов *rmf*, *raiA*, *sra*, *ettA*, *rsfS* на трансляционном уровне

Параметры	<i>rmf</i>			<i>raiA</i>			<i>sra</i>			<i>ettA</i>			<i>rsfS</i>		
	Pt	Cd	Sd	Pt	Cd	Sd	Pt	Cd	Sd	Pt	Cd	Sd	Pt	Cd	Sd
Эффект добавки ПА	+	+	-	+	+	Нет	Нет	+	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
Фаза максимальной экспрессии гена	Стационарная			Стационарная			Стационарная			Экспоненциальная			Экспоненциальная		
Потенциальные признаки ПА модулона	"Bulged-out" структура и необычно большое расстояние между старт-кодоном и SD			"Bulged-out" структура			"Bulged-out" структура			Минорный старт-кодон			Минорный старт-кодон		

Примечание. «+» – стимулирующий эффект, «-» – ингибирующий эффект, «нет» – нет эффекта. ПА – полиамины/полиаминовый; Pt – путресцин; Cd – кадаверин; Sd – спермидин; SD – последовательность Шайна-Дальгарно.

Таким образом, гены гибернации рибосом могут находиться под контролем различных мастер-регуляторов, а регуляторные сети могут оказывать взаимное влияние друг на друга. Полиамины и индол участвуют в регуляции сходных клеточных процессов, что подтверждается данными об их взаимодействии (Нестерова и др., 2021). Ранее в исследованиях на транскрипционном уровне нами показано, что точкой пересечения регуляторных сетей, контролируемых полиаминами и индолом, могут быть основные факторы гибернации рибосом у *E. coli* RaiA и RMF (Хаова и др., 2022). Результаты исследований на уровне и транскрипции, и трансляции свидетельствуют о полиамин-зависимом характере экспрессии соответствующих генов. Индол стимулировал экспрессию данных генов на уровне транскрипции (Хаова и др., 2022), однако результаты, полученные в настоящей работе, демонстрируют его значительное ингибирующее действие на трансляционном уровне при тех же условиях. Это указывает на возможность функционирования посттранскрипционного механизма регуляции генной экспрессии.

Заключение

Анализ структуры мРНК генов *rmf*, *raiA*, *sra*, *ettA*, *rsfS*, кодирующих факторы гибернации рибосом, а также полученные модели их вторичных структур показали, что исследуемые гены имеют потенциальные признаки полиаминового модулона. В связи с этим нами сконструированы штаммы, несущие соответствующие трансляционные *lacZ*-слияния, и изучена экспрессия генов при добавке поликатионов путресцина, кадаверина и спермидина в различных концентрациях и без добавок. Впервые гены гибернации рибосом, за исключением *rmf*, исследованы на способность данных метаболитов оказывать эффект на их экспрессию. Стимулирующий эффект полиаминов наблюдается в стационарной фазе и является типоспецифичным. При этом они влияли на экспрессию только генов *rmf*, *raiA* и *sra*, активных в стационарной фазе, но не *ettA* и *rsfS*, у которых наибольшая экспрессия наблюдается в ходе экспоненциального роста. Кроме того, индол ингибирует экспрессию генов *raiA* и *rmf* на уровне трансляции, несмотря на положительную модуляцию на транскрипционном уровне, что указывает на возможность посттранскрипционной регуляции генной экспрессии. Полученные результаты открывают перспективы для дальнейших исследований в данном направлении.

Список литературы / References

- Нестерова Л.Ю., Ахова А.В., Ткаченко А.Г. Влияние индола на содержание клеточных полиаминов и антибиотикоустойчивость *Escherichia coli*. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология*. 2021;76(4):219-224
- [Nesterova L.Y., Akhova A.V., Tkachenko A.G. Influence of indole on intracellular polyamines and antibiotic susceptibility of *Escherichia coli*. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16. Biologiya = Herald of Moscow University. Series 16. Biology*. 2021;76(4):219-224 (in Russian)]
- Ткаченко А.Г. Молекулярные механизмы стрессорных ответов у микроорганизмов. Екатеринбург, 2012
- [Tkachenko A.G. Molecular Mechanisms of Stress Responses in Microorganisms. Yekaterinburg, 2012 (in Russian)]
- Ткаченко А.Г. Стрессорные ответы бактериальных клеток как механизм развития толерантности к антибиотикам (обзор). *Прикл. биохимия и микробиология*. 2018;54(2):110-133. DOI 10.7868/S0555109918020022
- [Tkachenko A.G. Stress responses of bacterial cells as mechanisms of development of antibiotic tolerance (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2018;54(2):108-127. DOI 10.1134/S0003683818020114]
- Усачев К.С., Юсупов М.М., Валидов Ш.З. Гибернация – стадия функционирования рибосом. *Биохимия*. 2020;85(11):1690-1700. DOI 10.31857/S0320972520110111
- [Usachev K.S., Yusupov M.M., Validov Sh.Z. Hibernation as a stage of ribosome functioning. *Biochemistry (Moscow)*. 2020;85(11):1434-1442. DOI 10.1134/S0006297920110115]
- Хаова Е.А., Кашеварова Н.М., Ткаченко А.Г. Регуляторный эффект полиаминов и индола на экспрессию генов адаптации к стрессу у *Escherichia coli*. *Acta Biomedica Scientifica*. 2022;7(3):150-161. DOI 10.29413/ABS.2022-7.3.16
- [Khaova E.A., Kashevarova N.M., Tkachenko A.G. Regulatory effect of polyamines and indole on expression of stress adaptation genes in *Escherichia coli*. *Acta Biomedica Scientifica*. 2022;7(3):150-161. DOI 10.29413/ABS.2022-7.3.16 (in Russian)]
- Balaban N.Q., Helaine S., Lewis K., Ackermann M., Aldridge B., Andersson D.I., Brynildsen M.P., Bumann D., Camilli A., Collins J.J., Dehio C., Fortune S., Ghigo J.-M., Hardt W.-D., Harms A., Heinemann M., Hung D.T., Jenal U., Levin B.R., Michiels J., Storz G., Tan M.-W., Tenson T., Melderer L.V., Zinkernagel A. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nat. Rev. Microbiol.* 2019;17(7):441-448. DOI 10.1038/s41579-019-0196-3
- Datsenko K.A., Wanner B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000;97(12):6640-6645. DOI 10.1073/pnas.120163297
- Gaimster H., Cama J., Hernández-Ainsa S., Keyser U.F., Summers D.K. The indole pulse: a new perspective on indole signalling in *Escherichia coli*. *PLoS One*. 2014;9(4):e93168. DOI 10.1371/journal.pone.0093168

- Igarashi K., Kashiwagi K. Polyamine modulon in *Escherichia coli*: genes involved in the stimulation of cell growth by polyamines. *J. Biochem.* 2006;139(1):11-16. DOI 10.1093/jb/mvj020
- Igarashi K., Kashiwagi K. Effects of polyamines on protein synthesis and growth of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 2018;293(48):18702-18709. DOI 10.1074/jbc.TM118.003465
- Keseler I.M., Gama-Castro S., Mackie A., Billington R., Bonavides-Martinez C., Caspi R., Kothari A., Krummenacker M., Midford P.E., Muñoz-Rascado L., Ong W.K., Paley S., Santos-Zavaleta A., Subhraveti P., Tierrafría V.H., Wolfe A.J., Collado-Vides J., Paulsen I.T., Karp P.D. The EcoCyc database in 2021. *Front. Microbiol.* 2021;12:711077. DOI 10.3389/fmicb.2021.711077
- Kim C.S., Li J.H., Barco B., Park H.B., Gatsios A., Damania A., Wang R., Wyche T.P., Piizzi G., Clay N.K., Crawford J.M. Cellular stress upregulates indole signaling metabolites in *Escherichia coli*. *Cell Chem. Biol.* 2020;27(6):698-707.e7. DOI 10.1016/j.chembiol.2020.03.003
- Kusano T., Berberich T., Tateda C., Takahashi Y. Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta.* 2008;228(3):367-381. DOI 10.1007/s00425-008-0772-7
- Lang M., Krin E., Korlowski C., Sismeiro O., Varet H., Coppée J.Y., Mazel D., Baharoglu Z. Sleeping ribosomes: bacterial signaling triggers RaiA mediated persistence to aminoglycosides. *iScience.* 2021;24(10):103128. DOI 10.1016/j.isci.2021.103128
- Lee J.H., Wood T.K., Lee J. Roles of indole as an interspecies and inter-kingdom signaling molecule. *Trends Microbiol.* 2015;23(11):707-718. DOI 10.1016/j.tim.2015.08.001
- Lewis K. Persister cells. *Annu. Rev. Microbiol.* 2010;64:357-372. DOI 10.1146/annurev.micro.112408.134306
- Li G., Young K.D. Indole production by the tryptophanase TnaA in *Escherichia coli* is determined by the amount of exogenous tryptophan. *Microbiology (Reading).* 2013;159(2):402-410. DOI 10.1099/mic.0.064139-0
- Lightfoot H.L., Hall J. Endogenous polyamine function – the RNA perspective. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(18):11275-11290. DOI 10.1093/nar/gku837
- Lorenz R., Bernhart S.H., Siederdisen C., Tafer H., Flamm C., Stadler P.F., Hofacker I.L. ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms Mol. Biol.* 2011;6:26. DOI 10.1186/1748-7188-6-2
- Michael A.J. Polyamines in eukaryotes, bacteria, and archaea. *J. Biol. Chem.* 2016;291(29):14896-14903. DOI 10.1074/jbc.R116.734780
- Michael A.J. Polyamine function in archaea and bacteria. *J. Biol. Chem.* 2018;293(48):18693-18701. DOI 10.1074/jbc.TM118.005670
- Miller J.H. Experiments in Molecular Genetics. New York, 1972
- Miller-Fleming L., Olin-Sandoval V., Campbell K., Ralser M. Remaining mysteries of molecular biology: the role of polyamines in the cell. *J. Mol. Biol.* 2015;427(21):3389-3406. DOI 10.1016/j.jmb.2015.06.020
- Prossliner T., Skovbo Winther K., Sørensen M.A., Gerdes K. Ribosome hibernation. *Annu. Rev. Genet.* 2018;52:321-348. DOI 10.1146/annurev-genet-120215-035130
- Rhee H.J., Kim E.J., Lee J.K. Physiological polyamines: simple primordial stress molecules. *J. Cell. Mol. Med.* 2007;11(4):685-703. DOI 10.1111/j.1582-4934.2007.00077.x
- Sakamoto A., Sahara J., Kawai G., Yamamoto K., Ishihama A., Uemura T., Igarashi K., Kashiwagi K., Terui Y. Cytotoxic mechanism of excess polyamines functions through translational repression of specific proteins encoded by polyamine modulon. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(7):2406. DOI 10.3390/ijms21072406
- Shah P., Swiatlo E. A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. *Mol. Microbiol.* 2008;68(1):4-16. DOI 10.1111/j.1365-2958.2008.06126.x
- Simons R.W., Houman F., Kleckner N. Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene.* 1987;53(1):85-96. DOI 10.1016/0378-1119(87)90095-3
- Song S., Wood T.K. ppGpp ribosome dimerization model for bacterial persister formation and resuscitation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2020;523(2):281-286. DOI 10.1016/j.bbrc.2020.01.102
- Tabor C.W., Tabor H. Polyamines in microorganisms. *Microbiol. Rev.* 1985;49(1):81-99. DOI 10.1128/mr.49.1.81-99.1985
- Tkachenko A.G., Akhova A.V., Shumkov M.S., Nesterova L.Yu. Polyamines reduce oxidative stress in *Escherichia coli* cells exposed to bactericidal antibiotics. *Res. Microbiol.* 2012;163(2):83-91. DOI 10.1016/j.resmic.2011.10.009
- Tkachenko A.G., Kashevarova N.M., Karavaeva E.A., Shumkov M.S. Putrescine controls the formation of *Escherichia coli* persister cells tolerant to aminoglycoside netilmicin. *FEMS Microbiol. Lett.* 2014;361(1):25-33. DOI 10.1111/1574-6968.12613
- Tkachenko A.G., Kashevarova N.M., Tyuleneva E.A., Shumkov M.S. Stationary-phase genes upregulated by polyamines are responsible for the formation of *Escherichia coli* persister cells tolerant to netilmicin. *FEMS Microbiol. Lett.* 2017;364(9):fmx084. DOI 10.1093/femsle/fmx084
- Trösch R., Willmund F. The conserved theme of ribosome hibernation: from bacteria to chloroplasts of plants. *Biol. Chem.* 2019;400(7):879-893. DOI 10.1515/hsz-2018-0436
- Zarkan A., Liu J., Matuszewska M., Gaimster H., Summers D.K. Local and universal action: the paradoxes of indole signalling in bacteria. *Trends Microbiol.* 2020;28(7):566-577. DOI 10.1016/j.tim.2020.02.007
- Zhang Y. Persisters, persistent infections and the Yin-Yang model. *Emerg. Microbes Infect.* 2014;3(1):e3. DOI 10.1038/emi.2014.3

ORCID

E.A. Khaova orcid.org/0000-0003-4457-2652
A.G. Tkachenko orcid.org/0000-0002-8631-8583

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (124020500028-4).


Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 14.07.2023. После доработки 13.11.2023. Принята к публикации 15.11.2023.

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

Экспрессия генов транспортеров ауксина в волокнах льна (*Linum usitatissimum*) при гравитотворе

Н.Н. Ибрагимова , Н.Е. Мокшина

Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань, Россия
 nibra@yandex.ru


Аннотация. Гравитропизм – адаптивная реакция растений, связанная со способностью органов растений располагаться и расти в определенном направлении относительно вектора силы тяжести. При этом асимметричное распределение фитогормона ауксина считается необходимым условием для тропического изгиба органов растения. Ранее нами были описаны яркие морфологические изменения флоэмных волокон с утолщенной клеточной стенкой, находящихся на разных сторонах зрелых участков стебля в области гравитропического изгиба. Настоящее исследование – первая работа, посвященная идентификации генов, кодирующих переносчики ауксина в этих клетках на разных стадиях развития и при гравитотворе. В растениях льна идентифицированы гены основных переносчиков ауксина: AUX1/LAX, PIN-FORMED, PIN-LIKES и ABCB. Сравнительный анализ экспрессии этих генов во флоэмных волокнах льна, находящихся на разных стадиях развития, выявил повышенную экспрессию некоторых генов на стадии интрузивного роста (*LusLAX2* (A, B), *LuxPIN1-D*, *LusPILS7* (C, D)), на ранней стадии формирования третичной клеточной стенки (*LusAUX1* (A, D), *LusABCB1* (A, B), *LusABCB15-A*, *LusPIN1* (A, B), *LusPIN4-A*, *LusPIN5-A*) и на поздней стадии развития третичной клеточной стенки (*LusLAX3* (A, B)). Показано, что при гравитропизме повышалась экспрессия многих генов исследуемых семейств, в том числе отвечающих за приток ауксина в клетки (*LusAUX1-D*). Выявлена дифференциальная экспрессия генов переносчиков ауксина при гравитотворе в волокнах, находящихся на разных сторонах стебля – верхней (PUL) и нижней (OPP): различие наблюдалось за счет экспрессии генов, продукты которых отвечают за внутриклеточный транспорт (*LusPILS3*, *LusPILS7-A*) и отток ауксина из клеток (*LusABCB15-B*, *LusABCB19-B*). Повышенная экспрессия PIN-генов и ABCB-генов была более типична для волокон OPP-стороны стебля. Полученные результаты позволяют сделать предположение о наличии дифференциального содержания ауксина в волокнах разных сторон стебля гравитостимулированных растений льна, которое, возможно, определяется неравномерным оттоком ауксина. Исследование дает представление о переносчиках ауксина во льне и закладывает основу для дальнейшего изучения их функций в развитии флоэмного волокна и при гравитотворе.

Ключевые слова: лен; *Linum usitatissimum* L.; гравитропизм; волокно; транспорт ауксина; экспрессия генов.

Для цитирования: Ибрагимова Н.Н., Мокшина Н.Е. Экспрессия генов транспортеров ауксина в волокнах льна (*Linum usitatissimum*) при гравитотворе. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(1):33-43. DOI 10.18699/VJGB-24-05

Expression of auxin transporter genes in flax (*Linum usitatissimum*) fibers during gravity response

N.N. Ibragimova , N.E. Mokshina

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia
 nibra@yandex.ru

Abstract. Gravitropism is an adaptive reaction of plants associated with the ability of various plant organs to be located and to grow in a certain direction relative to the gravity vector, while usually the asymmetric distribution of the phytohormone auxin is a necessary condition for the gravitropical bending of plant organs. Earlier, we described significant morphological changes in phloem fibers with a thickened cell wall located on different sides of the stem in the area of the gravitropic curvature. The present study is the first work devoted to the identification of genes encoding auxin transporters in cells at different stages of development and during gravity response. In this study, the flax genes encoding the AUX1/LAX, PIN-FORMED, PIN-LIKES, and ABCB auxin transporters were identified. A comparative analysis of the expression of these genes in flax phloem fibers at different stages of development revealed increased expression of some of these genes at the stage of intrusive growth (*LusLAX2* (A, B), *LuxPIN1-D*, *LusPILS7* (C, D)), at the early stage of tertiary cell wall formation (*LusAUX1* (A, D), *LusABCB1* (A, B), *LusABCB15-A*, *LusPIN1* (A, B), *LusPIN4-A*, and *LusPIN5-A*), and at the late stage of tertiary cell wall development (*LusLAX3* (A, B)). It was shown that in the course of gravitropism, the expression of many genes, including those responsible for the influx of auxin in cells (*LusAUX1-D*), in the studied families increased. Differential expression of auxin transporter genes was revealed during gravity response in fibers located on different sides of the stem (upper (PUL) and lower (OPP)). The difference was observed due to the

expression of genes, the products of which are responsible for auxin intracellular transport (*LusPILS3*, *LusPILS7-A*) and its efflux (*LusABCB15-B*, *LusABCB19-B*). It was noted that the increased expression of *PIN* genes and *ABCB* genes was more typical of fibers on the opposite side. The results obtained allow us to make an assumption about the presence of differential auxin content in the fibers of different sides of gravistimulated flax plants, which may be determined by an uneven outflow of auxin. This study gives an idea of auxin carriers in flax and lays the foundation for further studies of their functions in the development of phloem fiber and in gravity response.

Key words: flax; *Linum usitatissimum* L.; gravitropism; fiber; auxin transport; gene expression.

For citation: Ibragimova N.N., Mokshina N.E. Expression of auxin transporter genes in flax (*Linum usitatissimum*) fibers during gravity response. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(1): 33-43. DOI 10.18699/VJGB-24-05

Введение

Растения находятся под постоянным действием абиотических и биотических факторов, в том числе неблагоприятных. Активность и скоординированные действия переносчиков ауксина (индолил-3-уксусная кислота, ИУК) в растениях лежат в основе гибкой сети, которая мобилизует ИУК в ответ на многие изменения окружающей среды. Это касается и тропизмов растений. Независимо от задействованных механизмов, активность фитогормона ауксина имеет решающее значение для всех тропизмов, включая гравитропизм (Harrison, Pickard, 1989; Evans, 1991; Li et al., 1991; Rakusová et al., 2019). Показано, что ингибиторы транспорта ИУК блокируют развитие гравитропической реакции в растениях (Li et al., 1991). Неравномерное распределение ауксина с участием белков-переносчиков при гравитропизме является важной областью как фундаментальных, так и прикладных исследований, связанных с полеганием растений.

Реализация гравитропического изгиба связана с формированием у растений гравитропического изгиба, которое происходит с участием разных механизмов. В молодых, активно растущих органах (корни проростков, гипокотили, колеоптили) изгиб формируется за счет разной скорости растяжения клеток на противоположных сторонах гравитимулированного органа (Harrison, Pickard, 1989; Li et al., 1991; Zhu et al., 2019). Гравитропический изгиб зрелых побегов, помимо вышеупомянутого механизма (который, по всей видимости, продолжает иметь место в растущей верхушке растения), в частях стебля, прекративших удлинение, происходит за счет предполагаемых «сократительных» свойств волокон (Ibragimova et al., 2017). Механизм формирования гравитропического изгиба зрелых побегов имеет также свои особенности у представителей разных систематических групп растений: у покрытосеменных древесных растений изгиб возникает за счет изменения камбиальной активности и формирования третичной клеточной стенки (ТКС) в ксилемных волокнах на верхней стороне гравитимулированного органа, приводящих к образованию древесины натяжения (Haugreen, Wouyer, 1996; Jourez et al., 2001). В зрелых побегах голосеменных гравитропический изгиб обеспечивает новообразование древесины сжатия, которая появляется на нижней стороне гравитимулированного органа (Timell, 1969). Наконец, в зрелых однолетних побегах травянистых растений, включая лен, гравитропический изгиб обеспечивают, как мы предполагаем, и первичные флоэмные волокна, имеющие ТКС, хотя в ксилемных волокнах верхней стороны стебля тоже наблюдается появление ТКС (Ibragimova et al., 2017). И если в случае молодых органов роль ауксина в форми-

ровании изгиба активно изучается, то для относительно зрелых органов информация о распределении ИУК очень ограничена и противоречива (Hellgren et al., 2004; Gerttula et al., 2015).

Ауксин распределяется в организме растения с помощью двух различных, но взаимосвязанных транспортных систем: во-первых, быстрого потока во флоэме вместе с фотосинтетическими ассимилятами и, во-вторых, медленного и направленного полярного переноса ауксина от клетки к клетке (Adamowski, Friml, 2015). Во время как флоэмная транспортировка обеспечивает общий способ доставки ауксина из мест его синтеза к органам-реципиентам, полярный транспорт распределяет ауксин точным образом, что критически важно для формирования локальных максимумов ауксина и является одним из ключевых элементов в его функционировании (Friml et al., 2002; Zažímalová et al., 2010; Adamowski, Friml, 2015). Переносчики ауксина семейства *PIN* образуют основную часть этой системы, контролируя направление и скорость транспорта через ряд клеток (Zažímalová et al., 2010). Что касается возможных изменений в экспрессии генов белков *PIN*, то соответствующие данные в настоящее время ограничены несколькими модельными видами.

Кроме семейства *PIN* (*PIN-FORMED*), транспорт ауксина осуществляется другими типами белков: *AUX1/LAX* (*AUXIN-INSENSITIVE1/LIKE AUX1*), *ABCB* (подсемейство ATP-binding cassette транспортеров), *PILS* (*PIN-LIKES*), *NRT1.1* (nitrate transporter 1.1) и *WAT1* (*WALLS ARE THIN1*) (Manna et al., 2022). Считается, что при низком pH апопласта ауксин становится протонированным и может проникать в клетку путем диффузии. В определенных типах клеток ауксин может транспортироваться в цитозоль белками-переносчиками – представителями семейства *AUX1/LAX* (Swarup, Péret, 2012). Внутри клетки ауксин становится отрицательно заряженным, и, следовательно, требуются переносчики, такие как *PIN* и *ABCB*, обеспечивающие его отток через клеточную мембрану в апопласт (Zažímalová et al., 2010). Менее охарактеризованная группа транспортных белков *PILS*, вероятно, ответственна за внутриклеточный транспорт ауксина (Barbez et al., 2012).

В данном исследовании в растениях льна были идентифицированы гены основных белков-переносчиков ауксина (*PIN*, *AUX1/LAX*, *ABCB* и *PILS*) и проведена оценка их экспрессии с помощью сравнительного транскриптомного анализа флоэмных волокон контрольных и гравитимулированных растений льна. В качестве модельной системы нами были выбраны флоэмные волокна льна на разных стадиях развития (с первичной и утолщенной ТКС), а так-

же флоэмные волокна с разных сторон гравистимулированных растений льна на поздней стадии развития ТКС. Флоэмные волокна льна расположены вдоль всего стебля в виде пучков (что упрощает их выделение на разных стадиях развития, разобщенных в пространстве и во времени): волокна достигают конечной длины в ходе интрузивного роста, а затем в клетках последовательно откладываются слоями вторичной и третичной КС (Gorshkova et al., 2003). Все это позволяет проводить разноплановые исследования на уровне клеток. Показано, что при гравистимуляции льна флоэмные волокна, локализованные на разных сторонах стебля (верхней (PUL) и нижней (OPP)), имели морфологические и структурно-биохимические изменения (Ibragimova et al., 2017, 2020). Анализ экспрессии генов, кодирующих основные переносчики ауксина, в изолированных волокнах позволит выявить тип транспорта ауксина, который, как мы предполагаем, активизируется во флоэмных волокнах при гравитовете.

Материалы и методы

Идентификация переносчиков ауксина. В работе при использовании базы данных Phytozome были выявлены последовательности белков, содержащие функциональные домены (Pfam) PF01490, PF03547 и PF03547, PF00005, характерные для AUX1/LAX, PIN/PILS и ABCB ауксиновых транспортеров соответственно. Идентифицированные гены переносчиков ауксина у льна были названы в соответствии с ортологичной последовательностью *Arabidopsis thaliana* (резуховидки); функции продуктов всех выявленных генов являются предположительными, поскольку их аннотация построена исключительно на гомологии к охарактеризованным генам резуховидки. Все последовательности анализируемых генов представлены в Приложении¹.

Уровень экспрессии генов и филогенетический анализ. Для оценки экспрессии генов мы использовали полученные нами ранее транскриптомные данные для растений льна (фаза быстрого роста), которые размещены в базе данных FIBexDB (<https://ssl.cres-t.org/fibex/flax/>) (Mokshina et al., 2021). Для анализа брали флоэмные волокна на разной стадии развития: до формирования ТКС (фаза интрузивного роста – iFIBa), на начальной стадии формирования ТКС (tFIBa), на поздней стадии формирования ТКС (tFIBb), а также на разных сторонах стебля (PUL – верхняя при подъеме растения, OPP – нижняя) поздней стадии формирования ТКС при гравистимуляции. Гравистимуляцию проводили путем наклона растений (у основания) параллельно почве (90 градусов). Экспрессию генов в волокнах на поздней стадии формирования ТКС анализировали через 8, 24 и 96 часов после наклона растений. Обсуждаются более чем двукратные изменения.

Для построения филогенетического дерева использовали метод Maximum Likelihood, модель Le_Gascuel_2008 (LG+G); бутстреп-поддержка 1000. Выполнено в программе MEGA7.

Результаты

Были идентифицированы гены основных семейств транспортеров ауксина: AUX1/LAX, ответственных за приток

ауксина в клетку (Swarup, Péret, 2012), PIN-FORMED и ABCB, ответственных в основном за отток ауксина (Zažímalová et al., 2010), PIN-LIKES (PILS), ответственных за внутриклеточный транспорт ауксина (Barbez et al., 2012), и проанализирована их экспрессия.

Идентификация и экспрессия *LusPIN* и *LusPILS*

В геноме льна при поиске в базе данных Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) по наличию домена мембранных транспортеров PF03547 выявлено 34 гена, которые соответствуют 12 ортологам в геноме резуховидки; всего в резуховидке обнаружено 15 генов с PF03547 (8 – PIN, 7 – PILS).

Последовательность гена *Lus10020829* (*AT2G01420*, *PIN4*) была нами скорректирована в программе Augustus (<https://bioinf.uni-greifswald.de/augustus/>) и продолжена за счет последовательности *Lus10020830*. При корректировке учитывали также результаты BLASTX Arabi/Clami/Rice, доступные в базе Phytozome (JBrowse) (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/jbrowse/index.html>). Аналогичным образом были отредактированы еще шесть последовательностей: *Lus10009685* (*AT1G73590*, *PIN1*), *Lus10002280* (*AT1G71090*, *PILS2*), *Lus10018006* (*AT1G73590*, *PIN1*), *Lus10036000* (*AT1G71090*, *PILS2*; *Lus100360001* исключена из анализа), *Lus10042003* (*AT1G73590*, *PIN1*), *Lus10016704* (*AT1G71090*, *PILS2*). Последовательность *Lus10004059* (*AT1G71090*, *PILS2*) включала в себя фрагмент из 119 неидентифицированных аминокислот (из 443), что связано, по всей видимости, с проблемами исходного секвенирования и/или сборки генома. Из последовательности *Lus10016688* были удалены лишние домены, после чего был установлен ближайший к ней гомолог – *PILS7* (*AT5G65980*). Из последовательности *Lus10019229* (*AT1G20925*, *PILS1*) были удалены чужеродные домены, но ее нельзя считать предсказанной полностью, так как в ней не удалось *in silico* установить положение стартокодона. Последовательность *Lus10012680* (*AT2G01420*, *PIN4*) была увеличена с 231 до 517 аминокислот. Из анализа исключались последовательности, где не предсказывались трансмембранные домены. При корректировке последовательностей была восстановлена целостность некоторых доменов, число трансмембранных доменов и молекулярная масса приблизились к показателям, характерным для представителей анализируемого семейства.

Таким образом, после биоинформатического анализа и корректировки из 34 осталось 27 последовательностей, аннотированных как мембранные транспортеры PIN или PILS, которые мы использовали для дальнейшего анализа (табл. 1).

Молекулярная масса данных белков варьировала от 33.5 до 75 кДа, значение pI – от 5.3 до 9.6, количество трансмембранных доменов – от 5 до 10 (см. табл. 1).

Для аннотации генов *PIN/PILS* в дополнение к результатам BLAST мы провели филогенетический анализ аминокислотных последовательностей PIN/PILS резуховидки и льна (рис. 1). Анализируемые последовательности ожидаемо разделились на две клады – PIN и PILS. Многим ортологам PIN резуховидки соответствовало два гена-паралога в геноме льна (PIN2, 5, 8), четыре последовательности льна находились в одной группе с PIN1 резу-

¹ Приложение см. по адресу:

<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2024-28/appx1.xlsx>

Таблица 1. Перечень и некоторые характеристики последовательностей LusPIN и LusPILS

LUS	AT	Название для LUS	AA	Mw, кДа	pI	TMH_LUS	TMH_AT
Lus10009054	AT1G73590	PIN1-A	613	66.0	8.9	9	9
Lus10009685/86	AT1G73590	PIN1-B	510	55.1	9.3	9	9
Lus10018006/07	AT1G73590	PIN1-C	498	53.7	9.0	9	9
Lus10042003/04	AT1G73590	PIN1-D	568	61.5	8.8	7	9
Lus10001429	AT5G57090	PIN2-A	650	69.5	9.1	9	9
Lus10001637	AT5G57090	PIN2-B	648	69.2	9.2	9	9
Lus10012680	AT2G01420	PIN4-A	517	57.0	8.8	7	10
Lus10020829/30	AT2G01420	PIN4-B	528	56.8	9.6	8	10
Lus10020193	AT5G16530	PIN5-A	354	38.8	7.4	9	9
Lus10026994	AT5G16530	PIN5-B	354	38.9	8.0	9	9
Lus10010303	AT5G15100	PIN8-A	359	39.3	9.3	8	8
Lus10013422	AT5G15100	PIN8-B	359	39.1	9.4	8	8
Lus10004287	AT1G20925	PILS1-A	417	44.5	8.3	9	9
Lus10016046	AT1G20925	PILS1-B	434	46.7	8.2	8	9
Lus10019229*	AT1G20925	PILS1-C	309	33.5	8.9	5	9
Lus10030715	AT1G20925	PILS1-D	394	42.8	9.3	8	9
Lus10002280/81	AT1G71090	PILS2-A	388	40.8	5.9	6	8
Lus10004059*	AT1G71090	PILS2-B	442	48.7	?	7	8
Lus10016704/05	AT1G71090	PILS2-C	465	51.1	5.3	9	8
Lus10036000/01	AT1G71090	PILS2-D	508	55.8	6.6	8	8
Lus10025166	AT1G76520	PILS3	406	43.5	7.8	9	10
Lus10003240	AT5G01990	PILS6-A	692	75.3	5.9	8	10
Lus10035610	AT5G01990	PILS6-B	422	45.3	8.2	9	10
Lus10001303	AT5G65980	PILS7-A	396	42.7	6.5	8	8
Lus10012708	AT5G65980	PILS7-B	396	42.7	6.3	8	8
Lus10016688	AT5G65980	PILS7-C	408	44.5	6.1	8	8
Lus10035978	AT5G65980	PILS7-D	392	42.8	6.7	8	8

Примечание. Здесь и далее: LUS – *Linum usitatissimum*; AT – *Arabidopsis thaliana*, AA – количество аминокислот; Mw – молекулярная масса, кДа; pI – изоэлектрическая точка; TMH – количество трансмембранных доменов.

Полужирным выделены скорректированные последовательности; * – неполные последовательности.

ховидки, а две последовательности льна соответствовали группе AtPIN3/4/7. Также дублированы были и многие PILS (см. рис. 1).

Экспрессия генов *Lus10001429* (*LusPIN2-A*), *Lus10001637* (*LusPIN2-B*), *Lus10004287* (*LusPILS1-A*), *Lus10002280* (*LusPILS2-A*), *Lus10010303* (*PIN8-A*) была низкой (<16 TGR) и далее не анализировалась. На разной стадии развития и при гравистимуляции в волокнах экспрессировались 22 *PIN/PILS*. По динамике экспрессии можно выделить несколько групп генов. Интересно, что повышенный уровень экспрессии в волокнах только на стадии удлинения показали три гена (*LusPIN1-D*, *LusPILS7-C, D*), их экспрессия уменьшалась в зрелых волокнах и не имела различий в волокнах при гравистимуляции (рис. 2).

Также была выявлена группа генов, имевшая выраженный пик экспрессии в волокнах на ранней стадии формирования ТКК (tFIBa) (рис. 3, *LusPIN1-A, B, LusPIN4-A*) или почти одинаковый уровень в волокнах при удлинении и формировании утолщенной КС (см. рис. 3, *LusPIN1-C, LusPIN4-B, LusPILS2-B*). Экспрессия всех этих генов снижалась в зрелых волокнах и снова активировалась при гравистимуляции, особенно в ОРР-образцах. Пик экспрессии при гравистимуляции приходился на 24 ч, затем экспрессия снижалась и была близка минимальным значениям, характерным для контрольных tFIBb образцов.

Экспрессия некоторых генов не менялась существенно во всех образцах (*LusPILS2-C, D*) или же была повышена в волокнах на ранней стадии формирования ТКК (tFIBa) (*LusPIN5-B, LusPILS1-C, D, LusPILS6-A, B, LusPILS7-B*),

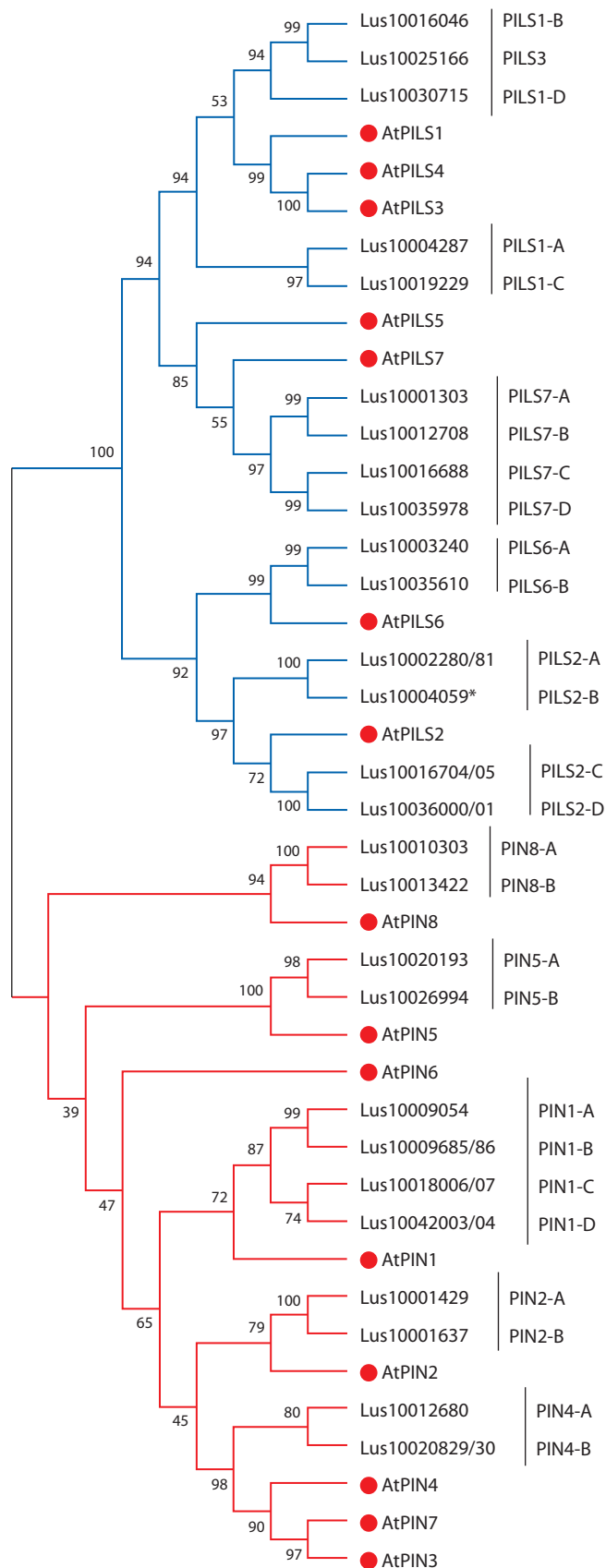


Рис. 1. Филогенетическое дерево для аминокислотных последовательностей PF03547 резуховидки и льна.

Метод Maximum Likelihood, модель Le_Gascuel_2008 (LG+G). Бутстреп-поддержка 1000. Выполнено в программе MEGA7. Красным обозначены последовательности резуховидки.

но практически не различалась в волокнах при гравистимуляции (данные не приводятся). На рис. 4 показана экспрессия генов, максимальное значение которой наблюдали при гравистимуляции. *LusPIN5-A* имел максимальный уровень экспрессии в волокнах PUL через 96 ч после гравистимуляции. *LusPILS3* отличался повышенным уровнем экспрессии в OPP-образцах через 8 ч, пик экспрессии наблюдали и в PUL-образцах, но через 24 ч после начала гравистимуляции (см. рис. 4).

Три гена из 22 показали повышенный уровень экспрессии только при гравистимуляции, причем особенно в PUL-образцах через 24 ч (*LusPIN8-B*) или через 8 ч от начала гравистимуляции (*LusPILS1-B*, *LusPILS7-A*). Экспрессия *LusPIN8-B* снижалась в PUL-образцах через 96 ч, но при этом увеличивалась в OPP (рис. 5). Наиболее контрастная экспрессия между PUL и OPP была продемонстрирована для *LusPILS7-A*, которая почти нивелировалась через 96 ч.

Идентификация и экспрессия *LusAUX1/LAX*

Переносчики притока ауксина *LusAUX1/LAX* обладают консервативным доменом PF01490 (Transmembrane amino acid transporter protein). У *A. thaliana* семейство *AUX1/LAX* представлено четырьмя высококонсервативными генами – *AUX1*, *LAX1*, *LAX2* и *LAX3*, которые кодируют белки, имеющие сходство с переносчиками аминокислот (Young et al., 1999). Всего в базе данных Phytozome представлено 82 гена льна с PF01490. Их них 8 кодируют транспортеры ауксина и соответствуют трем генам-ортологам резуховидки (*AUX1*, *LAX2*, *LAX3*). Все гены этой группы кодируют белки, близкие по молекулярной массе и изоэлектрической точке; для всех белков было предсказано 10 трансмембранных доменов (табл. 2).

Гены, кодирующие *LusLAX2* (А и В), высоко экспрессировались в интрузивно растущих волокнах (iFIBa). Их экспрессия резко падала в волокнах, формирующих ТКС, и оставалась низкой при гравистимуляции (рис. 6).

Абсолютно отличную от *LusLAX2* динамику экспрессии имели *LusLAX3* (А и В). Динамика экспрессии между двумя паралогами была идентичной, как и в случае *LusLAX2*. Максимальный уровень экспрессии *LusLAX3* отмечен в волокнах, формирующих ТКС на поздней стадии (tFIBb). В ходе гравитовета уровень экспрессии этих генов резко падал (рис. 7).

Гены *LusAUX1* имели относительно высокий уровень экспрессии во всех образцах. При этом четыре паралога показали четкое разделение на две группы по паттерну экспрессии: с максимальным уровнем в волокнах, формирующих ТКС (tFIBa, *LusAUX1-A, D*), и с максимальным уровнем экспрессии в волокнах гравистимулированных растений (OPP, 24 ч) (*LusAUX1-B, C*) (рис. 8).

Идентификация и экспрессия *LusABC*

Согласно базе данных Phytozome, в геноме льна присутствует 206 генов ABC транспортеров, из них 32 гена принадлежали группе В. Для анализа экспрессии мы отобрали ортологи перечисленных генов резуховидки во льне. Было выявлено 25 генов, соответствующих 5 генам-ортологам арабидопсиса: *ABC1* (2 гена льна), *ABC4* (4 гена льна), *ABC15* (9 генов льна), *ABC19* (8 генов льна), *ABC20* (2 гена льна). Последовательность *Lus10011977* была ча-

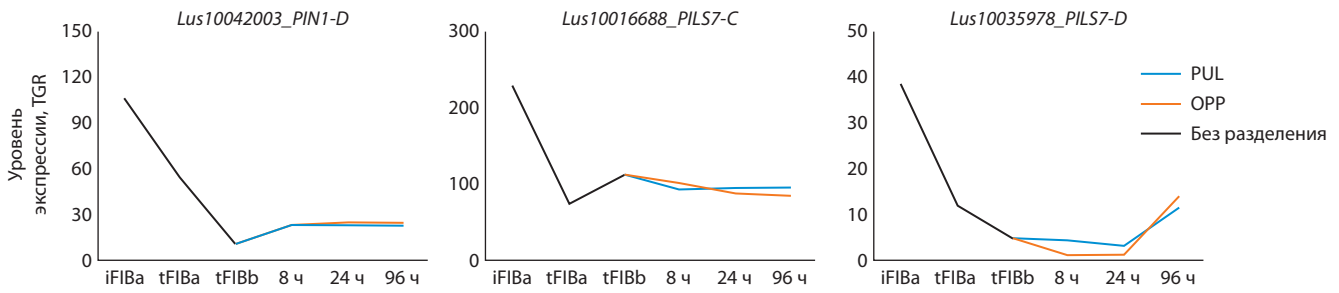


Рис. 2. Экспрессия *LusPIN/PILS*, имеющих повышенный уровень экспрессии только в интрузивно растущих волокнах.

Здесь и на рис. 3–9: iFIBa – интрузивно растущие волокна; tFIBa – ранняя стадия формирования третичной клеточной стенки (ТКС); tFIBb – поздняя стадия формирования ТКС; 8, 24, 96 ч – время фиксации образцов после наклона стебля; TGR – total gene reads; PUL – pulling side (тянущая сторона); OPP – противоположная PUL-стороне; «без разделения» – растения не подвергали гравитимуляции, стебель не разделяли на PUL и OPP.

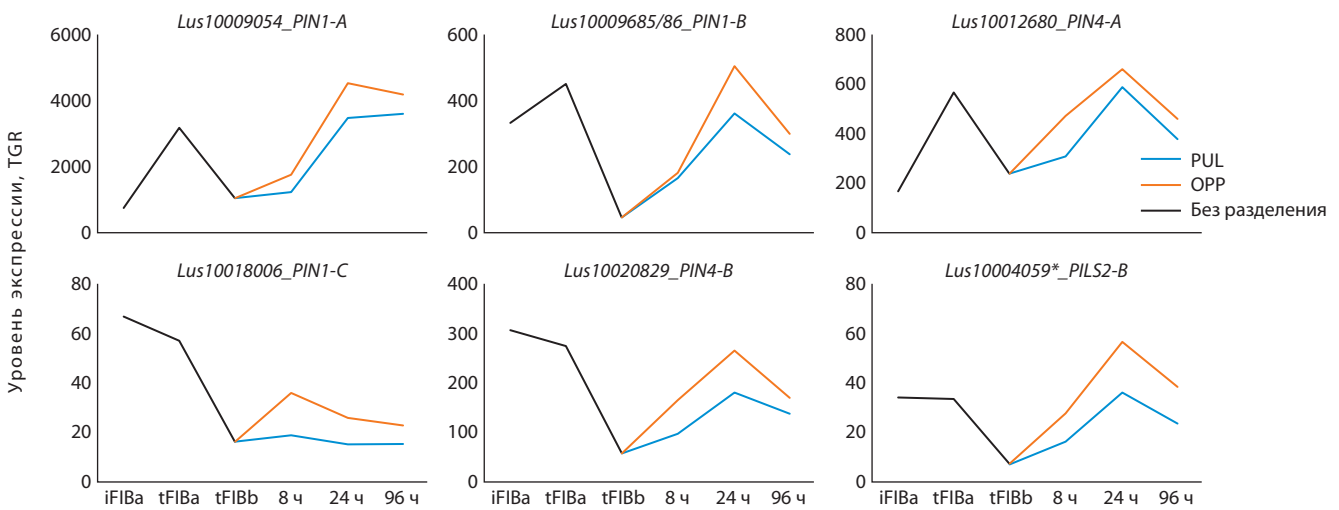


Рис. 3. Экспрессия *LusPIN1-A, B, C, LusPIN4-A, B, LusPILS2-B* в волокнах льна в норме и при гравитовете.

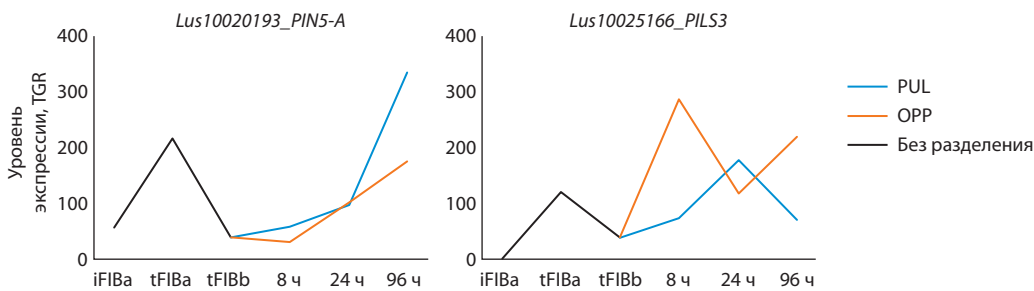


Рис. 4. Экспрессия *LusPIN5-A* и *LusPILS3* в волокнах льна в норме и при гравитовете.

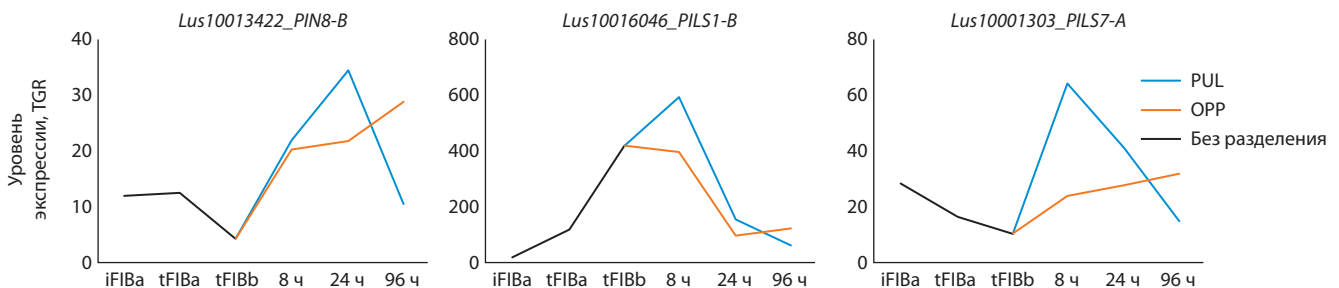


Рис. 5. Экспрессия *LusPIN8-B, LusPILS1-B, LusPILS7-A* в волокнах льна в норме и при гравитовете.

Таблица 2. Перечень и некоторые характеристики последовательностей LusAUX1/LAX

LUS	AT	Название для LUS	AA	Mw, кДа	pI	TMH_LUS
Lus10028278	AT2G38120	AUX1-A	628	70.0	7.2	10
Lus10002498	AT2G38120	AUX1-B	497	55.7	8.7	10
Lus10004831	AT2G38120	AUX1-C	487	54.7	8.7	10
Lus10040212	AT2G38120	AUX1-D	486	54.7	8.9	10
Lus10025057	AT2G21050	LAX2-A	497	55.6	8.5	10
Lus10034488	AT2G21050	LAX2-B	497	55.5	8.6	10
Lus10028078	AT1G77690	LAX3-A	477	53.7	8.7	10
Lus10025628	AT1G77690	LAX3-B	478	53.8	8.6	10

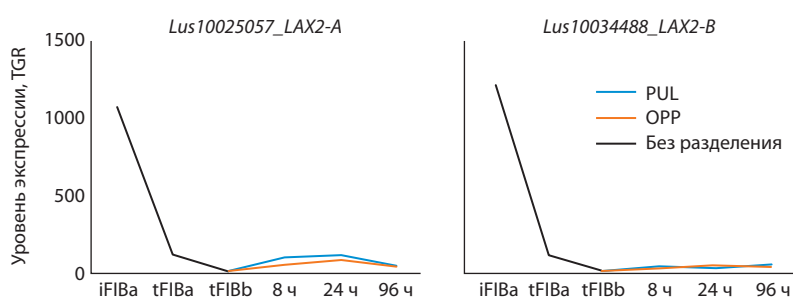


Рис. 6. Экспрессия *LusLAX2-A, B* в волокнах льна в норме и при гравитовете.

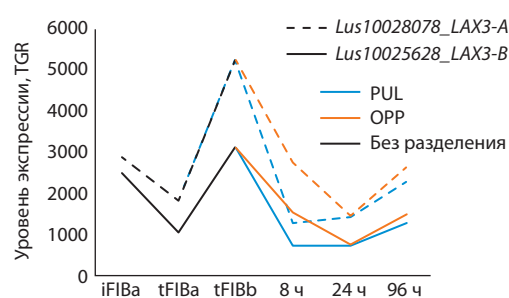


Рис. 7. Экспрессия *LusLAX3-A, B* в волокнах льна в норме и при гравитовете.

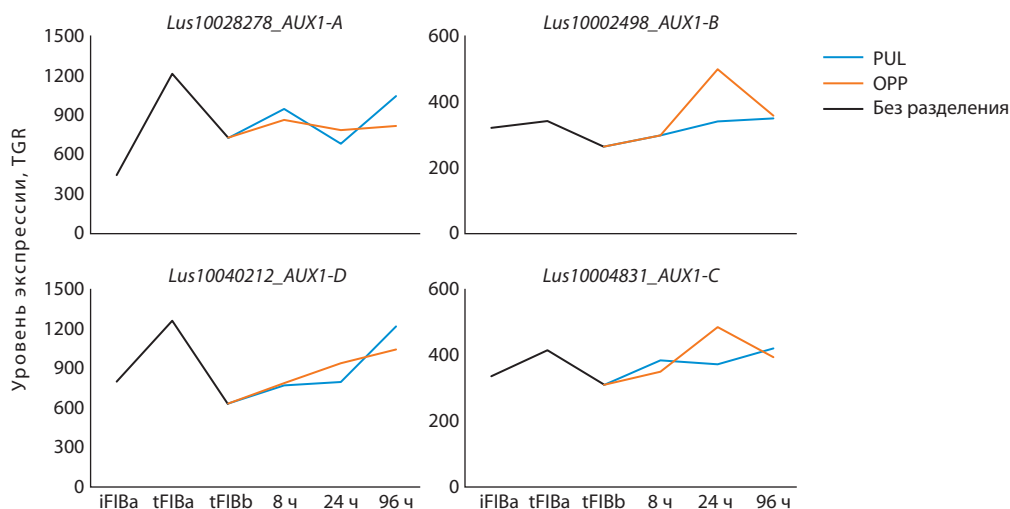


Рис. 8. Экспрессия *LusAUX1-A, B, C, D* в волокнах льна в норме и при гравитовете.

стично скорректирована, *Lus10036616* и *Lus10036617* объединены в одну последовательность (табл. 3). Из 24 генов четыре (*ABCВ4* и три изоформы *ABCВ15*) имели низкий уровень экспрессии или не экспрессировались.

Оставшийся 21 ген имел разный уровень и паттерн экспрессии. Так, *LusABCВ20* (*A* и *B*) отличались высоким уровнем экспрессии в растущих волокнах и на ранней стадии формирования ТКС, в зрелых волокнах их экспрессия снижалась и почти не менялась при гравитостимуляции. Две из четырех изоформ *LusABCВ4* имели максимальный уровень экспрессии в растущих волокнах, при этом сам

уровень экспрессии был невысоким, а третья изоформа имела пик экспрессии в волокнах на ранней стадии формирования ТКС. Наиболее разнообразные паттерны экспрессии были характерны для *LusABCВ19*, насчитывающего и наибольшее количество экспрессирующихся изоформ (8 генов) (данные не приводятся).

Мы отобрали *LusABCВ*, имеющие максимальную разницу в экспрессии между PUL- и OPP-образцами. Среди 6 генов четыре имели повышенную экспрессию в волокнах, формирующих ТКС. Экспрессия этих генов снижалась в более зрелых волокнах, но повышалась в волок-

Таблица 3. Перечень и некоторые характеристики последовательностей LusABCВ

LUS	AT	Название для LUS	AA	Mw, кДа	pI	TMH_LUS
Lus10024162	AT3G28345	ABCВ15-E	1246	135.7	8.5	9
Lus10033470	AT3G28860	ABCВ19-F	1511	164.8	8.8	12
Lus10014427	AT2G36910	ABCВ1-A	1210	132.1	8.8	9
Lus10015595	AT3G28860	ABCВ19-G	1268	139.2	7.0	11
Lus10041565	AT3G28345	ABCВ15-B	1244	135.2	7.8	10
Lus10035834	AT3G28345	ABCВ15-H	1287	139.8	8.9	7
Lus10030674	AT3G28860	ABCВ19-B	1254	136.6	8.0	8
Lus10005249	AT3G28860	ABCВ19-A	1254	136.5	8.0	8
Lus10012959	AT3G28345	ABCВ15-D	1237	135.4	8.6	9
Lus10032911	AT3G28860	ABCВ19-H	1269	138.9	7.2	9
Lus10023437	AT3G55320	ABCВ20-A	1406	155.4	6.3	12
Lus10023929	AT2G36910	ABCВ1-B	1338	145.9	7.3	12
Lus10011977*	AT2G47000	ABCВ4-D	1072	117.4	8.3	2
Lus10038050	AT2G47000	ABCВ4-B	1216	131.1	8.4	9
Lus10013178*	AT3G28860	ABCВ19-D	2432	266.4	6.7	10
Lus10039533	AT3G28345	ABCВ15-F	1250	136.4	8.2	9
Lus10008139	AT3G28860	ABCВ19-C	1249	136.1	7.4	11
Lus10040315	AT3G55320	ABCВ20-B	1395	154.1	6.4	12
Lus10036616/17	AT3G28345	ABCВ15-G	1267	137.8	8.9	9
Lus10039458	AT3G28345	ABCВ15-A	1270	137.7	8.0	9
Lus10009989	AT2G47000	ABCВ4-C	1272	136.9	7.7	9
Lus10020905	AT3G28860	ABCВ19-E	1504	163.6	8.8	12
Lus10005839	AT3G28345	ABCВ15-C	1261	136.8	8.3	10
Lus10004520*	AT2G47000	ABCВ4-A	826	89.2	8.2	7

* Последовательность может быть некорректной.

нах гравистимулированных растений, особенно в ОРР-образцах (достоверно для *LusABCВ15-B* и *LusABCВ19-B*) (рис. 9). Невысокий уровень экспрессии наблюдали для *LusABCВ15-B*, но при этом ген специфично активировался при гравистимуляции и практически не экспрессировался в других образцах. Экспрессия этого гена почти в пять раз выше в волокнах ОРР-стороны по сравнению с PUL (8, 24 ч) (см. рис. 9).

Обсуждение

Действие ауксина как переключателя тесно связано с присутствием локальных максимумов и минимумов, генерируемых в тканях (Adamowski, Friml, 2015). Они создаются, поддерживаются и модулируются путем межклеточного переноса ауксина, специфичного для растения процесса. Этот процесс, называемый полярным переносом ауксина, зависит от действия представителей по меньшей мере трех семейств переносчиков ауксина: PIN-FORMED, AUX1/LAX и ABCВ (Geisler et al., 2017).

В данном исследовании в растениях льна идентифицированы основные гены переносчиков ауксина: 12 *LusPIN*,

15 *LusPILS*, 8 *LusAUX1/LAX* и 24 *LusABCВ*. В результате сравнительного анализа экспрессии этих генов во флоэмных волокнах льна, находящихся на разных стадиях развития, была выявлена повышенная экспрессия некоторых из них на стадии интрузивного роста (*LusLAX2* (A, B), *LusPIN1-D*, *LusPILS7* (C, D)), на ранней стадии формирования ТКК (*LusAUX1* (A, D), *LusABCВ1-A*, B, *LusABCВ15-A*, *LusPIN1-A*, B, *LusPIN4-A*, *LusPIN5-A*) и на поздней стадии формирования ТКК (*LusLAX3* (A, B)).

Как известно, все транспортеры ауксина упрощенно можно разделить на три группы: ответственные за приток ауксина в клетку, отток из клетки и транспорт внутри клетки. В оттоке ауксина из клетки принимают участие два типа переносчиков – PIN-белки и ABCВ-переносчики (Zařimalová et al., 2010). Классификация белков PIN, как правило, основана на филогенетических взаимоотношениях, субклеточной локализации и длине доменов гидрофильной петли. С этой точки зрения члены семейства белков PIN обычно группируются в три типа: 1) канонические (PIN1, 2, 3, 4 и 7 для резуховидки), локализованные на плазмалемме (ПМ), которые опосредуют межклеточный

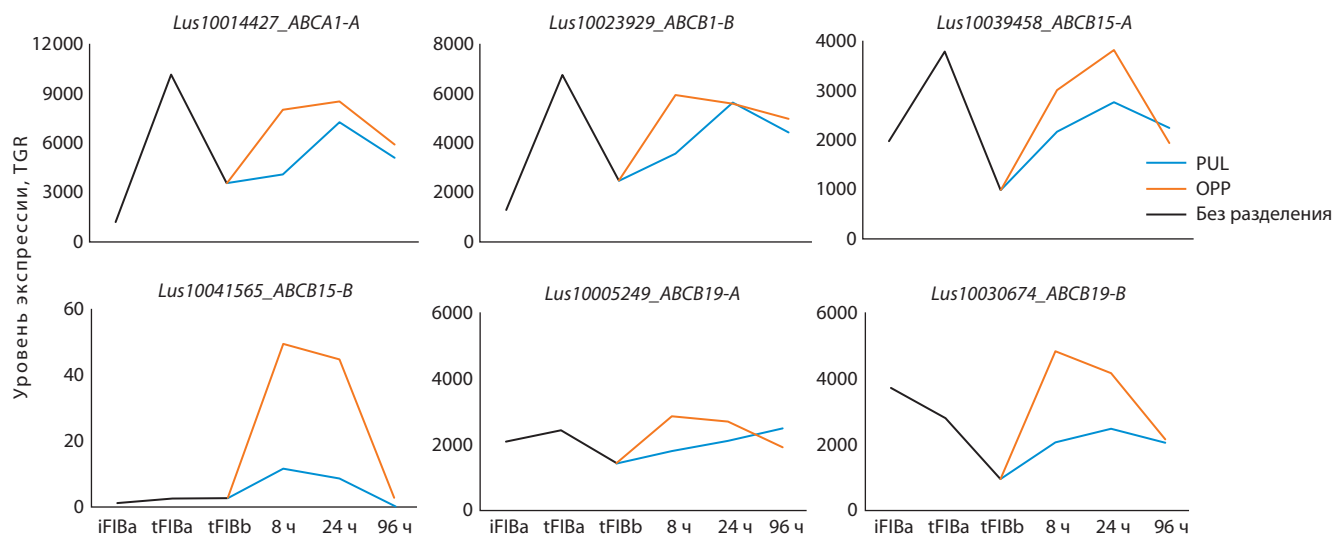


Рис. 9. Экспрессия некоторых изоформ *LusABC1*, 15, 19 в волокнах льна в норме и при гравитовете.

поток ауксина; 2) неканонические (PIN5 и 8 для резуховидки), которые локализуются на мембране ЭПР и опосредуют обмен ауксином между цитозолем и полостью ЭПР, способствуя внутриклеточному гомеостазу ауксина; 3) двойные, ПМ- и ЭПР-локализованные PIN, такие как PIN6 в резуховидке, с неясной функцией (Zhang et al., 2020). По результатам, полученным в настоящем исследовании, по PIN-переносчикам наблюдалась следующая тенденция: гены канонических *LusPIN* высоко экспрессировались в волокнах на стадии начала формирования ТКС (см. рис. 3) и при гравитовете. При этом их повышенная экспрессия наблюдалась в OPP-образцах (см. рис. 3), тогда как повышенная экспрессия генов неканонических PIN наблюдалась в PUL-образцах (см. рис. 4 и 5), что дает нам возможность предположить перераспределение содержания ауксина в волокнах на разных сторонах стебля при гравитовете. В подтверждение этого предположения подобная тенденция проявляется и в отношении ABCB-переносчиков (см. рис. 9): показана более высокая экспрессия *LusABC1*, 15 и 19 в OPP-образцах. ABCB-переносчики осуществляют транспорт за счет непосредственного связывания АТФ и энергии, которая высвобождается при гидролизе АТФ, и могут функционировать при снижении хемиосмотических градиентов, или когда ауксин должен двигаться против градиента (Zařimalová et al., 2010). Арабидопсис содержит 21 полноразмерный ген *ABCB* (Kang et al., 2011), но пока только для четырех изоформ – *ABCB1*, *ABCB4*, *ABCB19* и *ABCB21* – были получены достоверные данные о переносе ауксина; для *ABCB1* и *ABCB19* получена информация о согласованном действии при гравитропизме (Geisler et al., 2017). Также недавно было показано, что пары *ABCB1/19* и *ABCB6/20* представляют собой основные переносчики ауксина *ABCB* на дальние расстояния по проводящей системе у арабидопсиса (Jeness et al., 2022). Есть предположение, что *ABCB14* и *ABCB15* вовлечены в перенос ауксина в ходе лигнификации стебля (Kaneda et al., 2011). Надо отметить, что экспрессия генов ABCB-транспортеров в проростках арабидопсиса исследовалась в корнях, гипокотиле

и апексе побега (Geisler et al., 2017). Предполагают, что ABCB могут играть роль основных переносчиков ауксина: равномерно локализованы на ПМ, обычно обнаруживаются у различных видов растений и стабильно сохраняются независимо от внутренних и внешних сигналов. Напротив, PIN асимметрично локализованы и динамично распределяются в ответ на эндогенные и экзогенные сигналы (Cho M., Cho H.T., 2013).

Необходимо отметить, что в нашем исследовании были идентифицированы два паралога, гомологичные кладе *AtPIN3/4/7* (см. рис. 1), которые аннотированы нами по ближайшему гомологу как *LusPIN4* (А и В). Известно, что PIN3 обеспечивает латеральный перенос ауксина (Friml et al., 2002; Rakusová et al., 2019), показана высокая экспрессия *PIN3* в зрелых волокнах рами, имеющих утолщенную третичную клеточную стенку (Bao et al., 2019), и при формировании древесины натяжения (Gerttula et al., 2015). В данном исследовании гены *LusPIN4* (А и В) достоверно повышали экспрессию при гравитостимуляции (24 ч) (см. рис. 3), но экспрессия в волокнах OPP-образцов была немного выше по сравнению с PUL-образцами. Похожая тенденция была получена в результате анализа экспрессии генов и мембранной локализации *AtPIN3* и *AtPIN4* при формировании апикального крючка гипокотила, где тоже наблюдается выпуклая и вогнутая сторона. Авторы предположили, что увеличение содержания PIN3 и PIN4 в клеточной мембране на выпуклой стороне является решающим фактором для формирования локального максимума ауксина на вогнутой стороне (Zhu et al., 2019). Отметим, что мы исследовали область стебля взрослого растения, где волокна не растут растяжением и формируется второй (расположенный ниже) изгиб. Ранее мы показали, что при удалении верхней части стебля (где формируется верхний изгиб) растения не менее успешно реализуют гравитропическую реакцию (Ibragimova et al., 2017).

Из полученных здесь результатов следует, что у генов *AUX1/LAX*, ответственных за приток ауксина в клетку, повышалась экспрессия во время гравиреакции до уровня экспрессии в волокнах на ранней стадии формирования

ТКС (*LusAUX1-D* для PUL), но достоверного отличия между ОРР и PUL не наблюдалось (см. рис. 8). Однако очень интересен тот факт, что высокоэкспрессирующиеся гены *Lus10028078* и *Lus10025628* (*ATIG77690 – LAX3*) имели единственный максимум в контрольных образцах на поздней стадии формирования ТКС (см. рис. 7). Эти данные согласуются с высокой экспрессией аналогичных генов, которая отмечается в зрелых волокнах рами (Бао et al., 2019). При гравитовете экспрессия этих генов падала и незначительно возрастала к концу реакции, приближаясь к значениям в фазу начала формирования ТКС (см. рис. 7). Для *LAX2* наблюдали другой эффект: максимум экспрессии в волокнах приходился в фазу интрузивного роста, но, как и для *LAX3* и *AUX1*, при гравитовете значения экспрессии вновь были близки к величинам на ранней стадии формирования ТКС (достоверно для гена *LusLAX2-A* на PUL-стороне) (см. рис. 6).

Согласно результатам нашего исследования, повышенная экспрессия *LusPILS* в волокнах часто имела место при гравитовете – в волокнах как PUL-, так и ОРР-стороны (см. рис. 4 и 5), что позволяет предположить наличие связи между гравиреакцией и внутриклеточным перераспределением ауксина в целом. При этом в некоторых случаях наблюдалось достоверное отличие в волокнах на разных сторонах стебля (*LusPILS3* и *LusPILS7-A*) (см. рис. 4 и 5). Следует отметить, что у *LusPILS7-C* и *D* высокая экспрессия была только на стадии интрузивного роста волокон (см. рис. 2). PILS-переносчики были идентифицированы *in silico* как предполагаемое семейство посредников переноса ауксина; показано, что PILS, в том числе *PILS3* и *PILS7*, регулируют накопление ауксина в клетке, удерживая добавленный ауксин (Barbez et al., 2012), что, возможно, происходит и в случае гравитостимуляции.

Таким образом, в настоящей работе было показано, что при гравитропической реакции наиболее ярко экспрессировались гены, кодирующие транспортеры, ответственные за отток ауксина из клетки (*PIN* и *ABCB*) и внутриклеточный транспорт, отвечающие за гомеостаз ауксина (неканонические *PIN5*, *PIN8* и *PILS*). Уровень экспрессии этих генов часто приближался к величинам, которые были характерны для стадии начала формирования ТКС, когда биосинтетические процессы протекают более интенсивно по сравнению с таковыми в зрелых волокнах. При гравитропизме повышалась экспрессия и генов транспортеров, отвечающих за приток ауксина в клетки (*LusAUX1-D*). Выявлена дифференциальная экспрессия генов переносчиков ИУК в волокнах, находящихся на разных сторонах стебля: различие наблюдалось за счет экспрессии генов, продукты которых отвечают за внутриклеточный транспорт (*LusPILS3*, *LusPILS7-A*) и отток ауксина (*LusABCB15-B*, *LusABCB19-B*); повышенная экспрессия *PIN*-генов и *ABCB*-генов была более типична для волокон ОРР-стороны стебля.

Заключение

В данном исследовании в растениях льна идентифицированы основные гены переносчиков ауксина: 8 *LusAUX1/LAX*, 12 *LusPIN-FORMED*, 15 *LusPIN-LIKES* и 24 *LusABCB*. Выявлена дифференциальная экспрессия генов переносчиков ИУК на разной стадии развития и в волокнах, нахо-

дящихся на разных сторонах стебля при гравитовете. Мы предполагаем, что реализация гравиреакции может быть связана с асимметричным перераспределением ауксина, главным образом за счет внутриклеточных транспортеров и транспортеров оттока ауксина из клетки, повышение экспрессии генов которых мы наблюдали при гравиреакции. Для выяснения механизмов участия ауксина в реализации гравитовета, не связанного с ростом растяжением, наряду с участием в нем других гормонов, требуются дальнейшие исследования.

Список литературы / References

- Adamowski M., Friml J. PIN-dependent auxin transport: action, regulation, and evolution. *Plant Cell*. 2015;27(1):20-32. DOI 10.1105/tpc.114.134874
- Bao Y., Huang X., Rehman M., Wang Y., Wang B., Peng D. Identification and expression analysis of the PIN and AUX/LAX gene families in ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaud). *Agronomy*. 2019;9:435. DOI 10.3390/agronomy9080435
- Barbez E., Kubeš M., Rolčík J., Béziat C., Pencik A., Wang B., Rosquete M.R., Zhu J., Dobrev P.I., Lee Y., Zažímalová E., Petrášek J., Geisler M., Friml J., Kleine-Vehn J. A novel putative auxin carrier family regulates intracellular auxin homeostasis in plants. *Nature*. 2012;485(7396):119-122. DOI 10.1038/nature11001
- Cho M., Cho H.T. The function of ABCB transporters in auxin transport. *Plant Signal. Behav.* 2013;8(2):e22990. DOI 10.4161/psb.22990
- Evans M.L. Gravitropism: interaction of sensitivity modulation and effector redistribution. *Plant Physiol.* 1991;95(1):1-5. DOI 10.1104/pp.95.1.1
- Friml J., Wiśniewska J., Benkova E., Mendgen K., Palme K. Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature*. 2002;415(6873):806-809. DOI 10.1038/415806a
- Geisler M., Aryal B., Donato M., Hao P.A. Critical view on ABC transporters and their interacting partners in auxin transport. *Plant Cell Physiol.* 2017;58(10):1601-1614. DOI 10.1093/pcp/pcx104
- Gerttula S., Zinkgraf M., Muday G., Lewis D., Ibatullin F., Brumer H., Hart F., Mansfield S., Filkov V., Groover A. Transcriptional and hormonal regulation of gravitropism of woody stems in *Populus*. *Plant Cell*. 2015;27(10):2800-2813. DOI 10.1105/tpc.15.00531
- Gorshkova T.A., Sal'nikov V.V., Chemikosova S.B., Ageeva M.V., Pavlencheva N.V. The snap point: a transition point in *Linum usitatissimum* bast fiber development. *Ind. Crops Prod.* 2003;18(3):213-221. DOI 10.1016/S0926-6690(03)00043-8
- Harrison M.A., Pickard B.G. Auxin asymmetry during gravitropism by tomato hypocotyls. *Plant Physiol.* 1989;89(2):652-657. DOI 10.1104/pp.89.2.652
- Haygreen J.G., Bowyer J.L. Forest Products and Wood Science. Wiley-Blackwell, 1996
- Hellgren J.M., Olofsson K., Sundberg B. Patterns of auxin distribution during gravitational induction of reaction wood in poplar and pine. *Plant Physiol.* 2004;135(1):212-220. DOI 10.1104/pp.104.038927
- Ibragimova N.N., Ageeva M.V., Gorshkova T.A. Development of gravitropic response: unusual behavior of flax phloem G-fibers. *Protoplasma*. 2017;254(2):749-762. DOI 10.1007/s00709-016-0985-8
- Ibragimova N., Mokshina N., Ageeva M., Gurjanov O., Mikshina P. Rearrangement of the cellulose-enriched cell wall in flax phloem fibers over the course of the gravitropic reaction. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(15):5322. DOI 10.3390/ijms21155322
- Jenness M.K., Tayengwa R., Bate G.A., Tapken W., Zhang Y., Pang C., Murphy A.S. Loss of multiple ABCB auxin transporters recapitulates the major twisted dwarf 1 phenotypes in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* 2022;13:840260. DOI 10.3389/fpls.2022.840260
- Jourez B., Riboux A., Leclercq A. Anatomical characteristics of tension wood and opposite wood in young inclined stems of poplar (*Popu-*

- lus euramericana* cv 'Ghoy'). *IAWA J.* 2001;22(2):133-157. DOI 10.1163/22941932-90000274
- Kaneda M., Schuetz M., Lin B.S., Chanis C., Hamberger B., Western T.L., Ehling J., Samuelset A.L. ABC transporters coordinately expressed during lignifications of *Arabidopsis* stems include a set of ABCBs associated with auxin transport. *J. Exp. Bot.* 2011;62(6):2063-2077. DOI 10.1093/jxb/erq416
- Kang J., Park J., Choi H., Burla B., Kretschmar T., Lee Y., Martinoia E. Plant ABC transporters. *Arabidopsis Book.* 2011;9:e0153. DOI 10.1199/tab.0153
- Li Y., Hagen G., Guilfoyle T.J. An auxin-responsive promoter is differentially induced by auxin gradients during tropisms. *Plant Cell.* 1991;3(11):1167-1175. DOI 10.1105/tpc.3.11.1167
- Manna M., Rengasamy B., Ambash N.K., Sinha A.K. Characterization and expression profiling of PIN auxin efflux transporters reveal their role in developmental and abiotic stress conditions in rice. *Front. Plant Sci.* 2022;13:1059559. DOI 10.3389/fpls.2022.1059559
- Mokshina N., Gorshkov O., Takasaki H., Onodera H., Sakamoto S., Gorshkova T., Mitsuda N. FIBexDB: a new online transcriptome platform to analyze development of plant cellulosic fibers. *New Phytol.* 2021;231(2):512-515. DOI 10.1111/nph.17405
- Rakusová H., Han H., Valošek P., Friml J. Genetic screen for factors mediating PIN polarization in gravistimulated *Arabidopsis thaliana* hypocotyls. *Plant J.* 2019;98(6):1048-1059. DOI 10.1111/tpj.14301
- Swarup R., Péret B. AUX/LAX family of auxin influx carriers – an overview. *Front. Plant Sci.* 2012;3:225. DOI 10.3389/fpls.2012.00225
- Timell T.E. The chemical composition of tension wood. *Svensk Papperstidning.* 1969;72:173-181
- Young G.B., Jack D.L., Smith D.W., Saier M.H., Jr. The amino acid/auxin:proton symport permease family. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999;1415(2):306-322. DOI 10.1016/S0005-2736(98)00196-5
- Zažimalová E., Murphy A.S., Yang H., Hoyerová K., Hošek P. Auxin transporters – why so many? *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010;2(3):a001552. DOI 10.1101/cshperspect.a001552
- Zhang Y., Hartinger C., Wang X., Friml J. Directional auxin fluxes in plants by intramolecular domain-domain coevolution of PIN auxin transporters. *New Phytol.* 2020;227(5):1406-1416. DOI 10.1111/nph.16629
- Zhu Q., Gallemí M., Pospíšil J., Žádníková P., Strnad M., Benková E. Root gravity response module guides differential growth determining both root bending and apical hook formation in *Arabidopsis*. *Development.* 2019;146(17):dev175919. DOI 10.1242/dev.175919

ORCID

N.E. Mokshina orcid.org/0000-0002-6434-7404

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 23-24-00612.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 26.07.2023. После доработки 15.11.2023. Принята к публикации 16.11.2023.

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

Аскорбат-глутатионовый цикл в проростках пшеницы и риса при аноксии и последующей реэрации

В.В. Емельянов^{1, 2}✉, Е.Г. Приказюк^{2, 3}, В.В. Ласточкин², О.М. Арешева², Т.В. Чиркова²

¹ Кафедра генетики и биотехнологии, биологический факультет, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

² Кафедра физиологии и биохимии растений, биологический факультет, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

³ Кафедра водных ресурсов, факультет геоинформатики и наблюдения за Землей, Университет Твенте, Энschede, Нидерланды

✉ bootika@mail.ru

Аннотация. Важной частью антиоксидантной системы растений является аскорбат-глутатионовый цикл (АГЦ), функционирование которого регистрируется при действии разнообразных стрессоров, в том числе дефицита и/или отсутствия O₂, а также окислительного стресса, возникающего сразу после восстановления доступа кислорода (реэрация, или постаноксия). Показана значительная аккумуляция окисленных форм аскорбата и глутатиона в проростках пшеницы (*Triticum aestivum*, сорт Ленинградка, неустойчивое растение) при действии на него 24-часовой аноксии и реэрации, что свидетельствует о развитии окислительного стресса. У риса (*Oryza sativa*, сорт Лиман, устойчивое растение) преобладали восстановленные формы данных антиоксидантов как в контроле, так и при стрессе, что может указывать на их интенсивное восстановление. У пшеницы активности аскорбатпероксидазы и дегидроаскорбатредуктазы в побегах, а также монодегидроаскорбатредуктазы и глутатионредуктазы в корнях снижались под действием аноксии и реэрации. У риса активность антиоксидантных ферментов сохранялась в отсутствие кислорода (аскорбатпероксидаза, глутатионредуктаза) и возрастала при постаноксии (редуктазы АГЦ). Аноксия стимулировала накопление мРНК генов органелльных форм аскорбатпероксидазы *OsAPX3*, *OsAPX5* в побегах и *OsAPX3-5*, *OsAPX7* в корнях проростков риса. При постаноксии во всем растении возрастал вклад генов цитоплазматических форм фермента – *OsAPX1*, *OsAPX2*, а также пластидной *OsAPX8*. При реэрации аккумулировались транскрипты пероксисомной и цитоплазматической монодегидроаскорбатредуктазы *OsMDAR2* и *OsMDAR4*, цитозольной и органелльной глутатионредуктазы *OsGR2* и *OsGR3*. В большинстве случаев недостаток O₂ индуцировал активность генов, кодирующих пероксисомные, пластидные и митохондриальные формы ферментов, а реэрация усиливала работу генов, кодирующих цитоплазматические формы. При действии аноксии и последующей реэрации выявлена инактивация ферментов АГЦ в проростках пшеницы, что нарушало эффективную работу цикла и запускало аккумуляцию окисленных форм аскорбата и глутатиона. У риса аноксия приводила к сохранению активности ферментов АГЦ, а реэрация ее стимулировала, в том числе на уровне экспрессии генов, что обеспечивало эффективное функционирование аскорбат-глутатионового цикла. Ключевые слова: аноксия; реэрация; окислительный стресс; аскорбиновая кислота; глутатион; аскорбат-глутатионовый цикл; пшеница; рис.

Для цитирования: Емельянов В.В., Приказюк Е.Г., Ласточкин В.В., Арешева О.М., Чиркова Т.В. Аскорбат-глутатионовый цикл в проростках пшеницы и риса при аноксии и последующей реэрации. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(1):44-54. DOI 10.18699/vjgb-24-06

Ascorbate-glutathione cycle in wheat and rice seedlings under anoxia and subsequent reaeration

V.V. Yemelyanov^{1, 2}✉, E.G. Prikaziuk^{2, 3}, V.V. Lastochkin², O.M. Aresheva², T.V. Chirkova²

¹ Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

² Department of Plant Physiology and Biochemistry, Faculty of Biology, Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

³ Department of Water Resources, ITC Faculty of Geo-Information Science and Earth Observation, University of Twente, Enschede, the Netherlands

✉ bootika@mail.ru

Abstract. The most important part of the plant antioxidant system is the ascorbate-glutathione cycle (AGC), the activity of which is observed upon exposure to a range of stressors, including lack of O₂, and oxidative stress occurring immediately after the restoration of oxygen access, hereafter termed reaeration or post-anoxia. The operation of the AGC (enzymes and low-molecular components) in wheat (*Triticum aestivum*, cv. Leningradka, non-resistant to hypoxia) and rice (*Oryza sativa*, cv. Liman, resistant) seedlings after 24 h anoxia and 1 h or 24 h reaeration was studied. Significant accumulation of oxidized forms of ascorbate and glutathione was revealed in the non-resistant plant (wheat) after 24 h of anoxia and reaeration, indicating the development of oxidative stress. In the resistant plant (rice), reduced forms of these antioxidants prevailed both in normoxia and under stress, which may indicate their intensive reduction. In wheat, the activities of ascorbate peroxidase and dehydroascorbate reductase in shoots, and monodehydroascorbate reductase and glutathione reductase in roots decreased under anoxia and reaeration. The activity of antioxidant enzymes was maintained in rice under lack of oxygen (ascorbate peroxidase, glutathione reductase) and increased during post-ano-

xia (AGC reductases). Anoxia stimulated accumulation of mRNA of the organellar ascorbate peroxidase genes *OsAPX3*, *OsAPX5* in shoots, and *OsAPX3-5* and *OsAPX7* in roots. At post-anoxia, the contribution of the *OsAPX1* and *OsAPX2* genes encoding the cytosolic forms of the enzyme increased in the whole plant, and so did that of the *OsAPX8* gene for the plastid form of the enzyme. The accumulation of mRNA of the genes *OsMDAR2* and *OsMDAR4* encoding peroxisomal and cytosolic monodehydroascorbate reductase as well as the *OsGR2* and *OsGR3* for cytosolic and organellar glutathione reductase was activated during reaeration in shoots and roots. In most cases, O₂ deficiency activated the genes encoding the peroxisomal, plastid, and mitochondrial forms of the enzymes, and upon reaeration, an enhanced activity of the genes encoding the cytoplasmic forms was observed. Taken together, the inactivation of AGC enzymes was revealed in wheat seedlings during anoxia and subsequent reaeration, which disrupted the effective operation of the cycle and triggered the accumulation of oxidized forms of ascorbate and glutathione. In rice, anoxia led to the maintenance of the activity of AGC enzymes, and reaeration stimulated it, including at the level of gene expression, which ensured the effective operation of AGC.

Key words: anoxia; reaeration; oxidative stress; ascorbate; glutathione; ascorbate-glutathione cycle; wheat; rice.

For citation: Yemelyanov V.V., Prikaziuk E.G., Lastochkin V.V., Aresheva O.M., Chirkova T.V. Ascorbate-glutathione cycle in wheat and rice seedlings under anoxia and subsequent reaeration. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(1):44-54. DOI 10.18699/vjgb-24-06

Введение

Растения обладают многоуровневой системой защиты от повреждающего действия активных форм кислорода (АФК), накапливающихся в ответ на изменение условий окружающей среды, этапов развития, действие гормонов и т. п. (Halliwell, 2006; Foyer, Noctor, 2009; Шиков и др., 2021). Важной частью антиоксидантной системы является аскорбат-глутатионовый цикл (АГЦ, путь Фойер–Халливелла–Асады), обеспечивающий эффективное восстановление низкомолекулярных антиоксидантов – аскорбата и глутатиона. Аскорбиновая кислота (АК, витамин С) – ключевой водорастворимый антиоксидант, присутствует во всех компартментах клетки, включая апопласт (Noctor, Foyer, 1998). Она нейтрализует большинство АФК, восстанавливает токоферол и эпоксикаротиноиды виолакаротинового цикла. При окислении АК образуется либо короткоживущий радикал – монодегидроаскорбиновая кислота (МДАК), либо нерадикальная окисленная форма – дегидроаскорбиновая кислота (ДАК). Две молекулы МДАК могут вступать в реакцию диспропорционирования с образованием одной молекулы восстановленной АК и одной молекулы ДАК.

Глутатион, еще один низкомолекулярный антиоксидант АГЦ, представляет собой трипептид γ -Glu-Cys-Gly. Он присутствует во всей клетке, но в апопласте лишь в следовых количествах (Noctor, Foyer, 1998; Gill, Tuteja, 2010). Глутатион нейтрализует активные формы кислорода и азота, свободные радикалы и пероксиды жирных кислот, участвует в обезвреживании метилглиоксала, ксенобиотиков и тяжелых металлов, восстанавливает ДАК и сульфгидрильные группы (Hasanuzzaman et al., 2017). Он участвует в различных физиологических процессах, включая окислительно-восстановительную регуляцию, передачу сигналов, конъюгацию и транспорт метаболитов, регуляцию роста и развития растений (Gill, Tuteja, 2010).

Ключевой фермент АГЦ – аскорбатпероксидаза (АПО или АРХ, КФ 1.11.1.11) – окисляет две молекулы АК до двух МДАК. АПО относится к гем-пероксидазам I класса и локализована преимущественно в пластидах (большинство изоформ), а также в цитоплазме и пероксисомах. Ряд стромальных АПО обнаружен и в матриксе митохондрий (Ishikawa, Shigeoka, 2008). МДАК в цикле может восстанавливаться до АК монодегидроаскорбатредуктазой

(МДАК, КФ 1.6.5.4), локализованной в цитозоле, пероксисомах, пластидах и митохондриях. При восстановлении двух молекул МДАК МДАК окисляет одну молекулу НАДН или НАДФН. ДАК может неферментативно восстанавливаться глутатионом, особенно при щелочных значениях pH, характерных для стромы хлоропластов. Тиоредоксины f и m также восстанавливают ДАК (Morell et al., 1997). В АГЦ за восстановление ДАК отвечает дегидроаскорбатредуктаза (ДАР, КФ 1.8.5.1), при этом две молекулы восстановленного глутатиона (GSH) превращаются в окисленную форму – глутатиондисульфид (GSSG). ДАР относится к суперсемейству глутатион-S-трансфераз, хотя и не способна катализировать конъюгацию глутатиона или восстановление пероксида. ДАР локализована в цитозоле, пероксисомах, пластидах и митохондриях, а у ряда растений – в апопласте и вакуолях (Ding et al., 2020). Глутатионредуктаза (ГР, КФ 1.8.1.7) катализирует восстановление глутатиона за счет НАДФН; она функционирует в цитоплазме, пластидах и митохондриях, причем 80 % активности в фотосинтетических тканях приходится на хлоропласты (Gill et al., 2013). Данные протеомного анализа подтверждают наличие ГР в пероксисомах (Palma et al., 2009). ГР участвует не только в АГЦ, она вовлечена в поддержание сульфгидрильных групп и восстановление глутатиона, окисленного непосредственно АФК, пероксидами жирных кислот и S-конъюгатами и т. п. (Gill, Tuteja, 2010; Gill et al., 2013).

Аскорбат-глутатионовый цикл участвует в антиоксидантной защите фотосинтетического аппарата. Именно в связи с этой функцией цикл и был сформулирован (Foyer, Halliwell, 1976). Он также реализуется в цитоплазме и, частично, в пероксисомах и митохондриях. АГЦ важен для адаптации растений к действию неблагоприятных факторов окружающей среды. Повышенная активность и экспрессия генов большинства ферментов АГЦ характерна для растений, устойчивых к засухе, засолению, неблагоприятным температурам, тяжелым металлам, фитопатогенам и т. п. Трансгенные растения со сверхэкспрессией генов цикла демонстрируют повышенную устойчивость к действию стрессоров (Hasanuzzaman et al., 2019).

Одним из распространенных стресс-факторов, действующих на растения, является дефицит (гипоксия) или полное отсутствие (аноксия) кислорода при избыточном

увлажнении, подтоплении почв или затоплении (Chirkova, Yemelyanov, 2018). АФК образуются еще в бескислородной среде, где они участвуют в трансдукции анаэробного сигнала и запускают деструктивные процессы (Blokchina et al., 2001). Последующее окисление кислородом накопленных в ходе аноксии восстановленных продуктов приводит к усилению генерации АФК и развитию пост-аноксического окислительного повреждения (Blokchina et al., 2003; Шиков и др., 2020).

Имеются многочисленные данные об изменении работы компонентов АГЦ под влиянием гипо- и аноксии. Дефицит O_2 снижал активность всех ферментов АГЦ в анаэробно-выращенных проростках риса и лотоса (Ushimaru et al., 1992, 2001), в корнях у пшеницы (Biemelt et al., 1998). Однако в корнях люпина (*Lupinus luteus*) изменений активности выявлено не было (Garnczarska, 2005), а у цитрусов (*Citrus paradisi* L. Macf. × *Poncirus trifoliata* L. Raf.) длительное затопление даже стимулировало большинство ферментов АГЦ (Hossain et al., 2009). В корнях сои при затоплении снижалась активность АПО (Kausar et al., 2012), у лука-батун – АПО и ГР (Yiu et al., 2009), а в листьях хлопчатника – АПО, ДАР и ГР (Wang et al., 2019). Реаэрация, напротив, стимулировала большинство ферментов АГЦ (Ushimaru et al., 1992, 2001; Garnczarska, 2005).

Отметим, что только в нескольких работах проанализированы различия в функционировании АГЦ у растений с разной устойчивостью к дефициту кислорода. У бобовых растений, голубиногороха (*Cajanus cajan*) и маша (*Vigna radiata*) устойчивые к затоплению формы характеризовались большей активностью АПО и ГР при гипоксии и реэрации, что сопровождалось усилением экспрессии соответствующих генов (Sairam et al., 2009, 2011). Активность АПО при затоплении повышалась у устойчивых медленно растущих сортов риса (Damanik et al., 2010) и райграса (*Lolium perenne*) (Liu, Jiang, 2015). Аноксия и реоксигенация вызывали большую продукцию АФК и окислительные повреждения липидов и белков в проростках неустойчивого растения пшеницы (Чиркова и др., 1998; Shikov et al., 2022) и повышали активность каталазы и пероксидазы III класса у устойчивого растения (риса) (Емельянов и др., 2022).

Цель данного исследования состояла в изучении действия аноксии и постаноксического окислительного стресса на содержание низкомолекулярных антиоксидантов и активность ферментов аскорбат-глутатионового цикла у растений пшеницы и риса, контрастных по устойчивости к недостатку кислорода.

Материалы и методы

Растительный материал. Объектами исследования были 7-дневные проростки пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Ленинградка и 10-дневные проростки риса (*Oryza sativa* L.) сорта Лиман. Семена пшеницы были приобретены в ОПХ «Суйда» (Ленинградская область), семена риса предоставлены ФНЦ риса (Краснодар). Пшеницу использовали в качестве неустойчивого, а рис – устойчивого к гипоксии растения.

Семена поверхностно стерилизовали 5 % раствором гипохлорита натрия и выращивали в гидропонных условиях, как описано нами ранее (Yemelyanov et al., 2020). Анаэроб-

ные условия создавали пропуском газообразного азота (содержание кислорода <0.01 %, «Лентехгаз», Россия) через камеры с растениями, которые затем герметично закрывали и помещали в темноту для предотвращения образования кислорода на свету. Анаэробные условия проверяли с помощью индикатора Anaerotest® (Merck, Германия). Экспозиция в атмосфере азота составляла 24 ч. Контрольные растения помещали в темноту в условиях аэрации. Далее для создания условий реэрации опытные растения вынимали из анаэробных камер и оставляли на воздухе в темноте на 15 мин, 1, 3 и 24 ч в экспериментах по определению низкомолекулярных антиоксидантов и 1 и 24 ч в экспериментах по изучению активности ферментов аскорбат-глутатионового цикла и экспрессии генов, их кодирующих.

Определение содержания аскорбата и глутатиона. Низкомолекулярные антиоксиданты цикла экстрагировали охлажденной 5 % метафосфорной кислотой из 1 г побегов и корней после гомогенизации в жидком азоте (Blokchina et al., 2000). Экстракт фильтровали и центрифугировали 30 мин при 15000 g. Содержание аскорбата и дегидроаскорбата определяли спектрофотометрически бипиридиловым методом (Knörzer et al., 1996). Восстановленный и окисленный глутатион детектировали энзиматическим методом (Law et al., 1983; Knörzer et al., 1996) с помощью глутатионредуктазы (Sigma, США).

Определение активностей ферментов аскорбат-глутатионового цикла. Для экстракции ферментов побеги и корни 10 проростков взвешивали и растирали в ступке с пестиком в охлажденном буфере (соотношение ткань : буфер 1 : 10, w/v) с добавлением кварцевого песка. Все операции проводили при температуре +4 °С. Содержание белка в ферментной вытяжке определяли методом Брэдфорда (Bradford, 1976). Для каждого фермента при расчетах активности учитывалось автоокисление субстратов, которое детектировали без добавления ферментной вытяжки.

Для экстракции *аскорбатпероксидазы* растительную ткань гомогенизировали и экстрагировали 0.05 М К₂Na-фосфатным буфером (рН 7.0). После 15 мин центрифугирования при 8000 g супернатант собирали, а мезгу ресуспендировали с 1/2 первоначального объема буфера, затем экстрагировали 20 мин и снова центрифугировали. Объединенную фракцию использовали для определения активности фермента по уменьшению поглощения при 290 нм (СФ-26, «ЛМО», Россия) вследствие окисления аскорбата (Nakano, Asada, 1981). Реакционная среда для измерения активности АПО состояла из 40 мкл ферментной вытяжки (7.0–23.2 мкг белка) в 0.05 М К₂Na-фосфатном буфере (рН 7.0), куда добавляли 0.5 мл 5 мМ аскорбата (Sigma). Реакцию запускали добавлением H_2O_2 (2.5 мМ), в контрольный вариант добавляли дистиллированную воду. Конечный объем среды – 3 мл. Активность фермента рассчитывали в микромолях окисляемого аскорбата на 1 г сырой массы в минуту, используя коэффициент экстинкции $2.8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Промежуточные редуктазы АГЦ (МДАР и ДАР) экстрагировали 0.05 М К₂Na-фосфатным буфером (рН 7.3), содержащим 2 мМ ЭДТА и 1 % поливинилполипирролидон поперечносшитый (Sigma). Гомогенат фильтровали и центрифугировали при 15000 g в течение 20 мин.

Активность МДАР определяли в реакции, сопряженной с аскорбатоксидазой (Arrigoni et al., 1981). Состав реакционной среды: 100 мкл 0.3 мМ аскорбиновой кислоты, 200 мкл 0.3 мМ НАДН (Sigma), 0.5 ед. аскорбатоксидазы (Sigma), 300 мкл пробы (экстракт из побегов) или 500 мкл (экстракт из корней) и 0.05 М К,Na-фосфатный буфер (рН 6.3). Конечный объем среды – 3 мл. Реакцию запускали, добавляя аскорбатоксидазу. Оптическую плотность измеряли при 340 нм на спектрофотометре СФ-46 («ЛЮМО», Россия). Активность фермента рассчитывали в наномолях окисляемого НАДН на 1 г сырой массы в минуту (коэффициент экстинкции НАД(Ф)Н $6.22 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$).

Активность ДАР детектировали в реакционной среде, содержащей: 100 мкл 0.5 мМ дегидроаскорбиновой кислоты (Sigma), 100 мкл 1 мМ восстановленного глутатиона (Sigma), 50 мкл ферментной вытяжки (из побегов) или 100 мкл (из корней) и 0.05 М К,Na-фосфатный буфер (рН 7.0) (Kpörzger et al., 1996). Конечный объем – 3 мл. Реакцию запускали, добавляя ДАК, которую растворяли непосредственно перед измерением активности в дистиллированной воде, насыщенной газообразным азотом. Оптическую плотность измеряли при 265 нм на спектрофотометре СФ-46. Активность фермента рассчитывали в микромолях восстанавливаемого аскорбата на 1 г сырой массы в минуту.

Глутатионредуктазу экстрагировали 0.1 М К,Na-фосфатным буфером (рН 7.5), содержащим 2 мМ ЭДТА и 1 % поливинилпиперидон поперечносшитый. Гомогенат фильтровали и центрифугировали при 15000 г в течение 20 мин. Активность ГР определяли в среде следующего состава: 300 мкл экстракта, 100 мкл 0.5 мМ окисленного глутатиона (Sigma), 200 мкл 0.2 мМ НАДФН (Sigma) в 0.1 М К,Na-фосфатном буфере (Rao et al., 1995). Конечный объем среды – 3 мл. Реакцию запускали добавлением НАДФН. Оптическую плотность измеряли при 340 нм на спектрофотометре СФ-46. Активность фермента рассчитывали в наномолях окисляемого НАДФН на 1 г сырой массы в минуту.

Анализ экспрессии генов, кодирующих ферменты аскорбат-глутатионового цикла. Экспрессию генов изучали в проростках риса, поскольку в них сохранялась или возрастала активность большинства изучаемых ферментов. Для подбора праймеров использовали базы данных аннотированного генома риса (Rice Genome Annotation Project, <http://rice.uga.edu/> и The rice annotation project database, <http://rapdb.dna.affrc.go.jp/tools/search/>), а также референсный геном риса IRGSP-1.0 *Oryza sativa* var. *japonica* сорта Nipponbare, доступный на сайте (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_001433935.1/).

Были найдены последовательности нуклеотидов генов, кодирующих все типы аскорбатпероксидаз (8 генов), монодегидроаскорбатредуктаз (5 генов), дегидроаскорбатредуктаз (2 гена) и глутатионредуктаз (3 гена). Исследованы кодирующие последовательности ДНК (CDS). Среди аскорбатпероксидаз несколько CDS имел ген *OsAPX8* (2), среди монодегидроаскорбатредуктаз – гены *OsMDAR2* и *OsMDAR4* (по 2), среди глутатионредуктаз несколько CDS обнаружено у *OsGR2* (3) и *OsGR3* (2). В программе MegAlign 5.05 из набора DNASTar были выравнены

все CDS соответствующих генов по алгоритму ClustalW. К консенсусным участкам, ближайшим к 3'-концу CDS, в программе VectorNTI 8 были подобраны праймеры (Приложения 1 и 2)¹, т.е. разработанные нами праймеры позволяют оценить экспрессию любых вариантов альтернативного сплайсинга по изучаемым генам. В качестве гена сравнения (референсного) использовали *OsTUB4*, кодирующий β -тубулин-4 и продемонстрировавший наиболее стабильную экспрессию (Емельянов и др., 2022). Специфичность праймеров проверяли с помощью поиска гомологии с геномом и транскриптомом риса по алгоритму BLASTn на сайте базы данных NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Праймеры заказывали в компании «Бигль» (Россия, <http://www.biobeagle.com/>).

Методы выделения и очистки РНК, обратной транскрипции и количественной ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) были подробно описаны ранее (Емельянов и др., 2022). ОТ-ПЦР-РВ проводили с помощью наборов с красителем SYBRGreen («Синтол», Россия, <http://www.syntol.ru>) на термочиклере С1000 с оптическим модулем CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США) согласно рекомендациям производителя. Использовали оборудование ресурсного центра СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

Для получения относительного количества транскриптов из пороговых циклов амплификации (C_t) использовали метод $2^{-\Delta C_t}$, а для получения степени изменения относительного количества транскриптов каждого гена – метод $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak, Schmittgen, 2001). Изменение уровня экспрессии рассчитывали относительно контрольных (нормоксических) значений, принимая их за единицу.

Статистическая обработка. Все опыты выполняли в 4–8-кратной биологической и 3-кратной аналитической повторности. Статистическую обработку данных проводили с помощью GraphPad Prism 8.0.1 для Windows. На графиках приведены средние значения величин и их стандартные ошибки. Значения с разными буквами достоверно различаются при $p < 0.05$ (взвешенное среднее Тьюки). Тепловые карты строили с помощью пакета tidyverse (Wickham et al., 2019) в программной среде R (R Core Team, 2023). Звездочками на теплокарте обозначены статистически значимые отличия от контроля (U-критерий Манна–Уитни, $p < 0.05$).

Результаты

Действие аноксии и реэрации

на низкомолекулярные антиоксиданты АГЦ

Исходный уровень аскорбата у пшеницы был выше, чем у риса: в 2 раза в побегах и в 1.5 раза в корнях (рис. 1). Восстановленная форма АК доминировала в проростках обоих растений (80 и 70 % в побегах и корнях пшеницы и 60 % в органах проростков риса). 24-часовая аноксия проростков пшеницы вызывала падение уровня АК в побегах (в 4 раза) и корнях (в 5 раз) (см. рис. 1, а, в), при этом происходила аккумуляция ДАК (в 3.5 и 3 раза соответственно). В результате окисленная форма в них доминировала (80 % в побегах и 90 % в корнях). У риса в

¹ Приложения 1–6 см. по адресу:

<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2024-28/appx2.pdf>

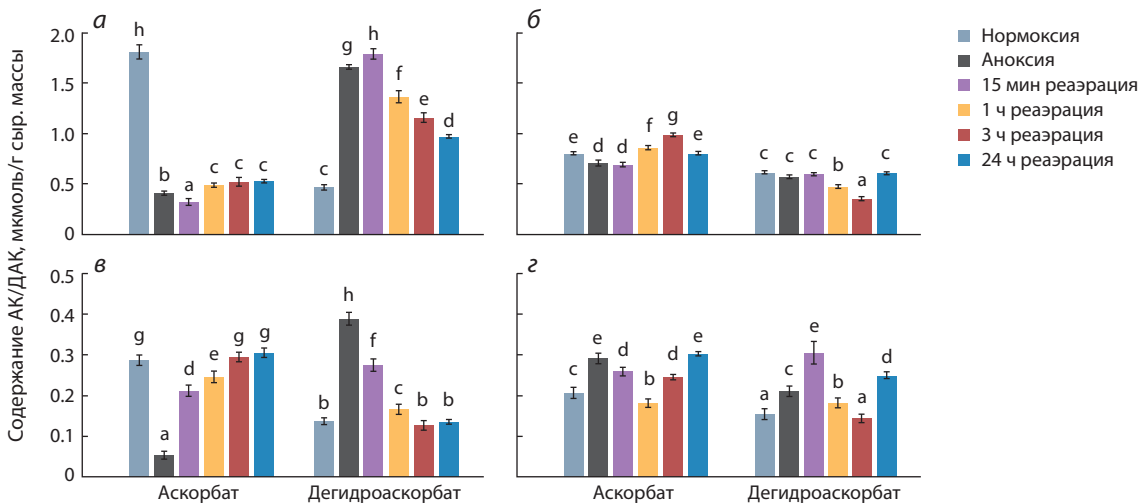


Рис. 1. Содержание аскорбиновой (АК) и дегидроаскорбиновой кислоты (ДАК) в побегах (а, б) и корнях (в, з) проростков пшеницы (а, в) и риса (б, з) при действии 24-часовой аноксии и последующей реаэрации. Значения с разными буквами (а–h) достоверно различаются (взвешенное среднее Тьюки, $p < 0.05$).

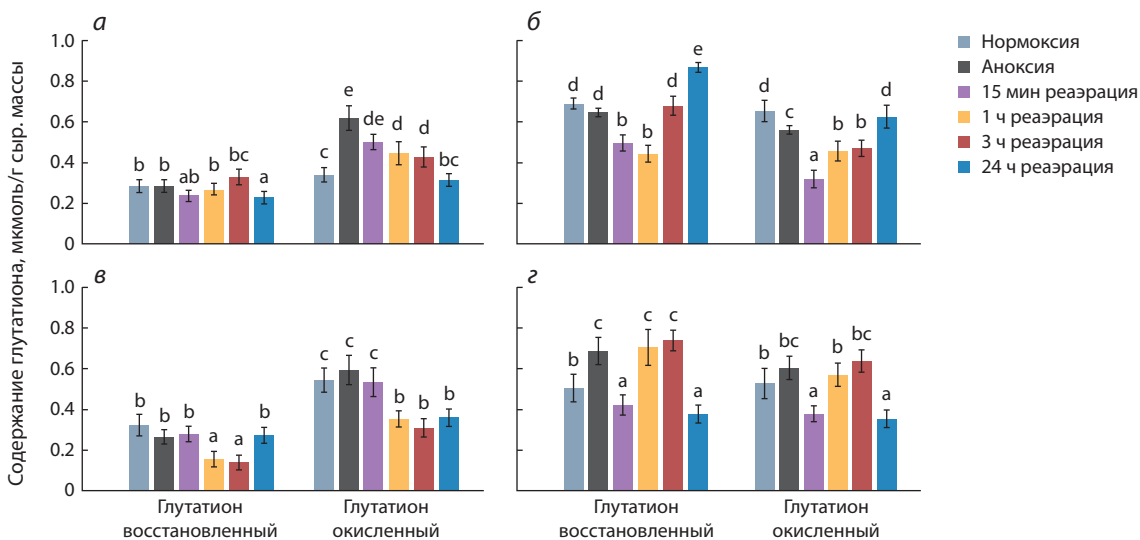


Рис. 2. Содержание восстановленной (GSH) и окисленной (GSSG) форм глутатиона в побегах (а, б) и корнях (в, з) проростков пшеницы (а, в) и риса (б, з) при действии 24-часовой аноксии и последующей реаэрации. Значения с разными буквами (а–e) достоверно различаются (взвешенное среднее Тьюки, $p < 0.05$).

побегах при действии аноксии содержание АК снижалось на 10 %, ДАК – не изменялось (см. рис. 1, б), тогда как в корнях уровень обеих форм аскорбата увеличивался на 40 % (см. рис. 1, з). 15-минутная реаэрация приводила к дальнейшему снижению содержания АК и накоплению ДАК в побегах пшеницы. Более длительная постаноксия (1–24 ч) вызывала аккумуляцию АК и падение уровня ДАК (см. рис. 1, в), причем обе формы достигали контрольных значений. Важно, что суммарный уровень аскорбата (АК+ДАК) под действием аноксии и последующей аэрации снижался с 2.3 до 1.5 мкмоль/г сыр. массы в побегах пшеницы и сохранялся в корнях. Изменения аскорбата в проростках риса были противоположены: в побегах уровень АК/ДАК сначала возрастал/снижался (соответственно), а затем возвращался к контрольному

(см. рис. 1, б), а в корнях, наоборот, сначала снижался/возрастал, однако к концу эксперимента оба параметра превосходили контрольные значения (см. рис. 1, з). Суммарный уровень аскорбата в проростках риса не изменялся (за исключением 24 ч реаэрации, когда в корнях он повышался в 1.5 раза).

Рассмотрим теперь динамику содержания глутатиона. Исходное содержание восстановленного глутатиона (GSH) и общего глутатиона (GSH+GSSG) было выше в проростках риса, особенно в побегах (рис. 2). Содержание обеих форм глутатиона, GSH и GSSG, было примерно равным. Соотношение GSH/GSSG составило 1.3 в побегах и 1.1 в корнях риса. У пшеницы доминировала окисленная форма (GSSG), соотношение GSH/GSSG – 0.6 и 0.9 соответственно. Отсутствие кислорода не оказывало воздействия

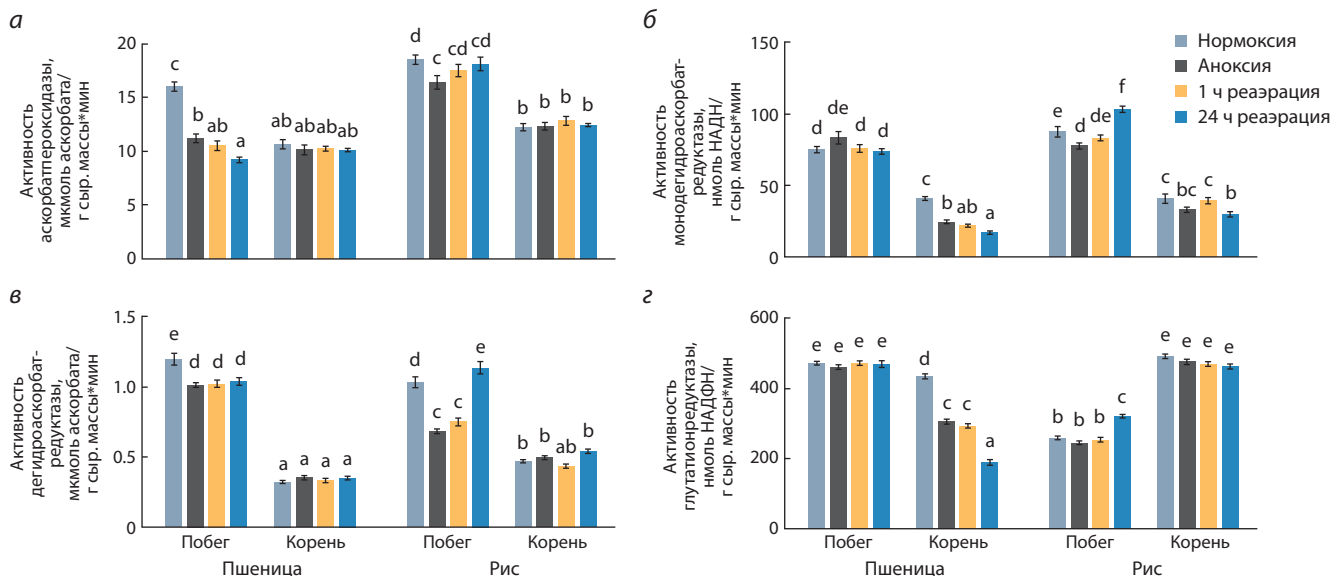


Рис. 3. Активность ферментов аскорбат-глутатионового цикла в побегах и корнях проростков пшеницы и риса при действии 24-часовой аноксии и последующей реэрации: *а* – аскорбатпероксидаза (АПО), *б* – монодегидроаскорбатредуктаза (МДАР), *в* – дегидроаскорбатредуктаза (ДАР), *г* – глутатионредуктаза (ГР).

Значения с разными буквами (а–f) достоверно различаются (взвешенное среднее Тьюки, $p < 0.05$).

на уровень ГSH в проростках пшеницы и побегах риса, тогда как в корнях риса он возрастал на 25 % (см. рис. 2, *г*). Содержание ГSSG изменялось под действием аноксии только в побегах изученных растений: у пшеницы увеличивалось в 2 раза, у риса снижалось на 15 % (см. рис. 2, *а, б*). Уровень ГSH снижался в побегах пшеницы при 24 ч реэрации, а в корнях на более коротких сроках (1–3 ч), после чего возвращался к контрольному (см. рис. 2, *а, в*). Содержание ГSSG при постаноксии уменьшалось в побегах до, а в корнях – ниже контроля (нормоксии). Уровень общего глутатиона (ГSH+ГSSG) при действии стресса существенно не изменялся, а доля ГSH уменьшалась с 46 % (побеги) и 40 % (корни) при нормоксии до 31–35 % при аноксии и краткосрочной реэрации, после чего возвращалась к контрольным значениям. На уровень обеих форм глутатиона в проростках риса постаноксия действовала сходным образом. В побегах он снижался при краткосрочной реэрации (15 мин–3 ч) и повышался к 24 ч постаноксии (см. рис. 2, *б*). В корнях риса содержание обеих форм снижалось после 15-минутной реоксигенации, повышалось к 1–3 ч и снова снижалось к 24 ч постаноксии (см. рис. 2, *г*). Уровень общего глутатиона у риса снижался при действии аноксии и краткосрочной (15 мин) реэрации, а затем возвращался к контролю. Соотношение ГSH/ГSSG в проростках риса было больше единицы на всем протяжении эксперимента, т. е. ГSH преобладал.

Действие аноксии и реэрации на ферменты АГЦ

Данные об изменении активности высокомолекулярных компонентов АГЦ представлены на рис. 3. Отметим, что исходный уровень активности ферментов АГЦ, за исключением ГР риса, был выше в побегах растений обоих видов (см. рис. 3). Аноксия и последующая реэрация вызвали существенное снижение активности АПО в побегах пшеницы, а в побегах риса 10 % подавление актив-

ности при кислородной недостаточности сменялось возвращением к контрольному уровню при постаноксии (см. рис. 3, *а*). В корнях растений обоих видов ни аноксия, ни реэрация не вызвали изменения активности АПО, так же как и МДАР в побегах пшеницы (см. рис. 3, *б*). В корнях пшеницы активность МДАР снижалась под действием кислородного голодания и реоксигенации почти в два раза. В побегах риса изменение активности МДАР было сходным с таковым у АПО, только при 24 ч постаноксии активность превышала контрольное значение. В корнях риса МДАР стабильно работала на протяжении всего эксперимента и ингибировалась на 25 % только после 24 ч реэрации (см. рис. 3, *б*).

Инактивацию ДАР регистрировали при аноксии в побегах обоих растений, но если у риса при реэрации происходило восстановление и дальнейшая активация фермента, то у пшеницы – нет (см. рис. 3, *в*). В корнях обоих растений активность ДАР оставалась неизменной при всех применяемых воздействиях, как и активность ГР в побегах пшеницы и корнях риса (см. рис. 3, *г*). В корнях пшеницы фермент под действием стрессоров инактивировался, а у риса происходила его стимуляция при 24 ч реэрации (см. рис. 3, *г*).

Действие аноксии и реэрации на экспрессию генов, кодирующих ферменты АГЦ у риса

Проведен анализ экспрессии генов, кодирующих ферменты АГЦ у риса, в тканях которого была показана активация ферментов при постаноксии. АПО у риса кодируется восемью генами: *OsAPX1* и 2 кодируют цитозольные изоформы, *OsAPX3* и 4 – пероксисомные, *OsAPX5* и 6 – изоформы с двойной плазмидно-митохондриальной локализацией, *OsAPX7* – стромальную изоформу пластид, *OsAPX8* – тилакоидную (см. Приложение 1). В побегах риса 24-часовая аноксия приводила к незначительному

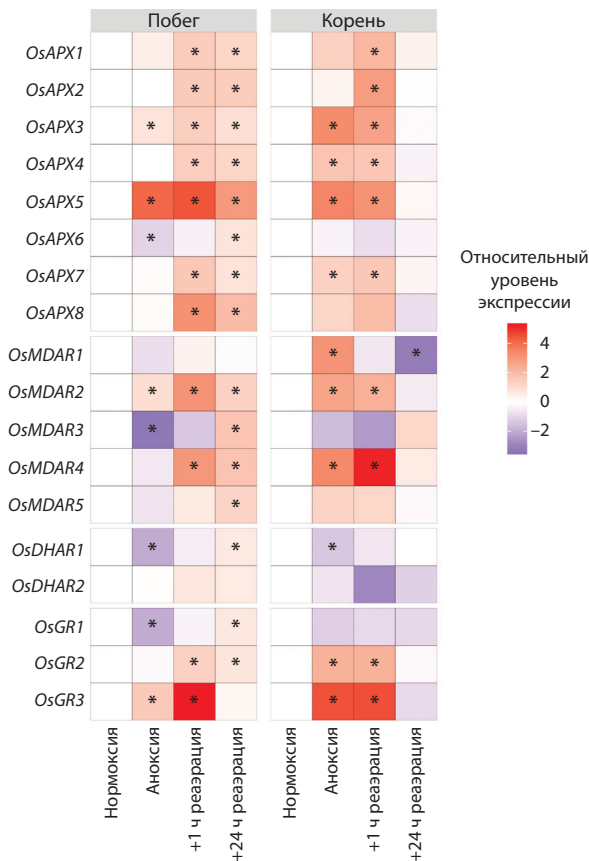


Рис. 4. Теплокарта относительного уровня транскрипции генов, кодирующих ферменты аскорбат-глутатионового цикла, в побегах и корнях проростков риса при действии 24-часовой аноксии и последующей реэрации.

За единицу принят уровень экспрессии в контроле (нормоксия). Звездочками на теплокарте обозначены статистически значимые отличия от контроля (U-критерий Манна-Уитни, $p < 0.05$).

увеличению экспрессии пероксисомного *OsAPX3*, 15-кратному увеличению экспрессии *OsAPX5* и небольшому уменьшению экспрессии *OsAPX6*, продукт которых локализован в пластидах и митохондриях (рис. 4, Приложение 3).

Реаэрация одинаково влияла на все гены семейства *OsAPX*, приводя к активации экспрессии как после 1 ч, так и после 24 ч. Статистически значимые различия в накоплении мРНК между часом и сутками реэрации детектировали у *OsAPX6*, экспрессия которого возрастала после суток реэрации, а также у *OsAPX7*, экспрессия которого тоже возросла после часа реэрации, но начинала уменьшаться после суток реэрации. При постаноксии в наибольшей степени активировались *OsAPX5* и *OsAPX8*. В корнях риса изменения экспрессии были более выражены (см. рис. 4 и Приложение 3). Под действием аноксии увеличилась экспрессия пероксисомных форм (*OsAPX3* и *OsAPX4*), пластидно-митохондриальной формы *OsAPX5* и стромальной формы *OsAPX7*. Через час реэрации экспрессия всех генов, кроме *OsAPX6*, возрастала, однако через сутки реэрации уровень мРНК всех генов возвращался к исходному значению. Наиболее активными при реэрации в корнях были *OsAPX2*, *OsAPX3* и *OsAPX5*.

В обоих органах ген *OsAPX5* был самым отзывчивым в ответ на аноксию и реэрацию.

Семейство генов, кодирующих МДАР у риса, насчитывает пять генов. Продукты генов *OsMDAR1* и *OsMDAR2* локализуются в пероксисомах, *OsMDAR3* и *OsMDAR4* – в цитозоле, *OsMDAR5* – в пластидах и митохондриях (см. Приложение 2). В побегах 24 ч аноксии приводили к увеличению экспрессии *OsMDAR2* и уменьшению экспрессии *OsMDAR3* (см. рис. 4, Приложение 4). После часа реэрации экспрессия *OsMDAR2* и *OsMDAR4* достигала пика, а после суток реэрации намечалась тенденция к возврату к исходному уровню экспрессии. Накопление мРНК *OsMDAR3* и *OsMDAR5* также возрастало после часа реэрации и продолжало расти после 24 ч реэрации. В корнях аноксия активировала экспрессию *OsMDAR1*, *OsMDAR2* и *OsMDAR4*. После часа реэрации количество транскриптов *OsMDAR1* возвращалось к исходному, нормоксическому уровню, а экспрессия генов *OsMDAR2* и *OsMDAR4* оставалась на повышенном аноксическом уровне. Через сутки реэрации активность всех генов возвращалась к исходному значению, а в случае гена *OsMDAR1* даже падала ниже него.

Среди двух генов, кодирующих ДАР у риса, изменения были показаны для *OsDHAR1*. В побегах и корнях экспрессия менялась схожим образом: 24 ч аноксии приводили к двукратному уменьшению количества транскриптов, после часа реэрации намечался возврат к исходным значениям, который успешно восстанавливался после суток реэрации (см. рис. 4, Приложение 5).

В геноме риса обнаружены три гена ГР: *OsGR1* и *OsGR3* кодируют изоформы фермента с пластидно-митохондриальной локализацией, а *OsGR2* – цитозольную изоформу (см. Приложение 2). В побеге после 24 ч аноксии экспрессия *OsGR1* снижалась, *OsGR2* – не изменялась, а *OsGR3* – возрастала (см. рис. 4, Приложение 6). После часа реэрации накопление мРНК *OsGR1* восстанавливалось до уровня нормоксии, *OsGR2* – возрастало, а *OsGR3* – продолжало возрастать, в 30 раз превышая контрольный уровень. Через сутки реэрации количество транскриптов *OsGR1* продолжало возрастать, *OsGR2* – оставалось на достигнутом уровне, *OsGR3* – возвращалось к исходному значению. В корнях риса наблюдалась абсолютная синхронность изменений *OsGR2* и *OsGR3*: возрастание после аноксии, сохранение достигнутого уровня через час реэрации, восстановление до исходного уровня через сутки реэрации. Экспрессия *OsGR1* не изменялась. *OsGR3* был ведущим в ответе на аноксию и реэрацию в обоих органах.

Обсуждение

Полученные результаты показали, что в условиях нормоксии неустойчивое к гипоксии растение (пшеница) накапливало большие количества аскорбиновой кислоты, а устойчивое растение (рис) продуцировало больше глутатиона (см. рис. 1 и 2). При действии 24-часовой аноксии и краткосрочной (15 мин–1 ч) реэрации происходила аккумуляция окисленных форм аскорбата и глутатиона в тканях пшеницы. Соотношение содержания восстановленных форм к содержанию окисленных (АК/ДАК, ГSH/ГSSG) становилось ниже единицы, что указывает

на развитие окислительного стресса. Важно, что в корнях пшеницы к 24 ч постаноксии уровни восстановленных антиоксидантов (АК, ГSH) возвращались к контрольным (см. рис. 1, в и рис. 2, в), тогда как в побегах этого не происходило: накапливалось больше ДАК (см. рис. 1, а) и снижался суммарный уровень аскорбата (АК+ДАК), что свидетельствует о большем развитии окислительных процессов в побегах пшеницы. Это согласуется с ранее полученными нами данными о сильных окислительных повреждениях липидов в побегах по сравнению с корнями пшеницы при действии аноксии и реэрации (Чиркова и др., 1998; Shikov et al., 2022).

У риса в проростках преобладали восстановленные формы антиоксидантов АГЦ как в контроле, так и при стрессе (см. рис. 1, б, з и рис. 2, б, з), что может свидетельствовать об эффективной антиоксидантной защите, купирующей развитие окислительного стресса. Меньшие окислительные повреждения липидов и белков (Чиркова и др., 1998; Shikov et al., 2022) и более низкая продукция H_2O_2 (Емельянов и др., 2022) были выявлены нами в проростках риса по сравнению с пшеницей.

В исследованиях других авторов в корнях пшеницы была показана аккумуляция АК и ДАК, а также понижение уровней обеих форм глутатиона при корневой аноксии (Biemelt et al., 1998). Далее краткосрочная реэрация вызывала снижение уровня АК, аккумуляцию ДАК и ГSH. При неизменном суммарном содержании аноксия приводила к истощению пула АК и накоплению ДАК, а реэрация стимулировала восстановление ДАК в листьях ячменя (*Hordeum vulgare*) (Skutnik, Rychter, 2009) и суспензионной культуре клеток резуховидки (*Arabidopsis thaliana*) (Paradiso et al., 2016). При продолжительной тотальной аноксии содержание всех форм низкомолекулярных антиоксидантов АГЦ уменьшалось в корнях проростков пшеницы и риса, а также в корневищах различающихся по устойчивости видов ириса, причем у устойчивых к гипоксии растений снижение было менее интенсивным (Blokshina et al., 2000). Листья среднеустойчивого к затоплению сорта цитрумело СРВ4475 содержали большие количества АК и ГSH при длительном затоплении и последующей реэрации (Hossain et al., 2009). Устойчивые к затоплению и реоксигенации трансгенные формы резуховидки со сверхэкспрессией гена *MYC2*, кодирующего фактор транскрипции сигналинга жасмоновой кислоты, аккумулялировали при затоплении и реэрации больше АК и ГSH, чем растения дикого типа и нокаутные мутанты *myc2* (Yuan et al., 2017). Таким образом, можно заключить, что для устойчивых к затоплению растений характерно преобладание восстановленных форм аскорбата и глутатиона при кислородном голодании и последующей реэрации, что может быть следствием их интенсивного восстановления в ходе аскорбат-глутатионового цикла.

Активность ферментов АГЦ в проростках неустойчивого растения (пшеница) под действием аноксии и реэрации либо не изменялась, либо подавлялась (АПО и ДАР в побегах, МДАР и ГР в корнях) (см. рис. 3). В результате эффективное функционирование АГЦ становилось невозможным. Снижение активности ферментов аскорбатной части АГЦ (АПО и ДАР) может быть связано с неспособностью побегов пшеницы восстанавливать дострессовый

уровень АК и ДАК при кислородной недостаточности и последующей реоксигенации (см. рис. 1, а). В то же время сохранение активности этих ферментов, возможно, обуславливает достижение этих уровней в корнях пшеницы (см. рис. 1, в). В корнях устойчивого растения (рис) активность ферментов АГЦ в условиях кислородной недостаточности и постаноксии также не изменялась (за исключением МДАР при 24 ч реэрации, см. рис. 3). В побегах риса аноксия вызывала снижение активности АПО, МДАР и ДАР, а возвращение кислорода стимулировало все ферменты цикла, что приводило к аккумуляции восстановленных форм АК и ГSH (см. рис. 1 и 2).

Ранее было показано, что недостаток/отсутствие O_2 вызывал снижение активности всех ферментов АГЦ в корнях пшеницы (Biemelt et al., 1998), а также выращенных в условиях гипоксии проростках риса и лотоса (Ushimaru et al., 1992, 2001). Для ряда неустойчивых к затоплению растений тоже получены данные о некоторых ферментах цикла. Так, дефицит кислорода подавлял активность АПО, ДАР и ГР в листьях хлопчатника (Wang et al., 2019) и ячменя (Skutnik, Rychter, 2009), АПО и ГР – в корнях лука-багуна (Yiu et al., 2009), активность АПО – у сои (Kausar et al., 2012). В корнях люпина дефицит O_2 влиял на работу ферментов АГЦ (Garczarska, 2005), а в листьях среднеустойчивого к затоплению сорта цитрумело СРВ4475 стимулировал активность большинства ферментов АГЦ, за исключением МДАР (Hossain et al., 2009). В суспензионной культуре клеток резуховидки работа АПО и ГР подавлялась аноксией и стимулировалась реоксигенацией, активности МДАР и ДАР при этом оставались неизменными (Paradiso et al., 2016). В корнях пшеницы происходила стимуляция ГР во время постигипоксии; при постаноксии стимуляции ферментов АГЦ не выявлено (Biemelt et al., 1998). Реэрация стимулировала активность всех ферментов АГЦ в проростках риса и лотоса (Ushimaru et al., 1992, 2001), в корнях люпина (Garczarska, 2005) и ГР в корнях ячменя (Skutnik, Rychter, 2009). Активность ГР в побегах ячменя, а также активности АПО и ДАР во всем растении не изменялись при постаноксии (Skutnik, Rychter, 2009). Сопоставление растений, различающихся по устойчивости к затоплению, выявило большую активацию АПО и ГР при гипоксии и реэрации у устойчивых форм голубинового гороха, маша (Sairam et al., 2009, 2011), сортов риса (Damanik et al., 2010) и райграса (Liu, Jiang, 2015). Можно заключить, что у устойчивых к затоплению растений кислородная недостаточность приводит к сохранению или активации ферментов АГЦ, а возвращение O_2 в окружающую среду стимулирует их активность, что позволяет восстанавливать низкомолекулярные антиоксиданты цикла и обеспечивать их эффективную рециклизацию.

Для более глубокого анализа функционирования АГЦ в проростках устойчивого к аноксии риса нами изучена экспрессия генов, кодирующих ферменты цикла. Хотя при аноксии активность АПО в побегах риса снижалась (см. рис. 3, а), подавление экспрессии было обнаружено только у гена *OsAPX6*, кодирующего пластидно-митохондриальную изоформу (см. рис. 4, Приложение 3). Наоборот, для *OsAPX5*, кодирующего фермент этой же локализации, и пероксисомного *OsAPX3* показана активация экспрессии в

побегах риса в анаэробной среде. Возвращение кислорода в окружающую среду стимулировало накопление мРНК всех *OsAPX*, включая цитозольные *OsAPX1* и *OsAPX2*, что соответствовало возрастанию активности АПО до контрольных нормоксических значений. В наибольшей степени при постаноксии активировались гены *OsAPX5* и *OsAPX8*, кодирующие пластидные изоформы. В корнях активность фермента не изменялась, однако уровень экспрессии пероксисомных (*OsAPX3* и *OsAPX4*) и пластидных (*OsAPX5* и *OsAPX7*) форм возрастал уже под действием аноксии, а при постаноксии к ним присоединялись цитозольные (*OsAPX1* и *OsAPX2*) и пластидная (*OsAPX8*) формы. Сильная стимуляция была показана для *OsAPX2*, *OsAPX3* и *OsAPX5*, т. е. цитозольной, пероксисомной и пластидно-митохондриальной форм соответственно. Ген *OsAPX5* активировался сильнее всех других и в обоих органах проростка.

В литературе данные об экспрессии генов *APX* немногочисленны. В проростках сои затопление подавляло гены цитозольных АПО *GmAPX1* и *GmAPX2* (Nishizawa et al., 2013). У голубиногороха и маша устойчивые к гипоксии формы характеризовались повышенной экспрессией генов, кодирующих цитозольную АПО при гипоксии, по сравнению с неустойчивыми к затоплению формами (Sairam et al., 2009, 2011). Повышенная экспрессия *OsAPX1* при затоплении была обнаружена у устойчивого сорта риса, несущего аллель *Sub1A* (Parlanti et al., 2011). Устойчивые к затоплению трансгенные формы резуховидки, экспрессирующие ген *MYC2*, и растения дикого типа отличались при затоплении активацией генов, кодирующих ферменты АГЦ (*AtAPX2*, *AtMDHAR3*, *AtDHAR1* и *AtGR1*) (Yuan et al., 2017). В культуре клеток резуховидки уровень мРНК *AtAPX2*, кодирующего цитозольную изоформу, тоже возрастал при аноксии, но еще больше он повышался при краткосрочной реэрации, как и у других цитозольных форм (*AtAPX1* и *AtAPX6*). Гены других АПО не исследовали (Paradiso et al., 2016). Нами показана активация генов цитозольных форм АПО у риса только в условиях постаноксии (см. рис. 4, Приложение 3).

В наших экспериментах активность промежуточных редуктаз АГЦ (МДАР и ДАР) изменялась в побегах сходным образом: снижалась при аноксии и возрастала выше контроля при реэрации. У ДАР такой паттерн совпадал с изменением экспрессии *OsDHAR1* (см. рис. 4, Приложение 5). Уменьшение активности МДАР в побеге происходило на фоне снижения количества транскриптов *OsMDAR3*, кодирующего цитозольную форму, и накопления транскриптов пероксисомной формы *OsMDAR2* (см. рис. 4, Приложение 4). При действии краткосрочной реэрации возрастала экспрессия *OsMDAR2* и *OsMDAR4*, кодирующих цитозольную изоформу. После суток постаноксии к ним присоединялись *OsMDAR3* и *OsMDAR5*, кодирующие цитозольную и пластидно-митохондриальную формы соответственно. В корнях, несмотря на отсутствие изменения активности фермента, аноксия активировала экспрессию *OsMDAR1*, *OsMDAR2* и *OsMDAR4*. При реэрации, как и в побеге, возрастало количество мРНК генов *OsMDAR2* и *OsMDAR4*. В научной литературе удалось обнаружить только вышеупомянутую статью (Yuan

et al., 2017), авторы которой изучали экспрессию генов, кодирующих редуктазы АГЦ при гипоксии и постгипоксии. Поддержание активности ГР при действии аноксии в побегах и корнях риса, а также стимуляция при реэрации в побегах связаны в первую очередь с экспрессией *OsGR2* и *OsGR3*, кодирующих цитозольную и пластидно-митохондриальную изоформы соответственно (см. рис. 4, Приложение 6).

Таким образом, в большинстве случаев недостаток O_2 индуцировал активность генов, кодирующих пероксисомные, пластидные и митохондриальные формы ферментов, а по возвращении в условия нормоксии наблюдалось также усиление работы генов, кодирующих цитоплазматические формы. Возможно, подобное вовлечение разных изоформ ферментов является важным физиологическим механизмом адаптации клетки при переходе от условий дефицита кислорода к реэрации. С другой стороны, подключение при реоксигенации цитоплазматических форм ферментов к органелльным, активированным еще при аноксии, может быть следствием усиления окислительного стресса при возвращении уровня кислорода к нормоксическим значениям. Активация ферментов АГЦ при постаноксии в большинстве случаев соответствовала изменениям экспрессии.

Заключение

Проведенное комплексное изучение работы АГЦ при действии аноксии и последующей реэрации выявило инактивацию АПО и ДАР в побегах, а также МДАР и ГР в корнях неустойчивого растения (пшеница), что нарушало эффективную работу цикла, запускало аккумуляцию окисленных форм аскорбата и глутатиона и способствовало развитию значительных окислительных повреждений. У устойчивого к затоплению растения (рис) кислородная недостаточность приводила к сохранению активности ферментов АГЦ, а реэрация ее стимулировала, в том числе на уровне экспрессии генов, что, по-видимому, позволяет восстанавливать низкомолекулярные антиоксиданты цикла и обеспечивать антиоксидантную защиту, препятствующую развитию окислительного стресса. Таким образом, выработанная растениями устойчивость к недостатку кислорода включает и механизмы устойчивости к окислительному стрессу.

Список литературы / References

- Емельянов В.В., Ласточкин В.В., Приказюк Е.Г., Чиркова Т.В. Активность каталазы и пероксидазы в растениях пшеницы и риса в условиях аноксии и постаноксической аэрации. *Физиология растений*. 2022;69(6):675-690. DOI 10.31857/S0015330322060033
- [Yemelyanov V.V., Lastochkin V.V., Prikaziuk E.G., Chirkova T.V. Activities of catalase and peroxidase in wheat and rice plants under conditions of anoxia and post-anoxic aeration. *Russ. J. Plant Physiol.* 2022;69(6):1-15. DOI 10.1134/S1021443722060036]
- Чиркова Т.В., Новицкая Л.О., Блохина О.Б. Перекисное окисление липидов и антиоксидантные системы в условиях аноксии у растений, различающихся по устойчивости к кислородной недостаточности. *Физиология растений*. 1998;45(1):65-73
- [Chirkova T.V., Novitskaya L.O., Blokhina O.B. Lipid peroxidation and antioxidant systems under anoxia in plants differing in their tolerance to oxygen deficiency. *Russ. J. Plant Physiol.* 1998;45(1): 55-62]

- Шиков А.Е., Чиркова Т.В., Емельянов В.В. Постаноксия у растений: причины, последствия и возможные механизмы. *Физиология растений*. 2020;67(1):50-66. DOI 10.31857/S0015330320010200
[Shikov A.E., Chirkova T.V., Yemelyanov V.V. Post-anoxia in plants: reasons, consequences, and possible mechanisms. *Russ. J. Plant Physiol.* 2020;67(1):45-59. DOI 10.1134/S1021443720010203]
- Шиков А.Е., Чиркова Т.В., Емельянов В.В. Функции активных форм кислорода в растительных клетках в норме и при адаптации. *Экол. генетика*. 2021;19(4):343-363. DOI 10.17816/ecogen75975
[Shikov A.E., Chirkova T.V., Yemelyanov V.V. Functions of reactive oxygen species in plant cells under normal conditions and during adaptation. *Ecol. Genet.* 2021;19(4):343-363. DOI 10.17816/ecogen75975]
- Arrighoni O., Dipierro S., Borraccino G. Ascorbate free radical reductase, a key enzyme of the ascorbic acid system. *FEBS Lett.* 1981;125(2):242-244. DOI 10.1016/0014-5793(81)80729-6
- Biemelt S., Keetman U., Albrecht G. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. *Plant Physiol.* 1998;116(2):651-658. DOI 10.1104/pp.116.2.651
- Blokhina O.B., Virolainen E., Fagerstedt K.V., Hoikkala A., Wähälä K., Chirkova T.V. Antioxidant status of anoxia-tolerant and -intolerant plant species under anoxia and reoxygenation. *Physiol. Plant.* 2000;109(4):396-403. DOI 10.1034/j.1399-3054.2000.100405.x
- Blokhina O.B., Chirkova T.V., Fagerstedt K.V. Anoxic stress leads to hydrogen peroxide formation in plant cells. *J. Exp. Bot.* 2001;52(359):1179-1190. DOI 10.1093/jxb/52.359.1179
- Blokhina O.B., Virolainen E., Fagerstedt K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Bot.* 2003;91(2):179-194. DOI 10.1093/aob/mcf118
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976;72(1-2):248-254. DOI 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Chirkova T., Yemelyanov V. The study of plant adaptation to oxygen deficiency in Saint Petersburg University. *Biol. Commun.* 2018;63(1):17-31. DOI 10.21638/spbu03.2018.104
- Damanik R.I., Maziah M., Ismail M.R., Ahmad S., Zain A.M. Responses of the antioxidative enzymes in Malaysian rice (*Oryza sativa* L.) cultivars under submergence condition. *Acta Physiol. Plant.* 2010;32(4):739-747. DOI /10.1007/s11738-009-0456-3
- Ding H., Wang B., Han Y., Li S. The pivotal function of dehydroascorbate reductase in glutathione homeostasis in plants. *J. Exp. Bot.* 2020;71(12):3405-3416. DOI 10.1093/jxb/eraa107
- Foyer C.H., Halliwell B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*. 1976;133(1):21-25. DOI 10.1007/BF00386001
- Foyer C.H., Noctor G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid. Redox Signal.* 2009;11(4):861-905. DOI 10.1089/ars.2008.2177
- Garnczarska M. Response of the ascorbate-glutathione cycle to reoxygenation following hypoxia in lupine roots. *Plant Physiol. Biochem.* 2005;43(6):583-590. DOI 10.1016/j.plaphy.2005.05.003
- Gill S.S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 2010;48:909-930. DOI 10.1016/j.plaphy.2010.08.016
- Gill S.S., Anjum N.A., Hasanuzzaman M., Gill R., Trivedi D.K., Ahmad I., Pereira E., Tuteja N. Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiol. Biochem.* 2013;70:204-212. DOI 10.1016/j.plaphy.2013.05.032
- Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006;141(2):312-322. DOI 10.1104/pp.106.077073
- Hasanuzzaman M., Nahar K., Anee T.I., Fujita M. Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. *Physiol. Mol. Biol. Plants*. 2017;23(2):249-268. DOI 10.1007/s12298-017-0422-2
- Hasanuzzaman M., Bhuyan M.H.M.B., Anee T.I., Parvin K., Nahar K., Mahmud J.A., Fujita M. Regulation of ascorbate-glutathione pathway in mitigating oxidative damage in plants under abiotic stress. *Antioxidants*. 2019;8(9):384. DOI 10.3390/antiox8090384
- Hossain Z., Lopez-Climent M.F., Arbona V., Perez-Clemente R.M., Gomez-Cadenas A. Modulation of the antioxidant system in citrus under waterlogging and subsequent drainage. *J. Plant Physiol.* 2009;166(13):1391-1404. DOI 10.1016/j.jplph.2009.02.012
- Ishikawa T., Shigeoka S. Recent advances in ascorbate biosynthesis and the physiological significance of ascorbate peroxidase in photosynthesizing organisms. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2008;72(5):1143-1154. DOI 10.1271/bbb.80062
- Kausar R., Hossain Z., Makino T., Komatsu S. Characterization of ascorbate peroxidase in soybean under flooding and drought stresses. *Mol. Biol. Rep.* 2012;39(12):10573-10579. DOI 10.1007/s11033-012-1945-9
- Knörzer O.C., Durner J., Boger P. Alterations in the antioxidative system of suspension cultured soybean cells (*Glycine max*) induced by oxidative stress. *Physiol. Plant.* 1996;97(2):388-396. DOI 10.1034/j.1399-3054.1996.970225.x
- Law M.Y., Charles S.A., Halliwell B. Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of hydrogen peroxide and of paraquat. *Biochem. J.* 1983;210(3):899-903. DOI 10.1042/bj2100899
- Liu M., Jiang Y. Genotypic variation in growth and metabolic responses of perennial ryegrass exposed to short-term waterlogging and submergence stress. *Plant Physiol. Biochem.* 2015;95:57-64. DOI 10.1016/j.plaphy.2015.07.008
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods*. 2001;25(4):402-408. DOI 10.1006/meth.2001.1262
- Morell S., Follmann H., De Tullio M., Haberlein I. Dehydroascorbate and dehydroascorbate reductase are phantom indicators of oxidative stress in plants. *FEBS Lett.* 1997;414(3):567-570. DOI 10.1016/S0014-5793(97)01074-0
- Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 1981;22(5):867-880. DOI 10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232
- Nishizawa K., Hiraga S., Yasue H., Chiba M., Tougou M., Nanjo Y., Komatsu S. The synthesis of cytosolic ascorbate peroxidases in germinating seeds and seedlings of soybean and their behavior under flooding stress. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2013;77(11):2205-2209. DOI 10.1271/bbb.130384
- Noctor G., Foyer C.H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1998;49:249-279. DOI 10.1146/annurev.arplant.49.1.249
- Palma J.M., Corpas F.J., Del Rio L.A. Proteome of plant peroxisomes: new perspectives on the role of these organelles in cell biology. *Proteomics*. 2009;9(9):2301-2312. DOI 10.1002/pmic.20070732
- Paradiso A., Caretto S., Leone A., Bove A., Nisi R., De Gara L. ROS production and scavenging under anoxia and re-oxygenation in *Arabidopsis* cells: a balance between redox signaling and impairment. *Front. Plant Sci.* 2016;7:1803. DOI 10.3389/fpls.2016.01803
- Parlanti S., Kudahettige N.P., Lombardi L., Mensuali-Sodi A., Alpi A., Perata P., Pucciariello C. Distinct mechanisms for aerenchyma formation in leaf sheaths of rice genotypes displaying a quiescence or escape strategy for flooding tolerance. *Ann. Bot.* 2011;107(8):1335-1343. DOI 10.1093/aob/mcr086
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing, Vienna, Austria. 2023. (<https://www.R-project.org/>)
- Rao M.V., Hale B.A., Ormrod D.P. Amelioration of ozone-induced oxidative damage in wheat plants grown under high carbon dioxide. Role of antioxidant enzymes. *Plant Physiol.* 1995;109(2):421-432. DOI 10.1104/pp.109.2.421

- Sairam R.K., Kumutha D., Ezhilmathi K., Chinnusamy V., Meena R.C. Waterlogging induced oxidative stress and antioxidant enzyme activities in pigeon pea. *Biol. Plant.* 2009;53(3):493-504. DOI 10.1007/s10535-009-0090-3
- Sairam R.K., Dharmar K., Lekshmy S., Chinnusamy V. Expression of antioxidant defense genes in mung bean (*Vigna radiata* L.) roots under water-logging is associated with hypoxia tolerance. *Acta Physiol. Plant.* 2011;3(3):735-744. DOI 10.1007/s11738-010-0598-3
- Shikov A.E., Lastochkin V.V., Chirkova T.V., Mukhina Z.M., Yemelyanov V.V. Post-anoxic oxidative injury is more severe than oxidative stress induced by chemical agents in wheat and rice plants. *Acta Physiol. Plant.* 2022;44(9):90. DOI 10.1007/s11738-022-03429-z
- Skutnik M., Rychter A.M. Differential response of antioxidant systems in leaves and roots of barley subjected to anoxia and post-anoxia. *J. Plant Physiol.* 2009;166(9):926-937. DOI 10.1016/j.jplph.2008.11.010
- Ushimaru T., Shibasaka M., Tsuji H. Development of O₂ detoxification system during adaptation to air of submerged rice seedlings. *Plant Cell Physiol.* 1992;33(8):1065-1071. DOI 10.1093/oxfordjournals.pcp.a078357
- Ushimaru T., Kanematsu S., Katayama M., Tsujid H. Antioxidative enzymes in seedlings of *Nelumbo nucifera* germinated under water. *Physiol. Plant.* 2001;112(1):39-46. DOI 10.1034/j.1399-3054.2001.1120106.x
- Wang H., Chen Y., Hu W., Snider J.L., Zhou Z. Short-term soil-waterlogging contributes to cotton cross tolerance to chronic elevated temperature by regulating ROS metabolism in the subtending leaf. *Plant Physiol. Biochem.* 2019;139:333-341. DOI 10.1016/j.plaphy.2019.03.038
- Wickham H., Averick M., Bryan J., Chang W., McGowan L.D., François R., Grolemond G., Hayes A., Henry L., Hester J., Kuhn M., Pedersen T.L., Miller E., Bache S.M., Müller K., Ooms J., Robinson D., Seidel D.P., Spinu V., Takahashi K., Vaughan D., Wilke C., Woo K., Yutani H. Welcome to the tidyverse. *J. Open Source Softw.* 2019;4(43):1686. DOI 10.21105/joss.01686
- Yemelyanov V.V., Lastochkin V.V., Chirkova T.V., Lindberg S.M., Shishova M.F. Indoleacetic acid levels in wheat and rice seedlings under oxygen deficiency and subsequent reoxygenation. *Biomolecules.* 2020;10(2):276. DOI 10.3390/biom10020276
- Yiu J.-C., Liu C.-W., Fang D.Y., Lai Y.-S. Waterlogging tolerance of Welsh onion (*Allium fistulosum* L.) enhanced by exogenous spermidine and spermine. *Plant Physiol. Biochem.* 2009;47(8):710-716. DOI 10.1016/j.plaphy.2009.03.007
- Yuan L.-B., Dai Y.-S., Xie L.-J., Yu L.-J., Zhou Y., Lai Y.-X., Yang Y.-C., Xu L., Chen Q.-F., Xiao S. Jasmonate regulates plant responses to postsubmergence reoxygenation through transcriptional activation of antioxidant synthesis. *Plant Physiol.* 2017;173(3):1864-1880. DOI 10.1104/pp.16.01803

ORCID

V.V. Yemelyanov orcid.org/0000-0003-2323-5235
E.G. Prikaziuk orcid.org/0000-0002-7331-7004
V.V. Lastochkin orcid.org/0000-0001-9540-497X
O.M. Aresheva orcid.org/0009-0000-6024-2966
T.V. Chirkova orcid.org/0000-0002-2315-0816

Благодарности. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-00484 (<https://rscf.ru/project/22-24-00484/>). В экспериментах использовали оборудование Ресурсного центра Санкт-Петербургского государственного университета «Развитие молекулярных и клеточных технологий». Статья посвящается 300-летию Санкт-Петербургского государственного университета.


Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 18.08.2023. После доработки 27.11.2023. Принята к публикации 28.11.2023.

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

Морфологический и молекулярный анализ сортов роз из садовых групп грандифлора и розы Кордеса

С.С. Юданова , О.В. Дорогина, О.Ю. Васильева


Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
 judanova.sophia@yandex.ru

Аннотация. Поиск зимостойких, устойчивых к грибным болезням сортов, характеризующихся высокой декоративностью, ремонтантным и продолжительным цветением, является важнейшей задачей при работе с коллекционным генофондом садовых роз. В настоящее время межсортовая гибридизация роз в пределах одной садовой группы во многом исчерпала себя. Требуется поиск высокодекоративных форм или сортов, выделяющихся по резистентности, морфологическим и ритмологическим признакам для использования в селекции в качестве родительских форм. В работе выполнен сравнительный анализ сортов из двух садовых групп – грандифлора (Гурзуф, Лезгинка, Коралловый сюрприз, Queen Elizabeth, Комсомольский огонёк, Love) и кордезии (Летние звёзды, Dortmund, Гуцулочка). Эти сорта хорошо показали себя в течение многих лет испытаний в суровых климатических условиях. Целью исследования было определение степени родства внутри групп и установление возможной принадлежности фенотипически различающихся сортов к одной из групп. Анализ проводили по морфологическим, фенологическим признакам, а также с помощью ISSR-маркеров. По результатам фенологических наблюдений в группе грандифлора выделился сорт Комсомольский огонёк: более позднее вступление в фазы бутонизации и цветения. Данные полиморфизма, полученные на основании ISSR-маркирования, показали, что он удален от других сортов, образуя на дендрограмме отдельный кластер. Сравнение сортов роз по морфологическим признакам (диаметр цветка, количество лепестков, длина цветоноса, высота куста) также свидетельствует о достоверных отличиях ($p < 0.05$) сорта Комсомольский огонёк от остальных сортов группы грандифлора. Дендрограмма, построенная на основании молекулярного анализа, показала отсутствие близкого родства сорта Комсомольский огонёк и группы кордезии, которые формировали отдельный кластер. При попарном сравнении морфологических показателей сорта Комсомольский огонёк и группы кордезии обнаружено достоверное различие ($p < 0.05$) по трем из четырех изученных признаков, за исключением диаметра цветка (при сравнении с сортами Dortmund и Летние звёзды) и длине цветоноса (при сравнении с Гуцулочкой). Несмотря на то что Комсомольский огонёк по феноритмике схож с сортом Dortmund из группы кордезии, молекулярный анализ не позволяет отнести его к данной группе роз. Такие сорта, фенотипически отличающиеся от общей массы и обладающие рядом ценных признаков, являются ценнейшим селекционным материалом. Ключевые слова: *Rosa L.*; грандифлора; розы Кордеса; ISSR-маркеры; морфологические признаки; фенологические наблюдения.

Для цитирования: Юданова С.С., Дорогина О.В., Васильева О.Ю. Морфологический и молекулярный анализ сортов роз из садовых групп грандифлора и розы Кордеса. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(1): 55-62. DOI 10.18699/vjgb-24-07

Morphological and molecular analysis of rose cultivars from the Grandiflora and Kordesii garden groups

S.S. Yudanova , O.V. Dorogina, O.Yu. Vasilyeva

Central Siberian Botanical Garden of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
 judanova.sophia@yandex.ru

Abstract. The breeding of remontant rose cultivars that are resistant to diseases and adverse conditions, with high decorative value and continuous flowering is the most important task during work with the gene pool of garden roses. Currently, intercultivar hybridization within a single garden group has largely outlived its usefulness. It is necessary to breed for highly decorative forms or cultivars that have outstanding resistance, morphological characters and patterns of seasonal rhythms, and use these plants as parental forms in further breeding. This study represents a comparative analysis of rose cultivars from two garden groups, Grandiflora (Gurzuf, Lezginka, Korallovy Syurpriz, Queen Elizabeth, Komsomolsky Ogonyok, Love) and Rosa Kordesii (Letniye Zvyozdy, Dortmund, Gutsulochka). These cultivars proved themselves during many years of testing in harsh climatic conditions. The objectives of the study were to determine the genetic relationship within the groups and to assign phenotypically different cultivars to one or another garden group. The analysis was carried out by morphological, phenological and ISSR markers. According to the phenological observations on the Grandiflora cultivars, Komsomolsky Ogonyok had later budding and flowering stages. Polymor-

phic data generated from the ISSR markers showed that this cultivar was the most distant from the others and formed a separate cluster on the dendrogram. A comparison of the morphological characters (flower diameter, number of petals, peduncle length, bush height) showed a significant difference ($p < 0.05$) between Komsomolsky Ogonyok and the other Grandiflora cultivars. A dendrogram based on a molecular analysis showed a lack of close relationships between Komsomolsky Ogonyok and the Kordesii group, which formed a separate cluster. A pairwise comparison of the morphological characters in Komsomolsky Ogonyok with the Kordesii group revealed a significant ($p < 0.05$) difference in three of the four characters studied. The exceptions were flower diameter when comparing with Dortmund and Letniye Zvyozdy and peduncle length when comparing with Gutsulochka. Although Komsomolsky Ogonyok has a pattern of seasonal development similar to Dortmund in the Kordesii group, the molecular analysis did not assign the former to this group of roses. The cultivars that have valuable characters that no average rose does and that are phenotypically different from such roses represent the most valuable breeding material.

Key words: *Rosa* L.; grandiflora; *Rosa* Kordesii; ISSR markers; morphological characters; phenological observations.

For citation: Yudanova S.S., Dorogina O.V., Vasilyeva O.Yu. Morphological and molecular analysis of rose cultivars from the Grandiflora and Kordesii garden groups. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(1):55-62. DOI 10.18699/vjgb-24-07

Введение

Розы относятся к числу древнейших культивируемых человеком растений, они используются не только в декоративных, но и в парфюмерных, медицинских, кулинарных целях. В состав рода *Rosa* L. входит около 200 видов, однако лишь 10–15 видов внесли свой вклад в создание садовых групп роз (Cairns, 2007). Согласно современной садовой классификации роз, весь мировой ассортимент, представленный 40000 сортов, подразделяется на 36 садовых групп (Аннотированный каталог..., 2018; Plugatar et al., 2019). Ценнейшее качество сортов роз из садовых групп чайно-гибридные, флорибунда, градифлора, розы Кордеса, полиантовые и миниатюрные – способность к ремонтантному цветению (Клименко, 2010; Городняя, 2014; Тыщенко, 2015), обусловленная наличием в их наследственной основе генетического материала вечнозеленых и, соответственно, малозимостойких видов из секции *Indicae*, которым в местах естественного произрастания несвойствен зимний покой.

Одним из основных критериев отбора сортов садовых роз, перспективных для выращивания в суровых климатических условиях, является цветение однолетних побегов (Васильева, 1999). Эта биологическая особенность характерна не для всех садовых групп и не для всех сортов одной садовой группы. Например, большинство сортов плетистых крупноцветковых роз (LCl.) образуют генеративные побеги на многолетних системах побега формирования (СПФ), которые из-за суровых зим практически ежегодно погибают (Пашина, 2011; Капелян, 2017; Plugatar et al., 2018). Особый интерес для создания розариев в условиях континентального климата представляют, наряду с чайно-гибридными и флорибунда, сорта из садовых групп грандифлора и розы Кордеса (кордезии).

Садовая группа грандифлора (Gr.) была выделена в 1950-х гг. исключительно по морфологическим признакам, без учета происхождения. Основу ее составляют сорта, полученные от скрещивания роз флорибунда с чайно-гибридными. Эти сорта ценятся за обильное и ремонтантное цветение, как у группы флорибунда, за длинные прямые побеги с крупными цветками различных окрасок, по форме напоминающие сорта чайно-гибридных роз, но не одиночные, а в малоцветковых соцветиях. Важнейшим признаком группы считаются также сила роста и более высокая, чем у чайно-гибридных роз, зимостойкость.

Розы Кордеса или кордезии – относительно молодая садовая группа, основателем которой является спонтанный гибрид *Rosa rugosa* × *Rosa wichuraiana*, полученный фирмой “W. Kordes’ Sohne”, приоритетным направлением селекции которой стал отбор неприхотливых и зимостойких форм. Кордезии отличаются обильным цветением с июня до поздней осени, высокой зимостойкостью и повышенной устойчивостью к болезням (Бардакова, 2017; Адрицкая, Капелян, 2022). Особая ценность этой группы в условиях сурового климата обусловлена образованием цветков на однолетних побегах, что может делать их заменой плетистым розам, характеризующимся цветением на многолетних СПФ, но плохо зимующим в условиях Сибири.

Яркий представитель кордезий – сорт Dortmund, часто использовавшийся в селекции в качестве родительской формы, обладающий ценнейшим признаком – устойчивостью к грибным болезням. В Никитском ботаническом саду (НБС-ННЦ РАН) селекционером З.К. Клименко выведены сорта-кордезии Летние звёзды и Гуцулочка (Клименко, Рубцова, 1986), которые в дальнейшем зарекомендовали себя как высокодекоративные и устойчивые в суровых климатических условиях. В группе грандифлора наиболее популярный, многократно применявшийся в селекции, высокодекоративный и обладающий комплексной устойчивостью сорт – Queen Elizabeth. Среди отечественных сортов данной группы популярен сорт Комсомольский огонёк, полученный от скрещивания сортов Charlotte Wheatcroft × Gloria Dei. Его многолетнее испытание в коллекции ЦСБС СО РАН на фоне других сортов свидетельствует о том, что он фенотипически отличается от представителей своей группы и имеет сходство с кордезиями. Поэтому дальнейшей задачей была оценка сортов из групп грандифлора и кордезий по морфологическим и молекулярно-генетическим признакам с целью определения родственных связей внутри групп и возможного установления принадлежности фенотипически выделяющихся сортов к той или иной садовой группе.

Кроме того, одной из основных задач при работе с коллекционным генофондом роз является поиск ценных по комплексу признаков форм для дальнейшей селекционной работы. Для суровых климатических условий континентального климата это сорта, обладающие высокой комплексной устойчивостью, в первую очередь зимостой-

костью, устойчивостью к грибным болезням, характеризующиеся высокой декоративностью, ремонтантным и продолжительным цветением.

В данной работе для оценки генетического полиморфизма использовался ISSR-анализ (inter simple sequence repeats). Метод основан на анализе ДНК последовательностей, фланкированных микросателлитными локусами, обладает хорошей воспроизводимостью, не требует клонирования и секвенирования фрагментов ДНК для подбора праймеров, что существенно снижает затратность и трудоемкость проведения анализа. Число микросателлитных повторов в геноме как у животных, так и у растений очень велико, что делает этот метод удобным для генетического анализа (Amom, Nongdam, 2017; Дорогина, Жмудь, 2020).

Материалы и методы

В работе использовались сорта роз из двух садовых групп: грандифлора (Гурзуф, Лезгинка, Коралловый сюрприз, Queen Elizabeth, Комсомольский огонёк, Love) и розы Кордеса (Летние звёзды, Dortmund, Гуцулочка). Сорта, относящиеся к группе грандифлора, характеризуются следующими признаками: 1) крупные цветки различных окрасок, собранные в малоцветковые соцветия; 2) высокорослые кусты, в южных районах России достигающие высоты 2 м; 3) листья крупные, глянцевые; 4) обильное ремонтантное цветение; 5) достаточно высокая зимостойкость, что благоприятно для выращивания в условиях Сибири. Кордезии отличаются высокой зимостойкостью и устойчивостью к болезням, обильным длительным цветением. В условиях континентального климата эту группу можно частично использовать в качестве замены плетистым розам благодаря цветению на однолетних побегах.

Изучение морфобиологических признаков (диаметр цветка, число лепестков, длина цветоноса, высота куста) проводили в течение пяти летних сезонов 2017–2021 гг. Исследование выполнялось на участке ЦСБС СО РАН «Коллекции живых растений в открытом и закрытом грунте» USU 440534 (54°49'13.8" N, 83°06'13.3" E). Для оценки морфобиологических признаков применялись стандартные методики (Методика государственного сортоиспытания..., 1968; Клименко и др., 2019; Супрун, 2021). Фенологические наблюдения проводили по методике, разработанной И.Н. Бейдеманом (1974), с модификациями (Фомина, 2012). Для сравнения достоверности отличий по метрическим признакам использовали *t*-критерий Стьюдента (Haunes, 2013). Среднее значение показателя и ошибка среднего значения ($M \pm \bar{x}$) вычислялись по 20 показателям.

Для выделения ДНК применяли СТАВ метод с некоторыми модификациями (Doyle J.J., Doyle J.L., 1987). Амплификация выполнялась по следующей программе: первичная денатурация при 95 °C в течение 2 мин; далее 35 циклов амплификации – 20 с при 94 °C для денатурации; 45 с – отжиг праймеров; 1.5 мин – элонгация при 72 °C; финальная элонгация в течение 7 мин при 72 °C. Дальнейшее электрофоретическое разделение продуктов амплификации выполняли в 1–1.5 % агарозном геле в 1× TBE-буфере по стандартной методике (Vasilyeva et al., 2020). Характеристика и температура отжига ISSR-праймеров, использованных в работе, приведена в табл. 1.

Таблица 1. Характеристика ISSR-праймеров, использованных при изучении сортов роз грандифлора и роз Кордеса

Праймер	Последовательность	Температура отжига, °C
HB12	(CAC) ₃ GC	42
17899B	(CA) ₆ GG	42
UBC807	(AG) ₈ T	52
UBC834	(AG) ₈ YT	60
UBC855	(AC) ₈ YT	50
M2	(AC) ₈ YG	50

Количественную оценку полиморфизма маркеров и определение уровня дивергенции между изученными формами проводили с использованием бинарной матрицы. Наличие или отсутствие ПЦР-фрагментов одинакового размера обозначали как 1 или 0. Для статистической обработки данных применяли программу TREECON (Van de Peer, Wachter, 1994). Генетические дистанции рассчитывали по формуле

$$GD_{xy} = 1 - 2N_{xy}/(N_x + N_y),$$

где N_{xy} – число общих фрагментов для образцов x и y ; N_x и N_y – число фрагментов для образцов x и y соответственно (Nei, Li, 1979).

При построении дендрограмм распределения ISSR-маркеров использовался алгоритм «ближайших соседей» с бутстреп-поддержкой не менее 100. Уровень полиморфизма (P , %) каждого праймера рассчитывали по формуле

$$P = 100 \times N_p/N,$$

где N_p – число полиморфных фрагментов; N – общее число фрагментов.

Результаты

Веgetационный период у роз в условиях Сибири делится на следующие этапы: отрастание, формирование побегов текущего года, бутонизация, первое (I) и второе (II) цветение, отцветание. В более благоприятных климатических условиях некоторых преимущественно южных регионов России у сортов садовых роз наблюдается третье (III) цветение. Среднеголетние данные (2017–2022 гг.) фенологических наблюдений за сортами роз из садовых групп грандифлора и кордезии показали, что группа грандифлора отличается более ранним отрастанием побегов, чем кордезии, несмотря на то что зимнее укрытие со всей коллекции снимается одновременно (табл. 2). Период дальнейшего формирования генеративных побегов первого цветения у роз Кордеса более растянут, что обусловлено образованием мощных побегов с большим, чем у грандифлора, числом междоузлий. Повторное цветение роз Кордеса менее продолжительное.

Среди изученных образцов наиболее раннее цветение наблюдается у зарубежных сортов Love и Queen Elizabeth в группе грандифлора. Время вступления в фазу цветения сорта Queen Elizabeth в среднем наступает на 61-й день с момента снятия зимних укрытий роз и начала вегетации, что достоверно ($p < 0.01$) отличается от всех исследован-

Таблица 2. Среднеголетние фенофазы сортов роз из садовых групп грандифлора и розы Кордеса (Новосибирск, 2017–2021 гг.)

Сорт	Отрастание	Начало бутонизации	Первое цветение			Второе цветение		
			Начало	Окончание	Продолжительность, дней	Начало	Окончание	Продолжительность, дней
Группа грандифлора								
Гурзуф	07.05 ± 2	17.06 ± 2	09.07 ± 2	24.07 ± 4	16	12.08 ± 4	07.10 ± 2	57
Лезгинка	04.05 ± 4	15.06 ± 2	12.07 ± 2	30.07 ± 3	19	17.08 ± 2	22.09 ± 3	37
Коралловый сюрприз	05.05 ± 3	09.06 ± 2	07.07 ± 3	27.07 ± 2	21	12.08 ± 3	10.10 ± 2	60
Queen Elizabeth	02.05 ± 3	05.06 ± 3	26.06 ± 3	14.07 ± 2	19	03.08 ± 2	02.10 ± 3	61
Комсомольский огонёк	04.05 ± 2	18.06 ± 2	09.07 ± 2	25.07 ± 3	17	21.08 ± 2	28.09 ± 3	39
Love	05.05 ± 3	07.06 ± 3	29.06 ± 4	22.07 ± 2	24	14.08 ± 3	03.10 ± 4	51
Группа кордезий								
Летние звёзды	10.05 ± 3	20.06 ± 2	09.07 ± 3	28.07 ± 2	20	18.08 ± 3	21.09 ± 3	35
Dortmund	08.05 ± 2	23.06 ± 4	14.07 ± 2	31.07 ± 3	18	24.08 ± 4	26.09 ± 3	33
Гуцулочка	10.05 ± 4	20.06 ± 3	08.07 ± 3	03.08 ± 3	27	19.08 ± 3	19.09 ± 3	32

Таблица 3. Морфологические признаки сортов роз из садовых групп грандифлора и розы Кордеса

Сорт	Диаметр цветка, см	Кол-во лепестков, шт.	Длина цветоноса, см	Высота куста, см
Группа грандифлора				
Queen Elizabeth	8.75 ± 0.22	29.92 ± 0.71	41.33 ± 2.20	63.67 ± 1.36
Коралловый сюрприз	9.27 ± 0.18	24.75 ± 0.81	45.25 ± 2.37	65.95 ± 1.33
Гурзуф	10.24 ± 0.19	35.65 ± 0.91	51.95 ± 1.71	78.15 ± 1.80
Лезгинка	8.97 ± 0.23	25.20 ± 0.79	68.45 ± 1.62	85.50 ± 1.44
Love	9.42 ± 0.20	32.85 ± 0.84	53.50 ± 1.38	70.20 ± 1.92
Комсомольский огонёк	7.92 ± 0.14	21.25 ± 0.64	50.17 ± 1.91	73.25 ± 2.68
Группа кордезий				
Dortmund	7.58 ± 0.17	6.75 ± 1.66	90.42 ± 2.94	117.00 ± 1.64
Гуцулочка	6.80 ± 0.17	25.60 ± 0.98	44.20 ± 2.30	80.20 ± 1.80
Летние звёзды	8.20 ± 0.17	42.15 ± 1.60	41.00 ± 1.95	64.80 ± 1.36

ных в работе сортов, кроме сорта Love, который по этому показателю близок к Queen Elizabeth. Остальные сорта зацветают на 72–79-й день с начала вегетации. Самое позднее первое цветение в группе грандифлора наблюдается у сортов Лезгинка и Комсомольский огонёк. При изучении фенологических фаз было отмечено, что среди сортов группы грандифлора Комсомольский огонёк позже всех вступает в фазу бутонизации, приближаясь по этому показателю к розам Кордеса. Кроме того, вторичное цветение у этого сорта наступает позднее, чем у остальных представителей группы грандифлора, и сходно с сортами роз из группы Кордеса. Феноритмика¹ сорта Комсомоль-

ский огонёк оказалась наиболее близкой к сорту Dortmund из группы кордезий (см. табл. 2).

У исследуемых сортов были изучены морфологические признаки: диаметр цветка, число лепестков, длина цветоноса, высота куста. Сорта сравнивались отдельно по садовым группам согласно классификации Всемирной федерации обществ розоводов (WFRS). При этом сорт Комсомольский огонёк достоверно отличался от остальных сортов по морфологическим признакам (табл. 3).

У сорта Комсомольский огонёк выявлены статистически достоверные различия ($p < 0.05$) по всем признакам с сортами Queen Elizabeth и Лезгинка, а также по трем признакам с сортом Коралловый сюрприз (диаметр цветка, количество лепестков и высота куста). Сравнение с сортами Гурзуф и Love тоже показало статистически достоверное различие ($p < 0.05$) по двум признакам (диа-

¹ Феноритмика – фенологические ритмы роста и развития организмов, приспособленные к сезонной ритмике экологических факторов и выражающиеся в четком чередовании фенологических фаз. Чередование фенофаз иллюстрируется феноспектрами (Дедю, 1989).

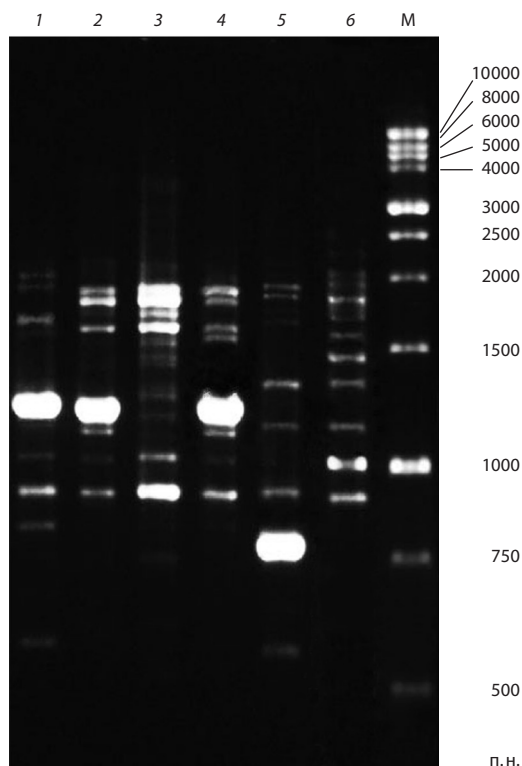


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР, полученных при амплификации ДНК образцов роз из садовой группы грандифлора и ISSR-праймера HB12.

1 – Комсомольский огонёк, 2 – Queen Elizabeth, 3 – Коралловый сюрприз, 4 – Лезгинка, 5 – Гурзуф, 6 – Love; М – ДНК-маркер.

метр цветка, количество лепестков). Изучение сорта Комсомольский огонёк по фено- и морфологическим признакам дало основание предположить, что сорт целесообразно относить к группе грандифлора, поскольку он отличается маленьким диаметром цветка, небольшим количеством лепестков, приближаясь по этим показателям к розам Кордеса.

Однако при сравнении сорта Комсомольский огонёк по морфометрическим признакам с сортами из группы кордезий выявлены статистически достоверные различия ($p < 0.05$). Так, Комсомольский огонёк достоверно отличается от сортов Dortmund и Летние звёзды по количеству лепестков, длине цветоноса и высоте куста, а от сорта Гуцулочка – по диаметру цветка, количеству лепестков и высоте куста.

На основании проведенных оценок по фенологическим фазам и морфометрическим признакам установлено, что сорт Комсомольский огонёк отличается как от сортов своей группы, так и от сортов группы Кордеса. Для оценки степени родства мы использовали метод ISSR-маркирования.

При сравнении сортов группы грандифлора была проведена амплификация ДНК образцов с шестью ISSR-праймерами и идентифицированы 122 ПЦР фрагмента длиной от 250 до 3000 п. н., из которых 109 были полиморфными (см. табл. 1). Число фрагментов амплификации варьировало от 18 (маркеры HB12 и UBC834) до 23 (17899В)

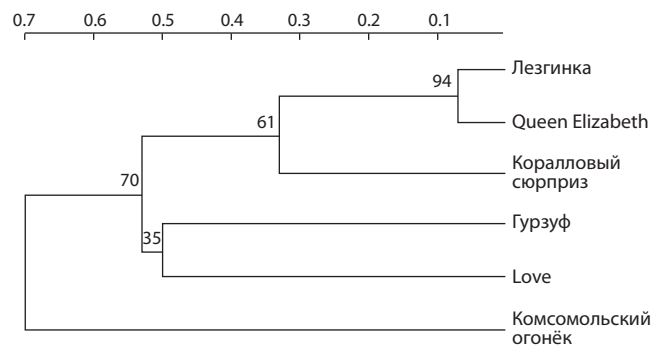


Рис. 2. Дендрограмма, построенная методом ближайших соседей на основе данных ПЦР для сортов из группы грандифлора.

Цифры в узлах показывают уровень статистической поддержки ветвей (бутстреп), цифры вверх – генетическую дистанцию.

(рис. 1). Уровень полиморфизма, выявляемого отдельно взятым праймером, варьировал от 77.8 % (маркер HB12) до 94.4 % (UBC855) и в среднем составил 91.42 %.

По результатам ISSR-маркирования образцы разделились на три кластера (рис. 2). В первый кластер вошли сорта Лезгинка, Queen Elizabeth и Коралловый сюрприз, во второй – сорта Гурзуф и Love. Комсомольский огонёк был наиболее удален от других сортов и образовал отдельную ветвь. Сорт Queen Elizabeth, полученный в середине XX в., широко использовался в селекции. По всей вероятности, он являлся родительской формой при создании сорта Лезгинка, выведенного в Никитском ботаническом саду в 2005 г. Об этом может свидетельствовать генетическая дистанция (0.1) с высоким уровнем статистической поддержки (>90)².

На следующем этапе нашей работы мы сравнили сорт Комсомольский огонёк с сортами из группы кордезии. При изучении этого материала выявлено 103 амплифицированных фрагмента длиной от 350 до 2000 п. н., из которых 97 были полиморфными. Суммарное число идентифицированных фрагментов варьировало от 15 (UBC855) до 19 (HB12) (рис. 3). Уровень полиморфизма, выявляемого отдельно взятым праймером, варьировал от 88.9 % (праймер 17899В) до 100 % (M2) и в среднем равнялся 94.25 %.

Сравнение сорта Комсомольский огонёк с кордезиями по ISSR-маркерам показало отсутствие близкого родства между ними (рис. 4). С высокой достоверностью наибольшее родство выявлено у сортов Dortmund и Летние звёзды. По-видимому, Dortmund использовался в качестве родительской формы в данной паре. Сорт Гуцулочка тоже родственен сортам Dortmund и Летние звёзды, но отстоит дальше и достоверность их общности несколько ниже. Эти три сорта из группы кордезий сформировали отдельный кластер.

Таким образом, результаты молекулярного анализа, а также изучение фено- и морфометрических показателей сортов групп грандифлора и кордезии свидетельствуют о том, что сорт Комсомольский огонёк отличается от сортов обеих групп.

² Мера статистической достоверности для узла >70 (с вероятностью более 95 %) рассматривается как высоконадежная.

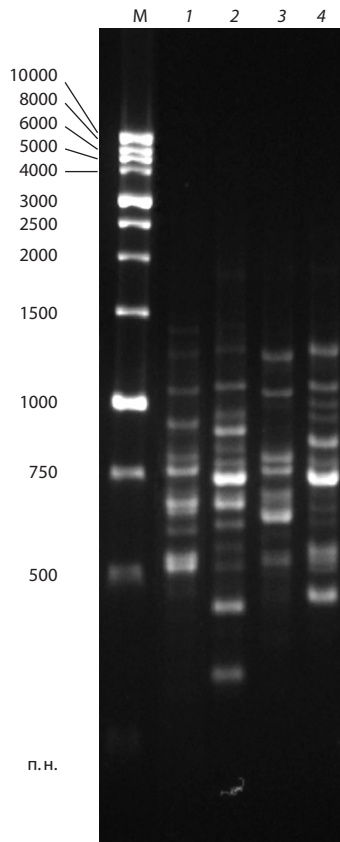


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов ПЦР, полученных при амплификации ДНК образцов роз из садовой группы кордезии и ISSR-маркера UBC855.

1 – Dortmund, 2 – Летние звёзды, 3 – Комсомольский огонёк, 4 – Гуцулочка; М – ДНК-маркер.

Обсуждение

Система классификации садовых роз на протяжении последних 50 лет совершенствовалась и претерпевала различные изменения. До 1970-х гг. мировой сортимент садовых роз составлял примерно 25000 сортов, которые подразделялись на 30 садовых групп (Былов и др., 1972). В 1980-х гг. (Клименко, Рубцова, 1986) наметилась тенденция к сокращению ранее выделенных садовых групп роз до 16 путем объединения. Одним из наиболее ярких примеров такого слияния стала группа Rambler (плетистые розы). В нее были объединены группы роз мультифлора (Multiflora) и вихурайана (Wichuraiana). Изначально сорта этих групп имели четкие различия, поскольку были созданы на основе двух разных видов, входящих в одну секцию *Synstylae*, – *Rosa multiflora* Thunb. и *R. wichuraiana* соответственно. В результате дальнейших скрещиваний между сортами этих

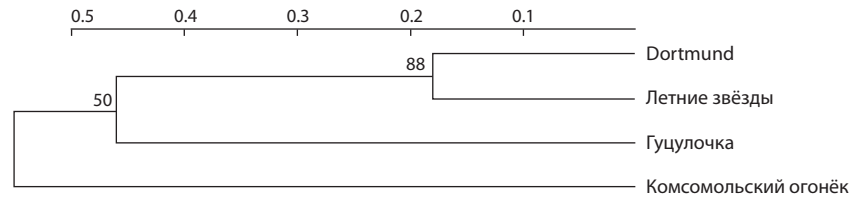


Рис. 4. Дендрограмма, построенная на основе данных ISSR-маркирования сортов роз Кордеса.

Цифры в узлах показывают уровень статистической поддержки ветвей (бутстреп), цифры вверху – генетическую дистанцию.

групп были получены сорта с признаками, общими для исходных видов, и явное разграничение между садовыми группами исчезло. Примечательно, что современные молекулярно-генетические исследования (Cui et al., 2020) по-прежнему подтверждают различие между исходными видами.

Генетические исследования, касающиеся уточнения таксономических, филогенетических отношений у роз, в настоящее время интенсивно развиваются. Так, представлены разработки генетических, геномных и транскриптомных инструментов для роз, с помощью которых можно изучать молекулярные механизмы, лежащие в основе создания некоторых видов роз (Bendahmane et al., 2013; Duta-Cornescu et al., 2017; Li et al., 2018). В частности, проведена оценка генетического родства розы Таиф с некоторыми генотипами роз (*Rosa* sp.) на основе случайной амплифицированной полиморфной ДНК, маркеров простого повтора последовательности *inter* и простого повтора последовательности *simple* (El-Assal et al., 2014), а китайские ученые идентифицировали транскрипты, общие для розоцветных, которые должны помочь прояснить филогенетические взаимоотношения розоцветных растений (Li et al., 2018).

Интродукция и селекция роз имеют долгую и сложную историю. Виды роз скрещивались в совершенно разных регионах мира, таких как Европа, Азия и Ближний Восток. В процессе одомашнивания было отобрано несколько признаков, влияющих на качество цветка: периодическое цветение, махровые цветки, окраска лепестков и аромат (Bendahmane et al., 2013). Стимулирование цветения, долговечности цветков, создание новизны в структуре цветков, цветовой гамме и ароматах являются основными задачами селекции декоративных растений. Методы редактирования генома открывают дополнительные возможности изучения функции генов и выведения новых сортов для производства роз в цветочной промышленности (Giovannini et al., 2021). Данные о генетической структуре популяций вида, рода или семейства позволяют рациональнее использовать имеющийся генофонд за счет оптимизации подбора исходных селекционных форм.

За последние два десятилетия у розы были изучены молекулярные основы производства цветочных ароматов, а также их генетическое наследование, что представляет собой полезную информацию как для изучения, так и для улучшения производства цветочного аромата (Yan et al., 2014; Shi, Zhang, 2022). В итоге, как результат комплексных исследований французских, китайских и немецких ученых, был секвенирован геном чайной розы (*R. chinensis*) – вида-прародителя многих современных сортов роз, и обнаружены гены, предположительно отвечающие за ремонтантность (способность к многократному цветению в течение сезона). Выяснилось, что синтез летучих веществ, которые придают цветку аромат и пигменты, ответственные за цвет, координируется одним и тем же тандемом белка и некодирующей микроРНК (Raymond et al., 2018).

Заключение

В настоящее время насчитывается уже свыше 40000 сортов садовых и парковых роз, которые подразделяются на 36 садовых групп. В этом гигантском мировом ассортименте многие сорта роз часто не имеют четкого подтверждения их происхождения; например, о происхождении сорта Dort-

mund в каталогах есть лишь указание: Сеянец × *R. kordesii*. Поэтому при создании научных коллекций и коллекционных генофондов большое значение приобретает паспортизация сортов. Межсортная гибридизация роз в пределах одной садовой группы во многом исчерпала себя. Требуется поиск сортов, в первую очередь среди групп чайно-гибридные, флорибунда и грандифлора, характеризующихся высокой декоративностью, но выделяющихся по морфологическим, ритмологическим признакам и резистентности для использования в селекции в качестве отцовских и материнских форм.

В данной работе были исследованы сорта роз из биоресурсной научной коллекции ЦСБС СО РАН (USU 440534), относящиеся к группе грандифлора и розы Кордеса. У выделяющегося по молекулярно-генетическим, фено- и морфологическим признакам из группы грандифлора сорта Комсомольский огонёк не обнаружено близкого родства с изученными сортами кордезии, хотя по размеру цветка и феноритмике он ближе к кордезиям.

Сорта, фенотипически отличающиеся от общей массы и обладающие рядом ценных признаков – прежде всего зимостойкостью, устойчивостью к грибным болезням, а также декоративностью, ремонтантным и продолжительным цветением, являются ценнейшим селекционным материалом для создания новых сортов. По результатам наших исследований именно Комсомольский огонёк может быть рекомендован для активного вовлечения в селекционную работу при создании сортов роз для регионов с суровыми климатическими условиями. Выявленный полиморфизм по ISSR-маркерам у изученных сортов роз в дальнейшем может быть использован для молекулярно-генетической паспортизации, что является необходимым этапом для учета и сохранения генофонда ценных сортов. К преимуществам ISSR-маркеров при описании генофондов различных видов культурных растений относятся полилокусность, наличие большого количества продуктов амплификации, полученных в полимеразной цепной реакции, и исключение процедуры секвенирования в полиакриламидных гелях.

Список литературы / References

Адрицкая Н.А., Капелян А.И. Сравнительная оценка зимостойкости и декоративности различных сортов роз в розарии ботанического сада Петра Великого. *Изв. С.-Петербург. гос. аграр. ун-та*. 2022;2(67):48-58. DOI 10.24412/2078-1318-2022-2-48-58 [Adritskaya N.A., Kapelyan A.I. Comparative assessment of winter hardiness and decorative properties of various varieties of roses in the rose garden of the Botanical Garden of Peter the Great. *Izvestiya Sankt-Peterburgskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Proceedings of the Saint Petersburg State Agrarian University*. 2022;2(67):48-58. DOI 10.24412/2078-1318-2022-2-48-58 (in Russian)]

Аннотированный каталог цветочно-декоративных растений коллекции Никитского ботанического сада. Т. I. Коллекции розы садовой, клематиса, сирени. Симферополь: АРИАЛ, 2018 [Annotated Catalog of Ornamental Plants from the Collection of the Nikita Botanical Garden. Vol. I. Collections of garden roses, clematis, and lilacs. Simferopol: ARIAL Publ., 2018 (in Russian)]

Бардакова С.А. Влияние неблагоприятных климатических условий на рост и развитие садовых роз в Ставропольском Ботаническом саду. *Вестн. АПК Ставрополя*. 2017;1(25):120-122 [Bardakova S.A. Influence of adverse climatic conditions on the growth and development of garden roses in the Stavropol Botani-

cal Garden. *Vestnik APK Stavropolya = Agricultural Bulletin of the Stavropol Region*. 2017;1(25):120-122 (in Russian)]

Бейдеман И.Н. Методика изучения фенологии растений и растительных сообществ. Новосибирск: Наука, 1974 [Beideman I.N. Methodology for Studying the Phenology of Plants and Plant Communities. Novosibirsk: Nauka Publ., 1974 (in Russian)]

Былов В.Н., Штанько И.И., Юдинцева Е.В., Михайлов Н.Л. Розы. Краткие итоги интродукции. М.: Наука, 1972 [Bylov V.N., Shtanko I.I., Yudinseva E.V., Mikhailov N.L. Roses. Summary of introduction. Moscow: Nauka Publ., 1972 (in Russian)]

Васильева О.Ю. Интродукция роз в Западной Сибири. Новосибирск: Наука, 1999 [Vasilyeva O.Yu. Introduction of Roses in Western Siberia. Novosibirsk: Nauka Publ., 1999 (in Russian)]

Городня Е.В. Перспективный сортимент роз для использования в озеленении и селекции в условиях предгорной зоны Крыма. *Учен. зап. Таврич. нац. ун-та им. В.И. Вернадского. Сер.: Биология, химия*. 2014;27(5):29-37 [Gorodnyaya E.V. A promising assortment of roses for use in landscaping and breeding in the foothill zone of Crimea. *Uchenye Zapiski Tavricheskogo Natsyonalnogo Universiteta imeni Vernadskogo. Seriya Biologiya, Khimiya = Proceedings of the Vernadsky Taurida National University. Series: Biology, Chemistry*. 2014;27(5):29-37 (in Russian)]

Дедю И.И. Экологический энциклопедический словарь. Кишинев, 1989 [Dedu I.I. Ecological Encyclopedic Dictionary. Kishinev, 1989 (in Russian)]

Дорогина О.В., Жмудь Е.В. Молекулярно-генетические методы в экологии растений. *Сиб. экол. журн*. 2020;27(4):416-432. DOI 10.15372/SEJ20200402 [Dorogina O.V., Zhmud E.V. Molecular-genetic methods in plant ecology. *Contemporary Problems of Ecology*. 2020;13(4):333-345. DOI 10.1134/S1995425520040058]

Капелян А.И. Привитые и корнесобственные розы в Ботаническом саду Петра Великого. *Сб. науч. трудов Гос. Никитского ботан. сада*. 2017;145:271-274 [Kapelyan A.I. Grafted and own-rooted roses in the Saint Petersburg Botanical Garden. *Collection of Scientific Works of the Nikita State Botanical Garden*. 2017;145:271-274 (in Russian)]

Клименко З.К. Итоги многолетней работы (1824–2010 гг.) по селекции садовых роз в Никитском ботаническом саду. *Бюл. Гос. Никитского ботан. сада*. 2010;100:49-55 [Klimenko Z.K. The results of long-term work (1824–2010) on the breeding of garden roses in the Nikita Botanical Garden. *Byulleten Gosudarstvennogo Nikitskogo Botanicheskogo Sada = Bulletin of the Nikita State Botanical Garden*. 2010;100:49-55 (in Russian)]

Клименко З.К., Рубцова Е.Л. Розы. Киев: Наук. думка, 1986 [Klimenko Z.K., Rubtsova E.L. Roses. Kyiv: Naukova dumka Publ., 1986 (in Russian)]

Клименко З.К., Васильева О.Ю., Зорина Е.В., Дзюба О.В. Эколого-географическое испытание садовых роз в трех климатических зонах. *Самар. науч. вестн*. 2019;8(1):36-42. DOI 10.24411/2309-4370-2019-11105 [Klimenko Z.K., Vasilyeva O.Yu., Zorina E.V., Dzyuba O.V. Ecological and geographical testing of garden roses in three climatic zones. *Samarskiy Nauchnyi Vestnik = Samara Journal of Science*. 2019;8(1):36-42. DOI 10.24411/2309-4370-2019-11105 (in Russian)]

Методика государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур. Вып. 6. Декоративные культуры. М.: Колос, 1968 [Methodology of State Variety Testing of Agricultural Crops. Iss. 6. Ornamental crops. Moscow: Kolos Publ., 1968 (in Russian)]

Пашина М.В. Ритмы роста и развития садовых роз в условиях лесостепного Прииртышья. *Вестн. ИрГСХА*. 2011;6(44):110-116 [Pashina M.V. Rhythms of growth and development of garden roses in the Irtysh forest-steppe. *Vestnik IrGSHA*. 2011;6(44):110-116 (in Russian)]

- Супрун Н.А. Комплексная оценка коллекции сортов роз Ботанического сада ВГСПУ. В: Труды по интродукции и акклиматизации растений. Ижевск, 2021;525-529
[Suprun N.A. Comprehensive assessment of the collection of rose varieties of the VSSPU Botanical Garden. In: Proceedings on the Introduction and Acclimatization of Plants. Izhevsk, 2021;525-529 (in Russian)]
- Тыщенко Е.Л. Перспективные садовые группы роз для использования в ландшафтных композициях на юге России. В: Науч. труды Сев.-Кавк. зонального науч.-исслед. ин-та садоводства и виноградарства. 2015;7:67-72
[Tyshchenko E.L. Promising garden groups of roses for use in landscaping in southern Russia. In: Scientific Works of the North Caucasian Zonal Research Institute for Horticulture and Viticulture. 2015;7:67-72 (in Russian)]
- Фомина Т.И. Биологические особенности декоративных растений природной флоры в Западной Сибири. Новосибирск: Акад. изд-во «Гео», 2012
[Fomina T.I. Biological Characteristics of Ornamental Plants of Natural Flora in Western Siberia. Novosibirsk: Acad. Publ. House "Geo", 2012 (in Russian)]
- Amom T., Nongdam P. The use of molecular marker methods in plants: a review. *Int. J. Cur. Res. Rev.* 2017;9(17):1-7. DOI 10.7324/IJCRR.2017.9171
- Bendahmane M., Dubois A., Raymond O., Bris M.L. Genetics and genomics of flower initiation and development in roses. *J. Exp. Bot.* 2013;64(4):847-857. DOI 10.1093/jxb/ers387
- Cairns T. (Ed.) Modern Roses XI: The world encyclopedia of roses. New York: Acad. Press, 2007
- Cui W.H., Zhong M.C., Du X.Y., Qu X.J., Jiang X.D., Sun Y.B., Wang D., Chen S.Y., Hu J.Y. The complete chloroplast genome sequence of a rambler rose, *Rosa wichuraiana* (Rosaceae). *Mitochondrial DNA Part B.* 2020;5(1):252-253. DOI 10.1080/23802359.2019.1700198
- Doyle J.J., Doyle J.L. Genomic plant DNA preparation from fresh tissue-CTAB method. *Phytochem. Bul.* 1987;19(1):11-15
- Duta-Cornescu G., Pavlusenco C.-E., Pojoga D.M., Negulici M.E., Constantin N., Simon-Gruita A. Genetic analysis of some roses cultivars appropriate for S-E Romania climate using PCR-ISSR technology. *AgroLife Sci. J.* 2017;6(1):69-74
- El-Assal S.E.D., El-Awady M.A., El-Tarras A., Shehab G. Assessing the genetic relationship of Taif rose with some rose genotypes (*Rosa* sp.) based on random amplified polymorphic DNA, inter simple sequence repeat and simple sequence repeat markers. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* 2014;10(1):88-98. DOI 10.3844/ajbbsp.2014.88.98
- Giovannini A., Laura M., Nesi B., Savona M., Cardi T. Genes and genome editing tools for breeding desirable phenotypes in ornamentals. *Plant Cell Rep.* 2021;40(3):461-478. DOI 10.1007/s00299-020-02632-x
- Haynes W. Student's t-test. In: Dubitzky W., Wolkenhauer O., Cho K.H., Yokota H. (Eds.) Encyclopedia of Systems Biology. New York: Springer, 2013;2023-2025. DOI 10.1007/978-1-4419-9863-7_1184
- Li S., Zhong M., Dong X., Jiang X., Xu Y., Sun Y., Cheng F., Li D.Z., Tang K., Wang S., Dai S., Hu J.Y. Comparative transcriptomics identifies patterns of selection in roses. *Plant Biol.* 2018;18(1):371. DOI 10.1186/s12870-018-1585-x
- Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979;76(10):5269-5273. DOI 10.1073/pnas.76.10.5269
- Plugatar Yu.V., Klimenko Z.K., Plugatar S.A., Zykova V.K., Kravchenko I.N. Rambling roses in the landscape of the southern coast of the Crimea: historical traditions of their use. *Acta Hort.* 2018;1201:49-55. DOI 10.17660/ActaHortic.2018.1201.88
- Plugatar Yu.V., Klimenko Z.K., Zykova V.K., Plugatar S.A. Methods and results of roses breeding from different garden groups in the south of Russia. *Acta Hort.* 2019;1255:31-34. DOI 10.17660/ActaHortic.2019.1255.6
- Raymond O., Gouzy J., Just J., Badouin H., Verdenaud M., Lemainque A., Vergne P., Moja S., Choisine N., Pont C., ... Liu C., Le Bris M., Salse J., Baudino S., Benhamed M., Wincker P., Bendahmane M. The *Rosa* genome provides new insights into the domestication of modern roses. *Nat. Genet.* 2018;50(6):772-777. DOI 10.1038/s41588-018-0110-3
- Shi S., Zhang Z. Genetic and biochemical aspects of floral scents in roses. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(14):8014. DOI 10.3390/ijms23148014
- Van de Peer Y., Wächter R.D. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Appl. Biosci.* 1994;10(5):569-570
- Vasilyeva O.Yu., Dorogina O.V., Yudanova S.S., Plugatar S.A., Klimenko Z.K. Identifying the rose varieties and natural forms using ISSR-markers. *BIO Web Conf.* 2020;24:00091. DOI 10.1051/bioconf/20202400091
- Yan H., Zhang H., Chen M., Jian H., Baudino S., Caissard J.C., Bendahmane M., Li S., Zhang T., Zhou N., Qiu X., Wang Q., Tang K. Transcriptome and gene expression analysis during flower blooming in *Rosa chinensis* 'Pallida'. *Gene.* 2014;540(1):96-103. DOI 10.1016/j.gene.2014.02.008

ORCID

S.S. Yudanova orcid.org/0000-0001-7547-0099
O.V. Dorogina orcid.org/0000-0001-5729-3594
O.Yu. Vasilyeva orcid.org/0000-0003-0730-3365

Благодарности. Исследования выполнены по комплексной программе фундаментальных научных исследований СО РАН, проект «Анализ биоразнообразия, сохранение и восстановление редких и ресурсных видов растений с использованием экспериментальных методов» № АААА-А21-121011290025-2, с использованием материалов биоресурсной научной «Коллекции живых растений в открытом и закрытом грунте» USU 440534.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 28.06.2023. После доработки 11.12.2023. Принята к публикации 11.12.2023.

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

Проявление селекционно-ценных признаков в потомстве мутанта сорго, несущего генетическую конструкцию для РНК-сайленсинга гена γ -кафирина

Л.А. Эльконин¹✉, Н.В. Борисенко¹, Т.Е. Пылаев^{2,3}, О.А. Кенжегулов¹, С.Х. Сарсенова¹, Н.Ю. Селиванов², В.М. Панин¹

¹ Федеральный аграрный научный центр Юго-Востока, Саратов, Россия

² Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, Федеральный исследовательский центр «Саратовский научный центр Российской академии наук», Саратов, Россия

³ Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского Министерства здравоохранения Российской Федерации, Саратов, Россия

✉ elkonin@gmail.com

Аннотация. Улучшение питательной ценности зернового сорго – засухоустойчивой и жаростойкой зерновой культуры, служащей источником кормового и продовольственного зерна во многих засушливых регионах мира, – важная задача селекции в условиях глобального потепления климата. Одной из причин низкой питательной ценности зерна сорго является устойчивость его запасных белков (кафиринов) к протеолитическому расщеплению, обусловленная, в том числе структурной организацией белковых телец, в которых наиболее устойчивый к действию протеаз γ -кафирин располагается по периферии, инкапсулируя более легко перевариваемые α -кафирины. Введение генетических конструкций, способных к индукции РНК-сайленсинга гена γ -кафирина (*gKAF1*), открывает перспективы для решения этой проблемы. Нами у сорта зернового сорго Аванс посредством агробактериальной трансформации с использованием штамма, несущего в составе Т-ДНК генетическую конструкцию для РНК-сайленсинга гена *gKAF1*, получен мутант с улучшенной перевариваемостью белков эндосперма (до 92 %). Цель настоящей работы – изучение стабильности наследования введенной генетической конструкции в поколениях T_2 – T_4 , установление числа ее копий, а также проявления важнейших селекционно-ценных признаков у потомства полученного мутанта. Мутантные линии выращивали на экспериментальном участке Федерального аграрного научного центра Юго-Востока в трех рендомизированных блоках. Исследуемые линии характеризовались улучшенной перевариваемостью кафиринов, модифицированным типом эндосперма, полностью или частично лишенным стекловидного слоя, повышенным процентным содержанием лизина (на 75 %), сниженной высотой растений, длиной подметельчатого междоузлия, массой 1000 зерен и урожаем зерна с метелки. В поколении T_2 отобрана линия с моногенным контролем устойчивости к глюфосинату аммония. Анализ qPCR показал, что у разных растений из поколений T_3 и T_4 генетическая конструкция присутствует в двух-четыре копии. В поколении T_3 отобрана линия с высокой перевариваемостью белков эндосперма (81 %) и минимальным снижением селекционно-ценных признаков (на 5–7 %).
Ключевые слова: *Sorghum bicolor*; трансгенные растения; РНК-сайленсинг; кафирины; qPCR; качество зерна; текстура эндосперма.

Для цитирования: Эльконин Л.А., Борисенко Н.В., Пылаев Т.Е., Кенжегулов О.А., Сарсенова С.Х., Селиванов Н.Ю., Панин В.М. Проявление селекционно-ценных признаков в потомстве мутанта сорго, несущего генетическую конструкцию для РНК-сайленсинга гена γ -кафирина. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(1):63-73. DOI 10.18699/vjgb-24-08

Manifestation of agronomically valuable traits in the progeny of a sorghum mutant carrying the genetic construct for RNA silencing of the γ -kafirin gene

L.A. Elkonin¹✉, N.V. Borisenko¹, T.E. Pylaev^{2,3}, O.A. Kenzhegulov¹, S.Kh. Sarsenova¹, N.Yu. Selivanov², V.M. Panin¹

¹ Federal Center of Agriculture Research of the South-East Region, Saratov, Russia

² Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov Federal Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia

³ Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky, Saratov, Russia

✉ elkonin@gmail.com

Abstract. Improving the nutritional value of grain sorghum, a drought- and heat-tolerant grain crop, is an important task in the context of global warming. One of the reasons for the low nutritional value of sorghum grain is the resistance of its storage proteins (kafirins) to proteolytic digestion, which is due, among other things, to the structural organization of protein bodies, in which γ -kafirin, the most resistant to proteases, is located on the periphery, encapsulating more easily digested α -kafirins. The introduction of genetic constructs capable of inducing RNA silencing

of the γ -kafirin (*gKAF1*) gene opens up prospects for solving this problem. Using *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of immature embryos of the grain sorghum cv. Avans we have obtained a mutant with improved digestibility of endosperm proteins (up to 92 %) carrying a genetic construct for RNA silencing of the *gKAF1* gene. The goal of this work was to study the stability of inheritance of the introduced genetic construct in T₂–T₄ generations, to identify the number of its copies, as well as to trace the manifestation of agronomically valuable traits in the offspring of the mutant. The mutant lines were grown in experimental plots in three randomized blocks. The studied lines were characterized by improved digestibility of kafirins, a modified type of endosperm, completely or partially devoid of the vitreous layer, an increased percentage of lysine (by 75 %), reduced plant height, peduncle length, 1000-grains weight, and grain yield from the panicle. In T₂, a line with monogenic control of GA resistance was selected. qPCR analysis showed that in different T₃ and T₄ plants, the genetic construct was present in 2–4 copies. In T₃, a line with a high digestibility of endosperm proteins (81 %) and a minimal decrease in agronomically valuable traits (by 5–7 %) was selected.

Key words: *Sorghum bicolor*; transgenic plants; RNA silencing; kafirins; qPCR; grain quality; endosperm texture.

For citation: Elkonin L.A., Borisenko N.V., Pylaev T.E., Kenzhegulov O.A., Sarsenova S.Kh., Selivanov N.Yu., Panin V.M. Manifestation of agronomically valuable traits in the progeny of a sorghum mutant carrying the genetic construct for RNA silencing of the γ -kafirin gene. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(1):63–73. DOI 10.18699/vjgb-24-08

Введение

РНК-интерференция – один из важнейших природных механизмов регуляции экспрессии генов и противовирусной защиты клетки. Как известно, в основе механизма РНК-интерференции лежит деградация одноцепочечной мРНК в присутствии комплементарной ей короткой двуцепочечной РНК, что ведет к нарушению синтеза белка и замолчанию экспрессии соответствующего гена. Такие короткие интерферирующие РНК (siRNA) длиной 20–25 нуклеотидов транскрибируются с присутствующих в геноме природных последовательностей ДНК или искусственно созданных генетических конструкций, кодирующих шпилечные РНК (hpRNA) (Guo et al., 2016; Muhammad et al., 2019). Такая конструкция состоит из смысловой и антисмысловой последовательностей части мРНК гена-мишени в виде инвертированных повторов, которые разделены между собой спейсерной последовательностью. Нередко в генетических конструкциях в качестве спейсера используется способный к сплайсингу интрон, поскольку он улучшает эффективность сайленсинга РНК у растений (Smith et al., 2000).

Смысловая и антисмысловая последовательности в транскрибируемой РНК комплементарны друг другу и образуют hpRNA, которая процессируется Dicer-подобными белками (DCL). Белки DCL генерируют siRNA из предшественника, hpRNA. Одна цепь siRNA-дуплекса включена в белок Argonaute (AGO), образуя РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC). Молекула siRNA направляет RISC к комплементарной области одноцепочечной РНК, после чего AGO расщепляет мРНК-мишень (Журавлев и др., 2022; Bharathi et al., 2023).

Технология РНК-интерференции весьма интенсивно используется в функциональной геномике и геномной инженерии растений, поскольку позволяет создавать мутанты, устойчивые к биотическим и абиотическим стрессовым факторам, а также регулировать экспрессию генов, вовлеченных в цепи синтеза и распада важных метаболитов и запасных питательных веществ, включая белки, углеводы и липиды (Bharathi et al., 2023). Этот подход использовали для получения мутантов с измененным спектром запасных белков у возделываемых видов злаков, включая кукурузу, пшеницу, рис, сорго (Elkonin et al., 2016a).

Особое значение технология РНК-интерференции имеет для сорго, поскольку считается, что одна из причин сравнительно низкой питательной ценности зерна сорго – это устойчивость его запасных белков (кафиринов) к протеолитическому расщеплению, обусловленная в том числе структурной организацией белковых телец, в которых наиболее устойчивый к действию протеаз γ -кафирин располагается по периферии, инкапсулируя более легко перевариваемые α -кафирины (Oria et al., 2000; de Mesa-Stonestreet et al., 2010; Duressa et al., 2018). Показано, что подавление синтеза разных классов кафиринов ведет к модификации структуры белковых телец эндосперма, снижению устойчивости кафиринов к расщеплению протеазами, компенсаторному синтезу других белков с более высоким содержанием лизина (da Silva et al., 2011a, b; Kumar et al., 2012; Grootboom et al., 2014; Elkonin et al., 2016b).

Ранее нами посредством агробактериальной трансформации генетическая конструкция, способная к индукции РНК-сайленсинга гена γ -кафирина (*gKAF1*), входящая в состав Т-ДНК вектора pNRKAFSIL, была введена в геном коммерческого сорта зернового сорго Аванс. У одного из растений поколения T₀ все зерновки имели мучнистый тип эндосперма и характеризовались высоким уровнем перевариваемости кафиринов (до 93 %), который кардинально отличался от такового у сорта Аванс (57 %) (Elkonin et al., 2021). Растения из поколения T₁ наследовали эти признаки, так же как и устойчивость к глюфосинату аммония, обусловленную геном *bar*, также входящим в состав Т-ДНК вектора pNRKAFSIL (Borisenko et al., 2022).

Цель настоящей работы – изучение стабильности наследования введенной генетической конструкции в поколениях T₂–T₄, ее копийности, а также проявления важнейших селекционно-ценных признаков у потомства полученного мутанта, включая аминокислотный состав муки и перевариваемость ее белков в системе *in vitro*.

Материалы и методы

Исходный мутант с высокой перевариваемостью белков зерна (Аванс-1/18) был получен в эксперименте по агробактериальной трансформации нового коммерческого сорта Аванс зернового сорго (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) штаммом *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, несущим

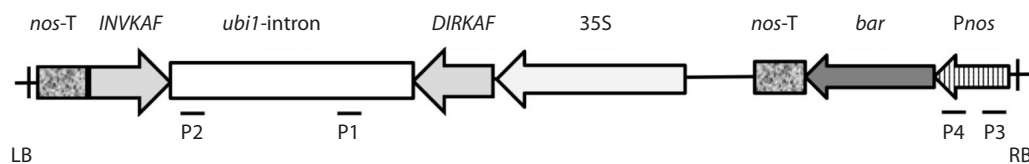


Рис. 1. Схема Т-ДНК вектора pNRKAFSIL (Elkonin et al., 2016b).

DIRKAF, *INVKAF* – фрагменты гена γ -кафирина сорго (GenBank Acc. No. M73688) в прямой и инвертированной ориентации; *ubi1* – интрон кукурузы; 35S – 35S-промотор вируса мозаики цветной капусты; *Pnos* – *nos*-промотор; *nos-T* – *nos*-терминатор; P1–P4 – позиции праймеров, использованных для ПЦР-анализа.

бинарный вектор pNRKAFSIL (Elkonin et al., 2021). Этот вектор содержит генетическую конструкцию, состоящую из фрагмента (309 п. н.) гена γ -кафирина (GenBank Acc. No. M73688) в прямой и инвертированной ориентации, которые разделены последовательностью *ubi1*-интрона кукурузы (рис. 1) (Elkonin et al., 2016b). Такая конструкция должна подавлять экспрессию *gKAF1* посредством РНК-интерференции. В состав Т-ДНК этого вектора входит также ген *bar*, определяющий устойчивость к глюфосинату аммония (ГА), под контролем *nos*-промотора.

Потомство RNAi-мутанта Аванс-1/18 выращивали в климатической камере (фотопериод 16 ч день/8 ч ночь, t° 28/22 $^{\circ}$ C), в теплице и опытных делянках на изолированном участке Федерального аграрного научного центра Юго-Востока (г. Саратов, Россия).

Для изучения наследования генетической конструкции для сайленсинга метелки трансгенных растений перед цветением тщательно изолировали пергаментными изоляторами до начала цветения. Кроме того, их скрещивали в качестве отцовских родителей с линиями с цитоплазматической мужской стерильностью (ЦМС) А2 КВВ-181, А2 КВВ-114 и А2 О-1237.

Оценка устойчивости к глюфосинату аммония. Для изучения устойчивости потомства трансгенных растений к ГА зерновки после стерилизации «Доместосом» и $HgCl_2$ (0.1 %) замачивали в растворе ГА (2.5 мг/л) на 20 ч. Из замоченных зерновок извлекали зародыши и помещали на безгормональную питательную среду MS, содержащую стерилизованный фильтрованием ГА (2.5 мг/л). Зародыши культивировали в растительной камере (фотопериод 16 ч день/8 ч ночь; t° 26–28 $^{\circ}$ C) в течение трех недель. При таком режиме проростки, несущие ген *bar*, нормально развивались и достигали 10 см за три недели, тогда как развитие проростков, не несущих ген *bar*, тормозилось на стадии разворачивания coleoptilya.

Текстура эндосперма. Текстуру эндосперма определяли на поперечных сколах зрелых зерновок, которые делали с помощью острого скальпеля. При этом выделяли следующие типы эндосперма: модифицированный, к которому относили мучнистый, мучнистый с вкраплениями стекловидного эндосперма и мучнистый с тонким, часто «размытым» ободком стекловидного слоя и обычный с толстым стекловидным слоем.

ПЦР-анализ. Геномную ДНК выделяли из листьев модифицированным СТАВ-методом. Наличие генетической конструкции для РНК-сайленсинга проверяли с помощью ПЦР-анализа (полимеразная цепная реакция) с праймерами, амплифицирующими фрагмент *ubi1*-интрона куку-

рузы длиной 588 п. н. (P1 (5'→3'): *tgctctggtgtgatgatgtgctc*; P2 (5'→3'): *gcgatgaaggcagggctaaa*), который является важным компонентом конструкции, обеспечивая ее стабильность и эффективность функционирования (Smith et al., 2000), а также фрагмент *nos*-промотора, управляющего маркерным геном *bar*, длиной 201 п. н. (P3 (5'→3'): *tgagacttaattggataccgaggg*; P4 (5'→3'): *tttggactgacagaaccgcaac*) (позиции праймеров указаны на рис. 1). Полимеразную цепную реакцию осуществляли с использованием ДНК-амплификаторов MasterCycler (Eppendorf, Германия) и T100 (Bio-Rad, США). Условия ПЦР были следующими: для *nos*-промотора: 95 $^{\circ}$ C (2 мин); 40 циклов [95 $^{\circ}$ C (30 с), 64 $^{\circ}$ C (30 с); 72 $^{\circ}$ C (1 мин 10 с)]; 72 $^{\circ}$ C (7 мин). Для *ubi1*-интрона: 95 $^{\circ}$ C (2 мин); 40 циклов [95 $^{\circ}$ C (1 мин), 56 $^{\circ}$ C (1 мин), 72 $^{\circ}$ C (1 мин 30 с)]; 72 $^{\circ}$ C (10 мин). Амплифицированные фрагменты визуализировали с помощью электрофореза в 2.0 % агарозном геле. ПЦР-анализы каждого образца были выполнены в двух повторностях.

Количественная ПЦР для определения количества копий генетической конструкции для РНК-интерференции. Число копий генетической конструкции для РНК-интерференции определяли с помощью количественной ПЦР (qPCR) путем амплификации фрагментов *nos*-промотора и гена антранилат-фосфорибозил-трансферазы сорго (*APRT*, Sobic.002G303300), выбранного в качестве референсного гена. Реакционная смесь включала 2 мкл геномной ДНК (10 нг/мкл), 10 мкл готовой реакционной смеси для амплификации, содержащей интеркалирующий краситель SYBR Green (2X HS-qSYBR-blue) («Биолаб-микс», Россия) и по 0.4 пмоль каждого праймера; общий объем реакционной смеси – 20 мкл; повторность трехкратная. Режим ПЦР: 1 цикл 95 $^{\circ}$ C (2 мин), затем 40 циклов [95 $^{\circ}$ C (15 с), 60 $^{\circ}$ C (20 с) + детекция на канале FAM, 72 $^{\circ}$ C (20 с)]. Анализ qPCR выполняли с использованием прибора для ПЦР в режиме реального времени LightCycler 96 (Roche, Швейцария). Праймеры для гена *APRT* были следующими (F (5'→3'): *tgacacattcccaacctca* и R (5'→3'): *atctctctcctgagtgcca*) (Wang et al., 2021); праймеры для *nos*-промотора описаны выше. Концентрацию геномной ДНК и праймеров определяли с использованием спектрофотометра УФ Nanodrop One C (Thermo Fisher Scientific, США) путем измерения поглощения на длинах волн 230/260/280 нм. Анализ данных и определение эффективности ПЦР проводили на сертифицированном программном обеспечении LightCycler® 96 Software, версия 1.1.0.1320.

Содержание общего белка в зерне у растений из поколений T₁ и T₂ анализировали с помощью метода Кельдаля.

Перевариваемость белков зерна в системе *in vitro*.

Для изучения перевариваемости белков зерна использовали метод обработки пепсином цельно-смолотой муки (Aboubacar et al., 2001; Nunes et al., 2004; Wong et al., 2009). При этом навеску муки (20 мг) инкубировали в 5 мл 0.15 % раствора пепсина (Carl Roth, Германия) (Art.-№. КК38.1, 2000 FIP-U/g) в 0.1 М калий-фосфатном буфере (pH 2.0) в течение 120 мин при 37 °С при периодическом встряхивании.

Для количественной оценки перевариваемости использовали метод, основанный на сканировании электрофоретических спектров белков, полученных в SDS-PAGE (Aboubacar et al., 2001; Wong et al., 2009; Elkonin et al., 2013). Из переваренных и контрольных образцов выделяли белки с помощью экстракционного буфера (0.0625 М TRIS·HCl, 2 % SDS, 5 % 2-меркаптоэтанол, pH 6.8). Образцы подвергали SDS-PAGE в 12.5 % (w/v) ПААГ; на каждую дорожку наносили по 10 мкл экстракта. В качестве стандартов использовали белковые маркеры молекулярной массы (14–116 кДа) (Thermo Scientific). Гели окрашивали Кумасси бриллиантовым синим R-250. После электрофореза гели сканировали с помощью ChemiDocTM (Bio-Rad); количество белка определяли с применением программы Image Lab 6.1 (Bio-Rad). Величину перевариваемости рассчитывали как процентное отношение разницы между объемом белка в контрольном образце и в образце, подвергнутому обработке пепсином, к объему белка в контрольном образце. Эксперименты были выполнены в двух повторностях.

Анализ аминокислотного состава белков муки. Для анализа общего состава аминокислот исследовали по 10 зерновок с трансгенных растений T₁ 190-1, 190-3, 190-4 и исходного сорта Аванс. Муку (15 мг), полученную из зерновок, подвергали кислотному гидролизу путем обработки 1.5 мл 6N HCl (при 106 °С в течение 24 ч) в атмосфере азота. Идентификацию аминокислот осуществляли с применением предколониальной модификации 6-аминонафталин гидроксисукцинамидил карбаматом – AccQ по методу Waters AccQ-Tag с использованием набора реактивов WAT 052880. Анализ выполняли методом ВЭЖХ на хроматографе Knauer Smartline с помощью обратнотазовой хроматографии на колонке Kromasil – 110 C18/2.5 мкм, 2 мм × 150 мм. Детекция фотометрическая при λ 248 нм. Объем инъекции – 20 мкл. Анализ образцов проводили в трех повторностях. Количественный расчет содержания аминокислот в гидролизатах образцов осуществляли методом внешнего стандарта – 250 пмоль аналитического стандарта аминокислот (AAS18 Fluka).

Оценка селекционно-ценных признаков. Для изучения влияния использованной нами генетической конструкции для сайленсинга гена *gKAF1* на проявление селекционно-ценных признаков потомства четырех трансгенных растений T₁, продвинутое до поколений T₃ и T₄, а также исходный сорт Аванс, – выращивали в четырех рядах в трех повторностях на делянках на изолированном участке Селекционного центра ФАНЦ Юго-Востока. Все метелки растений тщательно изолировали пергаментными изоляторами до начала цветения. Анализировали следующие признаки: «высота растения», «выдвинутость подметельчатого междоузлия», «масса 1000 зерен», «урожай

зерна с метелки». В каждом повторении определяли среднее значение признака для 10–15 растений.

Методы биологической статистики. Для оценки различий в перевариваемости белков *in vitro* исследуемых образцов выполняли дисперсионный анализ с использованием пакета программ AGROS, версия 2.09 (С.П. Мартынов, ИОГен РАН), и Теста множественных сравнений Дункана. Данные по проявлению селекционно-ценных признаков обрабатывали посредством однофакторного дисперсионного анализа с помощью программного пакета AGROS.

Результаты и обсуждение

Анализ ПЦР растений из поколений T₂–T₄ с праймерами к *ubil*-интрону, разделяющему инвертированные фрагменты гена *gKAF1* в векторе pNRKAFSIL, а также к *nos*-промотору, управляющему экспрессией гена *bar*, показал стабильность наследования генетической конструкции в процессе самоопыления. В поколении T₂ анализировали потомство четырех растений из поколения T₁, каждое из которых было ПЦР-положительным по обоим исследованным локусам (№ 1-3, 190-1, 190-2, 190-4), а также потомство растения № 190-3, которое было ПЦР-отрицательным по *ubil*-интрону, но ПЦР-положительным по гену *bar* (Elkonin et al., 2021).

Обнаружено, что все 12 растений T₂ из семьи T₁ № 1–3 и все 8 проанализированных растений T₂ из семьи T₁ № 190-4 были ПЦР-положительны по обоим исследованным локусам (табл. 1). В то же время в семьях T₂ – потомствах растений 190-1 и 190-2 – наблюдалось расщепление и присутствовали ПЦР-отрицательные по обоим локусам растения. В поколениях T₃ и T₄ ПЦР-отрицательных растений не зарегистрировано, что указывает на стабильность наследования введенной конструкции.

ПЦР-анализ гибридов растений T₁ с ЦМС-линиями показал возможность передачи введенной генетической конструкции через пыльцу. Примечательно, что среди гибридов F₁ с ЦМС-линией A2 KBB-114 обнаружено одно растение, ПЦР-положительное по *nos*-промотору, но ПЦР-отрицательное по *ubil*-интрону. Аналогичный случай выявлен нами ранее среди растений T₁ (Elkonin et al., 2021). Данные факты свидетельствуют, что в некоторых случаях могут иметь место нарушение целостности интегрированной T-ДНК и элиминация генетической конструкции для сайленсинга. Значительное преобладание ПЦР-положительных растений в T₂, а также среди гибридов F₁ свидетельствовало в пользу наличия нескольких несцепленных копий генетической конструкции у растений T₁.

Устойчивость к глюфосинату аммония. Для изучения характера расщепления по гену *bar* потомство ряда растений из поколений T₁–T₃ было высажено на питательную среду, содержащую глюфосинат аммония. В результате были выявлены растения, в потомстве которых наблюдалось расщепление 15:1 (№ 182-3), свидетельствовавшее о наличии двух копий генетической конструкции; моногенное расщепление 3:1 (№ 124-3; 124-3-9; 124-3-10), подтверждающее наличие у них одной копии конструкции; а также предполагаемые гомозиготы (№ 150-15, 124-3-3, 190-4) (табл. 2). С учетом того что растение 124-3-3 получено из потомства растения 124-3, которое расщепи-

Таблица 1. Наследование генетической конструкции для РНК-сайленсинга гена *gKAF1* в потомстве RNAi-мутанта зернового сорго Аванс-1/18 при самоопылении и в скрещиваниях с ЦМС-линиями

Растение T ₁	Потомство	<i>ubi1</i> -интрон			<i>nos</i> -промотор		
		Всего	ПЦР		Всего	ПЦР	
			«+»	«-»		«+»	«-»
Самоопыление							
1-3 (<i>ubi1+</i> ; <i>nos+</i>)	1-3/20 (T ₂)	12	12	–	12	12	–
	197/21 (T ₃)	6	6	–	–	–	–
	153/22 (T ₄)	7	7	–	–	–	–
190-1 (<i>ubi1+</i> ; <i>nos+</i>)	181/21 (T ₂)	19	18	1	19	18	1
190-2 (<i>ubi1+</i> ; <i>nos+</i>)	182/21 (T ₂)	15	12	3	15	12	3
	150/22 (T ₃)	14	14	–	–	–	–
190-3 (<i>ubi1-</i> ; <i>nos+</i>)	183/21 (T ₂)	–	–	–	3	–	3
190-4 (<i>ubi1+</i> ; <i>nos+</i>)	184/21 (T ₂)	8	8	–	8	8	–
	152/22 (T ₃)	11	11	–	–	–	–
Гибриды F ₁ с ЦМС-линиями							
A2 KBB-181/T ₁ 190-2		17	13	4	17	13	4
A2 O-1237/T ₁ 190-1		15	12	3	15	12	3
A2 KBB-114/T ₁ 190-1		18	16	2	18	17	1

Таблица 2. Расщепление по устойчивости к ГА в потомстве некоторых растений RNAi-мутанта сорта Аванс-1/18, несущего генетическую конструкцию для РНК-сайленсинга гена γ -кафирина сорго

Номер растения	Число растений в потомстве		Соотношение	χ^2	<i>p</i>	
	всего	устойчивых				чувствительных
Потомство растения T ₁ № 190-2 (<i>nos+</i>)						
124-3/21 (T ₂)	106	81	25	3:1	0.113	0.75 < <i>p</i> < 0.50
182-3/21 (T ₂)	110	101	9	15:1	0.701	0.50 < <i>p</i> < 0.25
150-15/22 (T ₃)	100	100	–	–	–	–
Потомство растения T ₂ № 124-3 (<i>nos+</i>)						
124-3-3 (T ₃)	35	35	–	–	–	–
124-3-9 (T ₃)	70	49	21	3:1	0.933	0.50 < <i>p</i> < 0.25
124-3-10 (T ₃)	29	21	6	3:1	0.111	0.75 < <i>p</i> < 0.50
Потомство растения T ₁ № 190-4 (<i>nos+</i>)						
190-4/21 (T ₁)	30	30	–	–	–	–
Потомство растения T ₁ № 190-3 (<i>nos-</i>)						
151-8/22 (T ₃)	30	–	30	–	–	–

лось как моногетерозигота (3:1), вполне очевидно, что у растения 124-3-3 генетическая конструкция для сайленсинга гена *gKAF1* представлена в виде одной копии, находящейся в гомозиготном состоянии. В потомстве 190-3 устойчивые растения полностью отсутствовали, как и у исходного сорта Аванс.

Текстура эндосперма. Анализ текстуры эндосперма в зерновках растений из разных поколений RNAi-мутанта сорта Аванс-1/18 показал сохранение модифицированного типа эндосперма (мучнистого или с вкраплениями стекловидного) (рис. 2), присущего зерновкам мутанта,

вплоть до поколения T₄. На метелках растений T₁ и T₂ вследствие их гетерозиготности наблюдалось расщепление 3:1 или 15:1 (модифицированный тип эндосперма: обычный стекловидный эндосперм), которое указывало на наличие одной или двух копий генетической конструкции (табл. 3). В поколениях T₃ и T₄ выщепление зерновок со стекловидным эндоспермом, как правило, отсутствовало, что свидетельствовало о гомозиготизации введенной генетической конструкции.

Обращает на себя внимание, что во многих зерновках присутствовал комбинированный тип эндосперма, при ко-



Рис. 2. Поперечные срезы зерновок сорго из потомства RNAi-мутанта сорта Аванс 1/18 (а, б) и исходной нетрансгенного сорта Аванс (в).

Заметны толстый слой стекловидного эндосперма в зерновке исходного сорта Аванс (в) и полное отсутствие стекловидного эндосперма (а) или размытый слой стекловидного эндосперма в зерновках трансгенных растений T_1 (б).

Таблица 3. Расщепление по типу эндосперма в зерновках некоторых растений из разных поколений RNAi-мутанта сорта Аванс-1/18

Номер растения, поколение	Число зерновок, тип эндосперма			Соотношение (модифицированный: обычный)	χ^2	p
	всего	мучнистый	с вкраплениями стекловидного			
№ 1 T_0 <i>ubi1+bar+</i>	18	13	5 (по периферии)	–	–	–
1-3, T_1 <i>ubi1+bar+</i>	7	7	–	–	–	–
1-6, T_1 <i>ubi1-bar-</i>	8	–	–	8	–	–
190-1, T_1 <i>ubi1+bar+</i>	72	58	–	14	3:1	1.185 0.50–0.25
190-2, T_1 <i>ubi1+bar+</i>	87	58	16	13	3:1	4.693 < 0.05
190-3 T_1 <i>ubi1-bar+</i>	16	–	–	16	–	–
190-4, T_1 <i>ubi1+bar+</i>	29	29	–	–	–	–
1-3-5, T_2 (от T_1 1-3) <i>ubi1+bar+</i>	8	8	–	–	–	–
1-3-10, T_2 (от T_1 1-3) <i>ubi1+bar+</i>	8	4	4 (по периферии)	–	–	–
181-II-5, T_2 (от T_1 190-1) <i>ubi1+bar+</i>	353	99	152	102	3:1	2.856 0.05–0.01
182-I-8, T_2 (от T_1 190-2) <i>ubi1+bar+</i>	70	55	11	4	15:1	0.034 0.90–0.75
182-II-3, T_2 (от T_1 190-2) <i>ubi1+bar+</i>	288	114	149	24	15:1	2.133 0.25–0.10
182-I-10, T_2 (от T_1 190-2) <i>ubi1+bar+</i>	267	149	118	–	Гомозигота	
184-I-8, T_2 (от T_2 190-4) <i>ubi1+bar+</i>	407	148	229	–	Гомозигота	
184-I-2, T_2 (от T_2 190-4) <i>ubi1+bar+</i>	70	52	18	–	Гомозигота	
150a-1, T_3 (от T_2 182-I-8) <i>ubi1+bar+</i>	93	26	17+50 (по периферии)	7	15:1	0.096 0.90–0.75
150a-12, T_3 (от T_2 182-I-8) <i>ubi1+bar+</i>	100	16	26+58 (по периферии)	–	Гомозигота	
150a-15, T_3 (от T_2 182-I-8) <i>ubi1+bar+</i>	100	26	52+22 (по периферии)	–	Гомозигота	
152a-10, T_3 (от T_2 184-I-8) <i>ubi1+bar+</i>	101	33	19+49 (по периферии)	–	Гомозигота	
197-6, T_3 (от T_2 1-3-5) <i>ubi1+bar+</i>	311	166	116+29 (по периферии)	–	Гомозигота	
153a-6, T_4 (от T_3 197-6) <i>ubi1+bar+</i>	100	33	9+58 (по периферии)	–	Гомозигота	
153a-4, T_4 (от T_3 197-6) <i>ubi1+bar+</i>	100	35	13+52 (по периферии)	–	Гомозигота	

тором в мучнистом эндосперме наблюдалось вкрапление секторов стекловидного эндосперма либо стекловидный эндосперм формировался в виде тонкого, нередко «размытого» периферийного слоя (см. рис. 2). Формирование таких типов эндосперма не зависело от числа копий кон-

струкции (см. ниже) и, возможно, отражало особенности ее экспрессии в условиях внешней среды, изменяющихся в ходе созревания зерновок.

Подобные «комбинированные» типы эндосперма описаны ранее в работах по введению генетических конструк-

ций для сайленсинга кафиринов (da Silva, 2012; Elkonin et al., 2016b), а также у рекомбинантных линий, полученных путем гибридизации мутанта P721Q, характеризовавшегося высокой перевариваемостью кафиринов и мучнистым типом эндосперма, с обычными линиями сорго с низкой перевариваемостью кафиринов и стекловидным типом эндосперма (Tesso et al., 2006). С учетом того что мучнистый тип эндосперма сопровождается рядом негативных агрономических признаков (Duressa et al., 2018), линии, сочетающие такие комбинированные типы эндосперма и улучшенную перевариваемость, имеют более высокую селекционную ценность.

Анализ числа копий конструкции. Для уточнения числа копий конструкции для сайленсинга у растений T_3 и T_4 был проведен количественный ПЦР-анализ с праймерами к *nos*-промотору, при этом в качестве референсного контроля брали собственный ген сорго *APRT*, который использовали ранее в экспериментах по выявлению числа копий трансгенов у разных видов растений, в том числе у сорго (Casu et al., 2012; Wang et al., 2021). Кроме того, число копий введенной генетической конструкции рассчитывали также при применении в качестве референсного контроля ДНК растения № 124-3-9 (T_4), расщеплявшегося как моногетерозигота (3:1) (см. табл. 2).

Обнаружено, что у растений, у которых по результатам анализа расщепления по устойчивости к глюфосинату аммония предполагалось наличие одной копии генетической конструкции, показатель копийности, по данным qPCR, был наиболее низким (0.6...0.9, в среднем 0.76 ± 0.06) (табл. 4). В то же время у растения № 124-3-3 – предполагаемой гомозиготы с двумя копиями генетической конструкции – показатель копийности, по данным qPCR, был в 2 раза выше (1.4 ± 0.2). Эти данные показывают, что проведенный нами qPCR-анализ достаточно точно отражает копийность анализируемой конструкции, и результаты, полученные с его использованием, заслуживают доверия.

Проведенный анализ выявил варьирование числа копий конструкции для сайленсинга у разных растений T_3 . Так, у растения № 150a-15 из семьи T_1 190-2 присутствовало две копии конструкции (см. табл. 2). С учетом отсутствия расщепления по устойчивости к ГА и типу эндосперма у формирующихся на нем зерновок (см. табл. 4) очевидно, что оно представляет собой моногомозиготу. В то же время у растения № 150a-12 уровень копийности был значительно выше, что указывало на наличие трех-четырёх копий генетической конструкции. Наличие индивидуумов с двумя и четырьмя копиями конструкции из потомства одного и того же растения, T_1 , указывает на наличие у него двух независимых инсерций Т-ДНК. Данное предположение подтверждается дигибридным характером расщепления (15:1) по устойчивости к ГА и типу эндосперма в потомстве некоторых растений из семьи 190-2.

Таким образом, данные классической генетики и qPCR достаточно точно согласуются между собой и свидетельствуют о наличии минимум двух независимых копий генетической конструкции для РНК-сайленсинга у трансгенного растения T_0 . Обращает на себя внимание высокий уровень копийности у растений из семей T_1 190-4 и T_1 1-3 (поколения T_3 и T_4). Так, индивидуумы из потом-

Таблица 4. Число копий генетической конструкции для сайленсинга гена *gKAF1* у разных растений из поколений T_3 и T_4 по результатам qPCR-анализа

Трансгенное растение	Копийность по отношению	
	к <i>APRT</i>	к <i>nos</i> -промотору ¹
Потомство растения T_1 190-2		
124-3-9 T_4 , моногетерозигота	0.8 ± 0.0	–
124-3-10 T_4 , моногетерозигота	0.9 ± 0.2	1.1 ± 0.3
124-3-4 T_4 , моногетерозигота	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.2
124-3-8 T_4 , моногетерозигота	0.6 ± 0.0	0.8 ± 0.1
В среднем по моногетерозиготам	0.76 ± 0.06	
124-3-3 T_4 , моногомозигота	1.4 ± 0.2	2.1 ± 0.2
150a-4 T_3	2.3 ± 0.1	2.9 ± 0.2
150a-12 T_3	2.9 ± 0.5	3.6 ± 0.7
150a-15 T_3	1.5 ± 0.1	1.9 ± 0.1
Потомство растения T_1 190-4		
156-2 T_2	4.0 ± 0.5	5.1 ± 0.7
152a-3 T_3	4.1 ± 0.2	5.1 ± 0.4
152a-10 T_3	4.2 ± 0.3	5.3 ± 0.5
152a-14 T_3	3.3 ± 0.3	4.1 ± 0.5
Потомство растения T_1 1-3		
153a-4 T_4	4.0 ± 0.2	5.0 ± 0.4
153a-6 T_4	2.9 ± 0.2	3.7 ± 0.3
153a-3 T_4	3.3 ± 0.3	4.1 ± 0.4
153b-2 T_4	3.5 ± 0.7	4.4 ± 0.9
153b-1 T_4	2.0 ± 0.1	2.6 ± 0.2
159-5 нетрансгенный сегрегант	0.02 ± 0.0	0.03 ± 0.0
Аванс, исходный сорт	0.03 ± 0.0	0.04 ± 0.0

¹ Копийность рассчитывали по отношению к ДНК моногетерозиготы, № 124-3-9 (T_4).

ства растения T_1 190-4 несли минимум по четыре копии генетической конструкции. Эти факты свидетельствуют, что родительское растение T_0 могло нести минимум две независимые копии Т-ДНК, что, возможно, обусловило достаточно высокий фенотипический эффект введенной генетической конструкции.

Перевариваемость белков муки. Оценка перевариваемости белков муки, полученной из цельнозерновых семян, завязавшихся на растениях T_1 и T_2 , показала наследование высокого уровня перевариваемости, выявленного у растений поколений T_0 , хотя показатели у большинства растений T_2 были несколько ниже значений этого признака в T_1 . Растения, выращенные при искусственном поливе в период созревания зерна (2 раза по 7–8 л/м²), имели более высокую перевариваемость по сравнению с растениями, выращенными в отсутствие дополнительного полива (табл. 5). По-видимому, условия более высокой

Таблица 5. Перевариваемость белков зерна у растений из потомства мутанта Аванс-1/18 сорго, несущего генетическую конструкцию для РНК-сайленсинга гена *gKAF1*

Растение	Наличие полива ¹	Тип эндосперма	Перевариваемость, %	Содержание белка, %
T₁				
190-1 <i>ubi1+bar+</i>	+	Мучнистый	–	12.8 a
190-3 <i>ubi1–bar+</i>	+	Стекловидный	75.3 b	14.5 b
190-4 <i>ubi1+bar+</i>	+	Мучнистый	92.2 c	14.3 b
Аванс (контроль)	+	Стекловидный	52.3 a	15.5 c
<i>F</i>			558.946*	51.97*
<i>HCP</i> ₀₅			5.1	0.69
T₂ (от T₁ 190-4)				
184-I-8	+	Мучнистый	79.8 h	9.16 a
		С вкраплениями стекловидного	81.0 hi	
184-I-7	+	Мучнистый розовый	62.4 a	–
184-I-2	+	Мучнистый	75.0 efgh	11.13 de
116-4	–		71.0 bcde	–
116-5	–		72.2 def	9.36 a
182-I-8	+		76.1 efgh	11.63 ef
182-II-3	+	Мучнистый	79.3 h	–
		С вкраплениями стекловидного	77.6 gh	–
		Стекловидный	71.4 cdef	–
T₂ (от T₁ 190-2)				
124-3	–	Мучнистый	63.6 a	13.22 h
		Стекловидный	64.4 a	
T₃ (от T₁ 1-3)				
197-5	+	Мучнистый	80.3 h	11.88 f
197-6	+		78.8 gh	12.78 gh
Аванс (контроль)	+	Стекловидный	59.3 a	11.09 de
<i>F</i>			16.988**	37.257*
<i>HCP</i> ₀₅			5.735	0.618

¹ Дополнительный полив: 2 раза по 8 л/м² в период созревания зерна. Данные, обозначенные разными буквами, значимо различаются при * $p < 0.05$ и ** $p < 0.01$ в соответствии с Тестом множественных сравнений Дункана.

влагообеспеченности способствуют более эффективной экспрессии введенной генетической конструкции для сайленсинга. Зерновки с мучнистым типом эндосперма и эндоспермом, содержащим вкрапления стекловидного эндосперма, имели одинаковый уровень перевариваемости (рис. 3). В то же время зерновки со стекловидным типом эндосперма имели более низкую перевариваемость по сравнению с зерновками с мутантным типом эндосперма (мучнистым или с вкраплениями стекловидного).

Примечательно, что у растения 184-I-7 обнаружен необычный эндосперм мучнистого типа с розовой окраской, вызванной, возможно, веществами полифенольной природы, в норме обуславливающими окраску стекловидного слоя эндосперма в зерновках Аванса. Аналогичную окраску имела и мука, полученная от этого же растения. Перевариваемость белков у такой муки была несколько ниже, чем у муки из других растений, возможно, из-за ингибирования действия пепсина полифенолами.

Содержание белка в зерне у растений T₁ снизилось на 7.5–17.3 % по сравнению с исходным сортом Аванс: 12.8–14.3 % против 15.5 %, при этом процентное содержание лизина в зерновках растения № 190-4 возросло на 75 % (см. Приложение)¹, что, возможно, стало следствием балансировки синтеза белка в зерновках трансгенных растений и появления белков, более насыщенных лизином, по сравнению с γ -кафирином. Такая балансировка уровня белка описана ранее у многих RNAi-мутантов злаков с конструкциями для подавления синтеза проламинов (Elkonin et al., 2016a). Содержание белка в зерне разных растений T₂ варьировало от 9.2 до 12.8 % и у большинства изученных растений значимо не отличалось от исходного сорта Аванс (11.1 %). У двух растений из семьи № 190-4 (184-I-8 и 116-5), имеющих, очевидно, две копии генетической конструкции, количество белка было значимо

¹ Приложение см. по адресу:
<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2024-28/appx3.pdf>

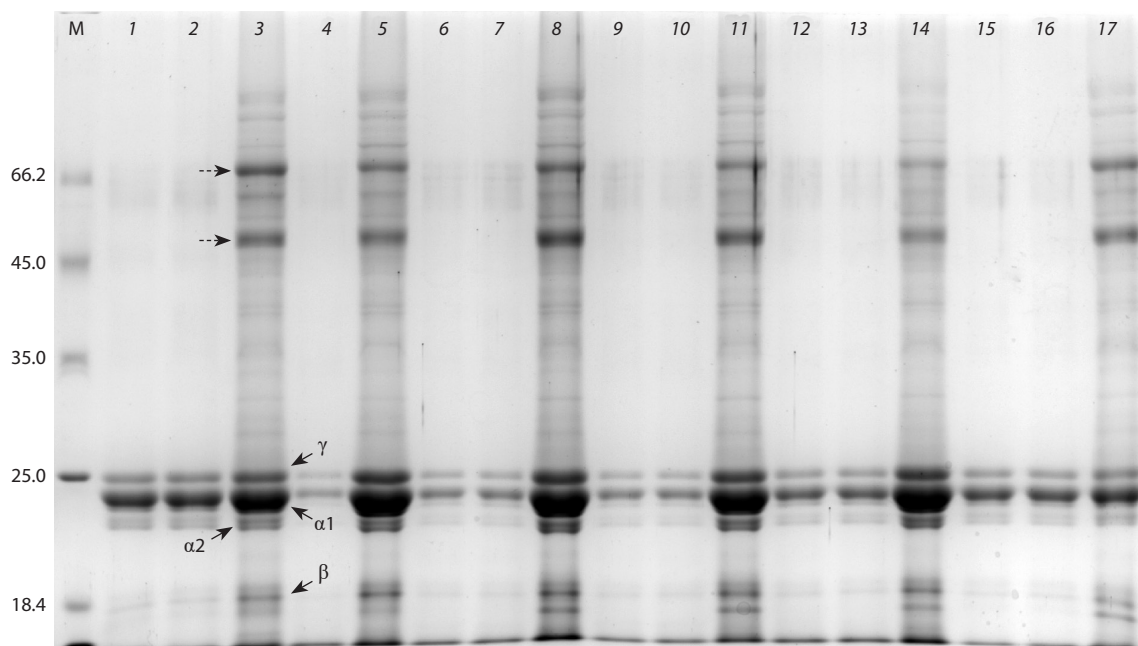


Рис. 3. SDS-электрофорез в ПААГ белков зерна исходного сорта Аванс и растений мутанта Аванс-1/18 после обработки пепсином.

1–3, 15–17 – исходный сорт Аванс; 4, 5 – T_1 190-4; 6–11 – T_2 184-1-8 (потомство 190-4); 6–8 – зерновки с мучнистым эндоспермом; 9–11 – зерновки с мучнистым эндоспермом с вкраплениями стекловидного эндосперма; 12–14 – T_2 184-1-7 (потомство 190-4) – зерновки с розовым мучнистым эндоспермом. 1, 2, 4, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16 – после обработки муки пепсином; 3, 5, 8, 11, 14, 17 – без обработки пепсином (контроль). Позиции разных классов кафиринов отмечены стрелками. Пунктирными стрелками отмечены белки, относящиеся к фракции глобулинов.

Таблица 6. Проявление некоторых селекционно-ценных признаков в потомстве мутанта Аванс-1/18

Семья	Высота растения, см	Выдвинутость подметельчатого междоузлия, см	Масса 1000, г	Урожай зерна с метелки, г
Аванс	104.6 с	12.0 b	32.5 с	32.2 с
T_3 150 (от T_1 190-2) <i>ubi1</i> ⁺	91.6 ab	7.4 a	29.7 abc	24.6 a
T_3 151 (от T_1 190-3) <i>ubi1</i> ⁻	91.0 ab	7.4 a	31.8 bc	27.1 ab
T_3 152 (от T_1 190-4) <i>ubi1</i> ⁺	86.6 a	5.1 a	28.0 a	22.2 a
T_4 153 (от T_1 1-3) <i>ubi1</i> ⁺	97.9 bc	7.4 a	29.1 ab	26.0 b
<i>F</i>	10.764*	10.848*	3.446*	12.051*
HCP ₀₅	7.0	2.5	3.0	2.9

¹ Наличие конструкции для сайленсинга гена *gKAF1* (по результатам ПЦР-анализа с праймерами на *ubi1*-интрон). Представлены средние от трех повторений. Данные, обозначенные разными буквами, значительно различаются при * $p < 0.05$ в соответствии с Тестом множественных сравнений Дункана.

ниже (9.2–9.4 %). Однако вопрос о влиянии числа копий конструкции для сайленсинга гена *gKAF1* на содержание белка в зерне требует дальнейших уточнений.

Анализ селекционно-ценных признаков. При выращивании растений T_1 на опытной делянке в полевых условиях в 2020 г. обнаружено, что эти растения отличаются сниженной высотой по сравнению с исходным сортом Аванс: 82.3 ± 1.7 и 100.8 ± 3.4 см соответственно ($p < 0.01$). Эти различия сохранились у растений поколения T_2 : 81.5–91.6 см в среднем для разных семей T_2 в сравнении с 104.1 см у исходного сорта ($p < 0.05$) (данные 2021 г.). В связи с этим для более детального исследования проявления основных селекционно-ценных признаков у

полученного мутанта поколение T_3 (потомство трех растений T_1 № 190-2, 190-3, 190-4, выращенных на опытной делянке), а также поколение T_4 (потомство растения T_1 № 1-3 из теплицы) выращивали в 2022 г. на опытной делянке в полевых условиях в 3-кратной повторности.

Обнаружено, что все изученные линии трансгенного происхождения, полученные на основе одного родительского мутантного растения T_0 , отличаются от исходного сорта Аванс пониженной высотой растения, укороченным подметельчатым междоузлем и более низким урожаем зерна с метелки (табл. 6). Такое снижение проявления этих признаков нами описано впервые у мутантов злаков, несущих конструкции для индукции РНК-сайленсинга ге-

нов проламинов. Однако оно вряд ли является следствием нецелевой экспрессии введенной нами генетической конструкции, поскольку у линии № 151 (потомство растения 190-3) эта конструкция элиминировалась, тогда как низкорослость и укороченность цветоножки сохранились. Такое изменение высоты растений и длины цветоножки может быть следствием как нецелевых эффектов экспрессии генетической конструкции для РНК-сайленсинга, которые хорошо известны и описаны в литературе (Jackson et al., 2003; Senthil-Kumar, Mysore, 2011), так и инсерционного мутагенеза в результате инсерции Т-ДНК в один из локусов, контролирующих высоту растений и длину цветоножки.

Подобные факты индукции мутаций в генах, кодирующих разные признаки растений, в результате инсерции Т-ДНК широко известны (Wilson et al., 2006; Deineko et al., 2007; Ram et al., 2019). В большинстве случаев такие инсерции ведут к делециям растительной ДНК, нарушающим функциональную активность генов. Ранее мутации низкорослости, в том числе в локусе, контролирующем синтез гиббереллина, участвующем в регуляции высоты растений, обусловленные инсерцией Т-ДНК, описаны у арабидопсиса (Feldmann et al., 1989; Chiang et al., 1995). По сорго сообщений о получении мутантов, индуцированных инсерцией Т-ДНК, в доступной литературе найти не удалось.

Масса 1000 зерен оказалась значимо снижена у двух линий, несущих конструкцию для РНК-сайленсинга (№ 152, 153). Очевидно, что такое снижение массы 1000 зерен – следствие модификации типа эндосперма, поскольку в рыхлом мучнистом эндосперме между крахмальными гранулами присутствуют воздушные полости. Примечательно, что у линии № 151 (потомство растения 190-3), у которой зерновки вследствие элиминации конструкции для РНК-сайленсинга имели обычный тип эндосперма с толстым стекловидным слоем, по этому признаку не было значимых отличий от исходного сорта Аванс. Отсутствие значимых различий между исходным сортом и линией № 150 также, возможно, объясняется наличием у этой линии гетерозиготных растений, на метелках которых присутствуют зерновки со стекловидным эндоспермом (см. табл. 3). Таким образом, снижение массы 1000 зерен – прямое следствие экспрессии конструкции для РНК-сайленсинга гена *gKAF1*. Аналогичное снижение массы 1000 зерен описано у RNAi-мутантов сорго, полученных у африканского сорта P898012, несущих генетическую конструкцию для РНК-сайленсинга двух генов γ -кафиринов, 27 и 50 кДа (Ndimba et al., 2017).

Такое снижение массы зерен не могло не вызвать снижения урожая зерна с метелки, которое наблюдалось у всех полученных нами трансгенных линий, и в связи с этим изменение данного признака также является следствием экспрессии введенной генетической конструкции. Вместе с тем падение урожая зерна может быть обусловлено также сниженной мощностью развития растений в результате инсерции Т-ДНК в один из локусов, контролирующих высоту растения, поскольку этот признак оказался также снижен у линии № 151, у которой конструкция для сайленсинга элиминировалась. Снижение урожая зерна

с метелки также может быть следствием инсерционного мутагенеза, индуцированного Т-ДНК.

Необходимо отметить, что наличие нескольких не сцепленных между собой копий генетической конструкции, интегрированных, по-видимому, в разные области генома, которые в силу эффекта положения генов могут различаться по влиянию на фенотипические признаки растений, открывает возможность для отбора линий, сочетающих улучшенную перевариваемость белков с нужным проявлением селекционно-ценных признаков. Так, обнаружена линия (№ 153, T₄ от T₁ 1-3), у которой высота растений и урожайность снижены на 5–6 %, тогда как уровень перевариваемости белков достигал 81 % (см. табл. 5). Данная линия в этом отношении может представлять более высокий интерес для практической селекции.

Заключение

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что генетическая конструкция для сайленсинга гена γ -кафирина сорго (*gKAF1*) представлена в геноме разных растений RNAi-мутанта Аванс-1/18 из поколений T₃ и T₄ в количестве 2–4 копий, которые, по-видимому, являются следствием двух независимых событий интеграции Т-ДНК. Эта конструкция стабильно наследуется и экспрессируется в поколениях T₃ и T₄, модифицируя текстуру эндосперма, улучшая перевариваемость белков зерна (до 81 % в сравнении с 52–59 % у исходного сорта) и повышая процентное содержание лизина (на 75 %). Вместе с тем зарегистрированы случаи нарушения целостности интегрированной Т-ДНК и элиминации генетической конструкции для сайленсинга. Трансгенные растения RNAi-мутанта сорта Аванс-1/18 характеризуются сниженной высотой растений, укороченным подметельчатым междоузлем, сниженной массой 1000 зерен и массой зерна с метелки. Отобрана линия (T₃) с высокой перевариваемостью белков эндосперма (81 %) и минимальным снижением селекционно-ценных признаков (на 5–7 %).

Список литературы / References

- Журавлев В.С., Долгих В.В., Тимофеев С.А., Ганнибал Ф.Б. Метод РНК-интерференции в защите растений от насекомых-вредителей. *Вестн. защиты растений*. 2022;105(1):28-39. DOI 10.31993/2308-6459-2022-105-1-15219
- [Zhuravlyov V.S., Dolgikh V.V., Timofeev S.A., Gannibal F.B. RNA interference method in plant protection against insect pests. *Vestnik Zashchity Rastenij = Plant Protection News*. 2022;105(1):28-39. DOI 10.31993/2308-6459-2022-105-1-15219 (in Russian)]
- Aboubacar A., Axtell J.D., Huang C.P., Hamaker B.R. A rapid protein digestibility assay for identifying highly digestible sorghum lines. *Cereal Chem*. 2001;78(2):160-165. DOI 10.1094/CCHEM.2001.78.2.160
- Bharathi J.K., Anandan R., Benjamin L.K., Muneer S., Prakash M.A.S. Recent trends and advances of RNA interference (RNAi) to improve agricultural crops and enhance their resilience to biotic and abiotic stresses. *Plant Physiol. Biochem*. 2023;194:600-618. DOI 10.1016/j.plaphy.2022.11.035
- Borisenko N., Elkonin L., Kenzhegulov O. Inheritance of the genetic construct for RNA-silencing of the γ -kafirin gene (*gKAF1*) in the progeny of transgenic sorghum plants. *BIO Web Conf*. 2022;43: 03015. DOI 10.1051/bioconf/20224303015
- Casu R.E., Selivanova A., Perroux J.M. High-throughput assessment of transgene copy number in sugarcane using real-time quantitative

- PCR. *Plant Cell Rep.* 2012;31(1):167-177. DOI 10.1007/s00299-011-1150-7
- Chiang H.H., Hwang I., Goodman H.M. Isolation of the *Arabidopsis* *GA4* locus. *Plant Cell.* 1995;7(2):195-201. DOI 10.1105/tpc.7.2.195
- da Silva L.S. Transgenic sorghum: Effects of altered kafirin synthesis on kafirin polymerisation, protein quality, protein body structure and endosperm texture. Thesis. Pretoria: University of Pretoria South Africa, 2012
- da Silva L.S., Taylor J., Taylor J.R.N. Transgenic sorghum with altered kafirin synthesis: kafirin solubility, polymerization, and protein digestion. *J. Agric. Food Chem.* 2011a;59(17):9265-9270. DOI 10.1021/jf201878p
- da Silva L.S., Jung R., Zhao Z., Glassman K., Grootboom A.W., Mehlo L., O'Kennedy M.M., Taylor J., Taylor J.R.N. Effect of suppressing the synthesis of different kafirin subclasses on grain endosperm texture, protein body structure and protein nutritional quality in improved sorghum lines. *J. Cereal Sci.* 2011b;54(1):160-167. DOI 10.1016/j.jcs.2011.04.009
- Deineko E.V., Zagorskaya A.A., Shumny V.K. T-DNA-induced mutations in transgenic plants. *Russ. J. Genet.* 2007;43(1):1-11. DOI 10.1134/S1022795407010012
- de Mesa-Stonestreet N.J., Alavi S., Bean S.R. Sorghum proteins: the concentration, isolation, modification, and food applications of kafirins. *J. Food Sci.* 2010;75(5):90-104. DOI 10.1111/j.1750-3841.2010.01623.x
- Duressa D., Weerasoriya D., Bean S.R., Tilley M., Tesso T. Genetic basis of protein digestibility in grain sorghum. *Crop Sci.* 2018;58(6): 2183-2199. DOI 10.2135/cropsci2018.01.0038
- Elkonin L.A., Italianskaya J.V., Fadeeva I.Yu., Bychkova V.V., Kozhemyakin V.V. *In vitro* protein digestibility in grain sorghum: effect of genotype and interaction with starch digestibility. *Euphytica.* 2013; 193:327-337. DOI 10.1007/s10681-013-0920-4
- Elkonin L.A., Domanina I.V., Ital'yanskaya Yu.V. Genetic engineering as a tool for modification of seed storage proteins and improvement of nutritional value of cereal grain. *Agricult. Biol.* 2016a;51(1): 17-30. DOI 10.15389/agrobiol.2016.1.17eng
- Elkonin L.A., Italianskaya J.V., Domanina I.V., Selivanov N.Y., Rakin A.L., Ravin N.V. Transgenic sorghum with improved digestibility of storage proteins obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Russ. J. Plant Physiol.* 2016b;63(5):678-689. DOI 10.1134/S1021443716050046
- Elkonin L.A., Panin V.M., Kenzhegulov O.A., Sarsenova S.Kh. RNAi-mutants of *Sorghum bicolor* (L.) Moench with improved digestibility of seed storage proteins. In: Jimenez-Lopez J.C. (Ed.). Grain and Seed Proteins Functionality. London: Intech Open Ltd., 2021;1-17. DOI 10.5772/intechopen.96204
- Feldmann K.A., Marks M.D., Christianson M.L., Quatrano R.S. A Dwarf mutant of *Arabidopsis* generated by T-DNA insertion mutagenesis. *Science.* 1989;243(4896):1351-1354. DOI 10.1126/science.243.4896.1351
- Grootboom A.W., Mkhonza N.L., Mbambo Z., O'Kennedy M.M., da Silva L.S., Taylor J., Taylor J.R.N., Chikwamba R., Mehlo L. Co-suppression of synthesis of major α -kafirin sub-class together with γ -kafirin-1 and γ -kafirin-2 required for substantially improved protein digestibility in transgenic sorghum. *Plant Cell Rep.* 2014; 33(3):521-537. DOI 10.1007/s00299-013-1556-5
- Guo Q., Liu Q., Smith N.A., Liang G., Wang M.B. RNA silencing in plants: mechanisms, technologies and applications in horticultural crops. *Curr. Genomics.* 2016;17(6):476-489. DOI 10.2174/1389202917666160520103117
- Jackson A.L., Bartz S.R., Schelter J., Kobayashi S.V., Burchard J., Mao M., Li B., Cavet G., Linsley P.S. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat. Biotechnol.* 2003;21(6): 635-638. DOI 10.1038/nbt831
- Kumar T., Dweikat I., Sato S., Ge Z., Nersesian N., Chen H., Elthon T., Bean S., Ioerger B.P., Tilley M., Clemente T. Modulation of kernel storage proteins in grain sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Plant Biotechnol. J.* 2012;10:533-544. DOI 10.1111/j.1467-7652.2012.00685.x
- Muhammad T., Zhang F., Zhang Y., Liang Y. RNA interference: a natural immune system of plants to counteract biotic stressors. *Cells.* 2019;8(1):38. DOI 10.3390/cells8010038
- Ndimba R.J., Kruger J., Mehlo L., Barnabas A., Kossmann J., Ndimba B.K. A comparative study of selected physical and biochemical traits of wild-type and transgenic sorghum to reveal differences relevant to grain quality. *Front. Plant Sci.* 2017;8:952. DOI 10.3389/fpls.2017.00952
- Nunes A., Correia I., Barros A., Delgadillo I. Sequential *in vitro* pepsin digestion of uncooked and cooked sorghum and maize samples. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52(7):2052-2058. DOI 10.1021/jf0348830
- Oria M.P., Hamaker B.R., Axtell J.D., Huang C.P. A highly digestible sorghum mutant cultivar exhibits a unique folded structure of endosperm protein bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000;97(10): 5065-5070. DOI 10.1073/pnas.080076297
- Ram H., Soni P., Salvi P., Gandass N., Sharma A., Kaur A., Sharma T.R. Insertional mutagenesis approaches and their use in rice for functional genomics. *Plants.* 2019;8(9):310. DOI 10.3390/plants8090310
- Senthil-Kumar M., Mysore K.S. Caveat of RNAi in plants: the off-target effect. *Methods Mol. Biol.* 2011;744:13-25. DOI 10.1007/978-1-61779-123-9_2
- Smith N.A., Singh S.P., Wang M.-B., Stoutjesdijk P., Green A., Waterhouse P.M. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature.* 2000;407(6802):319-320. DOI 10.1038/35030305
- Tesso T., Ejeta G., Chandrashekar A., Huang C.P., Tandjung A., Lewamy M., Axtell J., Hamaker B.R. A novel modified endosperm texture in a mutant high-protein digestibility/high-lysine grain sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Cereal Chem.* 2006;83(2):194-201. DOI 10.1094/CC-83-0194
- Wang L., Gao L., Liu G., Meng R., Liu Y., Li J. An efficient sorghum transformation system using embryogenic calli derived from mature seeds. *PeerJ.* 2021;9:e11849. DOI 10.7717/peerj.11849
- Wilson A.K., Latham J.R., Steinbrecher R.A. Transformation-induced mutations in transgenic plants: Analysis and biosafety implications. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 2006;23:209-238. DOI 10.1080/02648725.2006.10648085
- Wong J.H., Lau T., Cai N., Singh J., Pedersen J.F., Vensel W.H., Hurkman W.J., Wilson J.D., Lemaux P.G., Buchanan B.B. Digestibility of protein and starch from sorghum (*Sorghum bicolor*) is linked to biochemical and structural features of grain endosperm. *J. Cereal Sci.* 2009;49(1):73-82. DOI 10.1016/j.jcs.2008.07.013

ORCID

L.A. Elkonin orcid.org/0000-0003-3806-5697
N.V. Borisenko orcid.org/0000-0003-3543-9083
T.E. Pylaev orcid.org/0000-0002-2701-3333

O.A. Kenzhegulov orcid.org/0000-0002-1272-3105
S.Kh. Sarsenova orcid.org/0009-0007-2471-1631
N.Yu. Selivanov orcid.org/0000-0002-7438-0013
V.M. Panin orcid.org/0009-0007-2851-415X

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке бюджетной темы Федерального аграрного научного центра Юго-Востока FNWF-2023-0006 и государственного задания Минобрнауки России для Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр РАН», тема № 121031700141-7. ВЭЖХ-анализ аминокислотного состава белков муки проводили с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Симбиоз» ИБФРМ РАН, г. Саратов. qPCR-анализ копияности генетической конструкции выполнен на базе научно-производственного и образовательного центра молекулярно-генетических и клеточных технологий Саратовского ГМУ им. В.И. Разумовского.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 16.08.2023. После доработки 25.09.2023. Принята к публикации 13.10.2023.

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

Halo-RPD: в поисках мишеней РНК-связывающих белков растений

А.О. Шамустакимова

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия
✉ nastja_sham@mail.ru

Аннотация. Изучение РНК-белковых взаимодействий и идентификация РНК-мишеней относятся к важнейшим аспектам понимания биологии РНК. К настоящему времени предложены различные методы изучения таких взаимодействий; одним из широко распространенных является иммунопреципитация РНК (RIP). Большинство работ по поиску РНК-мишеней было проведено с использованием антител непосредственно на эндогенный белок или же на GFP, слитый с целевым белком. Зависимость от уровня экспрессии целевого белка и подбор специфичных антител значительно затрудняют классическую иммунопреципитацию. Белок же, слитый с GFP, нередко может быть цитотоксичен, что в дальнейшем приведет к его неправильному узнаванию и/или деградации. В последние годы был разработан ряд мультифункциональных тагов, включая SNAP-tag и HaloTag. Такие таги способствуют изучению целевых белков с разных сторон. Для них созданы флуоресцентные красители, способные прочно связываться с определенным участком тага. Это позволяет как изучать наработку химерного белка, так и определять его локализацию непосредственно в клетке или во всем организме. Для таких тагов разработаны также высокоаффинные субстраты, ковалентно связывающие химерные белки, что значительно сокращает потери в ходе выделення. В данной работе представлен метод, основанный на системе HaloTag, который мы назвали Halo-RPD (HaloTag RNA PullDown). В протоколе используются растения со стабильной экспрессией химерного белка и магнитные шарики Magne® HaloTag® Beads для захвата РНК-белковых комплексов непосредственно из цитоплазматического лизата трансгенных растений *Arabidopsis thaliana*. Приводится описание основных этапов: 1) подготовка магнитных шариков; 2) гомогенизация тканей и отбор контролей; 3) осаждение и отмывка РНК-белковых комплексов; 4) определение эффективности связывания белка; 5) выделение РНК; 6) анализ полученной РНК. Даны рекомендации для планирования эксперимента по высокопроизводительному секвенированию. Ключевые слова: *A. thaliana*; HaloTag; РНК-связывающие белки; соосаждение; РНК; РНК-белковые комплексы; белок с доменом холодного шока.

Для цитирования: Шамустакимова А.О. Halo-RPD: в поисках мишеней РНК-связывающих белков растений. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(1):74-79. DOI 10.18699/vjgb-24-09

Halo-RPD: searching for RNA-binding protein targets in plants

А.О. Shamustakimova

All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia
✉ nastja_sham@mail.ru

Abstract. Study of RNA-protein interactions and identification of RNA targets are among the key aspects of understanding RNA biology. Currently, various methods are available to investigate these interactions with, RNA immunoprecipitation (RIP) being the most common. The search for RNA targets has largely been conducted using antibodies to an endogenous protein or to GFP-tag directly. Having to be dependent on the expression level of the target protein and having to spend time selecting highly specific antibodies make immunoprecipitation complicated. Expression of the GFP-fused protein can lead to cytotoxicity and, consequently, to improper recognition or degradation of the chimeric protein. Over the past few years, multifunctional tags have been developed. SNAP-tag and HaloTag allow the target protein to be studied from different perspectives. Labeling of the fusion protein with custom-made fluorescent dyes makes it possible to study protein expression and to localize it in the cell or the whole organism. A high-affinity substrate has been created to allow covalent binding by chimeric proteins, minimizing protein loss during protein isolation. In this paper, a HaloTag-based method, which we called Halo-RPD (HaloTag RNA PullDown), is presented. The proposed protocol uses plants with stable fusion protein expression and Magne® HaloTag® magnetic beads to capture RNA-protein complexes directly from the cytoplasmic lysate of transgenic *Arabidopsis thaliana* plants. The key stages described in the paper are as follows: (1) preparation of the magnetic beads; (2) tissue homogenization and collection of control samples; (3) precipitation and wash of RNA-protein complexes; (4) evaluation of protein binding efficiency; (5) RNA isolation; (6) analysis of the RNA obtained. Recommendations for better NGS assay designs are provided. Key words: *A. thaliana*; HaloTag; RNA-binding proteins; RNA pulldown assay; RNA-protein complexes; cold-shock domain protein.

For citation: Shamustakimova A.O. Halo-RPD: searching for RNA-binding protein targets in plants. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(1):74-79. DOI 10.18699/vjgb-24-09

Введение

РНК-связывающие белки играют важную роль в сложных клеточных процессах, таких как дифференцировка, развитие, ответ на биотический и абиотический стрессы и посттранскрипционный контроль. За последние годы спектр методов исследования РНК-белковых взаимодействий значительно расширился (Ramanathan et al., 2019). Одна из ранних и распространенных на данный момент технологий изучения такого взаимодействия была названа РНК-иммунопреципитацией (RIP) (Brooks, Rigby, 2000). В основе метода лежит картирование *in vivo* РНК-белковых взаимодействий в присутствии сшивающего агента, такого как УФ или формальдегид. Большинство работ по исследованию РНК-белковых комплексов растений выполнено при помощи RIP (Köster, Meyer, 2018; Frydrych Capelari et al., 2019; Seo, Chua, 2019; Steffen et al., 2019).

Несмотря на широкое применение, технология RIP имеет ряд недостатков: УФ-излучение создает необратимую ковалентную связь между белком и РНК; формальдегид связывает не только интересующий белок с РНК, но и его белковые партнеры; для успешного эксперимента необходимы высокоспецифичные антитела.

В настоящем протоколе в качестве альтернативы RIP представлен метод, основанный на использовании химерных белков, слитых с HaloTag (Los et al., 2008). Первоначально система HaloTag была разработана и успешно применена для осаждения белок-белковых и ДНК-белковых комплексов из лизата клеток бактерий и млекопитающих (Urh et al., 2008). В последние несколько лет методика была адаптирована (van Dijk et al., 2015; Banks et al., 2016; Li et al., 2020) и модифицирована (Gu et al., 2018) для идентификации РНК-белковых комплексов в клетках тканей животных и человека.

Существует всего две работы о поиске белковых партнеров в растениях с применением системы HaloTag (Santana, Thakur, 2017; Ren et al., 2020). В первой статье анализировали белки медиаторного комплекса в трансгенных растениях риса. Во второй – занимались поиском сайта связывания транскрипционного фактора *ZmNST3* в трансгенных растениях кукурузы.

Нашей целью была разработка протокола для выделения РНК-белковых комплексов из цитоплазмы растений *Arabidopsis thaliana* с использованием системы HaloTag. Ориентирами при подготовке протокола, названного нами HaloTag RNA-PullDown (Halo-RPD) служили статьи (Sorenson, Bailey-Serres, 2015; Banks et al., 2016).

Метод Halo-RPD

Растительный материал. В качестве объекта исследования использовали две трансгенные линии *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. экотипа Columbia со стабильной экспрессией: 1) HaloTag; 2) химерного белка *EsCSDP3*, слитого с HaloTag (Taranov et al., 2018).

Процедура выделения РНК-белковых комплексов методом HaloRPD включает: подготовку магнитных шариков, гомогенизацию тканей и отбор контролей, осаждение и отмывку РНК-белковых комплексов, определение эффективности связывания белка, выделение РНК, анализ

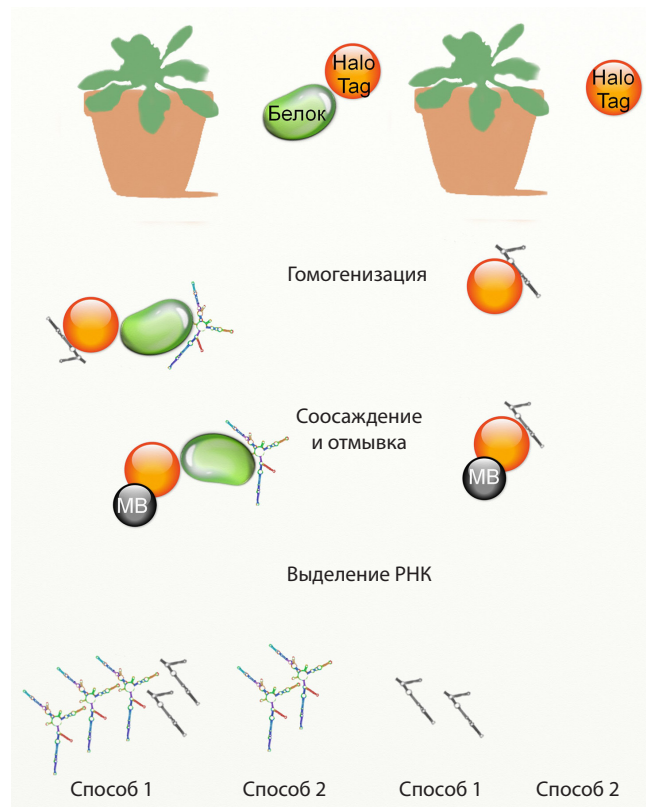


Рис. 1. Краткая схема эксперимента Halo-RPD: трансгенные растения, экспрессирующие РНК-связывающий белок, слитый с HaloTag (слева), и растения, экспрессирующие HaloTag (справа).

Растения гомогенизируют для получения цитоплазматического лизата и инкубируют с магнитными шариками, способными ковалентно связывать HaloTag. Шарика с осажденными на них комплексами целевых белков отмывают и выделяют РНК двумя различными способами: способ 1 – выделение РНК непосредственно с магнитных шариков путем инкубации в реагенте ExtractRNA; способ 2 – элюция в TEV буфере с последующей экстракцией с помощью ExtractRNA.

полученной РНК. Краткая схема эксперимента приведена на рис. 1.

Подготовка магнитных шариков

По 100 мкл суспензии шариков MagneBeads (Promega) помещали в две пробирки: для экспериментального образца (*EsCSDP3*-HaloTag) и для контроля (HaloTag). Пробирки инкубировали на магнитном штативе до прозрачности раствора. Аккуратно, не затрагивая шарика, удаляли жидкость. Добавляли к шарикам 400 мкл буфера следующего состава: 50 мМ Трис-НСl (рН 7.4), 137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 0.05 % Igepal Ca-630 (Promega). Плавнo перемешивали суспензию несколько раз вручную. Переносили пробирки на магнитный штатив, инкубировали до прозрачности раствора и отбирали пипеткой всю жидкость. Повторяли промывку еще два раза. После третьей промывки супернатант не сливали. Хранили пробирки при +4 °С.

Для осаждения химерного белка из лизата производитель предлагает два вида субстрата: смолу HaloLink (Promega) и магнитные шарика MagneBeads (Promega), которые появились позже. Преимущество магнитных шариков заключается в высокой связывающей способности слитых с HaloTag белков и низком уровне неспецифического свя-

звания. Так, 1 мл MagneBeads способен связать чуть больше 20 мг белка, тогда как такое же количество смолы – только 7 мг. Предварительные эксперименты в нашем исследовании были проведены с использованием смолы, что значительно удлиняло эксперимент из-за необходимости многостадийного центрифугирования. Такой подход предполагал также наличие LowBind пробирок или самостоятельного силиконирования для минимизации потери смолы.

Гомогенизация ткани и отбор контролей

Для лучшей сохранности растительной ткани листовые пластинки оборачивали в фольгу и помещали в жидкий азот.

Гомогенизацию проводили в предварительно охлажденных ступках с помощью пестиков. Ткань помещали в ступку, наливали небольшое количество жидкого азота и гомогенизировали до образования порошкообразной массы. Затем массу быстро переносили в пробирку, содержащую 300 мкл лизирующего буфера следующего состава: 50 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 150 мМ NaCl, 1 % Triton X-100, 0.1 мМ бензамидина HCl, 55 мкМ пенантролина, 10 мкМ бестатина, 20 мкМ леупептина, 5 мкМ пепстатина А, 1 мМ PMSF, 1 мМ ДТТ и 3 мкл RiboLock™ (Thermo Fisher Scientific). Пробирки закрывали и перемешивали на вортексе. Для оттаивания пробирки оставляли на льду. Гомогенат центрифугировали на предварительно охлажденной до +4 °С центрифуге в течение 7 мин при максимальной скорости. Супернатант переносили аккуратно, не задевая осадок, в чистые охлажденные пробирки. Полученный лизат содержал достаточно высокую концентрацию детергента, что могло привести к диссоциации РНК-белковых комплексов и ослабить последующее связывание белка с субстратом. Во избежание этого к лизату сразу добавляли 700 мкл буфера следующего состава: 50 мМ Трис-НСl (рН 7.4), 137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl. На этом этапе брали две пробы для контроля эксперимента: 1) по 100 мкл лизата отливали в отдельные пробирки для последующего анализа «input» фракции РНК; 2) по 10 мкл лизата переносили в 0.6 мкл пробирки для определения эффективности связывания целевого белка с субстратом. Обе пробирки хранили при +4 °С.

Осаждение и отмывка РНК-белковых комплексов

Предварительно подготовленные пробирки с магнитными шариками помещали в магнитный штатив, удаляли лишнюю жидкость. Извлекали пробирки из штатива и приливали к шарикам полученный разбавленный лизат. Пробирки помещали на орбитальный шейкер, инкубировали при постоянном вращении в течение 2 ч при +4 °С, после чего переносили их на магнитный штатив. Отбирали по 10 мкл лизата для контроля связывания белка с субстратом, оставшуюся жидкость аккуратно сливали.

Отмывку шариков проводили путем добавления 400 мкл буфера следующего состава: 50 мМ Трис-НСl (рН 7.4), 137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 0.05 % Igepal Ca-630 (Promega). Пробирки плавно, вручную, покачивали 3 раза и помещали на магнитный штатив. Важно отметить, что количество отмывок для каждого РНК-белкового комплекса подбирается индивидуально. В нашем эксперименте применяли 5 отмывок. Во время последней пробирки инкубировались на орбитальном шейкере в течение 5 мин при +4 °С.

После стадии отмывки пробирки помещали в лед.

Определение эффективности связывания белка с магнитными шариками

На этом этапе отслеживали уровень целевого белка, его сохранность, а также эффективность осаждения. Для этого использовали пробирки с заранее отобранными фракциями лизатов, описанными в разделах «Гомогенизация ткани и отбор контролей» и «Осаждение и отмывка РНК-белковых комплексов». В каждую из пробирок добавляли по 1 мкл HaloTag® TMR Ligand (Promega) в концентрации 50 мкМ. Перемешивали пипетированием. Помещали пробирки в темноту на 15 мин. Добавляли по 10 мкл 4× SDS загрузочного буфера и нагревали 2 мин при температуре +90 °С. Готовили 8 % ПААГ для электрофореза по методу Лэммли (Laemmli, 1970). В лунки геля загружали по 5 мкл продукта. Анализировали гель с помощью сканера-денситометра на определенной длине волны (экстинция = 532 нМ, эмиссия = 580 нМ).

В процентном соотношении большая часть белка оказалась в связанном состоянии (рис. 2), за счет чего не детектируется в супернатанте после 2-часовой инкубации.

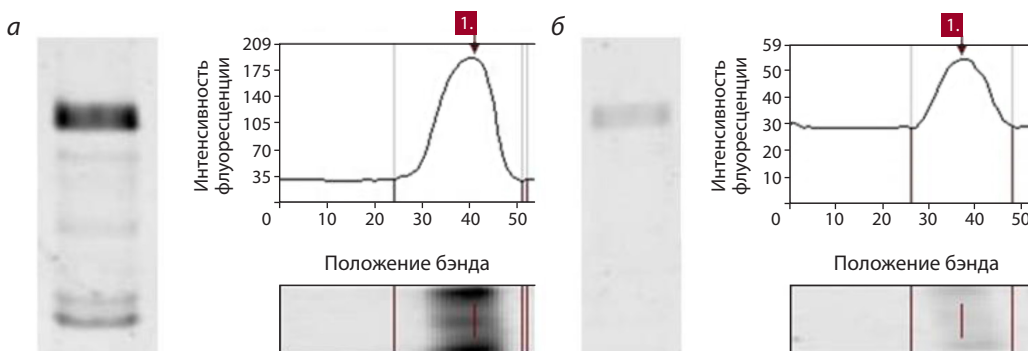


Рис. 2. Оценка эффективности связывания белка *EsCSDP3* на магнитных шариках с помощью флуоресцентного красителя TMRligand.

а – образец лизата до связывания и уровень флуоресценции связанного красителя; б – образец лизата через 2 ч после инкубации при +4 °С и соответствующий уровень флуоресценции связанного красителя. Количество несвязавшейся фракции белка составляет около 25 %.

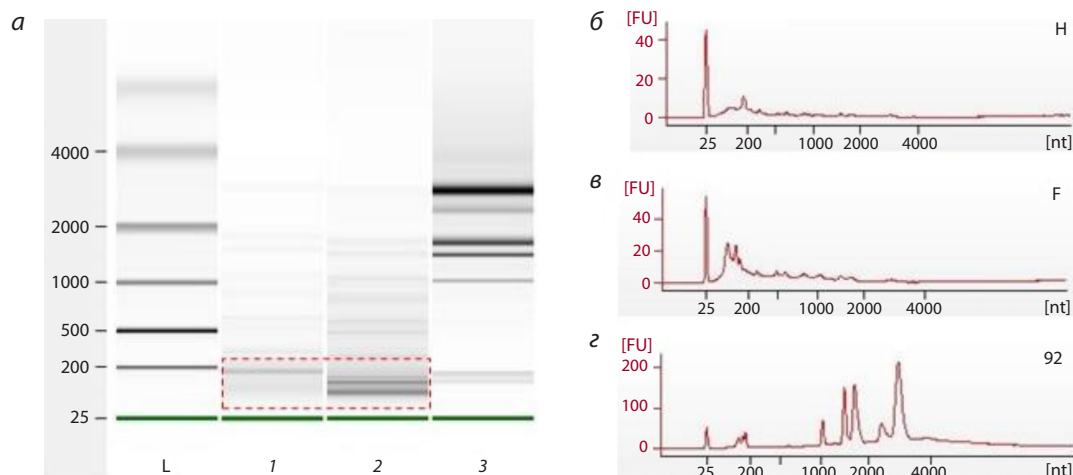


Рис. 3. РНК-профиль, полученный на приборе Agilent 2100 Bioanalyzer с использованием набора RNA 6000 Nano kit. *a*–*в* – РНК, выделенная способом 1, где *a1* и *б* – образец HaloTag, *a2* и *в* – образец *EsCSDP3*; *a3* и *г* – образец тотальной РНК для сравнения. Штриховой рамкой отмечена зона малых РНК. По оси абсцисс отложен размер РНК относительно маркера-стандарта, по оси ординат – интенсивность флуоресценции интеркалирующего красителя.

Если наблюдается иная картина, то в первую очередь необходимо увеличить время инкубации. Большое количество магнитных шариков приведет к повышению неспецифического связывания.

Выделение РНК

На данном этапе есть два варианта выделения РНК из белкового комплекса. Стоит опираться на предварительные знания об исследуемом белке и последующей системе анализа полученной РНК.

Способ 1 подразумевает выделение РНК непосредственно с магнитных шариков путем инкубации в реагенте ExtractRNA («Евроген»). Элюат, полученный таким образом, будет содержать не только искомые РНК (непосредственно с белка), но и ряд неспецифичных – с субстрата и HaloTag®. Данный способ будет оптимален при последующей RT-PCR или Real-time PCR с праймерами на известные РНК-мишени.

В случае высокопроизводительного секвенирования для установления природы неизвестных РНК-мишеней рекомендуется прибегнуть к элюции РНК из комплекса в TEV буфере с последующей экстракцией с помощью ExtractRNA («Евроген») – **способ 2**. Обработка TEV протеазой РНК-белкового комплекса способствует его высвобождению в раствор, оставляя при этом неспецифично-связавшиеся молекулы РНК на дне пробирки.

Для выделения РНК из элюата к промытым шарикам, содержащим целевой РНК-белковый комплекс, приливали 100 мкл буфера следующего состава: 50 мМ Трис-НСl (рН 8.0), 0.5 мМ ЭДТА, 0.005 мМ ДТТ, 40 ед. RiboLock™ (Thermo Fisher Scientific) и 5 ед. HaloTEV протеазы (Promega). Пробирки инкубировали в орбитальном шейкере в течение ночи при +4 °С. На следующий день помещали пробирки в магнитный штатив, отбирали 90 мкл элюата и переливали в чистые 1.5 мл пробирки. К полученному элюату приливали 1 мл реагента ExtractRNA («Евроген»). На этом этапе выделение РНК из элюата или с шариков ничем не различалось. В пробирки с магнит-

ными шариками после отмытки в буфере также заливали по 1 мл реагента ExtractRNA («Евроген»). Инкубировали пробирки в штативе при комнатной температуре в течение 5 мин. Периодически плавно перемешивали. Добавляли 200 мкл хлороформа и перемешивали на вортексе 30 с. Центрифугировали пробирки в охлажденной до +4 °С центрифуге на скорости 10000g в течение 10 мин. Осторожно отбирали 500 мкл водной фазы и переносили в новую пробирку. Добавляли по 25 мкг гликогена, перемешивали пипетированием и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Центрифугировали пробирки 10 мин на скорости 18000g при комнатной температуре. Аккуратно сливали супернатант, оставляя на дне немного изопропанола, так как велик риск потерять прозрачный осадок, приливали по 1 мл 75 % этанола. Инкубировали пробирки при –20 °С на протяжении ночи. Центрифугировали пробирки на максимальной скорости при комнатной температуре 5 мин. Осторожно сливали супернатант и просушивали осадок в течение 10 мин при комнатной температуре. Элюировали в 20 мкл свободной от РНКаз воды.

Анализ полученной РНК

Для измерения концентрации выделенной РНК использовали прибор Quantus Fluorometer (Promega). РНК-профиль анализировали на приборе 2100 Bioanalyzer с помощью набора RNA 6000 Nano и Pico kit (Agilent). Для анализа на таком высокочувствительном приборе необходим всего 1 мкл образца, что позволяет сохранить достаточное количество элюата для дальнейших экспериментов.

Профиль РНК, детектируемый на приборе Agilent 2100 Bioanalyzer, представлен на рис. 3. На рис. 3, *a* показана РНК, полученная путем элюции из TEV буфера и последующего выделения с использованием реагента ExtractRNA (способ 2). При сравнении обоих РНК-профилей можно видеть, что в комплексе с белком (дорожка 1) элюируется гораздо более разнообразный спектр различных РНК с большей концентрацией, нежели с HaloTag (дорожка 2). При более детальном рассмотрении можно заметить, что

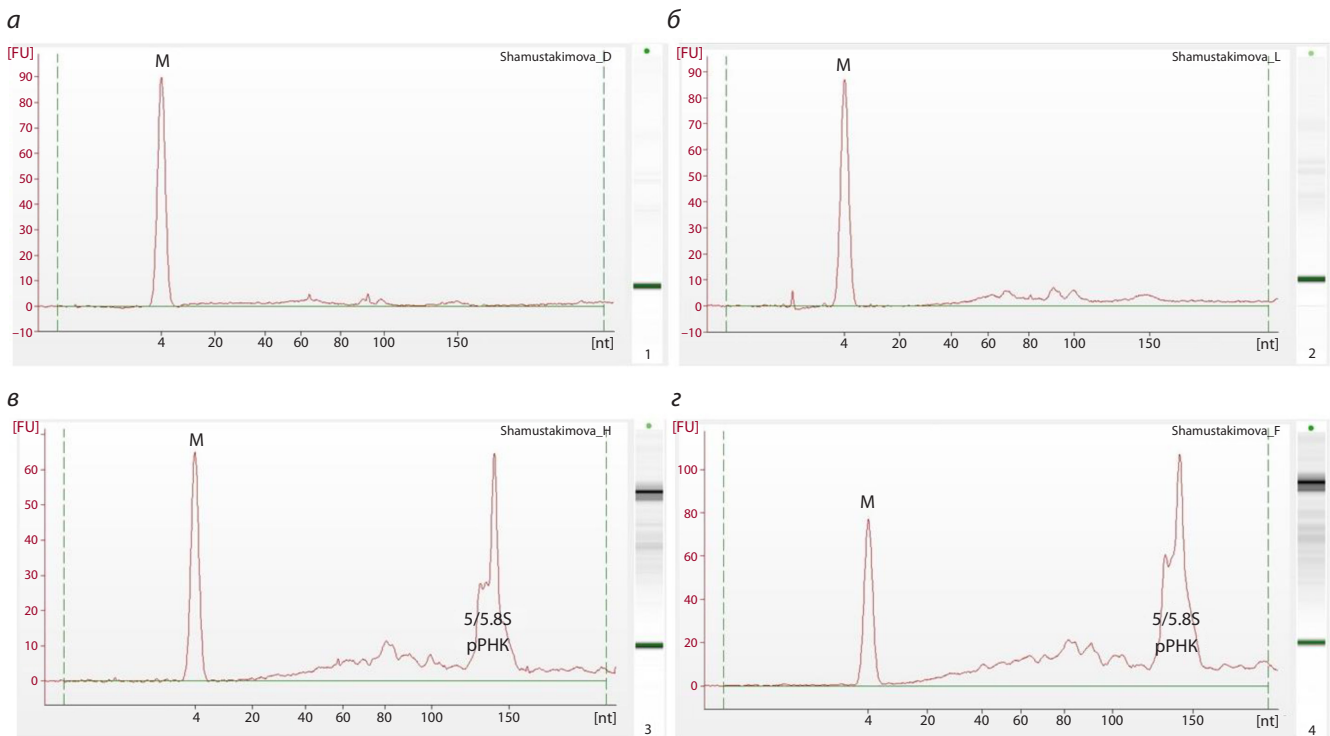


Рис. 4. РНК-профиль, полученный на приборе Agilent 2100 Bioanalyzer с использованием набора Small RNA kit для анализа малых РНК.

а, б – образцы HaloTag и EsCSDP3 из эксперимента, представленного на рис. 3, *а* (отмечено штриховой рамкой); *в, г* – РНК, выделенная из образцов HaloTag и EsCSDP3 способом 2. По оси ординат – интенсивность флуоресценции интеркалирующего красителя, по оси абсцисс – размер РНК в количестве нуклеотидов. Буквой «М» обозначен нижний маркер молекулярного веса.

оба образца имеют часть общих РНК, что надо учитывать при дальнейшем анализе и сравнении.

На рис. 4 показана зона малых РНК в образцах, представленных на рис. 3, *а* (отмечена штриховой рамкой). Эта зона представляла особый интерес вследствие обнаружения больших различий между образцами. Анализ зоны малых РНК позволяет также предсказать природу РНК-мишеней. Так, зону малых РНК можно поделить на участки: в диапазоне до ~40 нуклеотидов расположен участок микроРНК; от ~40 до ~80 находятся транспортные РНК; от ~80 до ~150 – малые ядрышковые, ядерные и рибосомальные РНК.

Сравнение профилей РНК от двух разных способов выделения показало ожидаемо более высокий сигнал флуоресценции в образцах, полученных при выделении непосредственно с магнитных шариков. При этом в таких образцах преобладали 5/5.8S рибосомальные РНК. Если сравнивать общий сигнал флуоресценции в образцах HaloTag и EsCSDP3, то можно увидеть, что он почти в два раза выше у опытного образца (110 FU) по сравнению с контрольным (65 FU).

Подготовка кДНК библиотек и секвенирование

В данном протоколе подробно не освещены процедуры подготовки кДНК библиотек и последующее секвенирование. Указаны лишь моменты, на которые надо обратить внимание при планировании и подготовке эксперимента.

Набор по пробоподготовке библиотек должен подбираться исходя из получаемого количества РНК. Несмотря

на небольшой геном, количество генов у *A. thaliana* сопоставимо с *H. sapiens*: 27000 против 25000. Принимая во внимание данный факт, рекомендуется использовать ячейки на 15–30 млн непарных прочтений (ридов) с длиной 50 п. о. (Xing et al., 2015; Petri, Jakobsson, 2018). Такой длины ридов будет достаточно для последующего картирования на геном, а заданное количество прочтений должно позволить статистически достоверно выявить специфические мишени путем количественного измерения их представленности в пробе.

В случае анализа РНК, полученной непосредственно с магнитных шариков, рекомендуется воспользоваться набором для избавления от рибосомальной РНК, так как на них будет приходиться большое число ридов из-за высокой представленности.

Заключение

Полученные результаты показали, что разработанный нами метод позволяет выделить из листьев *A. thaliana* химерный белок в комплексе с РНК-мишенями.

Метод Halo-RPD обладает рядом преимуществ по сравнению с протоколами, основанными на иммунопреципитации:

- благодаря стабильной экспрессии белка минимизируется как количество растительного материала на старте эксперимента, так и расход реактивов;
- применение реагента на стадии выделения РНК из элюата/субстрата способствует получению малых и микроРНК;

- за счет отсутствия ковалентных сшивок и исключения этапа ультразвуковой фрагментации настоящий протокол дает возможность анализировать нативный РНК-профиль, на основе которого можно делать предварительные выводы о природе РНК-мишеней;
- применение флуоресцентных красителей, связывающихся ковалентно с HaloTag, помогает отслеживать правильность выполнения этапов гомогенизации и выделения белка.

Список литературы / References

- Banks C.A.S., Boanca G., Lee Z.T., Eubanks C.G., Hattem G.L., Peak A., Weems L.E., Conkright J.J., Florens L., Washburn M.P. TNIP2 is a hub protein in the NF- κ B network with both protein and RNA mediated interactions. *Mol. Cell. Proteomics*. 2016;15(11):3435-3449. DOI 10.1074/mcp.M116.060509
- Brooks S.A., Rigby W.F.C. Characterization of the mRNA ligands bound by the RNA binding protein hnRNP A2 utilizing a novel *in vivo* technique. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(10):e49. DOI 10.1093/nar/28.10.e49
- Frydrych Capelari É., da Fonseca G.C., Guzman F., Margis R. Circular and micro RNAs from *Arabidopsis thaliana* flowers are simultaneously isolated from AGO-IP libraries. *Plants*. 2019;8(9):302. DOI 10.3390/plants8090302
- Gu J., Wang M., Yang Y., Qiu D., Zhang Y., Ma J., Zhou Y., Hanon G.J., Yu Y. GoldCLIP: gel-omitted ligation-dependent CLIP. *Genom. Proteom. Bioinform.* 2018;16(2):136-143. DOI 10.1016/j.gpb.2018.04.003
- Köster T., Meyer K. Plant ribonomics: proteins in search of RNA partners. *Trends Plant Sci.* 2018;23(4):352-365. DOI 10.1016/j.tplants.2018.01.004
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685. DOI 10.1038/227680a0
- Li X., Pritykin Y., Concepcion C.P., Lu Y., La Rocca G., Zhang M., King B., Cook P.J., Au Y.W., Popow O., Paulo J.A., Otis H.J., Mastroleo C., Ogradowski P., Schreiner R., Haigis K.M., Betel D., Leslie C.S., Ventura A. High-resolution *in vivo* identification of miRNA targets by Halo-enhanced Ago2 pull-down. *Mol. Cell*. 2020;79(1):167-179. DOI 10.1016/j.molcel.2020.05.009
- Los G.V., Encell L.P., McDougall M.G., Hartzell D.D., Karassina N., Zimprich C., Wood M.G., Learish R., Ohana R.F., Urh M., Simpson D., Mendez J., Zimmerman K., Otto P., Vidugiris G., Zhu J., Darzins A., Klaubert D.H., Bulleit R.F., Wood K.V. HaloTag: a novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis. *ACS Chem. Biol.* 2008;3(6):373-382. DOI 10.1021/cb800025k
- Petri R., Jakobsson J. Identifying miRNA targets using AGO-RIPseq. In: Lamandé S. (Ed.) *mRNA Decay. Methods in Molecular Biology*. Vol. 1720. New York: Humana Press, 2018;131-140. DOI 10.1007/978-1-4939-7540-2_9
- Ramanathan M., Porter D.F., Khavari P.A. Methods to study RNA-protein interactions. *Nat. Methods*. 2019;16(3):225-234. DOI 10.1038/s41592-019-0330-1
- Ren Z., Zhang D., Cao L., Zhang W., Zheng H., Liu Z., Han S., Dong Y., Zhu F., Liu H., Su H., Chen Y., Wu L., Zhu Y., Ku L. Functions and regulatory framework of ZmNST3 in maize under lodging and drought stress. *Plant Cell Environ.* 2020;43(9):2272-2286. DOI 10.1111/pce.13829
- Samanta S., Thakur J.K. Characterization of mediator complex and its associated proteins from rice. In: Kaufmann K., Mueller-Roeber B. (Eds.) *Plant Gene Regulatory Networks. Methods in Molecular Biology*. Vol. 1629. New York: Humana Press, 2017;123-140. DOI 10.1007/978-1-4939-7125-1_9
- Seo J.S., Chua N.H. Analysis of interaction between long noncoding RNAs and protein by RNA immunoprecipitation in *Arabidopsis*. In: Chekanova J.A., Wang H.-L.V. (Eds.) *Plant Long Non-Coding RNAs. Methods in Molecular Biology*. Vol. 1933. New York: Humana Press, 2019;289-295. DOI 10.1007/978-1-4939-9045-0_18
- Sorenson R., Bailey-Serres J. Rapid immunopurification of ribonucleoprotein complexes of plants. In: Alonso J., Stepanova A. (Eds.) *Plant Functional Genomics. Methods in Molecular Biology*. Vol. 1284. New York: Humana Press, 2015;209-219. DOI 10.1007/978-1-4939-2444-8_10
- Steffen A., Elgner M., Staiger D. Regulation of flowering time by the RNA-binding proteins *AtGRP7* and *AtGRP8*. *Plant Cell Physiol.* 2019;60(9):2040-2050. DOI 10.1093/pcp/pcz124
- Taranov V.V., Zlobin N.E., Evlakov K.I., Shamustakimova A.O., Babakov A.V. Contribution of *Eutrema salsugineum* cold shock domain structure to the interaction with RNA. *Biochemistry (Moscow)*. 2018;83(11):1369-1379. DOI 10.1134/S000629791811007X
- Urh M., Hartzell D., Mendez J., Klaubert D.H., Wood K. Methods for detection of protein-protein and protein-DNA interactions using HaloTagTM. In: Zachariou M. (Ed.) *Affinity Chromatography. Methods in Molecular Biology*. Vol. 421. New York: Humana Press, 2008;191-210. DOI 10.1007/978-1-59745-582-4_13
- van Dijk M., Visser A., Buabeng K.M., Poutsma A., van der Schors R.C., Oudejans C.B. Mutations within the *LINC-HELLP* non-coding RNA differentially bind ribosomal and RNA splicing complexes and negatively affect trophoblast differentiation. *Hum. Mol. Genet.* 2015;24(19):5475-5485. DOI 10.1093/hmg/ddv274
- Xing D., Wang Y., Hamilton M., Ben-Hur A., Reddy A.S. Transcriptome-wide identification of RNA targets of Arabidopsis SERINE/ARGININE-RICH45 uncovers the unexpected roles of this RNA binding protein in RNA processing. *Plant Cell*. 2015;27(12):3294-3308. DOI 10.1105/tpc.15.00641

ORCID

A.O. Shamustakimova orcid.org/0000-0003-3535-3108

Благодарности. Автор благодарит Чарльза Бэнкса из Института медицинских исследований им. Стоуерса (США) за консультативную помощь в разработке протокола. Работа поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований (№ 05-04-89005-NWO, № 14-04-00816). Выполнена с использованием научного оборудования Центра коллективного использования «Биотехнология» в ФГБНУ ВНИИСБ (соглашение № RFMEFI62114X0003).

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 28.03.2023. После доработки 21.08.2023. Принята к публикации 24.08.2023.

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

Ассоциации CAG-полиморфизма гена андрогенового рецептора с уровнем стероидных гормонов и антропометрическими показателями у мужчин: роль этнического фактора

Л.В. Осадчук , Г.В. Васильев, А.В. Осадчук


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

Аннотация. Андрогены необходимы для роста и поддержания гомеостаза костной ткани. Физиологические функции андрогенов опосредованы андрогеновым рецептором (AR). Ген андрогенового рецептора *AR* имеет полиморфный тринуклеотидный CAG-повтор, и длина *AR* CAG-повторов, регулируя чувствительность костной ткани к андрогенам, оказывает влияние на формирование скелета и пропорций тела. Цель исследования – выявить ассоциации между длиной *AR* CAG-повторов, гормональными и антропометрическими показателями у мужчин различных этнических групп. В популяционном исследовании приняли участие мужчины добровольцы ($n = 1078$) трех этнических групп (славян, бурят и якутов) из городских популяций России. У участников измеряли рост, размах рук, длину ноги, длину второго и четвертого пальцев обеих рук, рассчитывали ростовые индексы: отношение роста к длине ноги, отношение размаха рук к росту, отношение длины второго к четвертому пальцу. Тестостерон и эстрадиол в образцах периферической крови определяли иммуноферментным методом. Генотипирование *AR* CAG-повторов проводили с помощью фрагментного анализа и капиллярного электрофореза. Установлены более высокие антропометрические показатели у славян по сравнению с бурятами и в большинстве случаев с якутами. Уровень тестостерона повышен у славян по сравнению с бурятами, но не отличался от якутов, а уровень эстрадиола понижен по сравнению с таковым у бурят или якутов, которые не отличались по этому показателю. Длина *AR* CAG-повторов составила 23, 24 и 25 триплетов (медианы) у славян, бурят и якутов соответственно. Выявлены положительные корреляции между длиной *AR* CAG-повторов и уровнем эстрадиола у бурят и уровнем тестостерона у якутов, причем длинные CAG-повторы сопровождалось повышенным уровнем эстрадиола у бурят и тестостерона у славян и якутов. Установлены этнозависимые корреляции между уровнем стероидных гормонов и антропометрическими показателями у всех этносов. Полученные данные предполагают существование этнозависимых ассоциаций *AR* CAG-полиморфизма с размерами костей скелета, которые опосредуются стероидными гормонами как важными регуляторами роста и гомеостаза костной ткани. Ключевые слова: полиморфизм *AR* CAG-повторов; антропометрия; тестостерон; эстрадиол; этнические различия; популяции человека.

Для цитирования: Осадчук Л.В., Васильев Г.В., Осадчук А.В. Ассоциации CAG-полиморфизма гена андрогенового рецептора с уровнем стероидных гормонов и антропометрическими показателями у мужчин: роль этнического фактора. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(1):80-89. DOI 10.18699/vjgb-24-10

Associations of CAG repeat polymorphism in the androgen receptor gene with steroid hormone levels and anthropometrics among men: the role of the ethnic factor

L.V. Osadchuk , G.V. Vasiliev, A.V. Osadchuk

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

Abstract. Androgens are required for stimulation and maintenance of skeletal growth and bone homeostasis. Physiological functions of androgens are mediated through the androgen receptor (AR). The androgen receptor gene *AR* has a polymorphic trinucleotide CAG repeat and the length of *AR* CAG repeats determining the sensitivity of bone tissue to androgens is associated with skeleton formation and body proportions. This study aimed to investigate the relationship between *AR* CAG repeat polymorphism, circulating sex steroid hormones and the anthropometrics in males of different ethnic origins. Male volunteers of three ethnic groups (Slavs, Buryats, Yakuts) from urban Russian populations were recruited in a population-based study ($n = 1078$). Anthropometric indicators (height, arm span, leg length, the length of 2 and 4 digits of both hands) were measured and the following anthropometric indices were calculated: the ratio of height to leg length, the ratio of arm span to height, the ratio of lengths of second to fourth digit of the hand. Serum testosterone and estradiol were determined by enzyme immunoassay. Genotyping of the *AR* CAG repeats was performed using fragment analysis and capillary electrophoresis. Ethnic differences in all anthropometric and hormonal

indicators have been established, with higher anthropometric indicators in Slavs than Buryats, and in most cases higher than in Yakuts. The testosterone level was higher among Slavs compared to Buryats, but did not differ from Yakuts; the estradiol level was lower among Slavs compared to Buryats, who did not differ from Yakuts. Buryats and Yakuts had a higher number of CAG repeats than Slavs (medians: Slavs, 23; Buryats, 24; Yakuts, 25). Positive correlations were found between the length of AR CAG repeats and estradiol levels in Buryats and testosterone levels in Yakuts, while longer CAG repeats were accompanied by higher estradiol levels in Buryats and testosterone levels in Slavs and Yakuts. Ethnic-specific correlations have been established between the steroid hormone levels and some anthropometric indicators in all ethnic groups. Available data suggest that the ethnic-specific associations of AR CAG repeats with anthropometrics can be mediated by sex steroid hormones as important regulators of skeletal growth and bone homeostasis.

Key words: AR CAG repeat polymorphism; testosterone; estradiol; anthropometrics; human male population.

For citation: Osadchuk L.V., Vasiliev G.V., Osadchuk A.V. Associations of CAG repeat polymorphism in the androgen receptor gene with steroid hormone levels and anthropometrics among men: the role of the ethnic factor. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(1):80-89. DOI 10.18699/vjgb-24-10

Введение

Андрогены, которые секретируются клетками Лейдига семенников, играют исключительную роль в нормальной физиологии мужского организма, а нарушение действия андрогенов на ткани-мишени сопровождается широким спектром патологических изменений. Андрогены необходимы для онтогенетического формирования и поддержания целостности мужского фенотипа, включая нормальный процесс половой дифференцировки, пубертатного развития, формирования и поддержания вторичных половых признаков, сексуального поведения и адекватной продукции сперматозоидов. Кроме репродуктивных эффектов андрогены влияют на функции нерепродуктивных тканей, в частности на рост костей и увеличение массы костной ткани, формирование телосложения и пропорций тела (Zitzmann, Nieschlag, 2003; Almeida et al., 2017; Alemany, 2022). Андрогены осуществляют физиологические эффекты на рост костей и поддержание костного метаболизма совместно с эстрогенами, которые связываются с рецепторами, присутствующими в костной ткани (Almeida et al., 2017; Alemany, 2022).

Процесс формирования костной ткани имеет несколько возрастных этапов. Первый из них проходит внутриутробно и находится под контролем половых стероидных гормонов. Поскольку прямое определение андрогенов внутриутробно у людей затруднено, то для изучения этой проблемы большинство исследований опирается на биомаркеры – устойчивые показатели организма, которые отражают степень воздействия андрогенов в период внутриутробного развития. Из них популярностью пользуется отношение длины второго (указательного) к длине четвертого (безымянного) пальца (2П:4П). Несколько обзоров и метаанализов показало, что в большинстве случаев у мужчин и мальчиков наблюдаются более низкие значения этого отношения, чем у женщин и девочек. По-видимому, гендерную разницу по 2П:4П определяют более высокие уровни андрогенов у эмбрионов мужского пола по сравнению с женским (Hönekopp et al., 2007; Grimbois et al., 2010; Knickmeyer et al., 2011; Xu, Zheng, 2015; Swift-Gallant et al., 2020; Jägetoft et al., 2022). В работе (Mitsui et al., 2015) установлено, что уровни тестостерона в пуповинной крови плода различаются по полу, причем у плодов мужского пола уровень гормона выше, чем у плодов женского пола, что согласуется с половым диморфизмом в отношении 2П:4П, поскольку он отражает уровни половых стероидов

у плода. Половой диморфизм в отношении 2П:4П сохраняется в течение всей жизни, хотя данные, касающиеся половых различий в соотношении длин пальцев в детском возрасте, менее вариабельны по сравнению с данными у взрослых (Knickmeyer et al., 2011; Mitsui et al., 2015; Jägetoft et al., 2022).

Обнаруженная связь между развитием пальцев рук и пренатальным уровнем андрогенов (и эстрогенов) позволяет считать, что соотношение 2П:4П обратно пропорционально связано с уровнем пренатального тестостерона и прямо пропорционально уровню пренатального эстрогена. Имеются данные, свидетельствующие о том, что отношение 2П:4П коррелирует с уровнями половых гормонов у взрослых, что перспективно для использования 2П:4П как способа оценки эффектов пренатальных половых гормонов и часто используется для изучения влияния пренатальных половых стероидов на разнообразные физиологические, поведенческие и антропометрические характеристики человека (Knickmeyer et al., 2011; Manning et al., 2014). Однако не всегда в популяции взрослых мужчин отношение 2П:4П связано с уровнем половых гормонов, поэтому отношение 2П:4П часто становится предметом дебатов о причинно-следственной связи и достоверности его значения как индикатора эмбрионального уровня андрогенов (Richards et al., 2020; Swift-Gallant et al., 2020).

Половое созревание – важный этап накопления костной массы, роста костей в длину и формирования телосложения, который контролируется реактивацией гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси после длительного периода покоя. В начале полового созревания андрогены совместно с эстрогенами стимулируют скачок роста за счет повышения уровня гормона роста и ИФР-1 (инсулиноподобный фактор роста-1). В период раннего полового созревания рост костей обусловлен в основном модулирующим влиянием андрогенов на продукцию гормона роста, но половые стероиды могут оказывать прямой эффект на рост кости, поскольку в хондроцитах имеются рецепторы к андрогенам и эстрогенам. На поздних стадиях полового созревания высокие концентрации эстрогенов, но не андрогенов блокируют продольный рост костей у мальчиков, стимулируя закрытие эпифизарных пластинок роста, эффект, опосредованный прямым действием эстрогенов на пролиферирующие хондроциты (Almeida et al., 2017). Как известно, андрогены – предшественники эстрогенов на

общем пути биосинтеза стероидных гормонов, причем у мужчин только около 15 % эстрогенов секретируется непосредственно в семенниках, а остальные 85 % образуются в результате периферической ароматизации андрогенов в эстрогены ферментом ароматазой (CYP19A1) (Almeida et al., 2017; Alemany, 2022). Резистентность к эстрогенам или дефицит ароматазы у подростков мужского пола приводят к задержке костного возраста и высокому росту, несмотря на нормальные или высокие концентрации тестостерона в крови (Frank, 2003; Alemany, 2022).

Андрогены, как и все стероидные гормоны, не действуют на ткани-мишени немедленно, а осуществляют свои эффекты, по существу, в среднесрочной перспективе за счет модуляции экспрессии генов, а их действие имеет относительно длительный эффект и регулируется сложной сетью механизмов адаптации к изменяющимся потребностям организма. Большинство физиологических эффектов андрогенов осуществляется через андрогеновый рецептор (AR). Поскольку андрогеновые рецепторы экспрессируются почти в каждой ткани, то «андрогенность» видна почти повсеместно, а роль андрогеновых рецепторов в организме мужчин исключительно важна (Zitzmann, Nieschlag, 2003). Андрогеновый рецептор принадлежит к семейству ядерных рецепторов стероидных и тиреоидных гормонов и, как и другие члены семейства, способен непосредственно взаимодействовать с ядерной ДНК, является лиганд-зависимым ядерным транскрипционным фактором, который активируется при связывании с андрогенами (тестостероном и дигидротестостероном) и изменяет экспрессию AR-зависимых генов-мишеней (Davey, Grossmann, 2016; Xiao et al., 2016). Взаимодействуя с определенными регуляторными областями, AR служит фактором транскрипции, регулируя синтез целого ряда белков. Отметим, что существуют и негеномные эффекты AR, не связанные с регуляцией экспрессии генов.

Ген AR в экзоне 1 имеет тринуклеотидный полиморфный CAG-повтор (цитозин–аденин–гуанин), который транскрибируется в различное число аминокислот полиглутамина, а изменчивость размера AR частично обусловлена этим тринуклеотидным повтором. У здоровых мужчин нормальный диапазон CAG-повторов составляет 11–31 триплета и трансактивационная активность AR обратно пропорциональна числу CAG-повторов (Davey, Grossmann, 2016). Исследования *in vitro* и *in vivo* показали, что чем больше длина CAG-повторов, тем слабее трансактивационная способность AR и слабее эффекты андрогенов в тканях-мишенях (Buchanan et al., 2004). Авторы предполагают, что нормальная функция AR поддерживается в критическом и ограниченном диапазоне числа CAG-повторов (16–29 триплетов), а длина CAG-повторов за пределами этого диапазона может быть ассоциирована с нарушениями нормального функционирования андроген-зависимых тканей и различными заболеваниями (Davis-Dao et al., 2007; Davey, Grossmann, 2016; Ryan et al., 2017; Wang et al., 2018; Osadchuk L., Osadchuk A., 2022). Следует также отметить, что эффекты тестостерона проявляются уже после того, как он связывается с AR, влияя на транскрипционную активность AR. Таким образом, AR CAG-полиморфизм, снижая чувствительность тканей-мишеней к андрогенам, ослабляет

физиологические эффекты андрогенов и поэтому считается решающим фактором, определяющим «маскулинность» каждого мужчины.

Рецепторы андрогенов (AR) экспрессируются во всех типах костных клеток: остеобластах, остеокластах и остеоцитах. Поскольку некоторые полиморфные варианты AR повышают чувствительность к андрогенам, различия в ассоциации между уровнем тестостерона и массой костной ткани могут быть связаны с CAG-полиморфизмом в гене AR. Установлено, что повышенное количество CAG-повторов в гене андрогенового рецептора ослабляет влияние тестостерона на плотность костной ткани и костный метаболизм (Zitzmann, Nieschlag, 2003). Кроме того, показана связь между AR CAG-полиморфизмом, костной массой и минеральной плотностью кости, которая модулировалась уровнем свободного тестостерона (Guadalupe-Grau et al., 2010). У мальчиков в период от раннего препубертатного до молодого возраста рост тела в длину был обратно пропорционален длине AR CAG-повторов, но эта ассоциация уменьшалась в последующие годы и полностью исчезала после достижения 16-летнего возраста. Рост взрослых мужчин не был связан с длиной AR CAG-повторов (Voorhoeve et al., 2011). Авторы считают, что в период полового созревания связь значительно ослабевает за счет компенсаторного повышения активности гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси. Влияние AR CAG-повторов на костную массу изучалось у мальчиков препубертатного возраста – 12 лет (Rodríguez-García et al., 2015). У мальчиков – носителей длинных AR CAG-повторов – рост, масса тела, содержание минералов в костях и минеральная плотность костной ткани были выше по сравнению с носителями коротких AR CAG-повторов, что подтверждает гипотезу о том, что более длинные CAG-аллели ассоциированы с более высоким ростом.

Как уже упоминалось, тестостерон играет важную роль в регуляции костной массы и всей костной системы, следовательно, можно ожидать тесной связи между циркулирующим уровнем тестостерона и CAG-полиморфизмом гена андрогенового рецептора. Большинство исследований поддерживает точку зрения, что у взрослых мужчин между длиной AR CAG-повторов и уровнем тестостерона существует положительная ассоциация (Stabbe et al., 2007; Huhtaniemi et al., 2009; Ma et al., 2014; Grigорова et al., 2017; Khan et al., 2018). Авторы полагают, что более длинные CAG-повторы ослабляют обратную связь андрогенов в гипоталамо-гипофизарно-тестикулярной системе и повышают уровень тестостерона. Поскольку с увеличением длины CAG-повторов происходит снижение функциональной активности AR, при длинных CAG-повторах повышение уровня тестостерона можно рассматривать как компенсаторный эффект для поддержания адекватного андрогенового статуса мужчины. С генетической точки зрения уровень тестостерона, несомненно, является полигенным признаком, а CAG-полиморфизм гена AR – лишь один из многих генетических факторов, лежащих в основе генетического контроля этого признака. Индивидуальная вариабельность уровня тестостерона у мужчин может быть частично объяснена AR CAG-полиморфизмом. На большой группе здоровых

бельгийских мужчин показана положительная ассоциация между длиной *AR* CAG-повторов и уровнем тестостерона (Crabbe et al., 2007). Авторы предполагают, что у мужчин 6.0–8.5 % индивидуальной изменчивости уровня тестостерона связано с *AR* CAG-полиморфизмом.

В нашей предыдущей работе показано, что изменчивость длины CAG-повторов гена *AR* связана с этническим составом исследуемой популяции (Osadchuk et al., 2022). Установлены достоверные различия в длине и диапазоне CAG-повторов между тремя этническими группами: славянами, бурятами и якутами – с медианой у славян – 23, бурят – 24, якутов – 25 триплетов. Диапазон длины *AR* CAG-повторов составил у славян 7–36; у бурят 11–39; у якутов 18–32 триплета. У славян и бурят более длинные CAG-повторы были связаны с ослабленным сперматогенезом, у якутов связей между длиной CAG-повторов и патозооспермией не обнаружено.

С учетом вышеизложенного можно ожидать влияния CAG-полиморфизма гена андрогенового рецептора на изменчивость уровня половых стероидных гормонов у российских мужчин, что может отражаться на формировании некоторых андроген-зависимых антропометрических показателей. Цель настоящего исследования состояла в том, чтобы выявить возможные ассоциации между длиной *AR* CAG-повторов, которая влияет на чувствительность рецептора к андрогенам, и уровнем половых стероидных гормонов (тестостерона и эстрадиола), с одной стороны, и стероидзависимыми антропометрическими характеристиками телосложения, с другой стороны. Дополнительно представлялось интересным сравнить направленность этих ассоциаций у мужчин разной этнической принадлежности, которые отличаются по длине *AR* CAG-повторов, антропометрическим показателям, уровню тестостерона и эстрадиола. Для достижения поставленных целей было проведено мультицентровое популяционное исследование большой группы российских мужчин-добровольцев, у которых были определены длины *AR* CAG-повторов, уровни тестостерона и эстрадиола в периферической крови, антропометрические показатели, включая рост, длину ноги, размах рук, длину второго и четвертого пальцев обеих рук. Для выяснения роли этнического фактора исследование проводили на мужчинах трех этнических групп – славянах, бурятах и якутах, которые ранее были изучены в отношении полиморфизма *AR* CAG-повторов (Osadchuk et al., 2022). Отметим, что это первое в России исследование роли *AR* CAG-полиморфизма в регуляции уровня половых стероидных гормонов и стероидзависимых антропометрических коррелятах.

Материалы и методы

В исследовании принимали участие молодые мужчины-добровольцы трех этносов ($n = 1078$) из пяти российских городов: славяне из Архангельска, Новосибирска и Кемерово; буряты – из Улан-Удэ, якуты – из Якутска. Славяне были представлены тремя группами: русские (95.9 %), украинцы (0.5 %) и потомки смешанных браков русских, белорусов и украинцев (3.5 %). Мужчины заполняли анкеты, включающие вопросы о возрасте, месте рождения, национальности, профессии, характере труда, отмеча-

ли службу в армии, курение и употребление алкоголя, перенесенные и текущие заболевания. Этническая принадлежность оценивалась на глубину двух поколений – у участника, его родителей, бабушек и дедушек со стороны обоих родителей. Как правило, участники считали себя здоровыми и ранее не обращались к врачам по поводу хронических заболеваний. Критериями исключения были острые заболевания или прием лекарств, влияющих на уровень гормонов или метаболизм костей. Все мужчины, включенные в исследование, подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Этический комитет Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук одобрил исследование (протокол № 160 от 17.09.2020).

Всем участникам проводили антропометрию: измеряли рост, массу тела, окружность талии (ОТ) и бедер (ОБ), длину ноги, размах рук, длину указательного и безымянного пальцев рук, рассчитывали индекс массы тела (ИМТ), трохантерный индекс (ТИ), индекс андрогенной недостаточности (ИАН, отношение размаха рук к росту) и пальцевый индекс (2П:4П-правый и 2П:4П-левый). Массу тела оценивали в килограммах (кг); ОТ, ОБ, рост, длину ноги, размах рук в сантиметрах (см). Индекс массы тела считается основным антропометрическим индикатором ожирения и рассчитывается как отношение массы тела (кг) к росту (m^2). Трохантерный индекс дает характеристику пропорций тела, сложившихся к завершению периода полового созревания, и рассчитывается как отношение роста к длине ноги от площади опоры до большого вертела. Индекс андрогенной недостаточности также характеризует пропорции тела, сложившиеся к завершению периода полового созревания, и рассчитывается как отношение размаха рук к росту. Этот показатель зависит от уровня тестостерона в крови подростков, и если до начала полового созревания имела место андрогенная недостаточность, то размах рук начинает превышать длину тела и формируется характерная высокорослость с евнухоидными пропорциями тела (Frank, 2003). Длину второго и четвертого пальцев обеих рук измеряли с помощью штангенциркуля, а отношение 2П:4П рассчитывали как отношение длины второго пальца к четвертому. Предполагается, что пальцевый индекс отражает пренатальную андрогенизацию организма, что определяет относительную длину пальцев, которая не меняется в течение жизни (Knickmeyer et al., 2011; Manning et al., 2011).

Образцы крови брали натощак из локтевой вены с 8 до 11 ч утра. Кровь центрифугировали в течение 15–20 мин при 1500 об/мин. Собранную сыворотку хранили при $-40\text{ }^\circ\text{C}$ до определения в ней гормонов. Концентрацию лютеинизирующего гормона (ЛГ), фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), тестостерона (Т), эстрадиола (E_2) в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом коммерческими наборами («Алкор Био», «Хема», Россия) по прилагаемой инструкции. Диапазон референсных значений, полученный для нашей выборки здоровых мужчин, составил: ЛГ – 1.3–6.7 мМЕ/мл; ФСГ – 1.3–8.8 мМЕ/мл; Т – 11.7–38.2 нмоль/л; E_2 – 0.10–0.35 нмоль/л.

В данное исследование были включены мужчины, у которых ранее было проведено генотипирование *AR* CAG-

повторов, и методика генотипирования в деталях описана (Osadchuk et al., 2022). Коротко, геномную ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови с использованием фенол-хлороформного метода. Анализ числа CAG-повторов в гене *AR* проводили методом фрагментного анализа и капиллярного электрофореза на секвенаторе «Нанофор-05» («Синтол», Россия). Метод позволяет определить относительную длину продукта по отношению к стандарту длин и основан на разделении ДНК на фракции по молекулярной массе. Для амплификации фрагмента гена *AR* использована пара праймеров F: -5'-TCCAGAATCT GTTCCAGAGCGTGC-3' и R: -5'-GCTGTGAAGGTTG CTGTTCCCTCAT-3'. Количество CAG-повторов рассчитывали относительно лестницы маркерных фрагментов длины, которая состояла из восьми фрагментов (12, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 33 CAG-повтора).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета компьютерных программ Statistica 8.0. Для всех исследуемых показателей высчитывали среднее (SD). Проверку на нормальность распределения изучаемых параметров проводили при помощи теста Колмогорова–Смирнова. Поскольку большинство параметров не подчинялось нормальному распределению, то, чтобы найти этнические различия в антропометрических и гормональных параметрах, был проведен однофакторный дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса (Kruskal–Wallis ANOVA), а для оценки взаимосвязи между показателями в каждой этнической группе рассчитывали коэффициенты корреляции по Спирмену. В рамках дисперсионного анализа для попарного сравнения групп применяли тест Дункана (Duncan's test). Уровни тестостерона и эстрадиола были трансформированы логарифмированием перед анализом.

Следующим шагом в поиске возможных ассоциаций между полиморфизмом *AR* CAG-повторов, антропометрическими и гормональными параметрами стала стратификация длины CAG-повторов в каждой этнической группе на три категории (подгруппы): короткие, средние и длинные. Короткие и длинные CAG-повторы были рассчитаны с учетом этнических различий в диапазоне и средней длине CAG-повторов в каждой этнической группе. Категория коротких и длинных CAG-повторов получена отсечением частот менее 5 %, остальная часть этнического диапазона повторов обозначена как категория средних CAG-повторов. Стратификация участников каждой этнической группы по длине CAG-повторов соответствовала используемой ранее (Osadchuk et al., 2022). Результаты стратификации участников по длине CAG-повторов (количество триплетов) следующее: буряты – короткие (≤ 20); средние (21–27); длинные (≥ 28); славяне – короткие (≤ 19); средние (20–24); длинные (≥ 25); якуты – короткие (≤ 22); средние (23–27); длинные (≥ 28). Для каждого этноса сравнение антропометрических и гормональных параметров между подгруппами с различной длиной CAG-повторов проводили, используя статистический анализ факторности ANCOVA с коррекцией параметров на кофакторы: возраст, массу тела, ОТ, ОБ, ИМТ. Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез принят равным ≤ 0.05 .

Результаты

Этнические различия по антропометрическим и гормональным показателям и длине *AR* CAG-повторов. Этнические группы несколько отличались по возрасту: буряты были в среднем на полтора года моложе, чем славяне и якуты ($p \leq 0.05$), которые не отличались между собой (табл. 1). Более высокие значения практически всех антропометрических показателей отмечены у славян по сравнению с бурятами ($p \leq 0.05$), за исключением более низких значений ТИ и длины безымянного пальца у славян ($p \leq 0.05$). Славяне отличались от якутов более высокими значениями почти всех антропометрических показателей ($p \leq 0.05$), но не отличались по ОТ и длине обоих указательных пальцев и характеризовались более низкими значениями индексов ТИ, ИАН и длины обоих безымянных пальцев ($p \leq 0.05$, см. табл. 1). Буряты не отличались от якутов по большинству антропометрических показателей, за исключением более высоких значений роста и ТИ и более низких значений ОТ, ОБ, ИАН ($p \leq 0.05$). Таким образом, буряты и якуты более близки между собой по пропорциям тела и значительно дифференцированы от славян.

Уровень ЛГ, ФСГ и эстрадиола был ниже у славян по сравнению с таковыми у бурят ($p \leq 0.05$), а уровень тестостерона и отношение Т/Е₂ – достоверно выше (см. табл. 1, $p \leq 0.05$). Буряты и якуты не отличались между собой по всем гормональным показателям, за исключением более низких значений ЛГ у якутов ($p \leq 0.05$). Таким образом, буряты и якуты были близки между собой по гормональному статусу и более дифференцированы от славян. Длина CAG-повторов отличалась между всеми этническими группами ($p \leq 0.05$) и составила у славян 23 триплета, у бурят – 24, у якутов – 25 (медианы).

Корреляционные связи между длиной *AR* CAG-повторов, гормональными и антропометрическими показателями у мужчин трех этнических групп. Корреляционные связи между длиной CAG-повторов, гормональными и антропометрическими показателями детерминированы этнической принадлежностью (табл. 2). У бурят – положительная корреляция между длиной CAG-повторов и правым пальцевым индексом, а также уровнем эстрадиола ($p \leq 0.05$), у якутов – между длиной CAG-повторов и уровнем тестостерона ($p \leq 0.05$), а у славян достоверных корреляций не выявлено (см. табл. 2). Более многочисленные корреляции наблюдались между уровнем гормонов и антропометрическими характеристиками, которые также модулировались этнической принадлежностью. У бурят установлена отрицательная корреляция между уровнем эстрадиола и размахом рук и ИАН ($p \leq 0.05$), у якутов – положительная корреляция между уровнем эстрадиола, длиной ноги и всех четырех пальцев ($p \leq 0.05$), но отрицательная – между уровнем эстрадиола и ТИ ($p \leq 0.05$). У славян отмечена положительная корреляция между уровнем тестостерона и длиной ноги, а также отношениями 2П:4П-правый и 2П:4П-левый ($p \leq 0.05$) и отрицательная – между уровнем тестостерона и ТИ, а также длиной всех четырех пальцев ($p \leq 0.05$). Кроме того, отмечены положительные корреляции между уровнем эстрадиола и длиной всех четырех пальцев (см. табл. 2, $p \leq 0.05$).

Таблица 1. Антропометрические и гормональные показатели и длина AR CAG-повторов у мужчин трех этнических групп

Показатель	Буряты, n = 223	Славяне, n = 708	Якуты, n = 147
Возраст, лет	23.7 (6.5) ^a	25.3 (6.6) ^b	25.4 (7.3) ^b
Масса тела, кг	70.9 (13.2) ^a	78.1 (13.9) ^b	70.6 (13.8) ^a
Рост, см	174.8 (6.3) ^a	179.0 (6.9) ^b	172.2 (6.5) ^c
Окружность талии, см	82.0 (12.1) ^a	84.8 (10.6) ^b	84.6 (12.7) ^b
Окружность бедер, см	94.2 (7.3) ^a	99.1 (8.2) ^b	97.2 (7.9) ^c
ИМТ	23.2 (4.3) ^a	24.3 (3.9) ^b	23.8 (4.4) ^{ab}
Длина ноги, см	89.2 (5.1) ^a	94.2 (5.3) ^b	89.4 (5.5) ^a
ТИ	1.96 (0.07) ^a	1.90 (0.08) ^b	1.93 (0.08) ^c
Размах рук, см	177.8 (7.4) ^a	182.3 (8.1) ^b	177.7 (7.4) ^a
ИАН	1.017 (0.025) ^a	1.018 (0.029) ^a	1.032 (0.021) ^b
2П-правый, см	7.7 (1.1) ^a	7.8 (1.0) ^b	7.8 (0.9) ^{ab}
2П-левый, см	7.7 (1.1) ^a	7.8 (1.0) ^b	7.7 (0.9) ^{ab}
4П-правый, см	8.1 (1.2) ^a	8.0 (1.1) ^b	8.2 (1.0) ^a
4П-левый, см	8.1 (1.2) ^a	8.0 (1.1) ^b	8.2 (1.0) ^a
2П:4П-правый	0.95 (0.03) ^a	0.98 (0.04) ^b	0.95 (0.03) ^a
2П:4П-левый	0.95 (0.03) ^a	0.98 (0.04) ^b	0.94 (0.04) ^a
ЛГ, мМЕ/мл	3.96 (1.66) ^a	3.51 (1.53) ^b	3.58 (1.56) ^b
ФСГ, мМЕ/мл	4.76 (3.12) ^a	3.76 (2.76) ^b	5.31 (3.24) ^a
Тестостерон, нмоль/л	18.81 (5.98) ^a	21.16 (7.58) ^b	19.67 (6.59) ^{ab}
Эстрадиол, нмоль/л	0.227 (0.059) ^a	0.194 (0.067) ^b	0.224 (0.055) ^{ab}
T/E ₂	87.3 (37.0) ^a	120.7 (62.9) ^b	91.7 (35.1) ^a
CAG-повторы	24.0 (3.5) ^a	23.0 (3.1) ^b	25.0 (2.8) ^c

Примечание. Здесь и далее данные представлены как mean (SD); ИМТ – индекс массы тела; ТИ – трохантерный индекс (отношение роста к длине ноги); ИАН – индекс андрогенной недостаточности (отношение размаха рук к росту); 2П, 4П – длина второго или четвертого пальца соответственно; 2П:4П – пальцевый индекс (отношение длины второго пальца к четвертому); ЛГ – лютеинизирующий гормон; ФСГ – фолликулостимулирующий гормон; T/E₂ – отношение концентрации тестостерона к эстрадиолу; a, b, c – значения показателя с различными суперскриптами достоверно различаются между этническими группами ($p \leq 0.05$).

Таблица 2. Коэффициенты корреляции (по Спирману) между гормональными и антропометрическими параметрами и длиной AR CAG-повторов у мужчин трех этнических групп

Показатель	Буряты (n = 223)			Славяне (n = 708)			Якуты (n = 147)		
	T	E ₂	CAG	T	E ₂	CAG	T	E ₂	CAG
Возраст, лет	-0.139*	-0.300*	-0.081	-0.297*	-0.215*	-0.034	-0.123	0.014	-0.130
Масса тела, кг	-0.341*	-0.153*	-0.090	-0.384*	-0.047	-0.027	-0.409*	0.067	-0.040
Рост, см	0.110	0.021	-0.093	-0.019	-0.003	-0.015	0.069	0.156	0.010
Длина ноги, см	0.121	-0.003	-0.009	0.094*	0.010	-0.027	-0.036	0.247*	0.054
ТИ	-0.098	0.066	-0.092	-0.151*	0.001	0.032	0.065	-0.251*	-0.068
Размах рук, см	0.083	-0.141*	-0.032	-0.004	0.035	-0.001	0.105	0.068	0.028
ИАН	-0.035	-0.262*	0.063	0.011	0.046	0.034	0.079	-0.146	0.101
2П-правый, см	0.125	-0.015	0.044	-0.177*	0.213*	-0.007	0.083	0.195*	-0.015
2П-левый, см	0.122	-0.035	0.019	-0.179*	0.189*	-0.009	0.053	0.213*	0.014
4П-правый, см	0.089	-0.037	-0.033	-0.212*	0.198*	-0.026	0.086	0.202*	-0.016
4П-левый, см	0.087	-0.059	-0.019	-0.204*	0.208*	-0.009	0.064	0.201*	-0.014
2П:4П-правый	0.109	0.108	0.189*	0.093*	0.006	0.044	-0.010	0.020	0.046
2П:4П-левый	0.103	0.097	0.119	0.097*	-0.038	-0.013	-0.046	0.025	0.086
ЛГ, мМЕ/мл	0.173*	0.085	-0.010	0.120*	-0.027	0.043	0.090	0.184*	0.052
Тестостерон (T), нмоль/л	-	0.178*	0.090	-	0.044	0.062	-	0.109	0.164*
Эстрадиол (E ₂), нмоль/л	0.178*	-	0.147*	0.044	-	-0.030	0.109	-	-0.037

* – Коэффициенты корреляции достоверны ($p < 0.05$).

Антропометрические и гормональные параметры в подгруппах с разной длиной AR CAG-повторов у мужчин трех этнических групп. Антропометрические и гормональные параметры в подгруппах коротких, средних и длинных CAG-повторов в каждой этнической группе представлены в табл. 3. Между подгруппами с короткими и длинными CAG-повторами у бурят наблюдались достоверные различия по росту, ИАН, 2П:4П-правый и уровню эстрадиола ($p \leq 0.05$), у славян – по длине ноги и уровню тестостерона, а у якутов – по размаху рук, ИАН и уровню тестостерона ($p \leq 0.05$). Таким образом, у всех этносов именно длинные CAG-повторы сопровождались повышенным уровнем стероидных гормонов.

Обсуждение

Сравнение антропометрических и гормональных показателей у молодых российских мужчин разной этнической принадлежности позволило установить достоверные этнические различия по всем антропометрическим показателям и уровню половых стероидных гормонов. Обращают на себя внимание более высокие антропометрические показатели, определяющие мужское телосложение (рост, длина ноги, размах рук), у славян, чем у бурят, и в большинстве случаев, чем у якутов, что соответствует более высокому уровню тестостерона у славян по сравнению с бурятами (якуты занимали промежуточное положение) и более низкому уровню эстрадиола у славян по сравнению с бурятами или якутами, которые не отличались по этому показателю. Установленные гормональные различия указывают на этнические особенности в функционировании гипоталамо-гипофизарно-тестикулярной оси и предполагают, что они могли сформироваться ранее, возможно, в эмбриональном или пубертатном периодах, что привело к этническим различиям в гормон-зависимых антропометрических характеристиках. Мы установили у бурят отрицательную корреляцию между уровнем эстрадиола и размахом рук, у якутов – положительную корреляцию между уровнем эстрадиола и длиной ноги, а у славян – положительную корреляцию между уровнем тестостерона и длиной ноги. Таким образом, складывается впечатление, что у бурят и якутов именно эстрадиол выступает детерминантом продольного роста костей скелета, определяющих телосложение, в то время как у славян эту функцию выполняет тестостерон. Основываясь на этих фактах, можно предположить, что в период пубертата у бурят и якутов повышенный уровень эстрадиола и пониженный уровень тестостерона по сравнению со славянами способствует замедлению скорости роста костей скелета и закрытию эпифизарных пластинок (зона роста) трубчатых костей, останавливая их рост.

Длина AR CAG-повторов была самой короткой у славян, выше у бурят и самой высокой у якутов. Положительные корреляции между длиной AR CAG-повторов и уровнем тестостерона у якутов или эстрадиола у бурят дополнялись ассоциацией длинных CAG-повторов с повышенным уровнем эстрадиола у бурят и повышенным уровнем тестостерона у якутов и славян. Таким образом, длинные CAG-повторы координировали изменчивость уровней стероидных гормонов. Учитывая роль половых

стероидных гормонов в регуляции роста и гомеостаза костной ткани, можно считать, что этнозависимые ассоциации AR CAG-полиморфизма с уровнем стероидных гормонов как важных регуляторов роста костей скелета опосредуют влияние AR CAG-повторов на антропометрические характеристики мужчин. Более того, полиморфизм AR CAG-повторов может предсказать уровень половых стероидов у мужчин исследованных нами этносов.

В нашей работе выявленные эффекты длинных AR CAG-повторов на уровни половых стероидных гормонов совпадают с ранее полученными у европейских мужчин (Crabbe et al., 2007; Huhtaniemi et al., 2009; De Naeyer et al., 2014) и в совокупности подтверждают мнение о том, что межиндивидуальная вариабельность уровня тестостерона и/или эстрадиола у мужчин может быть частично обусловлена полиморфизмом CAG-повторов гена андрогенового рецептора. В выборке стареющих мужчин из восьми европейских стран длина AR CAG-повторов положительно коррелировала с уровнем тестостерона и эстрадиола, а повышенный уровень тестостерона у мужчин с длинными AR CAG-повторами совпадал с отсутствием у них возрастного гипогонадизма (Huhtaniemi et al., 2009).

Гормональные эффекты AR CAG-полиморфизма не получили подтверждения у филиппинских (Ryan et al., 2017) и греческих мужчин (Goutou et al., 2009). Несоответствие результатов исследований может быть следствием этнических особенностей или смешанного этнического состава исследуемых групп мужчин. Следует отметить значительное влияние факторов образа жизни: ожирения, малоподвижности, приема анаболиков, стресса и других – на гормональный фон, которые, модулируя уровень тестостерона или эстрадиола, способны маскировать генетические эффекты AR CAG-полиморфизма у мужчин (Wrzosek et al., 2020).

Исследования *in vitro* и *in vivo* показали, что чем больше длина AR CAG-повторов, тем слабее трансактивационная способность AR и эффекты андрогенов на ткани-мишени. Возможный механизм, лежащий в основе этого явления, может быть связан с разным сродством белков коактиваторов к кодируемому полиглутаминовому тракту белка AR (Buchanan et al., 2004; Davey, Grossmann, 2016). Поскольку с увеличением длины CAG-повторов снижается функциональная активность AR, то при длинных CAG-повторах повышение уровня тестостерона, которое установлено у славян и якутов в нашей работе, по-видимому, компенсирует более слабую активность AR. Кроме того, в гипоталамо-гипофизарно-тестикулярной системе более длинные AR CAG-повторы ослабляют обратную связь андрогенов и повышают уровень тестостерона (Huhtaniemi et al., 2009). С генетической точки зрения уровень тестостерона считается полигенным признаком, а AR CAG-полиморфизм гена AR – лишь один из многих генетических факторов, лежащих в основе генетического контроля этого признака. По-видимому, нормальная функция AR поддерживается в критическом и ограниченном диапазоне длин CAG-повторов. Молекулярное моделирование и анализ взаимосвязи между длиной CAG-тракта и функцией AR показали критический размер в 16–29 триплетов для поддержания связи между доменами (Nenonen et al., 2010).

Таблица 3. Антропометрические параметры и уровень половых стероидных гормонов в этнических группах мужчин с различной длиной AR CAG-повторов

Буряты			
Показатель	Короткие CAG ≤ 20, n = 29	Средние 21 ≤ CAG ≤ 27, n = 166	Длинные CAG ≥ 28, n = 27
Рост, см	174.7 (7.2) ^a	175.4 (6.3) ^a	171.6 (4.9)^b
Длина ноги, см	88.0 (5.2) ^a	89.7 (5.2) ^b	89.7 (4.0) ^a
ТИ	1.99 (0.06) ^a	1.96 (0.07) ^a	1.96 (0.08) ^a
Размах рук, см	178.0 (7.5) ^a	178.0 (7.5) ^a	176.6 (6.6) ^a
ИАН	1.019 (0.026) ^{ab}	1.015 (0.024) ^a	1.029 (0.027)^b
2П-правый, см	7.3 (0.8) ^a	7.7 (1.1) ^a	7.6 (1.0) ^a
2П-левый, см	7.4 (0.8) ^a	7.8 (1.1) ^a	7.6 (1.0) ^a
4П-правый, см	7.9 (0.9) ^a	8.2 (1.3) ^a	8.0 (1.2) ^a
4П-левый, см	7.8 (0.9) ^a	8.2 (1.3) ^a	8.0 (1.1) ^a
2П:4П-правый	0.94 (0.04) ^a	0.95 (0.03) ^{ab}	0.95 (0.02)^b
2П:4П-левый	0.94 (0.04) ^a	0.95 (0.03) ^a	0.96 (0.02) ^a
Тестостерон, нмоль/л	17.78 (4.89) ^a	18.03 (6.02) ^a	19.31 (7.52) ^a
Эстрадиол, нмоль/л	0.211 (0.036) ^a	0.226 (0.054) ^{ab}	0.248 (0.098)^b
Славяне			
Показатель	Короткие CAG ≤ 19, n = 60	Средние 20 ≤ CAG ≤ 24, n = 430	Длинные CAG ≥ 25, n = 212
Рост, см	179.3 (7.9) ^a	179.2 (6.6) ^a	179.1 (6.6) ^a
Длина ноги, см	92.5 (5.7) ^a	94.1 (5.1) ^b	94.1 (5.5)^b
ТИ	1.89 (0.09) ^a	1.91 (0.08) ^a	1.91 (0.09) ^a
Размах рук, см	182.0 (8.7) ^a	182.3 (8.0) ^a	182.4 (8.0) ^a
ИАН	1.015 (0.033) ^a	1.019 (0.030) ^a	1.019 (0.028) ^a
2П-правый, см	7.5 (0.7) ^a	7.8 (1.1) ^b	7.8 (1.0) ^{ab}
2П-левый, см	7.6 (0.7) ^a	7.8 (1.1) ^a	7.8 (1.0) ^a
4П-правый, см	7.8 (0.6) ^a	8.0 (1.1) ^a	7.9 (1.1) ^a
4П-левый, см	7.7 (0.8) ^a	8.0 (1.1) ^a	8.0 (1.1) ^a
2П:4П-правый	0.97 (0.04) ^a	0.98 (0.04) ^a	0.98 (0.04) ^a
2П:4П-левый	0.98 (0.04) ^a	0.98 (0.04) ^a	0.98 (0.04) ^a
Тестостерон, нмоль/л	19.43 (6.33) ^a	20.97 (7.41) ^{ab}	22.14 (8.13)^b
Эстрадиол, нмоль/л	0.186 (0.056) ^a	0.197 (0.070) ^a	0.189 (0.062) ^a
Якуты			
Показатель	Короткие CAG ≤ 22, n = 30	Средние 23 ≤ CAG ≤ 27, n = 96	Длинные CAG ≥ 28, n = 21
Рост, см	171.3 (8.1) ^a	172.5 (6.1) ^a	172.3 (6.3) ^a
Длина ноги, см	88.2 (6.5) ^a	89.7 (5.1) ^a	89.9 (6.0) ^a
ТИ	1.95 (0.09) ^a	1.93 (0.08) ^a	1.92 (0.08) ^a
Размах рук, см	175.3 (9.9) ^a	178.3 (6.5) ^b	178.3 (7.1)^b
ИАН	1.023 (0.022) ^a	1.034 (0.021) ^b	1.035 (0.020)^b
2П-правый, см	7.8 (1.1) ^a	7.7 (0.9) ^a	8.0 (1.0) ^a
2П-левый, см	7.8 (1.0) ^a	7.7 (0.9) ^a	8.0 (1.0) ^a
4П-правый, см	8.3 (1.1) ^a	8.1 (1.0) ^a	8.4 (1.2) ^a
4П-левый, см	8.3 (1.1) ^a	8.2 (1.0) ^a	8.4 (1.1) ^a
2П:4П-правый	0.95 (0.03) ^a	0.95 (0.03) ^a	0.95 (0.04) ^a
2П:4П-левый	0.94 (0.03) ^a	0.94 (0.04) ^a	0.94 (0.04) ^a
Тестостерон, нмоль/л	18.43 (5.48) ^a	19.58 (6.76) ^{ab}	21.97 (7.01)^b
Эстрадиол, нмоль/л	0.227 (0.052) ^a	0.223 (0.056) ^a	0.221 (0.058) ^a

Отсюда следует, что анализ длины CAG-повторов в моделях линейной регрессии, выполняемый в большинстве исследований, вероятно, недостаточно адекватен и стратификация данных может быть альтернативным способом анализа связей длины CAG-повторов с фенотипическими признаками. Действительно, в нашем исследовании при анализе линейных связей между длиной AR CAG-повторов и уровнем стероидных гормонов нам не удалось установить ее у славян, однако при стратификации CAG-повторов на короткие, средние и длинные выявлены эффекты длинных CAG-повторов. Аналогичный прием успешно применен в других работах, которые установили стимулирующие эффекты длинных AR CAG-повторов на ряд гормональных и антропометрических признаков, включая уровень общего и/или свободного тестостерона и/или эстрадиола (Crabbe et al., 2007; De Naeyer et al., 2014; Khan et al., 2018), а также рост, массу тела, минеральную плотность костной ткани у мальчиков-подростков (Rodríguez-García et al., 2015).

Эффекты тестостерона на рост костей и поддержание костного метаболизма осуществляются совместно с эстрадиолом после превращения тестостерона в эстрадиол ферментом ароматазой и опосредуются рецепторами эстрогенов в костной ткани (Almeida et al., 2017; Alemany, 2022). Полученные нами результаты предполагают, что у бурят стимулирующее влияние длинных AR CAG-повторов на уровень эстрадиола и антропометрические показатели (рост, ИАН, 2П:4П правый) может быть следствием повышенной активности ароматазы, опосредующей эффекты андрогенов и андрогенового рецептора на рост костей.

Вариабельность длины AR CAG-повторов может отражаться на антропометрических показателях уже в эмбриогенезе, в частности на длине пальцев рук и отношении 2П:4П, которое отрицательно связано с эмбриональным уровнем тестостерона (Manning et al., 2002; McIntyre, 2006; Grimbos et al., 2010; Knickmeyer et al., 2011; Folland et al., 2012). В нашем исследовании у бурят длина CAG-повторов положительно коррелировала с правым пальцевым индексом, причем длинные AR CAG-повторы увеличивали правый пальцевый индекс, что предположительно могло быть обусловлено низкой пренатальной андрогенизацией. В то же время мы нашли положительную связь между уровнем тестостерона и обоими пальцевыми индексами у мужчин славянского этноса, которая, по-видимому, не контролируется длинными AR CAG-повторами. Следует отметить, что отношение 2П:4П считается спорным показателем, поскольку данные исследований весьма противоречивы: имеются работы, как подтверждающие, так и не подтверждающие связи пальцевого индекса с уровнем тестостерона и/или эстрадиола или с длиной CAG-повторов у взрослых мужчин (Hönekopp et al., 2007; Knickmeyer et al., 2011; Muller et al., 2011; Hönekopp, 2013; Zhang et al., 2013). В исследованиях на животных имеются более надежные экспериментальные доказательства влияния пренатальных половых гормонов на отношение 2П:4П и его связи с длиной AR CAG-повторов (Zheng, Cohn, 2011; Swift-Gallant et al., 2020). Наши результаты дополняют имеющиеся исследования, но указывают на этнические особенности таких связей.

Заключение

Проведенное исследование позволило установить: 1) различия в гормональных и антропометрических показателях между мужчинами трех этнических групп: бурятами, якутами и славянами; 2) этнозависимые корреляции между гормональными и антропометрическими показателями; 3) этнозависимые корреляции между длиной AR CAG-повторов и уровнем половых стероидных гормонов; 4) этнозависимое влияние длинных CAG-повторов на определенные антропометрические индикаторы и уровень половых стероидных гормонов во всех этнических группах.

Список литературы / References

- Alemany M. The roles of androgens in humans: Biology, metabolic regulation and health. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(19):11952. DOI 10.3390/ijms231911952
- Almeida M., Laurent M.R., Dubois V., Claessens F., O'Brien C.A., Bouillon R., Vanderschueren D., Manolagas S.C. Estrogens and androgens in skeletal physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 2017;97(1):135-187. DOI 10.1152/physrev.00033.2015
- Buchanan G., Yang M., Cheong A., Harris J.M., Irvine R.A., Lambert P.F., Moore N.L., Raynor M., Neufing P.J., Coetzee G.A., Tilly W.D. Structural and functional consequences of glutamine tract variation in the androgen receptor. *Hum. Mol. Genet.* 2004;13(16):1677-1692. DOI 10.1093/hmg/ddh181
- Crabbe P., Bogaert V., De Bacquer D., Goemaere S., Zmierzczak H., Kaufman J.M. Part of the interindividual variation in serum testosterone levels in healthy men reflects differences in androgen sensitivity and feedback set point: contribution of the androgen receptor polyglutamine tract polymorphism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007;92(9):3604-3610. DOI 10.1210/jc.2007-0117
- Davey R.A., Grossmann M. Androgen receptor structure, function and biology: From bench to bedside. *Clin. Biochem. Rev.* 2016;37(1):3-15
- Davis-Dao C.A., Tuazon E.D., Sokol R.Z., Cortessis V.K. Male infertility and variation in CAG repeat length in the androgen receptor gene: a meta-analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007;92(11):4319-4326. DOI 10.1210/jc.2007-1110
- De Naeyer H., Bogaert V., De Spaey A., Roef G., Vandewalle S., Derave W., Taes Y., Kaufman J.M. Genetic variations in the androgen receptor are associated with steroid concentrations and anthropometrics but not with muscle mass in healthy young men. *PLoS One.* 2014;9(1):e86235. DOI 10.1371/journal.pone.0086235
- Folland J.P., Mc Cauley T.M., Phypers C., Hanson B., Mastana S.S. Relationship of 2D:4D finger ratio with muscle strength, testosterone, and androgen receptor CAG repeat genotype. *Am. J. Phys. Anthropol.* 2012;148(1):81-87. DOI 10.1002/ajpa.22044
- Frank G.R. Role of estrogen and androgen in pubertal skeletal physiology. *Med. Pediatr. Oncol.* 2003;41(3):217-221. DOI 10.1002/mpo.10340
- Goutou M., Sakka C., Stakias N., Stefanidis I., Koukoulis G.N. AR CAG repeat length is not associated with serum gonadal steroids and lipid levels in healthy men. *Int. J. Androl.* 2009;32(6):616-622. DOI 10.1111/j.1365-2605.2008.00908.x
- Grigorova M., Punab M., Kahre T., Ivandi M., Tõnisson N., Poolamets O., Vihlajev V., Žilaitienė B., Erenpreiss J., Matulevičius V., Laan M. The number of CAG and GGN triplet repeats in the androgen receptor gene exert combinatorial effect on hormonal and sperm parameters in young men. *Andrology.* 2017;5(3):495-504. DOI 10.1111/andr.12344
- Grimbos T., Dawood K., Burriss R.P., Zucker K.J., Puts D.A. Sexual orientation and the second to fourth finger length ratio: A meta-analysis in men and women. *Beh. Neurosci.* 2010;124(2):278-287. DOI 10.1037/a0018764
- Guadalupe-Grau A., Rodríguez-González F.G., Ponce-González J.G., Dorado C., Olmedillas H., Fuentes T., Pérez-Gómez J., Sanchis-Moysi J., Diaz-Chico B.N., Calbet J.A. Bone mass and the CAG and

- GGN androgen receptor polymorphisms in young men. *PLoS One*. 2010;5(7):e11529. DOI 10.1371/journal.pone.0011529
- Hönekopp J. No evidence that 2D:4D is related to the number of CAG repeats in the androgen receptor gene. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2013;4:185. DOI 10.3389/fendo.2013.00185
- Hönekopp J., Bartholdt L., Beier L., Liebert A. Second to fourth digit length ratio (2D:4D) and adult sex hormone levels: new data and a meta-analytic review. *Psychoneuroendocrinology*. 2007;32(4):313-321. DOI 10.1016/j.psyneuen.2007.01.007.
- Huhtaniemi I.T., Pye S.R., Limer K.L., Thomson W., O'Neill T.W., Platt H., Payne D., John S.L., Jiang M., Boonen S., Borghs H., Vanderschueren D., Adams J.E., Ward K.A., Bartfai G., Casanueva F., Finn J.D., Forti G., Giwercman A., Han T.S., Kula K., Lean M.E., Pendleton N., Punab M., Silman A.J., Wu F.C., European Male Ageing Study Group. Increased estrogen rather than decreased androgen action is associated with longer androgen receptor CAG repeats. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009;94(1):277-284. DOI 10.1210/jc.2008-0848
- Jägetoft Z., Unenge Hallerbäck M., Julin M., Bornehag C.G., Wikström S. Anthropometric measures do not explain the 2D:4D ratio sexual dimorphism in 7-year-old children. *Am. J. Hum. Biol.* 2022; 34(9):e23776. DOI 10.1002/ajhb.23776
- Khan H.L., Bhatti S., Abbas S., Khan Y.L., Aslamkhan M., Gonzalez R.M.M., Gonzalez G.R., Aydin H.H., Trinidad M.S. Tri-nucleotide consortium of androgen receptor is associated with low serum FSH and testosterone in asthenospermic men. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 2018;64(2):112-121. DOI 10.1080/19396368.2017.1384080
- Knickmeyer R.C., Woolson S., Hamer R.M., Konneker T., Gilmore J.H. 2D:4D ratios in the first 2 years of life: Stability and relation to testosterone exposure and sensitivity. *Horm. Behav.* 2011;60(3):256-263. DOI 10.1016/j.yhbeh.2011.05.009
- Ma Y.M., Wu K.J., Ning L., Zeng J., Kou B., Xie H.J., Ma Z.K., Wang X.Y., Gong Y.G., He D.L. Relationships among androgen receptor CAG repeat polymorphism, sex hormones and penile length in Han adult men from China: a cross-sectional study. *Asian J. Androl.* 2014;16(3):478-481. DOI 10.4103/1008-682X.124560
- Manning J., Kilduff L., Cook C., Crewther B., Fink B. Digit Ratio (2D:4D): A biomarker for prenatal sex steroids and adult sex steroids in challenge situations. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2014;5:9. DOI 10.3389/fendo.2014.00009
- McIntyre M.H. The use of digit ratios as markers for perinatal androgen action. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2006;4:10. DOI 10.1186/1477-7827-4-10
- Mitsui T., Araki A., Imai A., Sato S., Miyashita C., Ito S., Sasaki S., Kitta T., Moriya K., Cho K., Morioka K., Kishi R., Nonomura K. Effects of prenatal Leydig cell function on the ratio of the second to fourth digit lengths in school-aged children. *PLoS One*. 2015;10(3): e0120636. DOI 10.1371/journal.pone.0120636
- Muller D.C., Giles G.G., Bassett J., Morris H.A., Manning J.T., Hopper J.L., English D.R., Severi G. Second to fourth digit ratio (2D:4D) and concentrations of circulating sex hormones in adulthood. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2011;9:57. DOI 10.1186/1477-7827-9-57
- Nenonen H., Björk C., Skjaerpe P.A., Giwercman A., Rylander L., Svartberg J., Giwercman Y.L. CAG repeat number is not inversely associated with androgen receptor activity in vitro. *Mol. Hum. Reprod.* 2010;16(3):153-157. DOI 10.1093/molehr/gap097.
- Osadchuk L.V., Osadchuk A.V. Role of CAG and GGC polymorphism in the androgen receptor gene in male fertility. *Russ. J. Genet.* 2022; 58(3):247-264. DOI 10.1134/S1022795422020119
- Osadchuk L., Vasiliev G., Kleshchev M., Osadchuk A. Androgen receptor gene CAG repeat length varies and affects semen quality in an ethnic-specific fashion in young men from Russia. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(18):10594. DOI 10.3390/ijms231810594
- Richards G., Browne W.V., Aydin E., Constantinescu M., Nave G., Kim M.S., Watson S.J. Digit ratio (2D:4D) and congenital adrenal hyperplasia (CAH): Systematic literature review and meta-analysis. *Horm. Behav.* 2020;126:104867. DOI 10.1016/j.yhbeh.2020.104867
- Rodríguez-García L., Ponce-González J.G., González-Henriquez J.J., Rodríguez-González F.G., Díaz-Chico B.N., Calbet J.A., Serrano-Sánchez J.A., Dorado C., Guadalupe-Grau A. Androgen receptor CAG and GGN repeat polymorphisms and bone mass in boys and girls. *Nutr. Hosp.* 2015;32(6):2633-2639. DOI 10.3305/nh.2015.32.6.9767
- Ryan C.P., McDade T.W., Gattler L.T., Eisenberg D.T., Rzhetskaya M., Hayes M.G., Kuzawa C.W. Androgen receptor CAG repeat polymorphism and hypothalamic-pituitary-gonadal function in Filipino young adult males. *Am. J. Hum. Biol.* 2017;29(1):e22897. DOI 10.1002/ajhb.22897
- Swift-Gallant A., Johnson B.A., Di Rita V., Breedlove S.M. Through a glass, darkly: Human digit ratios reflect prenatal androgens, imperfectly. *Horm. Beh.* 2020;120:104686. DOI 10.1016/j.yhbeh.2020.104686
- Voorhoeve P.G., van Mechelen W., Uitterlinden A.G., Delemarre-van de Waal H.A., Lamberts S.W. Androgen receptor gene CAG repeat polymorphism in longitudinal height and body composition in children and adolescents. *Clin. Endocrinol.* 2011;74(6):732-735. DOI 10.1111/j.1365-2265.2011.03986.x
- Wang Y., Wei Y., Tang X., Liu B., Shen L., Long C., Lin T., He D., Wu S., Wei G. Association between androgen receptor polymorphic CAG and GGC repeat lengths and cryptorchidism: A meta-analysis of case-control studies. *J. Pediatr. Urol.* 2018;14(5):432.e1-432.e9. DOI 10.1016/j.jpuro.2018.05.011
- Wrzosek M., Woźniak J., Włodarek D. The causes of adverse changes of testosterone levels in men. *Expert. Rev. Endocrinol. Metab.* 2020; 15(5):355-362. DOI 10.1080/17446651.2020.1813020
- Xiao F., Lan A., Lin Z., Song J., Zhang Y., Li J., Gu K., Lv B., Zhao D., Zeng S., Zhang R., Zhao W., Pan Z., Deng X., Yang X. Impact of CAG repeat length in the androgen receptor gene on male infertility – a meta-analysis. *Reprod. Biomed. Online.* 2016;33(1):39-49. DOI 10.1016/j.rbmo.2016.03.012
- Xu Y., Zheng Y. The digit ratio (2D:4D) in China: A meta-analysis. *Am. J. Hum. Biol.* 2015;27(3):304-309. DOI 10.1002/ajhb.22639
- Zhang C., Dang J., Pei L., Guo M., Zhu H., Qu L., Jia F., Lu H., Huo Z. Relationship of 2D:4D finger ratio with androgen receptor CAG and GGN repeat polymorphism. *Am. J. Hum. Biol.* 2013;25(1):101-106. DOI 10.1002/ajhb.22347
- Zheng Z., Cohn M.J. Developmental basis of sexually dimorphic digit ratios. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011;108(39):16289-16294. DOI 10.1073/pnas.1108312108
- Zitzmann M., Nieschlag E. The CAG repeat polymorphism within the androgen receptor gene and maleness. *Int. J. Androl.* 2003;26(2): 76-83. DOI 10.1046/j.1365-2605.2003.00393.x

ORCID

L.V. Osadchuk orcid.org/ 0000-0002-7597-9204
G.V. Vasiliev orcid.org/ 0000-0003-0929-6832
A.V. Osadchuk orcid.org/ 0000-0002-4210-7354

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 19-15-00075-П.


Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 05.05.2023. После доработки 13.06.2023. Принята к публикации 14.06.2023.

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

Генетическая история коряков и эвенов Магаданской области по данным о полиморфизме Y-хромосомы

Б.А. Малярчук , М.В. Деренко

Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения Российской академии наук, Магадан, Россия
 malyarchuk@ibpn.ru

Аннотация. Для прояснения истории формирования генофондов коренного населения Северного Приохотья изучен полиморфизм Y-хромосомы у коряков и эвенов Магаданской области. Результаты исследования показали, что мужской генофонд коряков представлен гаплогруппами C-B90-B91, N-B202, Q-B143, распространенными также у других народов Северо-Востока Сибири преимущественно палеоазиатского происхождения. Для эвенов Магаданской области характерна высокая частота гаплогруппы C-B80, свойственной и для других тунгусо-маньчжурских народов. Общим компонентом генофондов коряков и эвенов являются гаплогруппы R-M17 и I-P37.2, унаследованные в результате метисации с пришлым восточноевропейским (преимущественно русским) населением. Высокая частота такого рода гаплогрупп Y-хромосомы у коряков (16.7 %) и эвенов (37.8 %) свидетельствует об интенсивных межэтнических контактах на протяжении последних столетий, и особенно, по всей видимости, в советское время. Причем генетический вклад со стороны европейских мужчин (по Y-хромосоме) существенно преобладает над таковым со стороны женщин (по митохондриальной ДНК). Исследование разнообразия гаплогрупп Y-хромосомы показало, что в генофонде коряков сохранились только относительно молодые филогенетические ветви. Возраст наиболее древнего компонента генофонда коряков (гаплогруппа C-B90-B91) оценивается примерно в 3.8 тыс. лет, возраст более молодых гаплогрупп Q-B143 и N-B202 составляет примерно 2.8 и 2.4 тыс. лет соответственно. Гаплогруппы C-B90-B91 и N-B202 являются сибирскими по происхождению, а гаплогруппа Q-B143, вероятно, унаследована предками коряков (и других палеоазиатских народов) от палеоэскимосов в результате их миграций на Северо-Восток Азии из Америки. Анализ микросателлитных локусов для гаплогруппы Q-B143 у эскимосов Гренландии, Канады и Аляски, а также у представителей коренного населения Северо-Востока Сибири выявил снижение генетического разнообразия с востока на запад, что указывает на направление распространения палеоэскимосского генетического компонента в циркумполярном регионе Америки и Азии. Эвены же появились в Северном Приохотье намного позже (в XVII в.) в результате экспансии тунгусских племен, что подтверждается данными анализа полиморфизма гаплогруппы C-B80.

Ключевые слова: Y-хромосома; полиморфизм; популяции человека; коряки; эвены; генетическая история.

Для цитирования: Малярчук Б.А., Деренко М.В. Генетическая история коряков и эвенов Магаданской области по данным о полиморфизме Y-хромосомы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(1):90-97. DOI 10.18699/vjgb-24-11

Genetic history of the Koryaks and Evens of the Magadan region based on Y chromosome polymorphism data

Б.А. Malyarchuk , M.V. Derenko

Institute of Biological Problems of the North of the Far-Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Magadan, Russia
 malyarchuk@ibpn.ru

Abstract. In order to clarify the history of gene pool formation of the indigenous populations of the Northern Priokhotye (the northern coast of the Sea of Okhotsk), Y-chromosome polymorphisms were studied in the Koryaks and Evens living in the Magadan region. The results of the study showed that the male gene pool of the Koryaks is represented by haplogroups C-B90-B91, N-B202, and Q-B143, which are also widespread in other peoples of Northeastern Siberia, mainly of Paleo-Asiatic origin. High frequency of haplogroup C-B80, typical of other Tungus-Manchurian peoples, is characteristic of the Evens of the Magadan region. The shared components of the gene pools of the Koryaks and Evens are haplogroups R-M17 and I-P37.2 inherited as a result of admixture with Eastern Europeans (mainly Russians). The high frequency of such Y chromosome haplogroups in the Koryaks (16.7 %) and Evens (37.8 %) is indicative of close interethnic contacts during the last centuries, and most probably especially during the Soviet period. The genetic contribution of the European males' Y chromosome significantly prevails over that of maternally inherited mitochondrial DNA. The study of the Y chromosome haplogroup diversity has shown that only relatively young phylogenetic branches have been preserved in the Koryak gene pool. The age of the oldest component of the Koryak gene pool (haplogroup C-B90-B91) is estimated to be about 3.8 thousand years, the

age of the younger haplogroups Q-B143 and N-B202 is about 2.8 and 2.4 thousand years, respectively. Haplogroups C-B90-B91 and N-B202 are Siberian in origin, and haplogroup Q-B143 was apparently inherited by the ancestors of the Koryaks and other Paleo-Asiatic peoples from the Paleo-Eskimos as a result of their migrations to Northeast Asia from the Americas. The analysis of microsatellite loci for haplogroup Q-B143 in the Eskimos of Greenland, Canada and Alaska as well as in the indigenous peoples of Northeastern Siberia showed a decrease in genetic diversity from east to west, pointing to the direction of distribution of the Paleo-Eskimo genetic component in the circumpolar region of America and Asia. At the same time, the Evens appeared in the Northern Priokhotye much later (in the XVII century) as a result of the expansion of the Tungusic tribes, which is confirmed by the results of the analysis of haplogroup C-B80 polymorphisms.

Key words: Y chromosome; polymorphism; human populations; the Koryaks; the Evens; genetic history.

For citation: Malyarchuk B.A., Derenko M.V. Genetic history of the Koryaks and Evens of the Magadan region based on Y chromosome polymorphism data. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(1):90-97. DOI 10.18699/vjgb-24-11

Введение

Крайний Северо-Восток Сибири населен чукотско-камчатскими народами (чукчами, коряками, ительменами) и эскимосами, которые характеризуются генетическими особенностями и занимают обособленное положение среди этногеографических групп Северной Евразии (Rasmussen et al., 2010; Fedorova et al., 2013; Cardona et al., 2014; Pagani et al., 2016; Pugach et al., 2016; Gorin et al., 2022). Согласно палеогеномным данным, генетическое своеобразие этих народов связано с сохранившимся у них древним палеосибирским генетическим субстратом, унаследованным отчасти также индейцами Америки (Sikora et al., 2019). Между тем результаты анализа полиморфизма аутосомных локусов у коренного населения Сибири показали, что на востоке этого региона появление аллелей европейского происхождения регистрируется относительно недавно – примерно три-шесть поколений назад, что связано с освоением Сибири начиная с XVII в. и особенно интенсивно в советское время (Cardona et al., 2014). Причем поток европейских генов в генофонды коренного населения Северо-Восточной Сибири осуществлялся преимущественно со стороны мужчин (Балановская и др., 2020а, б; Агджоян и др., 2021; Соловьев и др., 2023). В связи с этим вклад европейских вариантов Y-хромосомы в генофонды коренных народов Северо-Востока Сибири и других регионов Арктики обычно превышает таковой для европейских вариантов митохондриальной ДНК (мтДНК), наследуемой по материнской линии (Bosch et al., 2003; Rubicz et al., 2010; Dulik et al., 2012; Olofsson et al., 2015).

Результаты генетических исследований коренного населения Северного Приохотья – коряков и эвенов Магаданской области, показали, что частота европейских вариантов мтДНК у них очень мала (лишь у эвенов достигает 4 %) (Derenko et al., 2023), а по данным полногеномного анализа частота европейского компонента на Северо-Востоке Сибири существенно выросла лишь за последние примерно сто лет (Cardona et al., 2014). По всей видимости, это может быть связано с усилением европейского вклада со стороны мужчин, и поэтому целью настоящей работы является проведение анализа полиморфизма Y-хромосомы у коренного населения Магаданской области.

Материалы и методы

Исследованы выборки мужчин из числа представителей коренного населения (коряков и эвенов) Магаданской об-

ласти (Приложения 1 и 2)¹. На основании данных анкетирования обследованные коряки ($N = 36$) и эвены ($N = 61$) относили себя к указанным этническим группам на протяжении не менее двух-трех поколений. По результатам анализа полиморфизма мтДНК все обследованные характеризуются гаплотипами северо-восточноазиатского происхождения.

Выделение и очистку геномной ДНК из крови проводили как описано нами ранее (Деренко, Мальярчук, 2010). Для генотипирования 12 микросателлитных (STR) локусов (DYS19, DYS385a, DYS385b, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS437, DYS438, DYS439) использовали набор реагентов PowerPlex Y System (Promega Corporation, Мэдисон, США). Аллели разделяли и детектировали с помощью капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Данные электрофореза анализировали с помощью программ GenScan v. 3.7 и Genotyper v. 3.7 (Applied Biosystems). При проведении статистического анализа не учитывали данные для DYS385, поскольку неизвестен порядок следования локусов DYS385a и DYS385b на Y-хромосоме. Число повторов в локусе DYS389II определяли путем вычитания длины меньшего повтора (DYS389I) из длины большего повтора (DYS389II).

Гаплогруппы Y-хромосомы устанавливали с помощью прямого секвенирования или рестрикционного анализа участков ДНК, содержащих маркеры гаплогрупп, как описано нами ранее (Malyarchuk et al., 2013). Информация об изменчивости в локусах B77, B79, B80, B81, B90, B91, B92, B94, B143, B186, B202, B203, B204, B471 получена ранее в ходе исследования полиморфизма целых Y-хромосом в различных этнических группах, включая некоторых коряков и эвенов Магаданской области (Karmin et al., 2015).

Для оценки внутрипопуляционного генетического разнообразия использовали статистику V_p – усредненную дисперсию числа повторов в STR-локусах (Kayser et al., 2001). Эволюционный возраст гаплогрупп рассчитывали, основываясь на анализе среднего числа повторов в локусах и их дисперсии (Zhivotovsky et al., 2004). Использованное в расчетах значение мутационной скорости – $2.79 \cdot 10^{-3}$ замен на локус на поколение, получено в результате усреднения мутационных скоростей для

¹ Приложения 1 и 2 см. по адресу:
<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2024-28/appx4.pdf>

10 проанализированных локусов Y-хромосомы, согласно (Ballantyne et al., 2010). Для конструирования медианных сетей STR-гаплотипов Y-хромосомы применяли программу Network 10.2 (www.fluxus-engineering.com).

Результаты и обсуждение

Результаты исследования полиморфизма Y-хромосомы показали, что мужской генофонд коряков Магаданской области представлен в основном гаплогруппами С, N и Q (табл. 1). Европейские линии у коряков обнаружены с частотой 16.7 % в виде гаплогрупп R-M17, I-M253, I-P37.2 и J-M314. У эвенов частота европейских линий еще выше – 37.8 %. Они представлены гаплогруппами R-M17, R-M269, I-P37.2, а также N-B186, которая характерна для народов Северо-Восточной Европы (Karmin et al., 2015). Восточноазиатский компонент генофонда эвенов состоит из различных подгрупп гаплогруппы С (суммарно 55.7 %). Кроме того, у эвенов зарегистрированы гаплотипы, относящиеся к гаплогруппе Q-M3, которая распространена у американских индейцев и эскимосов.

Варианты гаплогруппы С у коряков и эвенов значительно различаются. У коряков выявлены подгруппы, маркированные вариантами полиморфизма в локусах В90 и В91, а у эвенов – в локусе В80. По данным полногеномных исследований известно, что маркер В90 специфичен для Y-хромосом коренного населения Северо-Восточной Сибири (коряков, эвенков, ульчей) (Karmin et al., 2015; Балановская и др., 2018), а подгруппа В91 обнаружена только у коряков (Karmin et al., 2015). Ее частота у коряков составляет 27.8 % (см. табл. 1). Согласно результатам молекулярного датирования, основанного на анализе полиморфизма, связанного с однонуклеотидными заменами в Y-хромосомах (ОНП), возраст подгруппы В91 оценивается в 3.8 (3.0–4.7) тыс. лет (Karmin et al., 2015). Возраст вышестоящей подгруппы С-В90 составляет примерно 5.0 (4.2–5.7) тыс. лет. Исходя из сходства STR-профилей, В90-гаплотипы, по всей видимости, распространены преимущественно на Северо-Востоке Сибири, поскольку, кроме коряков, эвенков и ульчей, гомологичные STR-гаплотипы наблюдаются у якутов, юкагиров, ительменов и эвенов². В нашем исследовании у эвенов также обнаружен единичный гомологичный гаплотип, сходный по структуре с В90-гаплотипами, распространенными у коряков.

У эвенов главным образом получила распространение С-подгруппа, маркированная заменой в локусе В80 (см. табл. 1). Известно, что В80-гаплотипы характерны и для других тунгусо-маньчжурских народов (ороченов, эвенков, маньчжуров) (Yu et al., 2023). Эволюционный возраст этой подгруппы по ОНП-данным составляет 1.7 (1.2–2.2) тыс. лет (Karmin et al., 2015). Результаты анализа, проведенного Н.-Х. Yu с коллегами (Yu et al., 2023), показали, что возраст подгруппы В80 оценивается примерно в 2 тыс. лет, а гаплотипы В81 и В471, специфичные для эвенов, возникли в Приамурье и распространились на Северо-Востоке Сибири в результате миграций предков тунгусов в последние примерно 1.5 тыс. лет.

Таблица 1. Частота (в %) гаплогрупп Y-хромосомы у коряков и эвенов Магаданской области

Гаплогруппа	Коряки (N = 36)	Эвены (N = 61)
C-M217-M48-B90-B91-B92	13.9	0
C-M217-M48-B90-B91-B94	13.9	0
C-M217-M48-B90	0	1.6
C-M217-M48-B80-B81	0	16.4
C-M217-M48-B80-B471	0	26.2
C-M217-M48	2.8	11.5
C-M217-B77	2.8	0
C-M217-B79	2.8	0
C-M217	2.8	0
N-B202-B203	5.6	0
N-B202-B204	19.4	0
N-B186	0	3.3
N-M46	0	3.3
Q-B143	16.7	0
Q-M346-M3	0	3.3
O-M122	2.8	0
R-M17	8.3	27.9
R-M269	0	3.3
I-M253	2.8	0
I-P37.2	2.8	3.3
J-M314	2.8	0

Гаплогруппа N у коряков Магаданской области представлена исключительно ветвью N-B202 (25 %). Данная подгруппа преобладает в генофонде чукчей (Karmin et al., 2015; Plumäe et al., 2016; Агджоян и др., 2021), а также встречается у соседних народов – ительменов и эскимосов (Агджоян и др., 2021). Возраст ветви N-B202 составляет примерно 2.4 (1.8–3.1) тыс. лет (Plumäe et al., 2016). Эта гаплогруппа состоит из двух подгрупп – более древней N-B204 (возраст по разнообразию STR-гаплотипов оценивается в ~1.4 тыс. лет) и более молодой N-B203 (~600 лет) (Агджоян и др., 2021). У чукчей обе подгруппы распространены примерно в равной степени, у коряков преобладает более древняя подгруппа N-B204 (см. Приложение 1). У эвенов Магаданской области гаплогруппа N зарегистрирована с небольшой частотой (6.6 %) и представлена разнородными гаплотипами. В этом отношении магаданские эвены похожи на камчатских и отличаются от охотских эвенов, у которых с частотой 10 % выявлена «приамурская» подгруппа N-B479 (Агджоян и др., 2019).

Гаплогруппа Q маркирует собой древнейший компонент генофондов коренного населения Сибири и Америки. Гаплогруппа Q-F903 обнаружена у верхнепалеолитического обитателя Восточной Сибири (стоянка Афонтова гора, возраст ~17 тыс. лет) (Raghavan et al., 2014), а на северо-востоке Сибири (стоянка Дуванный Яр, возраст ~10 тыс. лет) выявлена гаплогруппа Q-B143 (Sikora et

² Адамов Д.С. Сводная таблица Y-STR гаплотипов гаплогруппы C-M48 якутов-саха. 2019. URL: <https://www.researchgate.net/profile/Dmitry-Adamov/publications/> (дата обращения: 05.09.2023).

al., 2019). Эта же гаплогруппа зарегистрирована у представителя палеоэскимосской культуры Саккак, жившего в Гренландии примерно 4 тыс. лет назад (Rasmussen et al., 2010). Сейчас гаплогруппа Q-B143 распространена только среди коренного населения Крайнего Севера Америки, Гренландии и Сибири (Malyarchuk et al., 2011; Karmin et al., 2015; Grugni et al., 2019; Luis et al., 2023). У коряков Магаданской области эта Q-гаплогруппа обнаружена с частотой 16.7 % (см. табл. 1). По косвенным данным (частотам гаплогрупп Q(xM346) и Q-NWT01, а также сходству STR-гаплотипов) гаплогруппа Q-B143 присутствует у коряков Камчатки (с частотой от 6 до 18 %)³ (Karafet et al., 2018), у чукчей (13 %)³, юкагигов (30.8 %) (Pakendorf et al., 2006), а также с высокими частотами (до 50 %) отмечается у эскимосов Аляски, Канады и Гренландии (Dulik et al., 2012; Olofsson et al., 2015; Luis et al., 2023).

Присутствие гаплогруппы Q-B143 на Северо-Востоке Сибири 10 тыс. лет назад и в настоящее время позволяет предположить, что это древнейший сибирский компонент, непрерывно присутствовавший в генофондах палеоазиатских народов и их предков. Археологические данные, а также результаты исследования полиморфизма гаплогруппы Q показали, что около 5 тыс. лет назад носители гаплогруппы Q-B143 (а также не достигшие успеха носители Q-L713 и Q-preM120) мигрировали из Сибири в Америку, а затем в Гренландию и стали основателями палеоэскимосской культуры (Grugni et al., 2019). Между тем, по результатам датирования гаплотипов Q-B143, возраст этой гаплогруппы у современных коряков составляет всего ~2.8 тыс. лет, что указывает на возможность обратной миграции носителей этих гаплотипов (по всей видимости, палеоэскимосов) из Северной Америки на Северо-Восток Азии (Grugni et al., 2019). Аналогично исследования изменчивости STR-локусов в пределах гаплогруппы Q-B143 у гренландских и североамериканских эскимосов показали, что разнообразие и эволюционный возраст гаплотипов у гренландских эскимосов выше, чем у эскимосов Канады и Аляски, в связи с чем авторы предположили, что гаплогруппа Q-B143 распространялась палеоэскимосами с востока на запад Америки и, более того, стала одним из основных компонентов генофонда неэскимосов, сформировавшихся, скорее всего, на севере Америки примерно 700 лет назад (Olofsson et al., 2015; Luis et al., 2023).

Поскольку J.R. Luis с коллегами (Luis et al., 2023) не изучали гаплотипы Q-B143 у коренного населения Северо-Востока Азии, мы проанализировали разнообразие STR-гаплотипов в выборках эскимосов Гренландии, Канады и Аляски по данным (Dulik et al., 2012; Olofsson et al., 2015; Luis et al., 2023), а также у коряков, юкагигов и эскимосов Чукотки по данным (Pakendorf et al., 2006; Luis et al., 2023), а также настоящей работы. Результаты этого исследования показали, что действительно на Северо-Востоке Азии, в сравнении с Гренландией и Северной Америкой, наблюдается самое низкое разнообразие Q-B143-гаплотипов. Это свидетельствует о том, что они

³ Харьков В.Н. Структура и филогеография генофонда коренного населения Сибири по маркерам Y-хромосомы: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Томск, 2012.

Таблица 2. Разнообразие и эволюционный возраст STR-гаплотипов Q-B143 у эскимосских и палеоазиатских народов

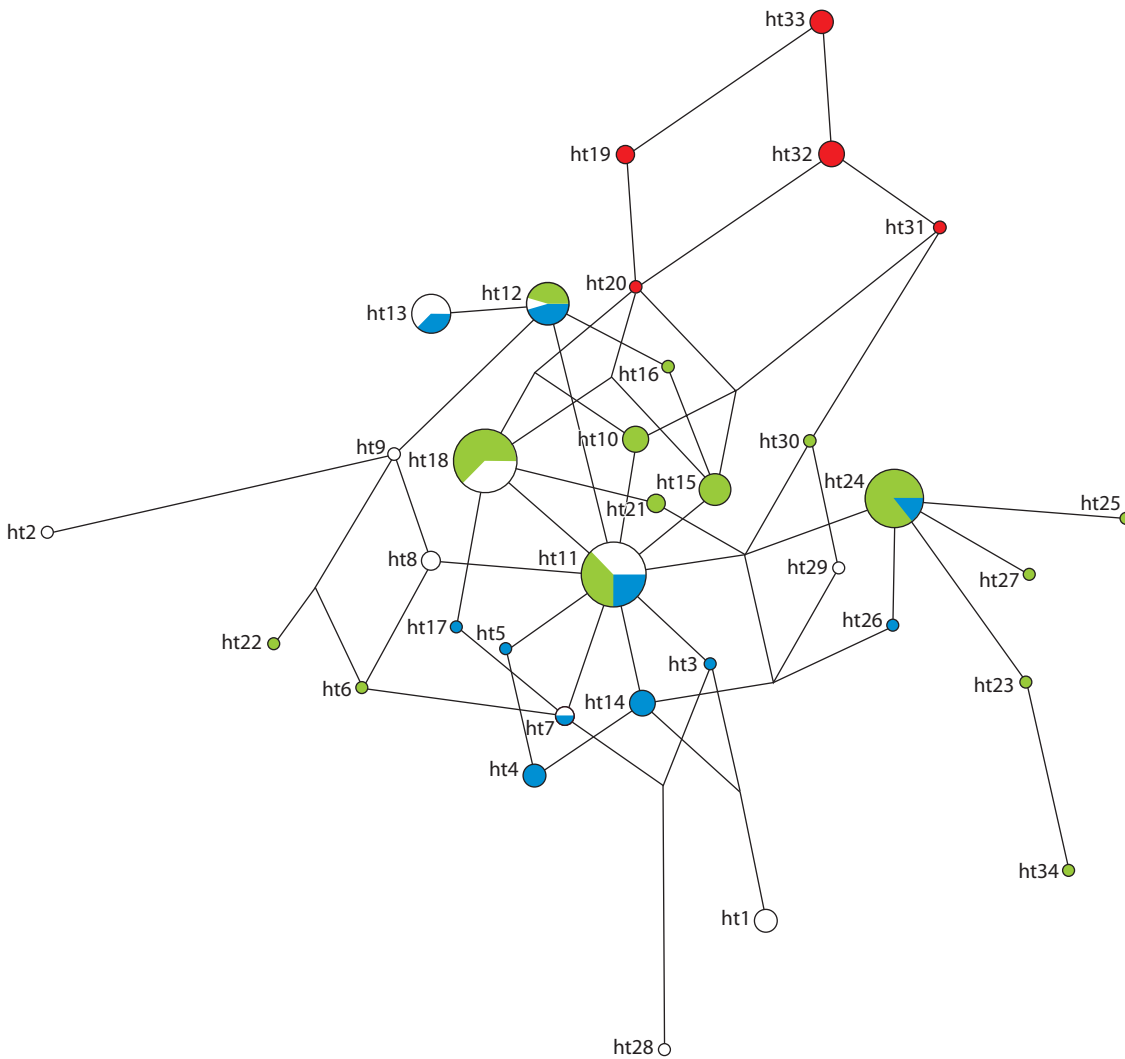
Регион	N	n	Vp	Возраст, тыс. лет
Северо-Восточная Азия	12	6	0.058	0.747 ± 0.401
Аляска	34	18	0.181	1.842 ± 0.525
Канада	28	20	0.160	1.703 ± 0.769
Гренландия	70	27	0.208	2.456 ± 1.188

Примечание. N – размер выборки; n – количество STR-гаплотипов; Vp – дисперсия числа повторов в STR-локусах.

появились на Северо-Востоке Азии позже, чем в Северной Америке и Гренландии (табл. 2).

Необходимо отметить несоответствие датировок, полученных по STR-маркерам и по полногеномным ОНП-данным, поскольку эволюционный возраст гаплогруппы Q-B143 у коряков по полногеномным данным (2.8 ± ±0.9 тыс. лет согласно (Grugni et al., 2019)) превышает таковой по STR-данным для коренного населения Северо-Востока Сибири (0.7 ± 0.4 тыс. лет) (см. табл. 2). Это объясняется, скорее всего, очень большим несоответствием числа вариабельных позиций для сравниваемых генетических систем, высокой вероятностью повторных (прямых и обратных) мутаций для быстро эволюционирующих STR-локусов и зависимостью такого рода мутационных событий от возраста гаплогрупп, в связи с чем, по всей видимости, только для молодых ветвей-кластеров возможно получить STR-датировки, близкие к полногеномным (Агджоян и др., 2021). Таким образом, если ориентироваться на полногеномные датировки (как более точные), то можно предположить, что появление гаплогруппы Q-B143 на Северо-Востоке Азии произошло задолго до появления неэскимосов и связано с миграциями палеоэскимосов. О возможности такого рода событий свидетельствуют археологические данные, согласно которым палеоэскимосская культурная традиция появилась на Чукотке примерно 3.0–3.5 тыс. лет назад (стоянки Чертов Овраг на о. Врангеля и поселение Уненен), а также в Северном Приохотье у представителей токаревской культуры (вероятных предков коряков) примерно 2.8 тыс. лет назад (Гребенюк и др., 2019). Низкий уровень разнообразия северо-восточносибирских STR-гаплотипов и их периферийное положение в медианной сети среди всего множества Q-B143-гаплотипов арктических народов указывают на очень малое число успешных (в репродуктивном отношении) миграций палеоэскимосов на азиатское побережье (см. рисунок). По сути, наиболее вероятным предком для остальных гаплотипов, выявленных у коряков и юкагигов, является единственный гаплотип ht20 (см. рисунок).

Низкий уровень гетерогенности Q-B143-гаплотипов у коренного населения Северо-Востока Сибири свидетельствует также о том, что в их генофондах не сохранились те самые древние гаплотипы, на основе которых форми-



Медианная сеть STR-гаплотипов, относящихся к гаплогруппе Q-B143 Y-хромосомы, у эскимосов Гренландии (зеленый цвет), Канады (синий цвет), Аляски (белый цвет) и у коренного населения Северо-Востока Сибири (коряки, юкагиры, эскимосы) (красный цвет).

ровались гаплотипы палеоэскимосов на севере Америки и в Гренландии. Это представляется вполне вероятным, учитывая низкую эффективную численность популяций Северо-Востока Сибири и усиливающуюся в этих условиях роль дрейфа генов, а также постоянное давление со стороны соседних сибирских популяций. Известно, что периоды почти полной смены населения происходили не раз на протяжении 35-тысячелетней истории населения Сибири (Sikora et al., 2019).

Следы более поздних контактов между неоэскимосами и палеоазиатскими народами фиксируются с помощью генетических данных очень надежно. Неоэскимосы сформировались на основе двух генетических компонентов – палеоэскимосского и палеоиндейского (Flegontov et al., 2019; Sikora et al., 2019). Причем палеоиндейский компонент неоэскимосов хорошо маркируется гаплогруппами мтДНК (A2a, A2b) и Y-хромосомы (Q-M3). Поэтому по присутствию этих гаплогрупп можно оценить генетический вклад со стороны неоэскимосов. По мтДНК у азиатских эскимосов и чукчей частота гаплогрупп A2a и

A2b очень высока, а из других палеоазиатских народов эти гаплогруппы отмечены только у коряков с частотой от 2.7 до 9.1 %⁴ (Derenko et al., 2023). По Y-хромосоме палеоиндейский вклад, маркируемый гаплогруппой Q-M3, у чукчей и камчатских коряков составляет 11.0 и 6.1 % соответственно⁵. В исследованной нами выборке коряков гаплогруппа Q-M3 не выявлена, однако у эвенов частота этой гаплогруппы составляет 3.3 % (см. табл. 1). Наиболее вероятная причина появления «американской» гаплогруппы Q-M3 у эвенов Магаданской области – межэтнические контакты либо с коряками, либо непосредственно с эскимосами или родственными им племенами, которые, согласно данным археологии, этнографии и лингвистики, могли проживать на Охотском побережье еще в начале 2-го тысячелетия н. э. (Бурыкин, 2001).

⁴ Стариковская Е.Б. Филогеография митогеномов коренного населения Сибири: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Новосибирск, 2016.

⁵ Харьков В.Н. Структура и филогеография генофонда коренного населения Сибири по маркерам Y-хромосомы: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Томск, 2012.

Высокий уровень межэтнической метисации на Северо-Востоке Сибири, отмеченный в ряде исследований (Хаховская, 2003; Балановская, 2020а, б), связан с хозяйственным освоением этого края сначала русскими землепроходцами, а затем, в советское время, многочисленными мигрантами, в основном восточноевропейского происхождения. В настоящей работе нами также обнаружена высокая частота гаплогрупп R, I и J, характерных для восточных европейцев (и русских, в частности) (Derenko et al., 2006; Balanovsky et al., 2008). У коряков их частота составила 16.7 %, а у эвенов – 37.8 % (см. табл. 1). Причем у эвенов разнообразие R-M17-гаплотипов значительно превышает таковое для присущей собственно эвенам гаплогруппы C-M217 ($V_p = 0.225$ и 0.1 соответственно). Между тем изучение полиморфизма наследуемой по материнской линии мтДНК у коряков и эвенов Магаданской области показало, что частота европейских вариантов мтДНК у них очень мала (до 4 % у эвенов) (Derenko et al., 2023). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о длительности процессов метисации коренного и пришлого населения на территории Магаданской области, а также о том, что со стороны пришлого населения в межэтнических браках участвовали преимущественно мужчины и большинство детей от таких браков записывались, по-видимому, как представители коренных народов, что характерно и для других районов Северо-Восточной Сибири согласно демографическим данным (Хаховская, 2003; Балановская и др., 2020б).

Заключение

Результаты проведенного исследования показали, что мужские генофонды коренного населения Магаданской области – коряков и эвенов – в структурном отношении существенно различаются. У коряков обнаружен специфический набор гаплогрупп Y-хромосомы, сходный с таковым для коренных народов Северо-Востока Азии: C-B90-B91, N-B202, Q-B143, тогда как для эвенов характерна высокая частота гаплогруппы C-B80, распространенной у тунгусо-маньчжурских народов. Общие для коряков и эвенов гаплогруппы, такие как R-M17 и I-P37.2, получены ими от пришлого восточноевропейского населения в результате метисации. Высокая частота такого рода гаплогрупп Y-хромосомы у коренного населения Магаданской области свидетельствует о достаточно интенсивных межэтнических контактах, преимущественно со стороны мужчин восточноевропейского происхождения. Анализ эволюционного возраста аборигенных гаплогрупп Y-хромосомы показал, что генофонды коряков и эвенов представлены относительно молодыми филогенетическими ветвями. У коряков возраст наиболее древнего компонента генофонда (гаплогруппа C-B91) оценивается примерно в 3.8 тыс. лет, позже в генофонде коряков появились гаплогруппы Q-B143 (примерно 2.8 тыс. лет назад) и N-B202 (примерно 2.4 тыс. лет назад). Причем гаплогруппа Q-B143, по всей видимости, унаследована предками коряков (а также других палеоазиатских народов) от палеоэскимосов в результате освоения ими Охотского побережья. Эвены появились в Северном Приохотье намного позже – в XVII в., в ходе экспансии тунгусских племен, что подтверждается результатами анализа полиморфизма гаплогруппы C-B80.

Список литературы / References

- Агджоян А.Т., Богунов Ю.В., Богунова А.А., Каменщикова Е.Н., Кагазежева Ж.А., Короткова Н.А., Чернышенко Д.Н., Пономарев Г.Ю., Утриван С.А., Кошель С.М., Балановский О.П., Балановская Е.В. Генетический портрет охотских и камчатских эвенов. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. XXIII. Антропология*. 2019;2:116-125. DOI 10.32521/2074-8132.2019.2.116-125
- [Agdzhoyan A.T., Bogunov Y.V., Bogunova A.A., Kamenshikova E.N., Kagazezheva Zh.A., Korotkova N.A., Chernyshenko D.N., Ponomarev G.Y., Utrivan S.A., Koshel S.M., Balanovsky O.P., Balanovska E.V. The genetic portrait of the Okhotsk and the Kamchatka Evens population. *Vestnik Moskovskogo Universiteta. Seria XXIII. Antropologia = Moscow University Anthropology Bulletin*. 2019;2:116-125. DOI 10.32521/2074-8132.2019.2.116-125 (in Russian)]
- Агджоян А.Т., Богунова А.А., Каменщикова Е.Н., Запороженко В.В., Богунов Ю.В., Балановский О.П., Балановская Е.В. Генетический портрет чукчей Камчатки (по развернутой панели маркеров Y-хромосомы). *Вестн. Моск. ун-та. Сер. XXIII. Антропология*. 2021;1:80-92. DOI 10.32521/2074-8132.2021.1.080-092
- [Agdzhoyan A.T., Bogunova A.A., Kamenshchikova E.N., Zaporozhchenko V.V., Bogunov Y.V., Balanovsky O.P., Balanovska E.V. The Chukchi of Kamchatka: a genetic portrait based on the wide array of Y-chromosome markers. *Vestnik Moskovskogo Universiteta. Seria XXIII. Antropologia = Moscow University Anthropology Bulletin*. 2021;1:80-92. DOI 10.32521/2074-8132.2021.1.080-092 (in Russian)]
- Балановская Е.В., Богунов Ю.В., Каменщикова Е.Н., Балаганская О.А., Агджоян А.Т., Богунова А.А., Схалыхо Р.А., Альборова И.Э., Жабагин М.К., Кошель С.М., Дараган Д.М., Борисова Е.Б., Галахова А.А., Мальцева О.В., Мустафин Х.Х., Янковский Н.К., Балановский О.П. Демографический и генетический портреты улчей. *Генетика*. 2018;54(10):1218-1227. DOI 10.1134/S0016675818100041
- [Balanovska E.V., Bogunov Y.V., Kamenshikova E.N., Balagan-skaya O.A., Agdzhoyan A.T., Bogunova A.A., Skhalyakho R.A., Alborova I.E., Zhabagin M.K., Koshel S.M., Daragan D.M., Borisova E.B., Galakhova A.A., Malteeva O.V., Mustafin Kh.Kh., Yankovsky N.K., Balanovsky O.P. Demographic and genetic portraits of the Ulchi population. *Russian Journal of Genetics*. 2018; 54(10):1245-1253. DOI 10.1134/S1022795418100046]
- Балановская Е.В., Богунов Ю.В., Богунова А.А., Каменщикова Е.Н., Чернышенко Д.Н., Пылев В.Ю., Балановский О.П., Лавряшина М.Б. Демографическая ситуация в чукотских селениях севера Камчатки. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. XXIII. Антропология*. 2020а;1:87-97. DOI 10.32521/2074-8132.2020.1.087-097
- [Balanovska E.V., Bogunov Y.V., Bogunova A.A., Kamenshchikova E.N., Chernyshenko D.N., Pylev V.Y., Balanovsky O.P., Lavryashina M.B. Demographic situation in Chukchi settlements from North Kamchatka. *Vestnik Moskovskogo Universiteta. Seria XXIII. Antropologia = Moscow University Anthropology Bulletin*. 2020а; 1:87-97. DOI 10.32521/2074-8132.2020.1.087-097 (in Russian)]
- Балановская Е.В., Богунов Ю.В., Богунова А.А., Каменщикова Е.Н., Пылев В.Ю., Бычковская Л.С., Балановский О.П., Лавряшина М.Б. Демографический портрет коряков севера Камчатки. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. XXIII. Антропология*. 2020б;4:111-122. DOI 10.32521/2074-8132.2020.4.111-122
- [Balanovska E.V., Bogunov Y.V., Bogunova A.A., Kamenshchikova E.N., Pylev V.Y., Bychkovskaya L.S., Balanovsky O.P., Lavryashina M.B. Demographic portrait of Koryaks from Northern Kamchatka. *Vestnik Moskovskogo Universiteta. Seria XXIII. Antropologia = Moscow University Anthropology Bulletin*. 2020б;4:111-122. DOI 10.32521/2074-8132.2020.4.111-122 (in Russian)]
- Бурькин А.А. Следы культуры эскимосов на Охотском побережье по археологическим, этнографическим, фольклорным и лингвистическим данным. *Сибирская заимка*. 2001. URL: <http://zaimka.ru/burykin-eskimos/> (дата обращения: 01.09.2023)

- [Burykin A.A. Traces of Eskimo culture on the coast of the Sea of Okhotsk according to archaeological, ethnographic, folkloristic and linguistic data. *Sibirskaya Zaimka*. 2001. URL: <http://zaimka.ru/burykin-eskimos/> (Reference date: 01.09.2023). (in Russian)]
- Гребенюк П.С., Федорченко А.Ю., Лебединцев А.И., Мальярчук Б.А. Древние культуры Крайнего Северо-Востока Азии и этногенетические реконструкции. *Том. журн. лингвистических и антропологических исследований*. 2019;2(24):110-136. DOI 10.23951/2307-6119-2019-2-110-136
- [Grebenuk P.S., Fedorchenko A.Y., Lebedintsev A.I., Malyarchuk B.A. The ancient cultures of the extreme Northeast Asia and ethnogenetic reconstructions. *Tomskiy Zhurnal Lingvistichekikh i Antropologicheskikh Issledovaniy = Tomsk Journal of Linguistics and Anthropology*. 2019;2(24):110-136. DOI 10.23951/2307-6119-2019-2-110-136 (in Russian)]
- Деренко М.В., Мальярчук Б.А. Молекулярная филогенетика населения Северной Евразии по данным об изменчивости митохондриальной ДНК. Магадан: СВНЦ ДВО РАН, 2010
- [Derenko M.V., Malyarchuk B.A. Molecular Phylogeography of Northern Eurasia Populations Based on Mitochondrial DNA Variability Data. Magadan: Far Eastern Scientific Center, Far Eastern Branch of the RAS, 2010 (in Russian)]
- Соловьев А.В., Борисова Т.В., Романов Г.П., Терьютин Ф.М., Пшеничкова В.Г., Никитина С.Е., Алексеев А.Н., Барашков Н.А., Федорова С.А. Генетическая история русских старожилов Арктического побережья Якутии из с. Русское Устье по данным Y-хромосомы и широкогеномного анализа. *Генетика*. 2023; 59(9):1070-1077. DOI 10.31857/S0016675823090114
- [Solovyev A.V., Borisova T.V., Romanov G.P., Teryutin F.M., Pshenichkova V.G., Nikitina S.E., Alekseev A.N., Barashkov N.A., Fedorova S.A. Genetic history of Russian Old-Settlers of the Arctic coast of Yakutia from the settlement of Russkoye Ust'ye inferred from Y chromosome data and genome-wide analysis. *Russian Journal of Genetics*. 2023;59(9):949-955. DOI 10.1134/S1022795423090119]
- Хаховская Л.Н. Камчадалы Магаданской области (история, культура, идентификация). Магадан: СВКНИИ ДВО РАН, 2003
- [Khakhovskaya L.N. Kamchadals of Magadan Oblast: history, culture, identification. Magadan: North-Eastern Interdisciplinary Research Institute, Far Eastern Branch of the RAS, 2003 (in Russian)]
- Balanovsky O., Rootsi S., Pshenichnov A., Kivisild T., Churnosov M., Evseeva I., Pocheshkhova E., Boldyreva M., Yankovsky N., Balanovska E., Vilems R. Two sources of the Russian patrilineal heritage in their Eurasian context. *Am. J. Hum. Genet.* 2008;82(1):236-250. DOI 10.1016/j.ajhg.2007.09.019
- Ballantyne K.N., Goedbloed M., Fang R., Schaap O., Lao O., Wollstein A., Choi Y., van Duijn K., Vermeulen M., Brauer S., Decorte R., Poetsch M., von Wurmb-Schwark N., de Knijff P., Labuda D., Vézina H., Knoblauch H., Lessig R., Roewer L., Ploski R., Dobosz T., Henke L., Henke J., Furtado M.R., Kayser M. Mutability of Y-chromosomal microsatellites: rates, characteristics, molecular bases, and forensic implications. *Am. J. Hum. Genet.* 2010;87(3):341-353. DOI 10.1016/j.ajhg.2010.08.006
- Bosch E., Calafell F., Rosser Z.H., Norby S., Lynnerup N., Hurles M.E., Jobling M.A. High level of male-biased Scandinavian admixture in Greenlandic Inuit shown by Y-chromosomal analysis. *Hum. Genet.* 2003;112(4):353-363. DOI 10.1007/s00439-003-091
- Cardona A., Pagani L., Antao T., Lawson D.J., Eichstaedt C.A., Yngvadottir B., Shwe M.T.T., Wee J., Romero I.G., Raj S., Metspalu M., Vilems R., Willerslev E., Tyler-Smith C., Malyarchuk B.A., Derenko M.V., Kivisild T. Genome-wide analysis of cold adaptation in indigenous Siberian populations. *PLoS One*. 2014;9(5):e98076. DOI 10.1371/journal.pone.0098076
- Derenko M., Malyarchuk B., Denisova G., Wozniak M., Dambueva I., Dorzhu C., Luzina F., Miscicka-Sliwka D., Zakharov I. Contrasting patterns of Y-chromosome variation in South Siberian populations from Baikal and Altay-Sayan regions. *Hum. Genet.* 2006;118(5): 591-604. DOI 10.1007/s00439-005-0076-y
- Derenko M., Denisova G., Litvinov A., Dambueva I., Malyarchuk B. Mitogenomics of the Koryaks and Evens of the northern coast of the Sea of Okhotsk. *J. Hum. Genet.* 2023;68(10):705-712. DOI 10.1038/s10038-023-01173-x
- Dulik M.C., Owings A.C., Gaieski J.B., Vilar M.G., Andre A., Lennie C., Mackenzie M.A., Kritsch I., Snowshoe S., Wright R., Martin J., Gibson N., Andrews T.D., Schurr T.G., Genographic Consortium. Y-chromosome analysis reveals genetic divergence and new founding native lineages in Athapaskan- and Eskimoan-speaking populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012;109(22):8471-8476. DOI 10.1073/pnas.1118760109
- Fedorova S.A., Reidla M., Metspalu E., Metspalu M., Rootsi S., Tambets K., Trofimova N., Zhadanov S.I., Hooshiar Kashani B., Olivieri A., Voevoda M.I., Osipova L.P., Platonov F.A., Tomsy M.I., Khusnutdinova E.K., Torroni A., Vilems R. Autosomal and uniparental portraits of the native populations of Sakha (Yakutia): implications for the peopling of Northeast Eurasia. *BMC Evol. Biol.* 2013;13:127. DOI 10.1186/1471-2148-13-127
- Flegontov P., Altınışık N.E., Changmai P., Rohland N., Mallick S., Adamski N., Bolnick D.A., Broomandkhoshbacht N., Candilio F., Culleton B.J., Flegontova O., Friesen T.M., Jeong C., Harper T.K., Keating D., Kennett D.J., Kim A.M., Lamnidis T.C., Lawson A.M., Olalde I., Oppenheimer J., Potter B.A., Raff J., Sattler R.A., Skoglund P., Stewardson K., Vajda E.J., Vasilyev S., Veselovskaya E., Hayes M.G., O'Rourke D.H., Krause J., Pinhasi R., Reich D., Schiffels S. Palaeo-Eskimo genetic ancestry and the peopling of Chukotka and North America. *Nature*. 2019;570(7760):236-240. DOI 10.1038/s41586-019-1251-y
- Gorin I., Balanovsky O., Kozlov O., Koshel S., Kostryukova E., Zhabagin M., Agdzhoyan A., Pylev V., Balanovska E. Determining the area of ancestral origin for individuals from North Eurasia based on 5,229 SNP markers. *Front. Genet.* 2022;13:902309. DOI 10.3389/fgene.2022.902309
- Grugni V., Raveane A., Ongaro L., Battaglia V., Trombetta B., Colombo G., Capodiferro M.R., Olivieri A., Achilli A., Perego U.A., Motta J., Tribaldos M., Woodward S.R., Ferretti L., Cruciani F., Torroni A., Semino O. Analysis of the human Y-chromosome haplogroup Q characterizes ancient population movements in Eurasia and the Americas. *BMC Biol.* 2019;17(1):3. DOI 10.1186/s12915-018-0622-4
- Illumäe A.M., Reidla M., Chukhryaeva M., Järve M., Post H., Karmin M., Saag L., Agdzhoyan A., Kushniarevich A., Litvinov S., Ekomasova N., Tambets K., Metspalu E., Khusainova R., Yunusbayev B., Khusnutdinova E.K., Osipova L.P., Fedorova S., Utevska O., Koshel S., Balanovska E., Behar D.M., Balanovsky O., Kivisild T., Underhill P.A., Vilems R., Rootsi S. Human Y chromosome haplogroup N: a non-trivial time-resolved phylogeography that cuts across language families. *Am. J. Hum. Genet.* 2016;99(1): 163-173. DOI 10.1016/j.ajhg.2016.05.025
- Karafet T.M., Osipova L.P., Savina O.V., Hallmark B., Hammer M.F. Siberian genetic diversity reveals complex origins of the Samoyedic-speaking populations. *Am. J. Hum. Biol.* 2018;30(6):e23194. DOI 10.1002/ajhb.23194
- Karmin M., Saag L., Järve M., Vicente M., Wilson Sayres M.A., Pagan L., DeGiorgio M., Talas U.G., Rootsi S., Illumäe A.M., ... Tyler-Smith C., Underhill P., Willerslev E., Nielsen R., Metspalu M., Vilems R., Kivisild T. A recent bottleneck of Y chromosome diversity coincides with a global change in culture. *Genome Res.* 2015; 25(4):459-466. DOI 10.1101/gr.186684.114
- Kayser M., Krawczak M., Excoffier L., Dieltjes P., Corach D., Pascali V., Gehrig C., Bernini L.F., Jespersen J., Bakker E., Roewer L., de Knijff P. An extensive analysis of Y-chromosomal microsatellite haplotypes in globally dispersed human populations. *Am. J. Hum. Genet.* 2001;68(4):990-1018. DOI 10.1086/319510
- Luis J.R., Palencia-Madrid L., Garcia-Bertrand R., Herrera R.J. Bidirectional dispersals during the peopling of the North American Arctic. *Sci. Rep.* 2023;13(1):1268. DOI 10.1038/s41598-023-28384-8

- Malyarchuk B., Derenko M., Denisova G., Maksimov A., Wozniak M., Grzybowski T., Dambueva I., Zakharov I. Ancient links between Siberians and Native Americans revealed by subtyping the Y chromosome haplogroup Q1a. *J. Hum. Genet.* 2011;56(8):583-588. DOI 10.1038/jhg.2011.64
- Malyarchuk B., Derenko M., Denisova G., Khoit S., Wozniak M., Grzybowski T., Zakharov I. Y-chromosome diversity in the Kalmyks at the ethnical and tribal levels. *J. Hum. Genet.* 2013;58(12):804-811. DOI 10.1038/jhg.2013.108
- Olofsson J.K., Pereira V., Børsting C., Morling N. Peopling of the north circumpolar region – insights from Y chromosome STR and SNP typing of Greenlanders. *PLoS One.* 2015;10(1):e0116573. DOI 10.1371/journal.pone.0116573
- Pagani L., Lawson D.J., Jagoda E., Mörseburg A., Eriksson A., Mitt M., Clemente F., Hudjashov G., DeGiorgio M., Saag L., ... Thomas M.G., Manica A., Nielsen R., Villems R., Willerslev E., Kivisild T., Metspalu M. Genomic analyses inform on migration events during the peopling of Eurasia. *Nature.* 2016;538(7624):238-242. DOI 10.1038/nature19792
- Pakendorf B., Novgorodov I.N., Osakovskij V.L., Danilova A.P., Protop'jakonov A.P., Stoneking M. Investigating the effects of prehistoric migrations in Siberia: genetic variation and the origins of Yakuts. *Hum. Genet.* 2006;120(3):334-353. DOI 10.1007/s00439-006-0213-2
- Pugach I., Matveev R., Spitsyn V., Makarov S., Novgorodov I., Osakovskiy V., Stoneking M., Pakendorf B. The complex admixture history and recent southern origins of Siberian populations. *Mol. Biol. Evol.* 2016;33(7):1777-1795. DOI 10.1093/molbev/msw055
- Raghavan M., Skoglund P., Graf K.E., Metspalu M., Albrechtsen A., Moltke I., Rasmussen S., Stafford T.W., Jr., Orlando L., Metspalu E., Karmin M., Tambets K., Rootsi S., Mägi R., Campos P.F., Balanovska E., Balanovsky O., Khusnutdinova E., Litvinov S., Osipova L.P., Fedorova S.A., Voevoda M.I., DeGiorgio M., Sicheritz-Ponten T., Brunak S., Demeshchenko S., Kivisild T., Villems R., Nielsen R., Jakobsson M., Willerslev E. Upper Palaeolithic Siberian genome reveals dual ancestry of Native Americans. *Nature.* 2014;505(7481):87-91. DOI 10.1038/nature12736
- Rasmussen M., Li Y., Lindgreen S., Pedersen J.S., Albrechtsen A., Moltke I., Metspalu M., Metspalu E., Kivisild T., Gupta R., ... Brunak S., Sicheritz-Pontén T., Villems R., Nielsen R., Krogh A., Wang J., Willerslev E. Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo. *Nature.* 2010;463(7282):757-762. DOI 10.1038/nature08835
- Rubicz R., Zlojutro M., Sun G., Spitsyn V., Dekka R., Young K.L., Crawford M.H. Genetic architecture of a small, recently aggregated Aleut population: Bering Island, Russia. *Hum. Biol.* 2010;82(5-6):719-736. DOI 10.1353/hub.2010.a408138
- Sikora M., Pitulko V., Sousa V., Allentoft M.E., Vinner L., Rasmussen S., Margaryan A., de Barros Damgaard P., de la Fuente Castro C., Renaud G., ... Sajantila A., Lahr M.M., Durbin R., Nielsen R., Meltzer D., Excoffier L., Willerslev E. The population history of north-eastern Siberia since the Pleistocene. *Nature.* 2019;570(7760):182-188. DOI 10.1038/s41586-019-1279-z
- Yu H.-X., Ao C., Zhang X.-P., Liu K.-J., Wang Y.-B., Meng S.-L., Li H., Wei L.-H., Man D. Unveiling 2,000 years of differentiation among Tungusic-speaking populations: a revised phylogeny of the paternal founder lineage C2a-M48-SK1061. *Front. Genet.* 2023;14:1243730. DOI 10.3389/fgene.2023.1243730
- Zhivotovsky L.A., Underhill P.A., Cinnioglu C., Kayser M., Morar B., Kivisild T., Scozzari R., Cruciani F., Destro-Bisol G., Spedini G., Chambers G.K., Herrera R.J., Yong K.K., Gresham D., Tournev I., Feldman M.W., Kalaydjieva L. The effective mutation rate at Y chromosome short tandem repeats, with application to human population-divergence time. *Am. J. Hum. Genet.* 2004;74(1):50-61. DOI 10.1086/380911

ORCID

B.A. Malyarchuk orcid.org/0000-0002-0304-0652
M.V. Derenko orcid.org/0000-0002-1849-784X

Благодарности. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-00264 (<https://rscf.ru/project/22-24-00264/>).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 14.09.2023. После доработки 29.11.2023. Принята к публикации 29.11.2023.

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

Универсальная панель STR-локусов для исследования полиморфизма вида *Canis lupus* и криминалистической идентификации собаки и волка

А.Е. Гребенчук¹✉, И.С. Цыбовский²

¹ Государственный комитет судебных экспертиз Республики Беларусь, Минск, Беларусь

² Республиканское унитарное предприятие «БелЮрОбеспечение», Минск, Беларусь

✉ iamsanya94@mail.ru

Аннотация. Коммерческие панели микросателлитных (STR) локусов предназначены для работы с ДНК собаки домашней (*Canis lupus familiaris*), в связи с чем при генотипировании волка обыкновенного (*Canis lupus lupus*) большинство маркеров показывают существенные отклонения от равновесия Харди–Вайнберга и имеют низкий показатель информативной ценности, что осложняет их использование в судебной экспертизе. Целью настоящего исследования стал подбор STR-маркеров, которые одинаково эффективно отображают популяционный полиморфизм волка и собаки, с последующим созданием универсальной панели для дифференциации и идентификации особей волка и собаки в криминалистике. На основе исследования полиморфизма 34 STR-локусов сконструирована панель Cplex из 15 аутосомных локусов и двух локусов половой принадлежности, которая одинаково применима для идентификации волка и собаки. Анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) между выборками выявил достоверные значения дифференциации ($F_{ST} = 0.0828$, $p < 0.05$), что позволяет использовать панель для дифференциации образцов волка обыкновенного и собаки домашней. Впервые в судебной экспертизе объектов животного происхождения в Республике Беларусь рассчитаны коэффициенты подразделенности популяции (θ -value) для каждого из 15 STR-локусов разработанной тест-системы. Показано, что значения частот генотипов, усредненные по всем исследованным животным без учета и с учетом θ -value, различаются на три порядка ($3.39 \cdot 10^{-17}$ и $4.71 \cdot 10^{-14}$ соответственно). Применение коэффициентов подразделенности популяции позволит оперировать наиболее достоверными результатами экспертного идентификационного исследования. Предложенная тест-система валидирована в соответствии с протоколом Scientific Working Group on DNA Analysis Methods. Создан информационно-статистический комплекс для автоматизации обсчета генетических данных волка обыкновенного и собаки домашней в судебной экспертизе, утверждены две методики для практикующих судебных экспертов. Методические разработки успешно применяются в экспертной практике при расследовании фактов незаконной охоты, жестокого обращения с животными и других правонарушений в Республике Беларусь. Ключевые слова: микросателлиты; полиморфизм; дифференциация; идентификация; собака домашняя; волк обыкновенный; судебная экспертиза объектов животного происхождения.

Для цитирования: Гребенчук А.Е., Цыбовский И.С. Универсальная панель STR-локусов для исследования полиморфизма вида *Canis lupus* и криминалистической идентификации собаки и волка. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(1):98-107. DOI 10.18699/vjgb-24-12

A universal panel of STR loci for the study of polymorphism of the species *Canis lupus* and forensic identification of dog and wolf

А.Е. Hrebianchuk¹✉, I.S. Tsybovsky²

¹ Forensic Examination Committee of the Republic of Belarus, Minsk, Belarus

² BelJurZabespjachjenne, Minsk, Belarus

✉ iamsanya94@mail.ru

Abstract. Commercial panels of microsatellite (STR) loci are intended for DNA analysis of the domestic dog (*Canis lupus familiaris*) and, therefore, when genotyping the Grey wolf (*Canis lupus lupus*), most markers reveal significant deviations from the Hardy–Weinberg equilibrium and have a low informative value, which complicates their use in a forensic examination. The aim of this study was to select STR markers that equally effectively reflect population polymorphism in the wolf and the dog, and to create a universal panel for the identification of individuals in forensic science. Based on the study of polymorphisms of 34 STR loci, a Cplex panel of 15 autosomal loci and two sex loci was developed, which is equally suitable for identifying wolves and dogs. Analysis of molecular variance (AMOVA) between samples revealed significant differentiation values ($F_{ST} = 0.0828$, $p < 0.05$), which allows the panel to be used for differentiating between wolf and dog samples. For the first time in the forensic examination of objects of animal origin in the Republic of Belarus, population subdivision coefficients (θ -values) were calculated for each of the 15 STR loci of the test system being reported. It was shown that the values of the genotype frequency, when averaged over all studied animals without and with considering the θ -value, differ by three orders of magnitude ($3.39 \cdot 10^{-17}$ and $4.71 \cdot 10^{-14}$, respectively). The use of population subdi-

vision coefficients will provide the researcher with the most relevant results of an expert identification study. The test system was validated in accordance with the protocol of the Scientific Working Group on DNA Analysis Methods. A computational tool was developed to automate the analysis of genetic data on the wolf and dog in the forensic examination; two guides were approved for practicing forensic experts. This methodology is being successfully used in expert practice in investigating cases of illegal hunting, animal abuse and other offenses in the Republic of Belarus.

Key words: microsatellites; polymorphism; differentiation; identification; *Canis lupus familiaris*; *Canis lupus lupus*; wildlife forensic science.

For citation: Hrebianchuk A.E., Tsybovsky I.S. A universal panel of STR loci for the study of polymorphism of the species *Canis lupus* and forensic identification of dog and wolf. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(1):98-107. DOI 10.18699/vjgb-24-12

Введение

В Республике Беларусь, согласно статистическим данным Министерства лесного хозяйства (2021), численность волка (*Canis lupus lupus*) за последние пять лет стабилизировалась и находится в пределах 1530–1630 особей, что является одним из лидирующих показателей среди стран Европы. При этом лицензионная охота на волка в Беларуси разрешена круглый год и на всех особей, независимо от пола и возраста. Вместе с тем охота на охраняемых природных территориях и охота без путевки приводят к возбуждению уголовных дел и, как следствие, назначению судебной экспертизы.

По сводкам Министерства жилищно-коммунального хозяйства, в Беларуси только за год уничтожается около 80 тыс. бродячих кошек и собак, и это число растет, а точное количество собак неизвестно. Особый статус собаки (*Canis lupus familiaris*) среди сельскохозяйственных и домашних животных определяется тем, что это одно из наиболее распространенных «животных-компаньонов». Активное использование человеком собак в качестве живого «средства» при реализации собственных целей находит отражение и в «криминальных» аспектах, сопутствующих развитию социума.

Естественная история европейских популяций волка (*C. lupus lupus*) характеризовалась сильным сокращением числа особей за последние несколько сотен лет (Boitani, 2003). Снижение численности, фрагментация популяции и нарушение потока генов являются хорошо известными триггерами генетического обеднения и увеличения инбридинга в естественных популяциях, что также приводит к увеличению риска вымирания волков, как и многих других видов. Пример такой ситуации был зафиксирован для волков Италии, у которых значения генетического разнообразия, определяемые уровнем гетерозиготности, были явно ниже аналогичных в популяциях из России, Аляски и Канады (Godinho et al., 2011).

Интенсивный отстрел волка может привести к замещению вида гибридами волка и собаки. В последнее время проблема гибридизации между волками и свободноживущими собаками в Европе стала основной темой во многих исследовательских программах (Stronen et al., 2022).

Основная сложность генетической дифференциации волка и собаки состоит в том, что ДНК-маркеры, уникальные как для волка, так и для собаки, не обнаружены. Сравнение геномов собаки и волка показало 99 % сходство, что лишний раз свидетельствует об их общем происхождении (Freedman, Wayne, 2017).

Как правило, исследование популяций волка выстраивается по типичной схеме: использование локусов, реко-

мендованных Международным обществом по изучению генетики животных (ISAG), с расчетом статистических показателей распределения аллелей данных локусов и оценкой представленности аллелей в популяции. В связи с высоким уровнем идентичности геномов волка и собаки, диапазоны аллелей локусов весьма схожи, поэтому речь о дифференциации особей с помощью отобранных локусов можно вести только при выявлении генетической дифференциации выборок путем статистической обработки результатов генотипирования (Halverson, Basten, 2005; Fan et al., 2016).

Разработанные панели для анализа ДНК собак в большинстве своем оказываются неприменимы для исследования ДНК волка по причине несоответствия равновесию Харди–Вайнберга и наличия нуль-аллелей у ДНК-маркеров. В то же время при подборе маркеров для анализа ДНК волка обыкновенного ученые, как правило, не учитывают возможность применения отобранных маркеров на инбредной популяции собак, что приводит к невозможности использования этих маркеров одновременно для идентификации волка и собаки в криминалистических исследованиях.

Целью настоящей работы был подбор STR-маркеров, которые одинаково эффективно отображают популяционную структуру и полиморфизм волка обыкновенного и собаки домашней, с последующим созданием универсальной панели для идентификации и дифференциации особей в криминалистике.

Материалы и методы

Объекты исследования. Образцы волка обыкновенного и собаки домашней получены легальным путем и представлены фрагментами мышечной и хрящевой тканей волков ($n = 103$) и образцами крови, волос и буккального эпителия чистопородных собак, собак-метисов и беспородных собак ($n = 198$). Перечень наиболее представленных пород отражен в Приложении 1¹.

Выделение ДНК, амплификация и генотипирование микросателлитных локусов. ДНК из образцов мышечной и хрящевой тканей, крови и волос волков и собак выделяли по методике, основанной на высвобождении ДНК в ходе инкубации образцов биологического материала в лизирующем буфере с протеиназой K и 0.01 мМ дитиотрейтолом при 37–56 °C. Лизат подвергали процедуре очистки на силикагеле (Boom et al., 1990).

Отобранные локусы были сгруппированы в две тест-системы: 1) тест-систему, включающую преимущест-

¹ Приложения 1–6 см. по адресу:

<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2024-28/appx5.pdf>

венно динуклеотидные локусы, рекомендованные ISAG: АНТк211, FH2054, CXX279, Ren169O18, INU055, АНTh260, INU030, FH2079, FH2848, АНТ121, АНTh171, Ren247M23, АНTh130, INRA21, АНТк253, АНТ137, Ren54P11, INU005, Ren105L03, Ren64E19, Ren162C04, и локус половой принадлежности Amelogenin (Radco, Podbielska, 2021); 2) тест-систему, включающую преимущественно тетра nukлеотидные локусы – FH2096, СРН12, СРН4, FH2004 (Caniglia et al., 2010), FH2016 (Fan et al., 2016), FH2361, PEZ17, FH2328 (van Asch et al., 2010), PEZ16, vWF.X (DeNise et al., 2004), FH2010 (Eichmann et al., 2004), FH2001 (Verardi et al., 2006), VGL3438 (Magory Cohen et al., 2013), и локусы половой принадлежности – DBX и DBY (Seddon, 2005).

Конечный состав реакционной смеси общим объемом 10 мкл составил: 10 mM tris-HCl, pH 8.6; 25 mM KCl; 2.0 mM MgCl₂; 0.2 mM каждого из dNTP; 0.2–1.0 мкМ каждого из пары праймеров; 0.15 е. а. ДНК-полимеразы; 1.5 нг/мкл BSA; 0.1 % Triton X-100 и 1–20 нг анализируемой ДНК. Амплификацию проводили на программируемых приборах термоциклического типа С1000 (BioRad, США) в следующих условиях: начальная инкубация 5 мин при 95 °С; 30 циклов, состоящих из денатурации при 95 °С (30 с), отжига для всех пар праймеров при 60 °С (40 с) и элонгации при 72 °С (1 мин); финальная элонгация в течение 30 мин при 72 °С.

Характерное для каждого из образцов сочетание аллелей выявляли путем электрофоретического разделения продуктов ПЦР в генетическом анализаторе 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Размеры выявленных аллелей (в п. н.) и соответствующих генотипов ДНК в исследуемых локусах устанавливали с использованием внутренних стандартов размера Orange 500 bp (NimaGen®, Нидерланды) и GeneScan-600 LIZ™ SizeStandard v2.0 (ThermoFisher Scientific, США), а также программного пакета GeneMapper ID-X v1.6.

Статистический анализ данных. Поскольку неверное отнесение животных к той или иной выборке искажает расчеты, основанные на анализе показателей генетического разнообразия (Galinskaaya et al., 2019), прежде всего проводили кластерный анализ данных генотипирования волков и собак по исследованным локусам. Популяционную структуру определяли с использованием алгоритма Монте-Карло по схеме марковских цепей с помощью программы STRUCTURE v.2.3.4 и с использованием модели Admixture (Pritchard et al., 2000) с дальнейшим выявлением истинного количества кластеров методом Эванно (Evanno et al., 2005). Выбор стартовой точки марковской цепи проводили в течение 500000 итераций с последующим построением марковской цепи в течение 1000000 итераций для предполагаемого числа групп в выборке K , от 1 до 10, в шести повторах для каждой величины K . Оценку кластеризации в совокупном массиве волков и собак методами невзвешенных парногрупповых средних (UPGMA) и присоединения ближайших соседей (NJ) и построением соответствующих дендрограмм осуществляли в программе MEGA v.11.0.10. Для визуализации генетической структуры выполняли многомерный анализ по матрице генетических дистанций методом РСoA в макросе GenAlEx v.6.5 (Peakall, Smouse, 2006, 2012).

Расчет частот встречаемости аллелей STR-локусов, значений наблюдаемой (H_0) и ожидаемой гетерозиготности (H_E) и оценку соответствия равновесию Харди–Вайнберга производили с использованием программного пакета Cervus v.3.0.7 (Kalinowski et al., 2007). Возможные ошибки в интерпретации генетических профилей, нуль-аллелей и артефактов ПЦР выявляли с помощью программы Micro-Checker v.2.2.1 (van Oosterhout et al., 2004).

Анализ молекулярной дисперсии и оценку коэффициентов инбридинга выполняли в программе Arlequin v.3.5.1.3 (Excoffier et al., 2005). Принадлежность особи к выборке (Assignment Test) при использовании отобранных локусов устанавливали со статистическим макросом GenAlEx v.6.5. Показатели информативной ценности (polymorphism information content, PIC) отобранных STR-локусов были рассчитаны с помощью программного продукта Cervus v.3.0.7.

Секвенирование аллелей локусов. Для выявления возможных микровариантов последовательностей, а также для перевода в тандемное исчисление аллелей, принятого в криминалистике, определяли первичную структуру аллелей путем секвенирования методом Сэнгера (Sanger et al., 1977). Нуклеотидные последовательности аллелей каждого из STR-локусов и локусов половой принадлежности устанавливали в прямом и обратном направлениях. Секвенирование проводили на приборе 3500 Genetic Analyzer с использованием набора для секвенирования “BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems). Сравнительный анализ последовательностей аллелей исследованных локусов выполнен на основе программы BioEdit v.7.0.5.3 (Hall et al., 2011). Последовательности каждого локуса, имеющие минимальный и максимальный молекулярные размеры аллелей, внесены в базу данных GenBank (Benson et al., 2005) с присвоением соответствующих номеров доступа.

Результаты и обсуждение

Апостериорный анализ результатов STRUCTURE выявил для совокупного массива генотипов волка и собаки максимальное значение тестовой статистики ΔK при $K = 2$, что свидетельствует о существовании двух генетических кластеров в анализируемой выборке животных: волка обыкновенного (зеленый кластер) и собаки домашней (красный кластер) (рис. 1, Приложение 2). При определении популяционной структуры выборок волков и собак отдельно друг от друга кластер из образцов волка оставался гомогенным; отсутствие кластеризации внутри популяции волка при использовании STR-локусов было ранее показано исследователями в Европе (Aspi et al., 2006; Sastre et al., 2011; Дан et al., 2016).

Для отдельного анализа STRUCTURE в выборке собак были сформированы четыре группы: беспородных собак ($n = 78$) и трех породных групп: молоссов ($n = 32$), самоедов ($n = 66$) и овчарок ($n = 22$). Максимальное значение ΔK при $K = 2$ указывает на формирование двух кластеров (Приложения 3 и 4), один из которых соответствует овчаркам, тогда как породные группы самоедов и молоссов не выделяются и, более того, не отличаются от группы беспородных собак.

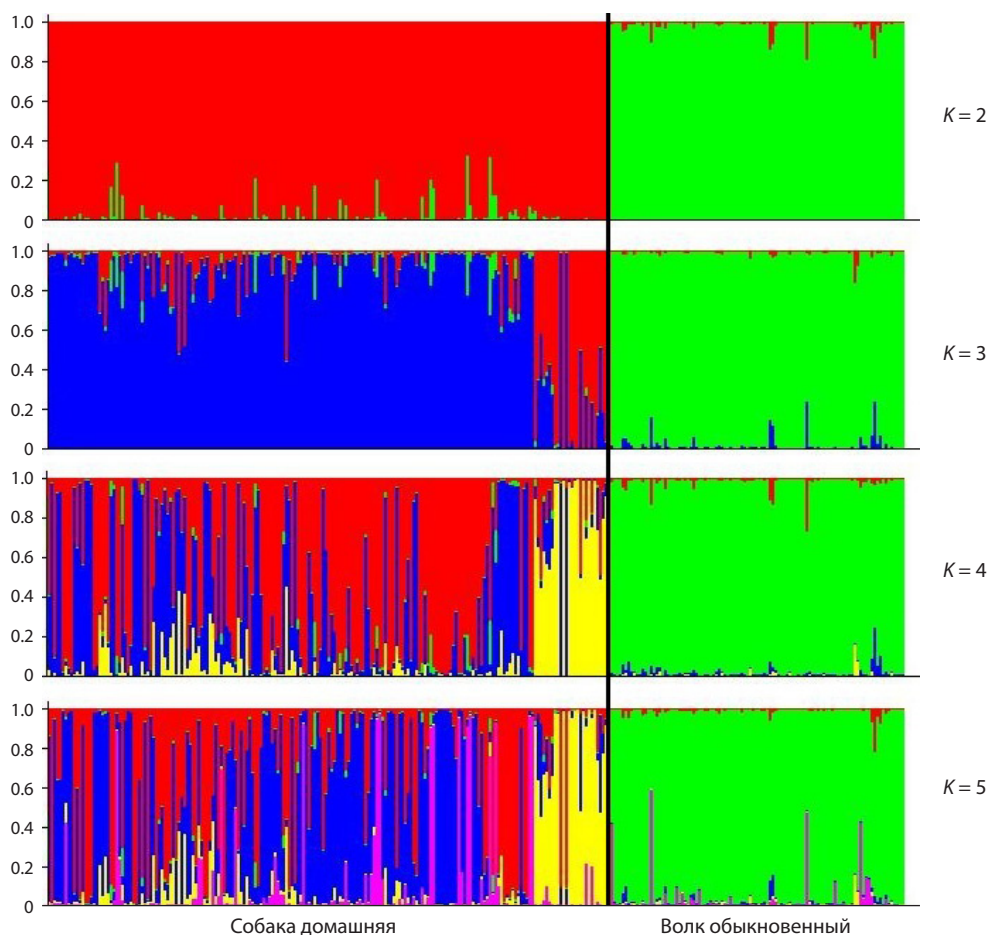


Рис. 1. Результаты кластерного анализа выборок волка и собаки, выполненного в программе STRUCTURE для наиболее вероятного значения числа исходных генетических кластеров $K = 2-5$, отсортированные по выборкам.

В то же время при оценке кластеризации в совокупном массиве волков и собак методами невзвешенных парно-групповых средних (UPGMA) и присоединения ближайших соседей (NJ) и построением соответствующих дендрограмм в выборке собак выделяются четыре кластера различного иерархического уровня. Наибольшую схожесть демонстрируют породная группа молоссов и беспородные собаки. С ними соседствует породная группа самоедов, и эти две группы отделяются от группы овчарок. Поскольку обе дендрограммы показали схожую структуру, то в Приложении 5 отображена только дендрограмма, построенная по методу UPGMA (с бутстреп-поддержкой в 10000 повторений). Следует отметить, что схожая картина кластеризации пород собак при исследовании SNP-маркеров получена другими авторами (Parker et al., 2017).

Анализ популяционной структуры волков и собак показал резкую генетическую дифференциацию между ними со средними значениями коэффициента принадлежности к собственному кластеру: $Q = 0.984$ и 0.981 соответственно. Полученные данные о дифференциации волка обыкновенного и собаки домашней с использованием 34 STR-маркеров успешно согласуются с данными Коралева с коллегами (Korablev et al., 2021). Уровень дифференциации между породами собак был намного ниже, чем между волком и собакой. Значения Q изменялись от 0.457 до 0.495

для молоссов, от 0.451 до 0.476 для самоедов и от 0.740 до 0.757 для овчарок.

Результаты кластерного анализа согласуются с многомерным анализом по матрице генетических дистанций (PCoA метод), который тоже показывает четкую дифференциацию выборок волка и собаки (рис. 2). При этом овчарки выделились в отдельную группу. Это может объясняться особенностями селекции, а также быть следствием высокой гетерогенности выборок молоссов и самоедов, объединенных общим историческим происхождением (более 20 различных пород), в то время как выборка овчарок включала в себя чистопородных особей породы немецкая овчарка.

Суммарно в выборке волков обыкновенных и собак домашних с использованием двух исследованных тест-систем было идентифицировано 405 аллелей. Все локусы были полиморфными и имели от 5 (FH2096) до 26 (FH2361) аллелей на локус. Среднее количество аллелей на локус во всех выборках было относительно одинаковым – 9.402 ± 0.617 (табл. 1). Исключение составила выборка овчарок, где среднее значение на локус находилось в пределах 5.824 ± 0.328 , что может объясняться в том числе небольшим размером выборки ($n = 22$).

Максимальные показатели гетерозиготности были получены для выборки волка: значения наблюдаемой и ожи-

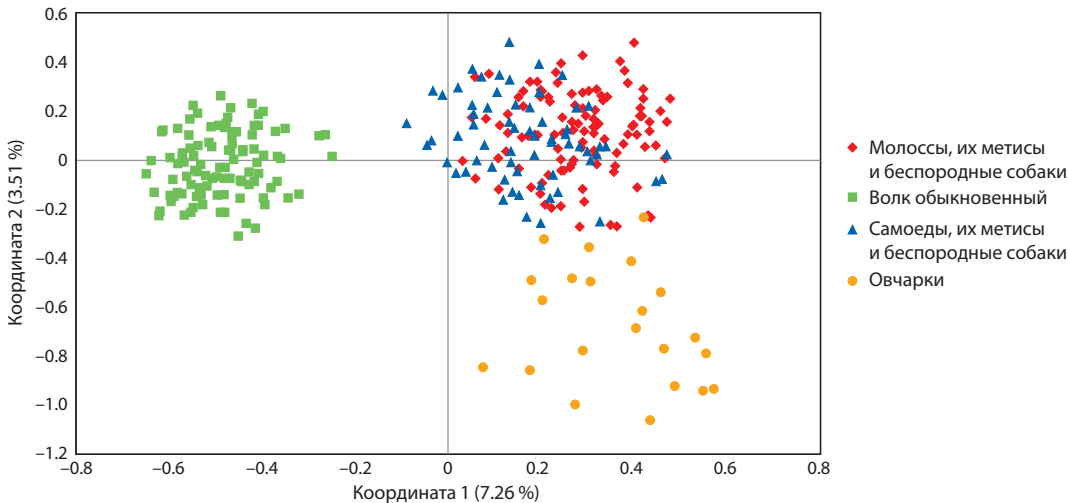


Рис. 2. Диаграмма результатов PCoA анализа на основе матрицы парных F_{ST} значений для выборок волка обыкновенного и собаки домашней.

Таблица 1. Средние значения уровня полиморфизма исследованных локусов в выборках волков обыкновенных и трех исторических породных групп собак

Выборка	N_a	N_e	H_o	H_E
Волк обыкновенный	9.265 ± 0.476	5.258 ± 0.306	0.730 ± 0.017	0.786 ± 0.013
Молоссы, их метисы и беспородные собаки	9.706 ± 0.575	4.916 ± 0.293	0.656 ± 0.017	0.768 ± 0.016
Самоеды, их метисы и беспородные собаки	9.235 ± 0.560	5.212 ± 0.312	0.688 ± 0.018	0.782 ± 0.015
Овчарки и их метисы	5.824 ± 0.328	2.992 ± 0.197	0.556 ± 0.029	0.617 ± 0.025

Примечание. N_a – число аллелей на локус; N_e – эффективное число аллелей на локус; H_o – наблюдаемая гетерозиготность; H_E – ожидаемая гетерозиготность.

даемой гетерозиготности составили 0.730 и 0.786 соответственно (см. табл. 1). В выборках собак более высокие значения ожидаемой гетерозиготности по сравнению с наблюдаемой с большой вероятностью указывают на наличие инбридинга вследствие искусственного отбора и генетического дрейфа, которые могут необратимо удалять аллели из популяции, что приводит к эффекту, существенно снижающему разнообразие (Galinskayaa et al., 2019). Мутационный процесс противодействует генетическому дрейфу, но вследствие жесткой направленности отбора при выведении пород собак сложно добиться равновесия генетических процессов ввиду элиминации из разведения особей с выявленными мутациями в том или ином признаке. Наивысшие из полученных показателей гетерозиготности и эффективного числа аллелей выявлены в выборке волка, что свидетельствует о естественном развитии и наличии мутационно-дрейфового равновесия в природной популяции.

Анализ профилей динуклеотидных локусов требует особого внимания, поскольку на электрофореграммах могут обнаруживаться фрагменты, не относящиеся к истинным аллелям и являющиеся «статтер»-продуктами. Количество «статтер»-продуктов обычно возрастает с увеличением длины аллеля. При анализе генотипов с использованием программы Micro-Checker из 20 исследованных динуклеотидных маркеров три (INU055, Ren169O18 и Ren64E19) показали высокую вероятность ошибок генотипирования и были исключены из дальнейшего анализа.

Анализ распределения аллелей двух локусов (АНТ121 и АНТк211) показал наличие большого количества нуль-аллелей в трех выборках, включая выборку волка. В локусах АНТ137 и INRA21 выявлено высокое содержание нуль-аллелей в двух выборках собак; восемь локусов (АНТh130, АНТh260, CXX279, FH2848, Ren105L03, Ren162C04, Ren247M23 и Ren54P11) показали достаточно высокое содержание нуль-аллелей (от 5.7 % в выборке молоссов в локусе FH2848 до 12.6 % в локусе CXX279 у овчарок). Данные локусы были также исключены из дальнейшей работы по конструированию универсальной криминалистической панели.

При анализе картины распределения частот аллелей в конкретных локусах особое внимание уделялось локусам с существенным преобладанием мажорных аллелей. Различия в частотах мажорных аллелей могут быть полезны для дифференциации волков и собак посредством микросателлитного анализа, однако существенное преобладание одного аллеля может влиять на уровень достоверности идентификации. По причине выраженного доминирования мажорных аллелей из дальнейшего анализа исключены локусы INU030, INU005, АНТк171 и АНТк253.

Большинство исследованных локусов в выборках волков и собак находились в равновесии Харди–Вайнберга ($p > 0.05$): АНТh171, АНТк253, СРН12, СРН4, FH2001, FH2004, FH2010, FH2016, FH2096, FH2328, FH2361, INU005, INU030, INU055, PEZ16, PEZ17, Ren169O18, Ren64E19, VGL3438 и vWF.X. Два локуса, FH2054 и

Таблица 2. Средние значения показателей гетерозиготности для волка и собаки и показателей F-статистик Райта для совокупной выборки *Canis lupus*

Лocus	H_O	H_E	H_O	H_E	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}
	Собака домашняя		Волк обыкновенный				
FH2016	0.783	0.894	0.832	0.886	0.129	0.033	0.158
FH2079	0.555	0.664	0.612	0.656	0.221	0.093	0.293
VGL3438	0.751	0.858	0.709	0.784	0.130	0.029	0.155
FH2361	0.793	0.852	0.861	0.821	0.003	0.032	0.035
FH2054	0.792	0.822	0.760	0.781	0.098	0.077	0.167
FH2001	0.737	0.804	0.612	0.744	0.054	0.025	0.078
FH2328	0.763	0.865	0.718	0.743	0.065	0.058	0.119
FH2004	0.767	0.803	0.784	0.885	0.081	0.067	0.142
CPH12	0.571	0.707	0.553	0.650	0.162	0.060	0.212
FH2010	0.641	0.713	0.767	0.777	0.022	0.070	0.090
PEZ17	0.675	0.797	0.777	0.776	0.109	0.068	0.170
PEZ16	0.611	0.793	0.786	0.825	0.145	0.120	0.247
CPH4	0.595	0.611	0.767	0.837	0.103	0.158	0.245
FH2096	0.414	0.524	0.485	0.603	0.174	0.133	0.284
vWF.X	0.545	0.613	0.786	0.838	0.052	0.136	0.182
Среднее	0.666	0.755	0.721	0.774	0.103	0.077	0.172

Примечание. H_O – наблюдаемая гетерозиготность; H_E – ожидаемая гетерозиготность; F_{IS} – коэффициент инбридинга особей внутри выборки, F_{ST} – индекс фиксации аллелей, F_{IT} – коэффициент инбридинга особей в совокупной выборке.

FH2079, отклонялись от равновесия ($p = 0.005$) во всех выборках, однако при использовании поправки Бонферрони p -значения перестали быть статистически значимыми. В 12 локусах выявлено статистически значимое отклонение от равновесия Харди–Вайнберга хотя бы в одной выборке, что может быть особенностью проявления локусов и объясняться наличием нуль-аллелей.

Индекс фиксации аллелей (F_{ST}) варьировал от 0.025 (FH2001) до 0.158 (CPH4) и в среднем по всем локусам составил 0.077. Самые высокие значения F_{IS} были характерны для локусов FH2079, FH2096 и CPH12 (0.221, 0.174 и 0.162 соответственно). В целом для панели из 15 отобранных локусов коэффициенты инбридинга F_{IS} и F_{IT} составляли 0.103 и 0.172 соответственно (табл. 2).

Значения F_{IS} в выборке волков в большинстве исследованных локусов были достаточно близки к нулю, что в совокупности с высокими значениями гетерозиготности может указывать на наличие в популяции панмиксии (Galinskaya et al., 2019).

Ключевым фактором в криминалистическом исследовании может быть правильное отнесение образца к волку обыкновенному или собаке домашней. Для оценки возможности дифференциации волка и собаки с использованием отобранных микросателлитных локусов был проведен анализ молекулярной дисперсии (AMOVA). Результаты AMOVA показали, что доля вариаций между выборками волка и собаки составила 8.28 %, а внутри выборки – 91.72 %. Компоненты дисперсии среди популяции были значимыми для всех изученных локусов (Приложение 6), что говорит о наличии дифференциации выборок волка и собаки. Локусы vWF.x, FH2096 и CPH4

объясняют 21.11, 19.34 и 14.40 % генетической изменчивости между выборками соответственно, а для FH2079 и FH2016 получена самая низкая вариабельность среди популяций (2.45 и 2.20 % соответственно).

Согласно интерпретации Райта (Wright, 1978), диапазон значений F_{ST} от 0.15 до 0.25 указывает на умеренное дифференцирование. В то же время значения, находящиеся в диапазоне 0.00–0.05, свидетельствуют о слабом, но заслуживающем внимания различии выборок. В силу того, что у гипервариабельных маркеров с большим количеством аллелей значения F_{ST} могут быть существенно ниже, чем у маркеров с небольшим количеством аллелей, более важен вопрос об обнаружении значимой генетической дифференциации волков и собак по совокупности отобранных STR-локусов (Hedrick, 2000). Анализ AMOVA между выборками выявил значимую дифференциацию между волком и собакой (парное значение $F_{ST} = 0.0828$, $p < 0.05$).

Графическим подтверждением значимой дифференциации волка и собаки с использованием отобранных локусов служит анализ принадлежности к определенной выборке (Assignment test). В его основе лежит расчет значения вероятности наличия генотипа определенной особи в выборке, из которой он был отобран, и его сравнение со значением вероятности этого же генотипа в другой выборке. В результате данных расчетов особь относится к той выборке, для которой получена наибольшая вероятность (рис. 3).

Расчет генетической принадлежности к истинной выборке показал высокую консолидированность волков и собак: 100 % всех исследованных животных были генети-

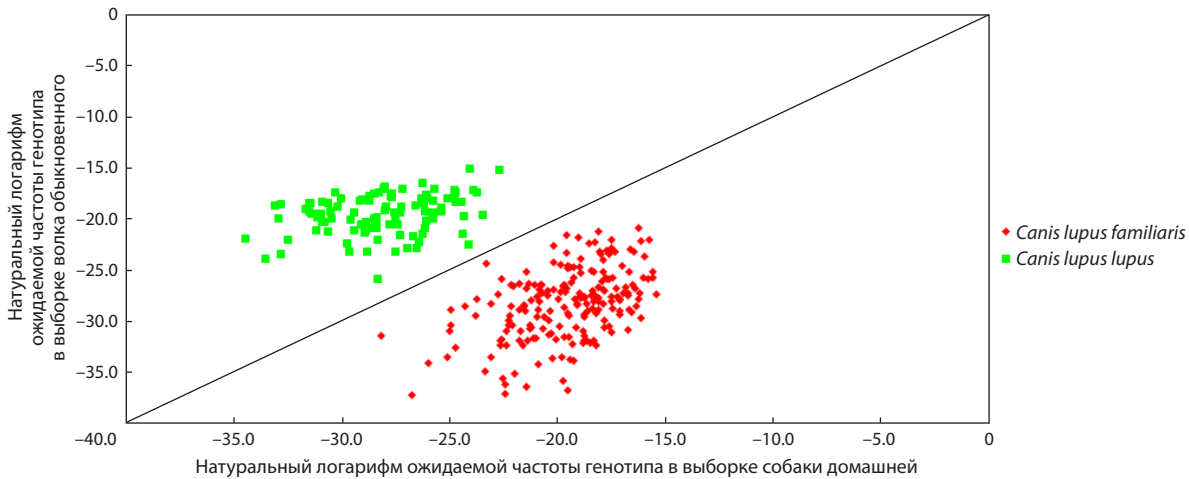


Рис. 3. График генетического отнесения образца к исследуемой выборке (графическая интерпретация анализа Assignment test).

чески отнесены к собственным кластерам. При этом разница модулей натуральных логарифмов ожидаемых частот генотипов особей, в случае их принадлежности к собственной выборке или к альтернативной выборке, имела высокое значение: для особей волка обыкновенного разница в среднем составляла 8.722, а для собаки домашней – 8.584. Высокие значения разницы модулей логарифмов ожидаемых частот генотипов подтверждают успешность дифференциации волка обыкновенного и собаки домашней с использованием предложенных локусов.

Важным критерием в криминалистике является адекватная интерпретация значения достоверности идентификационного исследования. Для расчета вероятности случайного совпадения генотипов необходимы соответствующая референтная база и корректное применение консервативной процедуры расчета (Buckleton et al., 2016). Проведенное исследование массивов генотипов образцов волков и собак позволило рассчитать частоты встречаемости аллелей и поправки на генетическую подразделенность популяций волков и собак, обитающих на территории Беларуси.

Сложная социальная организация жизни у волка наряду с четкой селекционной работой с породами собак приводит к формированию структурированности популяций этих животных. По этой причине для получения максимально достоверного экспертного вывода при идентификационном исследовании образца оптимально использовать частотные характеристики локусов конкретных субпопуляций, что практически невозможно в судебной экспертизе объектов животного происхождения. Альтернативным решением служит введение в расчет частоты встречаемости генотипа коэффициента подразделенности (θ -value), который учитывает наличие структурированности популяций (The Evaluation..., 1996; Buckleton et al., 2006).

Значения частот генотипов, усредненные по всем животным и рассчитанные с включением последующих исследованных локусов тест-системы без и с учетом θ -value, различаются на три порядка: $3.39 \cdot 10^{-17}$ и $4.71 \cdot 10^{-14}$ соответственно (табл. 3). Это говорит о том, что без учета коэффициента θ -value при идентификации возможна пе-

Таблица 3. Значения частоты генотипа, усредненные по всем животным, без и с использованием поправки на подразделенность популяции

Локус	θ -value	Частота генотипа	
		без учета θ -value и с включением последующего локуса	с учетом θ -value и с включением последующего локуса
FH2016	0.039	$2.08 \cdot 10^{-2}$	$3.62 \cdot 10^{-2}$
FH2079	0.145	$3.31 \cdot 10^{-3*}$	$9.58 \cdot 10^{-3**}$
VGL3438	0.020	$1.55 \cdot 10^{-4}$	$5.44 \cdot 10^{-4}$
FH2361	0.035	$7.19 \cdot 10^{-6}$	$3.39 \cdot 10^{-5}$
FH2054	0.081	$4.26 \cdot 10^{-7}$	$3.61 \cdot 10^{-6}$
FH2001	0.031	$3.23 \cdot 10^{-8}$	$3.38 \cdot 10^{-7}$
FH2328	0.065	$1.81 \cdot 10^{-9}$	$3.04 \cdot 10^{-8}$
FH2004	0.090	$8.97 \cdot 10^{-11}$	$2.96 \cdot 10^{-9}$
CPH12	0.102	$1.26 \cdot 10^{-11}$	$6.27 \cdot 10^{-10}$
FH2010	0.070	$1.46 \cdot 10^{-12}$	$9.84 \cdot 10^{-11}$
PEZ17	0.080	$1.05 \cdot 10^{-13}$	$1.16 \cdot 10^{-11}$
PEZ16	0.170	$6.07 \cdot 10^{-15}$	$1.91 \cdot 10^{-12}$
CPH4	0.173	$8.54 \cdot 10^{-16}$	$4.92 \cdot 10^{-13}$
FH2096	0.131	$2.25 \cdot 10^{-16}$	$1.76 \cdot 10^{-13}$
vWFX	0.192	$3.39 \cdot 10^{-17}$	$4.70 \cdot 10^{-14}$

Примечание. Локусы приведены в порядке увеличения F_{ST} . * Здесь и далее произведение частоты генотипа предыдущих и данного локусов; ** здесь и далее произведение частоты генотипа предыдущих и данного локусов.

реоценка (занижение) частоты генотипа, что в судебной экспертизе приведет к неправоначальному завышению достоверности экспертного исследования.

Анализ показателей информативной ценности локусов (PIC) выявил, что все отобранные локусы в объединенной выборке собак, согласно (Botstein et al., 1980), являются высокоинформативными для исследования ДНК как собаки домашней, так и волка обыкновенного (табл. 4).

Таблица 5. Характеристика микросателлитных локусов тест-системы CPlax

Локус	Выявленный диапазон, п. н.	Тип и диапазон тандема	Номер доступа GenBank	
			Аллель минимальной длины	Аллель максимальной длины
DBX	246	–	OQ216490	
DBY	117	–	OQ216491	
FH2096	88–108	(AATG) _{5–10}	OQ216492	OQ216493
vWF.X	133–199	(AGGAAT) _{5–16}	OQ216494	OQ216495
CPH4	138–152	(CA) _{14–22}	OQ216496	OQ216497
FH2079	260–292	(TGGA) _{6–14}	OQ216498	OQ216499
CPH12	180–200	(AC) _{5–19}	OQ216500	OQ216501
FH2010	215–239	(GAAT) _{7–13}	OQ216502	OQ216503
PEZ17	190–222	(TTTC) _{11–19}	OQ216504	OQ216505
PEZ16	269–337	(GAAA) _{5–22}	OQ216506	OQ216507
FH2004	229–337	(TTCT) _{11–38}	OQ216508	OQ216509
FH2054	140–180	(ATCT) _{13–23}	OQ216510	OQ216511
VGL3438	101–145	(AAAG) _{10–20}	OQ216512	OQ216513
FH2001	124–158	(ATCT) _{7–10}	OQ216514	OQ216515
		(ATCT) _{10–14} CAACTC	OQ216516	OQ216517
FH2361	329–425	(TCTT) _{11–35}	OQ216518	OQ216519
		(TCTT) _{11–18} TC	OQ216520	OQ216521
FH2328	181–219	(AAAG) _{7–16}	OQ216522	OQ216523
		(AAAG) ₁₅ AA(AAAG) ₁	OQ216524	
FH2016	276–340	(CTTT) _{15–31}	OQ216525	OQ216526
		(CTTT) _{19–21} CT	OQ216527	OQ216528

исследованиях по делам о незаконной охоте, нападении животных на людей и домашний скот, а также по делам о жестоком обращении с животными.

Разработаны «Методика ДНК-идентификации биологических образцов животных волк обыкновенный (*Canis lupus lupus*) и собака домашняя (*Canis lupus familiaris*)» и «Методика применения информационно-статистического комплекса для анализа генетических данных животных биологического вида *Canis lupus* – волка обыкновенного (*Canis lupus lupus*) и собаки домашней (*Canis lupus familiaris*)», предназначенные для практикующих судебных экспертов. Информационно-статистический комплекс содержит массивы генотипов и математический аппарат, позволяющий автоматизировать обработку данных при установлении принадлежности образца к волку обыкновенному или собаке домашней, расчете достоверности экспертного вывода в идентификационном исследовании или установлении биологического родства. Заложена также возможность ведения генотипоскопического учета биологических образцов животных биологического вида *C. lupus* в судебной экспертизе. Разработанные методики включены в Реестр судебно-экспертных методик и иных методических материалов Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь, что соответствует имплементации разработки в национальную правовую систему.

Список литературы / References

- Министерство лесного хозяйства Республики Беларусь. Годовой отчет о ведении лесного хозяйства. 2021 [Ministry of Forestry of the Republic of Belarus. Annual Forest Management Report. 2021 (in Russian)]
- Aspi J., Roininen E., Ruokonen M., Kojola I., Vila C. Genetic diversity, population structure, effective population size and demographic history of the Finnish wolf population. *Mol. Ecol.* 2006;15(6):1561–1576. DOI 10.1111/j.1365-294X.2006.02877.x
- Benson D.A., Karsch-Mizrachi L., Lipman D.J., Ostell J., Sayers E.W. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 2005;34:D16–D20. DOI 10.1093/nar/gkj157
- Boitani L. Wolf Conservation and Recovery. Chicago: Univ. of Chicago Press, 2003;317–340
- Boom R.C.J.A., Sol C.J., Salimans M.M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M., Van der Noordaa J.P.M.E. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 1990;28(3):495–503. DOI 10.1128/jcm.28.3.495-503.1990
- Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 1980;32(3):314
- Buckleton J.S., Curran J.M., Walsh S.J. How reliable is the sub-population model in DNA testimony? *Forensic Sci. Int.* 2006;157(2-3): 144–148. DOI 10.1016/j.forsciint.2005.04.004
- Buckleton J.S., Bright J.A., Taylor D. Forensic DNA Evidence Interpretation. CRC Press, 2016. DOI 10.4324/9781315371115
- Caniglia R., Fabbri E., Greco C., Galaverni M., Randi E. Forensic DNA against wildlife poaching: identification of a serial wolf killing in Italy. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2010;4(5):334–338. DOI 10.1016/j.fsigen.2009.10.012

- Dan M., Šnjegota D., Veličković N., Stefanović M., Obreht Vidaković D., Čirović D. Genetic variability and population structure of grey wolf (*Canis lupus*) in Serbia. *Russ. J. Genet.* 2016;52(8):821-827. DOI 10.1134/S1022795416080044
- DeNise S., Johnston E., Halverson J., Marshall K., Rosenfeld D., McKenn S., Sharp T., Edwards J. Power of exclusion for parentage verification and probability of match for identity in American kennel club breeds using 17 canine microsatellite markers. *Anim. Genet.* 2004;35(1):14-17. DOI 10.1046/j.1365-2052.2003.01074.x
- Eichmann C., Berger B., Reinhold M., Lutz M., Parson W. Canine-specific STR typing of saliva traces on dog bite wounds. *Int. J. Leg. Med.* 2004;118(6):337-342. DOI 10.1007/s00414-004-0479-7
- 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
- Excoffier L., Laval G., Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online.* 2005;1:47-50
- Fan Z., Silva P., Gronau I., Wang S., Armero A.S., Schweizer R.M., Ramirez O., Pollinger J., Galaverni M., Ortega Del-Vecchyo D., Du L., Zhang W., Zhang Z., Xing J., Vilà C., Marques-Bonet T., Godinho R., Yue B., Wayne R.K. Worldwide patterns of genomic variation and admixture in gray wolves. *Genome Res.* 2016;26(2):163-173. DOI 10.1101/gr.197517.115
- Freedman A.H., Wayne R.K. Deciphering the origin of dogs: from fossils to genomes. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2017;5:281-307. DOI 10.1146/annurev-animal-022114-110937
- Galinskayaa T.V., Schepetov D.M., Lysenkov S.N. Prejudices against microsatellite studies and how to resist them. *Russ. J. Genet.* 2019; 55(6):617-632. DOI 10.1134/S0016675819060043
- Godinho R., Llaneza L., Blanco J.C., Lopes S., Alvares F., Garcia E.J., Palacios V., Cortés Y., TALEGÓN J., Ferrand N. Genetic evidence for multiple events of hybridization between wolves and domestic dogs in the Iberian Peninsula. *Mol. Ecol.* 2011;20(24):5154-5166. DOI 10.1111/j.1365-294x.2011.05345.x
- Hall T., Biosciences I., Carlsbad C.J.G.B.B. BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bull. Biosci.* 2011;2(1):60-61
- Halverson J., Basten C. A PCR multiplex and database for forensic DNA identification of dogs. *J. Forensic Sci.* 2005;50(2):352-363
- Hedrick P.W. Genetics of Populations. Boston: Jones and Bartlett, 2000
- Kalinowski S.T., Taper M.L., Marshall T.C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecol.* 2007;16(5):1099-1106. DOI 10.1111/j.1365-294x.2007.03089.x
- Korablev M.P., Korablev N.P., Korablev P.N. Genetic diversity and population structure of the grey wolf (*Canis lupus* Linnaeus, 1758) and evidence of wolf × dog hybridisation in the centre of European Russia. *Mamm. Biol.* 2021;101(1):91-104. DOI 10.1007/s42991-020-00074-2
- Magory Cohen T., King R., Dolev A., Boldo A., Lichter-Peled A., Kahila Bar-Gal G. Genetic characterization of populations of the golden jackal and the red fox in Israel. *Conserv. Genet.* 2013;14(1):55-63. DOI 10.1007/s10592-012-0423-1
- Parker H.G., Dreger D.L., Rimbault M., Davis B.W., Mullen A.B., Carpintero-Ramirez G., Ostrander E.A. Genomic analyses reveal the influence of geographic origin, migration, and hybridization on modern dog breed development. *Cell Rep.* 2017;19(4):697-708. DOI 10.1016/j.celrep.2017.03.079
- Peakall R.O.D., Smouse P.E. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes.* 2006;6(1):288-295. DOI 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x
- 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
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics.* 2000;155(2):945-959. DOI 10.1093/genetics/155.2.945
- Radko A., Podbielska A. Microsatellite DNA analysis of genetic diversity and parentage testing in the popular dog breeds in Poland. *Genes.* 2021;12(4):485. DOI 10.3390/genes12040485
- Revised Validation Guideline – Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM). *Forensic Sci. Commun.* 2004;6(3). Available from: http://www.fbi.gov/about-us/lab/forensic-science-communications/fsc/july2004/standards/2004_03_standards02.htm
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977;74(12):5463-5467. DOI 10.1073/pnas.74.12.5463
- Sastre N., Vila C., Salinas M., Bologov V.V., Urios V., Sánchez A., Francino O., Ramírez O. Signatures of demographic bottlenecks in European wolf populations. *Conserv. Genet.* 2011;12(3):701-712. DOI 10.1007/s10592-010-0177-6
- Seddon J.M. Canid-specific primers for molecular sexing using tissue or non-invasive samples. *Conserv. Genet.* 2005;6(1):147-149. DOI 10.1007/s10592-004-7734-9
- Stronen A.V., Aspi J., Caniglia R., Fabbri E., Galaverni M., Godinho R., Kvist L., Mattucci F., Nowak C., von Thaden A., Harmoinen J. Wolf-dog admixture highlights the need for methodological standards and multidisciplinary cooperation for effective governance of wild × domestic hybrids. *Biol. Conserv.* 2022;266:109467. DOI 10.1016/j.biocon.2022.109467
- The Evaluation of Forensic DNA Evidence / Committee on DNA Forensic Science: an Update. National Research Council. Washington D.C.: National Academy Press, 1996
- van Asch B., Alves C., Santos L., Pinheiro R., Pereira F., Gusmao L., Amorim A. Genetic profiles and sex identification of found-dead wolves determined by the use of an 11-loci PCR multiplex. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2010;4(2):68-72. DOI 10.1016/j.fsigen.2009.05.003
- van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P., Shipley P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes.* 2004;4(3):535-538. DOI 10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x
- Verardi A., Lucchini V., Randi E. Detecting introgressive hybridization between free-ranging domestic dogs and wild wolves (*Canis lupus*) by admixture linkage disequilibrium analysis. *Mol. Ecol.* 2006; 15(10):2845-2855. DOI 10.1111/j.1365-294X.2006.02995.x
- Wright S. Variability Within and Among Natural Populations. Evolution and the Genetics of Populations. Chicago: Univ. of Chicago Press, 1978

ORCID

A.E. Hrebianchuk orcid.org/0000-0002-1224-3275
I.S. Tsybovsky orcid.org/0000-0002-8611-8215

Благодарности. Авторы выражают благодарность Республиканскому государственному общественному объединению «Белорусское общество охотников и рыболовов», ветеринарному центру «Друг» и государственному учреждению «Минская городская ветеринарная станция» за помощь в формировании коллекции биологических образцов.


Финансирование. Работа выполнялась на базе государственного учреждения «Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь» и финансировалась Государственным комитетом по науке и технологиям Республики Беларусь (номер государственной регистрации НИОК(ТР): 20190195).


Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 24.01.2023. После доработки 04.07.2023. Принята к публикации 11.07.2023.

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

Сравнительные особенности геномного разнообразия кур *Gallus gallus domesticus* с декоративным фенотипом оперения «баки и борода»


Н.В. Дементьева, Ю.С. Щербаков, А.Е. Рябова, А.Б. Вахрамеев, А.В. Макарова, О.А. Николаева, А.П. Дысин, А.И. Азовцева, Н.Р. Рейнбах, О.В. Митрофанова 


Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального исследовательского центра животноводства – ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, пос. Тярлево, Санкт-Петербург, Россия
 mo1969@mail.ru

Аннотация. На протяжении истории взаимодействия с домашними животными человек стремился усилить не только их продуктивные качества, но и различные декоративные особенности. У кур ряда пород сформировались пучки удлиненных перьев, выступающих сбоку и снизу от клюва, образуя фенотип, описываемый как «баки и борода» (англ. muffs and beard). Это неполный аутомно-доминантный фенотип, кодируемый локусом Mb, локализованным на хромосоме GGA27. Цель нашей работы – проанализировать генетическое разнообразие пород кур, определенное с помощью полногеномного генотипирования с использованием чипов Chicken 60K BeadChip. Всего в анализе учитывалось 53 313 однонуклеотидных полиморфных замен (SNP). ДНК получена от пород, обладающих маркерным признаком «баки и борода»: фавероль ($n = 20$), украинская ушанка ($n = 18$), орловская ($n = 20$), новопавловская белая ($n = 20$) и новопавловская цветная ($n = 15$). В качестве альтернативной породы, не имеющей фенотипа «баки и борода», использовалась русская белая ($n = 20$). Птица содержалась в ЦКП «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур» (г. Санкт-Петербург, Пушкин), входящем в состав Сетевой биоресурсной коллекции животных и птиц. Методом многомерного шкалирования установлено, что отдельную группировку образовали популяции новопавловская белая и новопавловская цветная. В самостоятельную группу объединились породы украинская ушанка и орловская. С помощью кластерного анализа с учетом ошибки кросс-валидации и наиболее вероятным числом кластеров $K = 4$ орловская порода выделена в отдельную группу. Украинская ушанка в этом случае продемонстрировала значительное сходство с орловской породой. При $K = 5$ разделились новопавловская белая и новопавловская цветная популяции. И только при $K = 6$ явный отдельный кластер образовала украинская ушанка. У кур русской белой породы отмечено наибольшее количество коротких (1–2 Мб) гомозиготных районов. В месте расположения гена *HOXB8* в регионе 3.402–3.404 Мб на хромосоме GGA27 у представителей пород с фенотипом «баки и борода» гомозиготные районы встречаются редко. Сканирование генома кур с использованием чипа Chicken 60K BeadChip позволяет получить достаточно информации о генетическом разнообразии пород кур для понимания особенностей формирования у них декоративного фенотипа «баки и борода». Ключевые слова: полногеномное генотипирование; SNP-маркер; фенотип; генотип; генетическое разнообразие; полиморфизм; гетерозиготность; ДНК; породы кур.

Для цитирования: Дементьева Н.В., Щербаков Ю.С., Рябова А.Е., Вахрамеев А.Б., Макарова А.В., Николаева О.А., Дысин А.П., Азовцева А.И., Рейнбах Н.Р., Митрофанова О.В. Сравнительные особенности геномного разнообразия кур *Gallus gallus domesticus* с декоративным фенотипом оперения «баки и борода». *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(1):108-116. DOI 10.18699/vjgb-24-13

Comparative peculiarities of genomic diversity in *Gallus gallus domesticus* chickens with decorative plumage: the muffs and beard phenotype

N.V. Dementieva, Y.S. Shcherbakov, A.E. Ryabova, A.B. Vakhrameev, A.V. Makarova, O.A. Nikolaeva, A.P. Dysin, A.I. Azovtseva, N.R. Reinbah, O.V. Mitrofanova 

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding – Branch of the L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Tyarlevo, St. Petersburg, Russia
 mo1969@mail.ru

Abstract. Throughout history, humans have been attempting to develop the ornamental features of domestic animals in addition to their productive qualities. Many chicken breeds have developed tufts of elongated feathers that jut out from the sides and bottom of the beak, leading to the phenotype known as muffs and beard. It is an incomplete autosomal dominant phenotype determined by the Mb locus localised on chromosome GGA27. This project aimed to analyse the genetic diversity of chicken breeds using full genomic genotyping with the Chicken 60K BeadChip. A total of 53,313 Single Nucleotide Polymorphisms were analysed. DNA was obtained from breeds with the muffs and beard as a

marker phenotype: Faverolles ($n = 20$), Ukrainian Muffed ($n = 18$), Orloff ($n = 20$), Novopavlov White ($n = 20$), and Novopavlov Coloured ($n = 15$). The Russian White ($n = 20$) was selected as an alternative breed without the muffs and beard phenotype. The chickens are owned by the Centre of Collective Use "Genetic Collection of Rare and Endangered Breeds of Chickens" (St. Petersburg region, Pushkin), and are also included in the Core Shared Research Facility (CSRF) and/or Large-Scale Research Facility (LSRF). Multidimensional scaling revealed that the Novopavlov White and the Novopavlov Coloured populations formed a separate group. The Ukrainian Muffed and the Orloff have also been combined into a separate group. Based on cluster analysis, with the cross-validation error and the most probable number of clusters $K = 4$ taken into account, the Orloff was singled out as a separate group. The Ukrainian Muffed exhibited a notable similarity with the Orloff under the same conditions. At $K = 5$, the populations of the Novopavlov White and the Novopavlov Coloured diverged. Only at $K = 6$, a distinct and separate cluster was formed by the Ukrainian Muffed. The Russian White had the greatest number of short (1–2 Mb) homozygous regions. If the *HOXB8* gene is located between 3.402 and 3.404 Mb on chromosome GGA27, homozygous regions are rarely found in the chickens with the muffs and beard phenotype. Scanning the chicken genome with the Chicken 60K BeadChip provided enough information about the genetic diversity of the chicken breeds for the peculiarities of the development of the ornamental muffs and beard phenotypes in them to be understood. For example, Phoenix bantams, whose tail feathers grow throughout their lives, require greater consideration of husbandry conditions.

Key words: whole-genome genotyping; SNP marker; phenotype; genotype; genetic diversity; polymorphism; heterozygosity; DNA; chicken breeds.

For citation: Dementieva N.V., Shcherbakov Y.S., Ryabova A.E., Vakhrameev A.B., Makarova A.V., Nikolaeva O.A., Dysin A.P., Azovtseva A.I., Reinbah N.R., Mitrofanova O.V. Comparative peculiarities of genomic diversity in *Gallus gallus domesticus* chickens with decorative plumage: the muffs and beard phenotype. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(1):108-116. DOI 10.18699/vjgb-24-13

Введение

Домашняя курица (*Gallus gallus domesticus*) – один из наиболее широко распространенных в мире видов домашних животных. Он играет ключевую роль в человеческом обществе не только как крупнейший источник животного белка, но и как важный фактор социально-культурного развития (Lawal, Nanotte, 2021). С момента одомашнивания куры были распространены по разным странам и континентам, в результате чего сегодня мы имеем возможность наблюдать множество пород кур.

Генетическая изменчивость является ключевой частью изучения эволюции, развития и дифференциации живых организмов. У домашних животных породы представляют собой особую систему, которая живет и развивается в соответствии с задачами, поставленными человеком. В итоге встречаются поразительные фенотипы, которые отличают животных, разводимых в домашних условиях, от их диких предков.

На протяжении исторического развития и взаимодействия с животными человек стремился усиливать и развивать у них не только продуктивные качества, но и различные декоративные особенности. Такие признаки могут в определенной степени ухудшить существование особей с выраженным их проявлением. Например, петухи породы феникс, у которых хвостовое оперение растет на протяжении всей жизни, требуют повышенного внимания к условиям содержания. Но значительная часть декоративных признаков, характерных для разных пород кур, не оказывает негативного влияния на животных. К таким особенностям можно отнести наличие у кур пучков удлиненных перьев, выступающих сбоку и снизу от клюва, образуя фенотип, описываемый как «баки и борода» (англ. muffs and beard). Это неполный аутосомно-доминантный фенотип, кодируемый локусом Mb.

Перья, расположенные в районе бороды и баков у кур, обладают сильной изменчивостью по форме и длине. У некоторых пород баки – это пышное перьевое украшение от уха и до уха (новопавловская, гудан, крив кер и др.), у

других они имеют слабую выраженность. В ряде случаев, например у кур породы антверпенский бородастый карлик, главным образом развиты баки, а горловая часть бороды почти не проявлена.

При изучении особенностей генома кур, обладающих фенотипическим признаком «баки и борода», было высказано предположение, что аллель Mb локализован на GGA27, формируя сложную структурную вариацию в геноме, ведущую к измененной экспрессии гена *HOXB8* (Guo Y. et al., 2016). Другими исследователями с помощью полногеномного анализа на GGA1, GGA2 и GGA27 также обнаружены участки, участвующие в формировании этого признака. Проведенный ими анализ семейства генов *HOXB8* выявил эволюционные различия у разных животных, а именно у птиц, пресмыкающихся, земноводных и млекопитающих, за исключением рыбы, чей белок *HOXB8* утратил мотив 10, что объясняет его потенциальную роль в эволюции сложных структур кожи, таких как ороговевшие придатки. Авторы указывают на сложные межбелковые взаимодействия продуктов генов семейства *HOXB* у кур, которые предположительно лежат в основе понимания механизмов развития и дифференциации фенотипа «баки и борода» (Yang et al., 2020).

К настоящему времени информация о регуляции образования перьев на голове у кур является неполной в силу фенотипического разнообразия признака «баки и борода». Вызывает особый интерес использование генофондных пород в качестве модельного объекта для поиска новых кандидатных генов, например, связанных с ростом волос у человека и животных. В силу другой селекционной нагрузки, без жесткого отбора по продуктивным признакам, генофондные породы кур имеют высокое генетическое разнообразие по сравнению с промышленными популяциями. Поэтому изучение их геномов может дать новую информацию о структурных преобразованиях в генах, накоплении гомозиготных районов и других генетических особенностях.

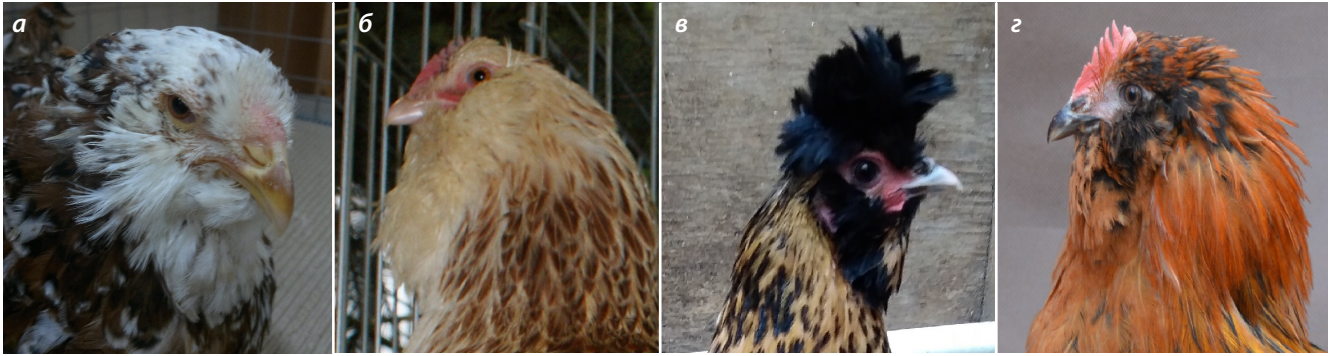


Рис. 1. Проявление фенотипа «баки и борода» у кур различных пород: а – орловская; б – фавероль; в – новопавловская; з – украинская ушанка.

В коллекции ЦКП «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур» (<https://vniigen.ru/ckp-geneticheskaya-kolleksiya-redkix-i-ischezayushhix-porod-kur/>), входящей в состав Сетевой биоресурсной коллекции животных и птиц, содержится несколько пород, обладающих этим признаком: фавероль, ушанка, орловская и новопавловская (Паронян и др., 2016). Орловская ситцевая является старинной русской породой кур с оригинальными экстерьерными признаками и выраженным признаком бороды и баков. Украинская ушанка относится к местным историческим породам южных регионов Украины и России, обладает разнообразной окраской оперения. Фавероль – старинная французская порода, отличающаяся высокими вкусовыми качествами мяса. Она также имеет декоративную пышную бороду и баки. Новопавловская – это фенотипически восстановленная старинная декоративная павловская порода кур, тоже характеризуется наличием бороды и баков (рис. 1). Кроме того, в ЦПК содержатся породы, не имеющие в геноме аллеля Mb.

Целью нашей работы было проанализировать генетическое разнообразие пород кур, обладающих маркерным признаком «баки и борода», определенное с помощью полногеномного генотипирования с использованием чипов Chicken 60K BeadChip, для получения новой информации о структурных преобразованиях в геномах, накоплении гомозиготных районов и других генетических особенностях.

Материалы и методы

Материалом исследования послужила геномная ДНК кур, содержащихся в биоресурсной коллекции Всероссийского НИИ генетики и разведения сельскохозяйственных животных «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур» (г. Санкт-Петербург, Пушкин), входящей в состав Сетевой биоресурсной коллекции.

В исследование были взяты породы кур, имеющие маркерный признак «баки и борода» (muffs and beard). Это фавероль ($n = 20$), украинская ушанка ($n = 18$), орловская ($n = 20$) и новопавловская, среди представителей которой сформировано две группы – новопавловская белая ($n = 20$) и новопавловская цветная ($n = 15$). В качестве альтернативной породы, не имеющей фенотипа “muffs and beard”, взята порода русская белая ($n = 20$).

Кровь кур брали из подкрыльцовой вены в микропробирки, содержащиеся в качестве антикоагулянта 30 мкл

0.5 М ЭДТА. Выделение геномной ДНК производилось методом фенол-хлороформной экстракции.

Качество выделенной ДНК оценивали посредством определения степени поглощения 260 и 280 нм ($OD_{260/280}$) с использованием прибора NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Для проведения полногеномного генотипирования были отобраны образцы ДНК со значением $OD_{260/280}$ в пределах 1.6–2.0.

При полногеномном генотипировании использовали ДНК-чипы средней плотности Chicken 60K BeadChip (Illumina, США), которые содержат ~50 тыс. SNP. Полученные полногеномные данные послужили материалом, на основе которого оценивали генетическое разнообразие последовательности ДНК. Всего в анализ было взято 53 313 SNP.

Контроль качества и фильтрацию данных генотипирования каждого SNP и каждого образца выполняли в программном пакете PLINK 1.9 (<http://zzz.bwh.harvard.edu/plink/>), используя следующие фильтры (в скобках даны соответствующие команды в программе PLINK): доля генотипированных SNP от общего количества SNP на ДНК-чипе (оценка качества генотипирования образца) по всем исследуемым SNP для индивидуального образца не ниже 90 %; качество генотипирования каждого из исследованных SNP по всем генотипированным образцам не ниже 90 %; частота встречаемости минорных аллелей более 1 %; отклонение SNP генотипов от распределения Харди–Вайнберга в совокупности протестированных образцов со статистической значимостью p -value < 10^{-6} .

Генетическое разнообразие оценивали с помощью R пакета diveRsity (Keenan et al., 2013), рассчитывая следующие показатели: H_O – наблюдаемая гетерозиготность; H_E – ожидаемая гетерозиготность; F – коэффициент инбридинга; F_{min} и F_{max} – соответственно минимальный и максимальный обнаруженные коэффициенты инбридинга.

При оценке геномной архитектуры пород использовали ряд методов: метод анализа количества и средней длины протяженных гомозиготных участков (runs of homozygosity, ROH); метод многомерного шкалирования (multidimensional scaling, MDS) на основе матрицы дистанций идентичности по состоянию (identity-by-state, IBS); метод F_{ST} -анализа генетической дивергенции популяций.

ROH определяли, применяя метод последовательной детекции SNP, реализованный в R пакете detectRUNS (Biscarini et al., 2018). Чтобы исключить недооценку числа

РОН длиной более 8 Мб, было допущено наличие одного SNP с отсутствующим генотипом и не более одного возможного гетерозиготного генотипа (Ferenčaković et al., 2013). Чтобы исключить общие РОН, установлен порог минимальной длины для одного РОН на уровне 1 Мб.

Для минимизации ложноположительных результатов рассчитано минимальное число SNP (Purfield et al., 2012):

$$l = \frac{\log_e \frac{\alpha}{n_s \cdot n_i}}{\log_e (1 - \overline{het})}$$

где l – минимальное количество SNP, составляющее РОН; n_s – число генотипированных SNP на индивидуума; n_i – количество генотипированных индивидуумов; α – процентное содержание ложноположительных РОН (в нашем исследовании установлено на уровне 0.05); \overline{het} – средняя гетерозиготность, рассчитанная по всем SNP. В нашем случае минимальное число SNP составило 23.

Первоначально были определены число и длина РОН для каждого индивидуума, а затем рассчитаны их средние значения внутри каждой из пород. Дополнительно рассчитан коэффициент геномного инбридинга на основе РОН ($F_{\text{РОН}}$) как отношение суммы длины всех РОН в расчете на животное к общей длине аутосомального генома. Затем определено число РОН в геноме изучаемых пород по классам длины: (1, 2), (2, 4), (4, 8), (8, 16) и >16 Мб. Долю генома, покрытую различными сегментами РОН, находили, рассчитывая сумму РОН для классов с различной минимальной длиной (>1, >2, >4, >8 и >16 Мб).

MDS выполняли в программе PLINK 1.9 (Anderson et al., 2010) с последующим построением графика в R пакете ggplot2. Расчет индекса фиксации F_{ST} проводили с использованием пакета EIGENSOFT 6.1.4 (Price et al., 2006)

с графическим представлением с помощью программного обеспечения SplitsTree (Huson, Bryant, 2006).

Генетическую структуру изучаемых пород оценивали в программе Admixture 1.3 (Alexander et al., 2009) с графическим представлением с помощью R пакета pophelper (Francis, 2017). Наиболее вероятное число предковых кластеров определяли как оптимальное число кластеров (K), рассчитывая значения ошибки кросс-валидации (CV error) в программе Admixture 1.3.

Филогенетическое дерево исследуемых популяций кур на основе попарных генетических дистанций F_{ST} было построено по методу «сети соседей» (Neighbor-Net) (Bryant, Moulton, 2004) в сервисе iTOL (Letunic, Bork, 2021).

Для оценки попарных генетических дистанций F_{ST} использовалась библиотека R StaMPP (Pembleton et al., 2013). На основе анализа 100 пермутаций была рассчитана значимость полученных результатов (P).

Результаты

Показатели генетического разнообразия в исследуемых породах представлены в табл. 1.

Попарные генетические дистанции F_{ST} (табл. 2) находились в пределах от 0.037 (между новопавловской цветной и новопавловской белой) до 0.220 (между русской белой и фавероль). Внутри выявленного кластера между украинской ушанкой и орловской значение F_{ST} составило 0.075. Визуализация генетических дистанций F_{ST} представлена на рис. 2.

Результаты визуализации данных с помощью анализа MDS приведены на рис. 3. Данный подход позволяет проанализировать и наглядно представить точки, соответствующие изучаемым объектам, так, чтобы минимизиро-

Таблица 1. Генетическое разнообразие в исследуемых породах

Порода	n	H_O	H_E	F	F_{max}	F_{min}
RB	20	0.285 ± 0.001	0.296 ± 0.001	0.037 ± 0.003	0.191	-0.096
F	20	0.321 ± 0.006	0.338 ± 0.001	0.051 ± 0.017	0.202	-0.087
UU	18	0.365 ± 0.005	0.364 ± 0.001	-0.002 ± 0.013	0.136	-0.082
O	20	0.355 ± 0.006	0.344 ± 0.001	-0.031 ± 0.017	0.215	-0.128
PB	20	0.344 ± 0.003	0.338 ± 0.001	-0.016 ± 0.009	0.057	-0.104
P	15	0.344 ± 0.007	0.342 ± 0.001	-0.007 ± 0.020	0.184	-0.084

Примечание. n – количество особей в анализе; H_O – наблюдаемая гетерозиготность; H_E – ожидаемая гетерозиготность; F – коэффициент инбридинга; F_{max} – максимальный обнаруженный коэффициент инбридинга; F_{min} – минимальный обнаруженный коэффициент инбридинга. При уровне значимости $\alpha = 0.05$ различия статистически не значимы.

Здесь и в табл. 2 и 3: RB – русская белая, F – фавероль, UU – украинская ушанка, O – орловская, PB – новопавловская (белая популяция), P – новопавловская (цветная популяция).

Таблица 2. Попарные генетические дистанции F_{ST} между исследуемыми породами кур

Показатель	RB	F	UU	O	PB
F	0.220	0			
UU	0.136	0.133	0		
O	0.176	0.180	0.075	0	
PB	0.198	0.214	0.137	0.174	0
P	0.187	0.206	0.128	0.165	0.037

Примечание. Статистическая значимость по всем парам сравнения – $p < 0.0001$.

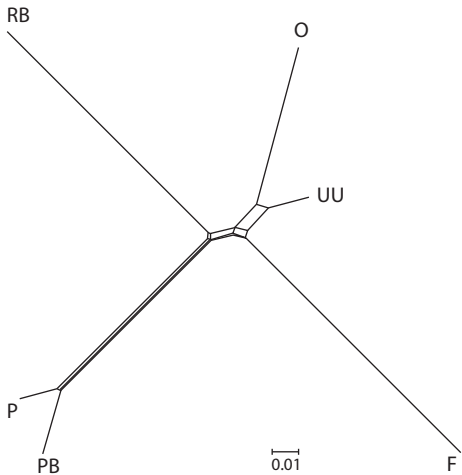


Рис. 2. Филогенетическое дерево исследуемых популяций кур на основе попарных генетических дистанций F_{ST} , построенное по методу «сети соседей» (Neighbor-Net).

Здесь и на рис. 3–6: RB – русская белая, F – фавероль, UU – украинская ушанка, O – орловская, PB – новопавловская (белая популяция), P – новопавловская (цветная популяция).

вать расстояние между ними. На диаграмме каждый объект располагается в пространстве в зависимости от выбранной системы главных компонент. Во всех случаях MDS анализ показал, что популяции новопавловская белая и новопавловская цветная образовали отдельный кластер. Еще один кластер объединил украинскую ушанку и орловскую породы кур. Кластеризация не изменялась при использовании в сравнении разных компонент.

При расчете CV erog в кластерном анализе Admixture наиболее вероятное число кластеров (K) в нашей выборке равнялось четырем. В этом случае ошибка кросс-валидации была наименьшей (CV erog = 0.54930). При K = 4 орловская порода формирует отдельный кластер (рис. 4). Украинская ушанка представляет собой популяцию фенотипически и генетически идентичных между собой индивидуумов, которые демонстрируют наибольшее сходство с орловской породой. При K = 5 произошло разделение новопавловской белой и цветной популяций. При K = 6 отчетливый отдельный кластер образовала порода украинская ушанка, в которой встречаются особи, обладающие структурами в геноме, схожими с генетическими структурами орловской породы кур.

Анализ распределения гомозиготных районов по длине показал, что наибольшее количество коротких гомозиготных

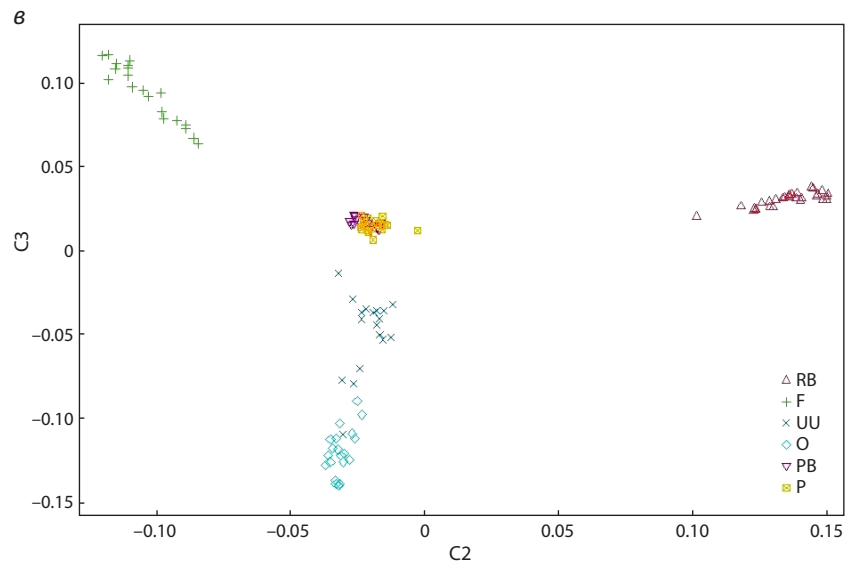
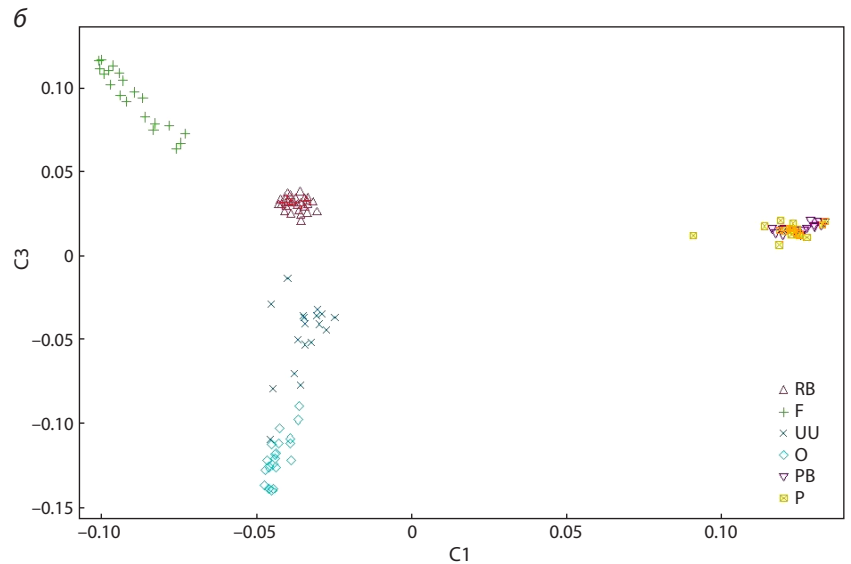
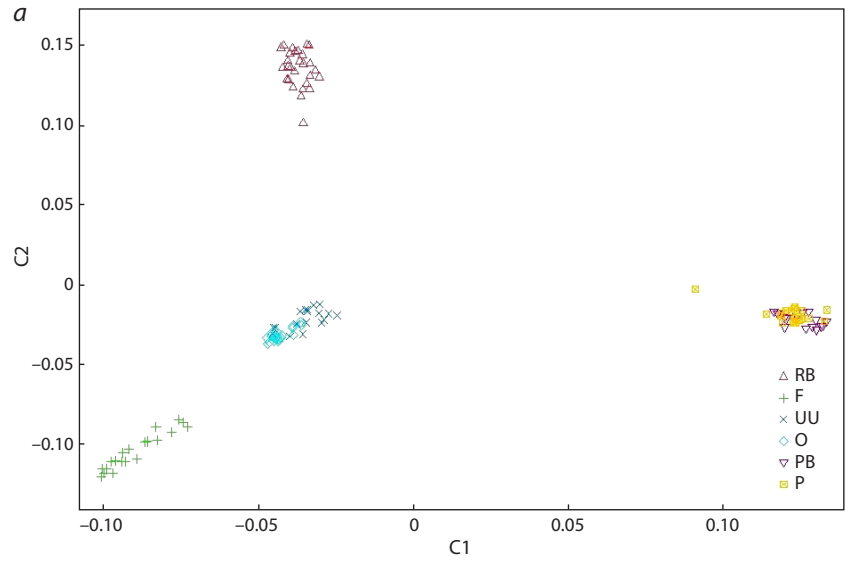


Рис. 3. Графики многомерного шкалирования с помощью анализа MDS в координатах главных компонент C1–C3.

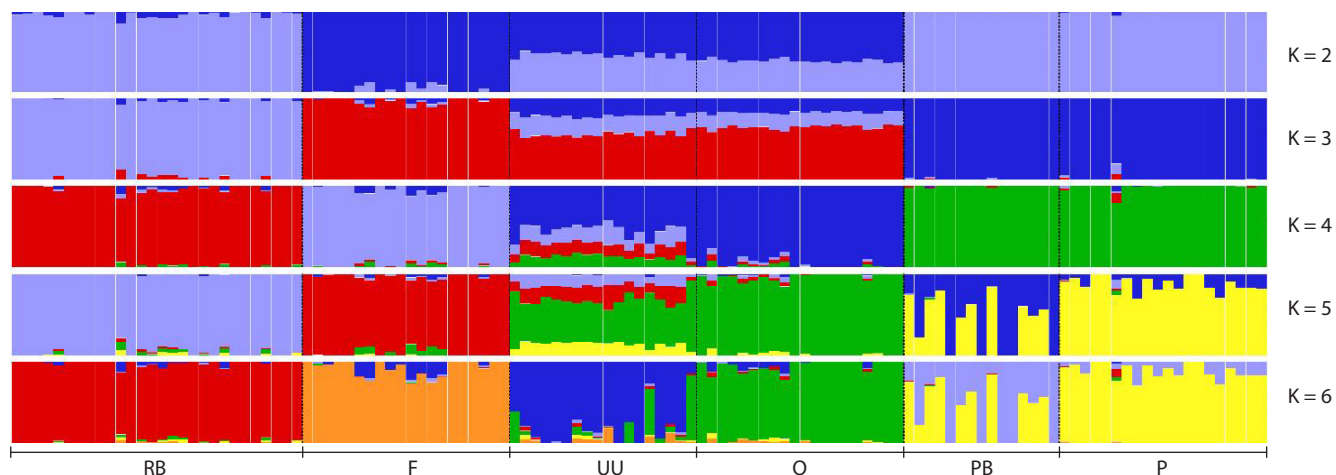


Рис. 4. Кластерный анализ Admixture, проведенный для шести пород кур на основе полногеномного SNP-генотипирования.

Таблица 3. Описательная статистика пробегов гомозиготности, определенных на основании SNP генотипов в изучаемых породах кур

Популяция	n	Длина ROH, Мб			Число ROH		
		X ± SE	Min	Max	X ± SE	Min	Max
RB	38	177.15 ± 5.29	126.12	234.06	143.71 ± 2.71	115	168
F	20	231.55 ± 11.51 ¹	142.65	313.17	155.50 ± 6.50 ²	109	206
UU	18	91.29 ± 9.20	48.20	200.17	78.11 ± 4.50	51	125
O	20	139.55 ± 10.01	89.60	291.26	105.00 ± 4.80	80	177
PB	15	224.42 ± 12.22 ²	166.15	341.79	153.07 ± 4.35 ²	133	192
P	20	184.90 ± 4.98	152.03	248.75	136.95 ± 2.60	108	153

^{1,2} Различия статистически не достоверны. В остальных случаях различия достоверны при уровне значимости $\alpha = 0.05$.

районов (1–2 Мб) отмечено у породы русская белая, а наименьшее – у породы фавероль (рис. 5). Гомозиготных районов класса 16+ было больше всего у новопавловской породы цветной популяции, а меньше всего – у русской белой.

Описательная статистика гомозиготных районов представлена в табл. 3. Среднее число и средняя длина протяженных гомозиготных участков были минимальными у исследованных образцов породы украинская ушанка. У породы фавероль отмечены наивысшие показатели средней длины и среднего числа ROH.

В связи с тем, что фенотип «баки и борода» ассоциирован с геном *HOM8*, который расположен на хромосоме GGA27, мы отдельно проанализировали гомозиготные районы в этой части генома кур (рис. 6). В регионе 3.402–3.404 Мб на GGA27 у представителей пород с фенотипом «баки и борода» ROH-фрагменты встречаются редко (см. рис. 6).

Обсуждение

Современные методы изучения полиморфизма геномной ДНК позволяют получить большое количество информации, которая может быть использована для понимания полногеномной архитектуры популяций. Генотипирование с помощью чипов различной плотности дает возмож-

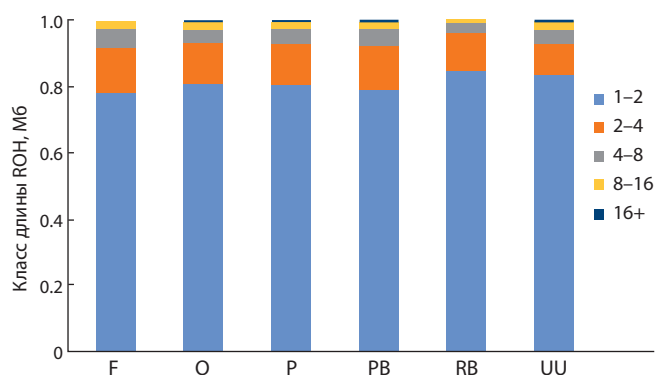


Рис. 5. Распределение числа пробегов гомозиготности (ROH) в зависимости от их средней длины в исследованных группах кур.

ность оценить филогенетическую дивергенцию пород животных, а также применить полученные данные для сохранения уникальности генетического разнообразия популяций (Криворучко и др., 2021; Dementieva et al., 2021). Информация об особенностях генетических структур является важным вкладом в знания о генетическом разнообразии, она необходима для исследования исторических процессов, связанных с формированием по-

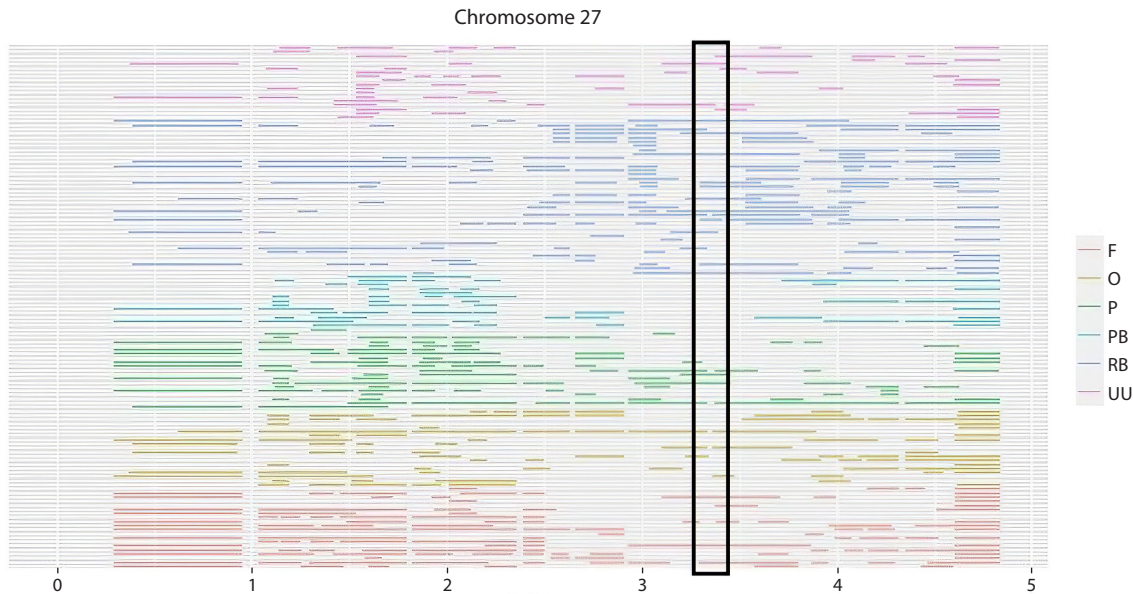


Рис. 6. Расположение пробегов гомозиготности на хромосоме GGA27 у кур. Рамкой выделен регион, аннотированный с аллелем Mb.

пуляций и пониманием путей эволюции популяций как отдельных экосистем, находящихся под влиянием человеческого фактора.

В нашем исследовании с помощью чипа Chicken 60K BeadChip было идентифицировано 53 313 однонуклеотидных полиморфизмов. Используемые ранее методы изучения генетического разнообразия, основанные на анализе мини- и микросателлитных локусов, а также митохондриальной ДНК, имеют значительно более низкое разрешение (Фисинин и др., 2017; Guo H.W. et al., 2017).

Расчитанные по данным полногеномного генотипирования ожидаемая (H_E) и наблюдаемая (H_O) гетерозиготность (см. табл. 1) оказались выше у кур, которые выделились в отдельные кластеры при анализе MDS (см. рис. 3). У первой группы, объединившей популяции новопавловской породы, отмечены значения $H_O = 0.344$, а H_E варьировала от 0.338 ± 0.001 до 0.342 ± 0.001 . У второй группы, куда попали породы украинская ушанка и орловская, H_O менялась от 0.355 ± 0.006 до 0.365 ± 0.005 , а значения H_E колебались от 0.344 ± 0.001 до 0.364 ± 0.001 (см. табл. 1). Эти данные хорошо согласуются с материалами других исследователей (Strillacci et al., 2017; Yuan et al., 2022).

Анализ многомерного шкалирования выявил, что наиболее удаленными друг от друга породами являются русская белая и фавероль. Максимальную генетическую дивергенцию между этими породами можно объяснить историей происхождения: русская белая порода кур формировалась на основе белых леггорнов отечественного происхождения (Деметьева и др., 2017), а фавероль выведена во Франции с использованием местных кур. Генетически схожие породы – орловская ситцевая, украинская ушанка и фавероль. Белая и цветная популяции новопавловской породы образовали один кластер, что показывает их одинаковую генетическую архитектуру. Украинская ушанка имеет сходные фрагменты генома с орловской сит-

цевой. Скорее всего, это связано с интрогрессией геномов между породами, которая могла произойти в период конца XIX–начала XX в., когда обе породы были многочисленны и развивались на общей территории. Использование для анализа различных компонент не приводило к изменению картины расположения популяций в пространстве, что говорит о том, что данный подход отражает реальную картину генетической дивергенции пород.

Оценка генетического разнообразия позволяет глубже понять особенности геномной архитектуры пород и популяций кур (Malomane et al., 2019; Restoux et al., 2022). Визуализация попарных генетических дистанций F_{ST} показала генетическое родство между породами орловская ситцевая, украинская ушанка и фавероль, а также между популяциями новопавловской породы кур (белая и цветная популяции) (см. рис. 2).

На филогенетическом дереве четко отмечена максимальная дивергенция пород кур фавероль и русская белая. Общее происхождение имеет ветвь, включающая в себя породы фавероль, украинская ушанка и орловская ситцевая (см. рис. 2). Каждая из указанных пород формирует в дальнейшем свои ответвления. Орловская ситцевая порода кур находится на удалении от украинской ушанки, при этом значительными различиями и консолидацией характеризуются куры породы фавероль. Популяции новопавловской породы (белая и цветная) практически не дивергировали. Высокий уровень генетической дифференциации между породами в нашей работе сопоставим с литературными данными, описанными ранее при изучении других пород (Dementieva et al., 2020; Fedorova et al., 2022).

Результаты анализа многомерного шкалирования подтверждены не только визуализацией попарных генетических дистанций F_{ST} с помощью алгоритма «сети соседей», но и программой Admixture (см. рис. 4). При $K = 4$ украинская ушанка и орловская отделились от остальных

популяций. Как и при оценке F_{ST} , изученная нами популяция украинской ушанки имеет особей, генетически сходных с орловской породой. Предположительно, это связано с интрогрессией геномов между породами. Вероятность незапланированных скрещиваний между популяциями украинской ушанки и орловской породы исторически обусловлена близостью регионов разведения этих пород в прошлом. При $K = 5$ произошло разделение белой и цветной популяций новопавловской породы кур. Данные результаты свидетельствуют об идентичной генетической структуре этих популяций, при этом новопавловская белая была получена отбором белых особей в цветной популяции.

Наибольшее количество коротких гомозиготных районов (1–2 Мб), обнаруженных у пород русская белая и украинская ушанка, говорит о наличии давнего инбридинга (см. рис. 5). Русская белая порода кур была получена с применением жесткого отбора на устойчивость цыплят к холоду. Благодаря разовому скрещиванию в 2005 г. с белым леггорном, популяция русских белых кур не имеет тенденции к росту гомозиготности, что свидетельствует о высоком генетическом разнообразии в популяции. Длинных гомозиготных районов класса 16+ было больше у пород новопавловская (белая и цветная популяции), орловская ситцевая и украинская ушанка, что указывает на недавний инбридинг. У русской белой породы отмечено наименьшее количество длинных гомозиготных районов, что говорит об отсутствии инбридинга внутри популяции благодаря индивидуальному закреплению производителя при разведении (Fedorova et al., 2022; Mulim et al., 2022).

Анализ расположения гомозиготных районов в регионе, где аннотирован ген *HOXB8*, отвечающий за фенотип «баки и борода», выявил отсутствие таких районов у пород с данным фенотипом. Вероятно, это связано с высокой изменчивостью указанного региона. В работе (Guo Y. et al., 2016) было отмечено, что наличие аллеля Mb приводит к появлению эктопической экспрессии гена *HOX8*, являющейся следствием структурной мутации в результате дупликации трех районов на хромосоме 27, что не способствовало селективному накоплению гомозиготных регионов. На хромосоме GGA27 нами обнаружены ROH-регионы в районе 1.5–1.6 Мб, встречающиеся более чем у 60 % представителей исследованных пород, за исключением русской белой, лишенной баков и борода (см. рис. 6). Возможно, накопление гомозиготности в этих регионах характерно не для всех особей в исследуемых породах. Это позволяет нам говорить о том, что данный участок генома с определенной долей вероятности может быть использован как маркер признака «баки и борода».

Заключение

В результате проведенного нами исследования можно сказать, что полногеномное генотипирование с использованием ДНК-чипов средней плотности Chicken 60K BeadChip (Illumina, США) является точным методом анализа генетической дивергенции популяций кур различного исторического происхождения. Разные статистические подходы к интерпретации данных дают сходные результаты, которые объяснимы с точки зрения как исторического развития экосистемы породы, так и особенностей метода

выявления полиморфизмов. Полученные нами данные позволяют глубже понять особенности геномной архитектуры исследуемых пород и популяций кур и применить эту информацию для контроля изменчивости с целью сохранения генетического разнообразия. Собранная информация может быть полезна в дальнейшем для выявления кандидатных генов фенотипа «баки и борода» у кур, а также позволяет рекомендовать генофондные популяции как модельные объекты с высоким уровнем генетического разнообразия.

Список литературы / References

- Дементьева Н.В., Романов М.Н., Кудинов А.А., Митрофанова О.В., Станишевская О.И., Терлецкий В.П., Федорова Е.С., Никиткина Е.В., Племяшов К.В. Изучение структуры генофондной популяции русской белой породы кур методом геномного SNP-сканирования. *С.-х. биология*. 2017;52(6):1166-1174. DOI 10.15389/agrobiology.2017.6.1166rus
[Dementeva N.V., Romanov M.N., Kudinov A.A., Mitrofanova O.V., Stanishevskaya O.I., Terletsky V.P., Fedorova E.S., Nikitkina E.V., Plemyashov K.V. Studying the structure of a gene pool population of the Russian White chicken breed by genome-wide SNP scan. *Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2017; 52(6):1166-1174. DOI 10.15389/agrobiology.2017.6.1166eng]
- Криворучко А.Ю., Скокова А.В., Яцык О.А., Каниболоцкая А.А. Современные подходы генетической идентификации породной принадлежности сельскохозяйственных животных (обзор). *Аграр. наука Евро-Северо-Востока*. 2021;22(3):317-328. DOI 10.30766/2072-9081.2021.22.3.317-328
[Krivoruchko A.Y., Skokova A.V., Yatsyk O.A., Kanibolotskaya A.A. Modern approaches to the genetic identification of farm animal breeds (review). *Agrarnaya Nauka Euro-Severo-Vostoka = Agricultural Science Euro-North-East*. 2021;22(3):317-328. DOI 10.30766/2072-9081.2021.22.3.317-328 (in Russian)]
- Паронян И.А., Юрченко О.П., Вахрамеев А.Б., Макарова А.В. Разведение малочисленных и редких пород кур. *Генетика и разведение животных*. 2016;4:62-66.
[Paronyan I.A., Jurchenko O.P., Vakhrameev A.B., Makarova A.V. Breeding of indigenous and rare breeds of chickens. *Genetika i Razvedenie Zhivotnyh = Animal Genetics and Breeding*. 2016;4:62-66 (in Russian)]
- Фисинин В.И., Селионова М.И., Шинкаренко Л.А., Щербакова Н.Г., Кононова Л.В. Исследование микросателлитных локусов в породах индеек российской селекции. *С.-х. биология*. 2017;52(4):739-748. DOI 10.15389/agrobiology.2017.4.739rus
[Fisinin V.I., Selionova M.I., Shinkarenko L.A., Shcherbakova N.G. Study of microsatellites in the Russian breeds of turkey. *Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2017;52(4):739-748. DOI 10.15389/agrobiology.2017.4.739eng]
- Alexander D.H., Novembre J., Lange K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Res*. 2009;19(9):1655-1664. DOI 10.1101/gr.094052.109
- Anderson C., Pettersson F., Clarke G., Cardon L.R., Morris A.P., Zondervan K.T. Data quality control in genetic case-control association studies. *Nat. Protoc*. 2010;5:1564-1573. DOI 10.1038/nprot.2010.116
- Biscarini F., Cozzi P., Orozco-ter Wengel P. Lessons learnt on the analysis of large sequence data in animal genomics. *Anim. Genet*. 2018;49(3):147-158. DOI 10.1111/age.12655
- Bryant D., Moulton V. Neighbor-net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Mol. Biol. Evol*. 2004;21(2): 255-265. DOI.10.1093/molbev/msh018
- Dementieva N.V., Kudinov A.A., Larkina T.A., Mitrofanova O.V., Dysin A.P., Terletsky V.P., Tyshchenko V.I., Griffin D.K., Romanov M.N. Genetic variability in local and imported germplasm chicken populations as revealed by analyzing runs of homozygosity. *Animals (Basel)*. 2020;10(10):1887. DOI 10.3390/ani10101887

- Dementieva N.V., Mitrofanova O.V., Dysin A.P., Kudinov A.A., Stanishevskaya O.I., Larkina T.A., Plemashov K.V., Griffin D.K., Romanov M.N., Smaragdov M.G. Assessing the effects of rare alleles and linkage disequilibrium on estimates of genetic diversity in the chicken populations. *Animal*. 2021;15(3):100171. DOI 10.1016/j.animal.2021.100171
- Fedorova E.S., Dementieva N.V., Shcherbakov Y.S., Stanishevskaya O.I. Identification of key candidate genes in runs of homozygosity of the genome of two chicken breeds, associated with cold adaptation. *Biology (Basel)*. 2022;11(4):547. DOI 10.3390/biology11040547
- Ferenčaković M., Sölkner J., Curik I. Estimating autozygosity from high-throughput information: effects of SNP density and genotyping errors. *Genet. Sel. Evol.* 2013;45:42. DOI 10.1186/1297-9686-45-42
- Francis R.M. Pophelper: an R package and web app to analyse and visualize population structure. *Mol. Ecol. Resour.* 2017;17(1):27-32. DOI 10.1111/1755-0998.12509
- Guo H.W., Li C., Wang X.N., Li Z.J., Sun G.R., Li G.X., Liu X.J., Kang X.T., Han R.L. Genetic diversity of mtDNA D-loop sequences in four native Chinese chicken breeds. *Br. Poult. Sci.* 2017;58(5):490-497. DOI 10.1080/00071668.2017.1332403
- Guo Y., Gu X., Sheng Z., Wang Y., Luo C., Liu R., Qu H., Shu D., Wen J., Crooijmans R.P., Carlborg Ö., Zhao Y., Hu X., Li N. A complex structural variation on chromosome 27 leads to the ectopic expression of *HOXB8* and the muffs and beard phenotype in chickens. *PLoS Genet.* 2016;12(6):e1006071. DOI 10.1371/journal.pgen.1006071
- Huson D., Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.* 2006;23(2):254-267. DOI 10.1093/molbev/msj030
- Keenan K., McGinnity P., Cross T.F., Crozier W.W., Prodöhl P.A. diveRsite: an R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors. *Methods Ecol. Evol.* 2013;4(8):782-788. DOI 10.1111/2041-210X.12067
- Lawal R.A., Hanotte O. Domestic chicken diversity: origin, distribution, and adaptation. *Anim. Genet.* 2021;52(4):385-394. DOI 10.1111/age.13091
- Letunic I., Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(W1):W293-W296. DOI 10.1093/nar/gkab301
- Malomane D.K., Simianer H., Weigend A., Reimer C., Schmitt A.O., Weigend S. The SYNBREED chicken diversity panel: a global resource to assess chicken diversity at high genomic resolution. *BMC Genomics.* 2019;20(1):345. DOI 10.1186/s12864-019-5727-9
- Mulim H.A., Brito L.F., Pinto L.F.B., Ferraz J.B.S., Grigoletto L., Silva M.R., Pedrosa V.B. Characterization of runs of homozygosity, heterozygosity-enriched regions, and population structure in cattle populations selected for different breeding goals. *BMC Genomics.* 2022;23(1):209. DOI 10.1186/s12864-022-08384-0
- Pembleton L.W., Cogan N.O., Forster J.W. StAMPP: an R package for calculation of genetic differentiation and structure of mixed-ploidy level populations. *Mol. Ecol. Resour.* 2013;13(5):946-952. DOI 10.1111/1755-0998.12129
- Price A.L., Patterson N.J., Plenge R.M., Weinblatt M.E., Shadick N.A., Reich D. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nat. Genet.* 2006;38(8):904-909. DOI 10.1038/ng1847
- Purfield D.C., Berry D.P., McParland S., Bradley D.G. Runs of homozygosity and population history in cattle. *BMC Genet.* 2012;13:70. DOI 10.1186/1471-2156-13-70
- Restoux G., Rognon X., Vieaud A., Guemene D., Petitjean F., Rouger R., Brard-Fudulea S., Lubac-Paye S., Chiron G., Tixier-Boichard M. Managing genetic diversity in breeding programs of small populations: the case of French local chicken breeds. *Genet. Sel. Evol.* 2022;54:56. DOI 10.1186/s12711-022-00746-2
- Strillacci G., Cozzi M.C., Gorla E., Mosca F., Schiavini F., Román-Ponce S.I., Ruiz López F.J., Schiavone A., Marzoni M., Cerolini S., Bagnato A. Genomic and genetic variability of six chicken populations using single nucleotide polymorphism and copy number variants as markers. *Animal.* 2017;11(5):737-745. DOI 10.1017/S1751731116002135
- Yang K.X., Zhou H., Ding J.M., He C., Niu Q., Gu C.J., Zhou Z.X., Meng H., Huang Q.Z. Copy number variation in *HOXB7* and *HOXB8* involves in the formation of beard trait in chickens. *Anim. Genet.* 2020;51(6):958-963. DOI 10.1111/age.13011
- Yuan J., Li S., Sheng Z., Zhang M., Liu X., Yuan Z., Yang N., Chen J. Genome-wide run of homozygosity analysis reveals candidate genomic regions associated with environmental adaptations of Tibetan native chickens. *BMC Genomics.* 2022;23(1):91. DOI 10.1186/s12864-021-08280-z

ORCID

N.V. Dementieva orcid.org/0000-0003-0210-9344
Y.S. Shcherbakov orcid.org/0000-0001-6434-6287
A.E. Ryabova orcid.org/0000-0003-2362-2892
A.B. Vakhrameev orcid.org/0000-0001-5166-979X
A.V. Makarova orcid.org/0000-0002-3281-4581

O.A. Nikolaeva orcid.org/0000-0003-3828-1111
A.P. Dysin orcid.org/0000-0002-4468-0365
A.I. Azovtseva orcid.org/0000-0002-2963-378X
N.R. Reinbah orcid.org/0000-0001-6193-5617
O.V. Mitrofanova orcid.org/0000-0003-4702-2736

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках научного проекта № 075-15-2021-1037 (внутренний № 15.БПК.21.0001) с использованием ЦКП «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур» (Санкт-Петербург, Пушкин).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 28.03.2023. После доработки 25.09.2023. Принята к публикации 26.09.2023.

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

Ассоциация трех однонуклеотидных полиморфизмов в гене *LPIN1* с показателями молочной продуктивности у коров ярославской породы

А.В. Игошин¹, Т.М. Мишакова¹, Р.Б. Айтназаров¹, А.В. Ильина², Д.М. Ларкин³, Н.С. Юдин¹ 

¹ Федеральное исследовательское учреждение Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Ярославский научно-исследовательский институт животноводства и кормопроизводства – филиал Федерального научного центра кормопроизводства и агроэкологии им. В.Р. Вильямса, пос. Михайловский, Ярославская область, Россия

³ Королевский ветеринарный колледж, Лондон, Великобритания

 yudin@bionet.nsc.ru

Аннотация. Липин-1 является членом эволюционно-консервативного семейства белков и экспрессируется преимущественно в жировой ткани и скелетных мышцах. С одной стороны, липин-1 – это фермент, который дефосфорилирует фосфатидную кислоту до диацилглицерина и таким образом участвует в метаболических путях биосинтеза запасных липидов в клетке, фосфолипидов мембраны и внутриклеточных сигнальных молекул. С другой стороны, липин-1 способен транспортироваться из цитоплазмы в ядро и служит коактиватором транскрипции генов липидного метаболизма. С использованием анализа ассоциаций однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) было показано, что ген липина-1 (*LPIN1*) является перспективным геном-кандидатом признаков молочной продуктивности у коров голштинской и бурой швицкой пород. Однако неясно, насколько его эффект зависит от породы. Ярославская молочная порода крупного рогатого скота была выведена в XVIII–XIX вв. в России путем разведения «в себе» северного великорусского скота, который был низкопродуктивным и малопродуктивным, но хорошо адаптированным к местным климатическим условиям и скудной кормовой базе. С помощью полногеномного генотипирования и секвенирования было показано, что ярославская порода обладает уникальной генетикой по сравнению с российскими и зарубежными породами крупного рогатого скота. Целью работы была оценка частоты аллелей и генотипов трех ОНП в гене *LPIN1* и исследование ассоциации этих ОНП с показателями молочной продуктивности у коров ярославской породы. Образцы крови от 142 коров ярославской породы были получены из двух хозяйств Ярославской области. Генотипирование ОНП выполняли методом анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов после проведения полимеразной цепной реакции. Ассоциации ОНП с удоем, выходом молочного жира и белка, а также с процентным содержанием жира и белка в молоке за 305 дней лактации были исследованы с первой по четвертую лактацию. Для статистического анализа использовали смешанную линейную модель с учетом родства между индивидами. При исследовании коров ярославской породы выявили три ОНП: rs110871255, rs207681322 и rs109039955 с частотой редкого аллеля 0.042–0.261. ОНП rs110871255 был ассоциирован с выходом жира за третью и четвертую лактации, rs207681322 был ассоциирован с удоем за вторую, третью и четвертую лактации, а также с выходом белка за третью лактацию. Таким образом, мы выявили достоверные ассоциации ОНП rs207681322 и rs110871255 в гене *LPIN1* с рядом показателей молочной продуктивности в ходе нескольких лактаций у коров ярославской породы. Ключевые слова: корова; ярославская порода; удой; процент жира; процент белка; выход жира; выход белка; ген *LPIN1*; однонуклеотидный полиморфизм; ассоциация.

Для цитирования: Игошин А.В., Мишакова Т.М., Айтназаров Р.Б., Ильина А.В., Ларкин Д.М., Юдин Н.С. Ассоциация трех однонуклеотидных полиморфизмов в гене *LPIN1* с показателями молочной продуктивности у коров ярославской породы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(1):117-125. DOI 10.18699/vjgb-24-14

Association of three single nucleotide polymorphisms in the *LPIN1* gene with milk production traits in cows of the Yaroslavl breed

A.V. Igoshin¹, T.M. Mishakova¹, R.B. Aitnazarov¹, A.V. Ilina², D.M. Larkin³, N.S. Yudin¹ 

¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Federal Williams Research Center for Forage Production and Agroecology, Scientific Research Institute of Livestock Breeding and Forage Production, Yaroslavl Region, Russia

³ Royal Veterinary College, University of London, London, United Kingdom

 yudin@bionet.nsc.ru

Abstract. Lipin-1 is a member of the evolutionarily conserved family of proteins and is expressed predominantly in adipose tissue and skeletal muscle. On the one hand, lipin-1 is an enzyme that catalyzes the dephosphorylation of phosphatidic acid to diacylglycerol (DAG) and thus participates in the metabolic pathways of biosynthesis of storage lipids in the cell, membrane phospholipids, and intracellular signaling molecules. On the other hand, lipin-1 is able to be transported from the cytoplasm to the nucleus and is a coactivator of lipid metabolism gene transcription. It was shown, using the analysis

of single nucleotide polymorphism (SNP) associations, that the lipin-1 coding gene (*LPIN1*) is a promising candidate gene for milk production traits in Holstein and Brown Swiss cows. However, it is unclear how much of its effect depends on the breed. The Yaroslavl dairy cattle breed was created in the 18–19 centuries in Russia by breeding northern Great Russian cattle, which were short and poor productive, but well adapted to local climatic conditions and bad food base. It was shown by whole genome genotyping and sequencing that the Yaroslavl breed has unique genetics compared to Russian and other cattle breeds. The aim of the study was to assess the frequency of alleles and genotypes of three SNPs in the *LPIN1* gene and to study the association of these SNPs with milk production traits in Yaroslavl cows. Blood samples from 142 cows of the Yaroslavl breed were obtained from two farms in the Yaroslavl region. Genotyping of SNPs was carried out by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method. Associations of SNPs with 305-day milk yield, fat yield, fat percentages, protein yield, and protein percentages were studied from the first to the fourth lactation. Statistical tests were carried out using a mixed linear model, taking into account the relationship between individuals. We identified three SNPs – rs110871255, rs207681322 and rs109039955 with a frequency of a rare allele of 0.042–0.261 in Yaroslavl cows. SNP rs110871255 was associated with fat yield during the third and fourth lactations. SNP rs207681322 was associated with milk yield for the second, third and fourth lactations, as well as protein yield for the third lactation. Thus, we identified significant associations of SNPs rs207681322 and rs110871255 in the *LPIN1* gene with a number of milk production traits during several lactations in Yaroslavl cows.

Key words: cow; Yaroslavl breed; milk yield; fat percentage; protein percentage; fat yield; protein yield; *LPIN1* gene; single nucleotide polymorphism; association.

For citation: Igoshin A.V., Mishakova T.M., Aitnazarov R.B., Ilina A.V., Larkin D.M., Yudin N.S. Association of three single nucleotide polymorphisms in the *LPIN1* gene with milk production traits in cows of the Yaroslavl breed. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(1):117-125. DOI 10.18699/vjgb-24-14

Введение

Наиболее важными экономическими характеристиками в молочном животноводстве считаются показатели молочной продуктивности коров, включая удой, выход молочного жира и белка, а также процентное содержание жира и белка в молоке (Gutierrez-Reinoso et al., 2021). Все эти показатели являются сложными количественными признаками, которые контролируются множеством генов с небольшим влиянием на фенотип (Weller et al., 2017; Silpa et al., 2021; Bekele et al., 2023; Singh et al., 2023). В последнее время для выявления генов и мутаций, непосредственно влияющих на надой и состав молока, широко используются методы картирования локусов количественных признаков (QTL) (Khatkar et al., 2004; Weller, Ron, 2011; Lopdell, 2023), полногеномного исследования ассоциаций (GWAS) (Bekele et al., 2023; Chen S.Y. et al., 2023; Teng et al., 2023), секвенирования транскриптомов органов-мишеней (RNA-seq) (Fang et al., 2020; Ahmad et al., 2021), а также поиска следов отбора в геноме (Rajawat et al., 2022; Nayak et al., 2023; Persichilli et al., 2023).

Ранее нами при анализе данных полногеномного генотипирования были выявлены следы отбора на хромосоме 11 в группе европейских молочных и комбинированных пород (бестужевская, голштинская, холмогорская, чернопестрая, ярославская), причем топовый однонуклеотидный полиморфизм (ОНП) был локализован в гене *LPIN1* (Yurchenko et al., 2018a). Другие авторы также нашли следы отбора в этом гене при анализе данных полногеномного генотипирования ярославской и голштинской пород (Zinovieva et al., 2020). Надо отметить, что впоследствии, при анализе данных полногеномного секвенирования ярославской породы, нами не были идентифицированы следы отбора в районе гена *LPIN1* (Ruvinskiy et al., 2022). Однако это может быть связано как с высоким порогом достоверности ($q = 0.01$), так и с другим набором пород для сравнения (голштинская, холмогорская, якутская).

Липин-1 является членом эволюционно-консервативного семейства, которое у большинства позвоночных представлено тремя белками (липины 1, 2 и 3) (Csaki et al.,

2013; Siniosoglou, 2013; Chen Y. et al., 2015; Сайдакова и др., 2021). Липин-1 экспрессируется преимущественно в жировой ткани и скелетных мышцах, в меньшей степени – в печени, мозге и других тканях (Reue, Zhang, 2008). С одной стороны, липин-1 является ферментом – фосфо-гидролазой, которая дефосфорилирует фосфатидную кислоту до диацилглицерина (ДАГ) и таким образом участвует в метаболических путях биосинтеза запасных липидов в клетке, фосфолипидов мембраны и внутриклеточных сигнальных молекул. С другой стороны, липин-1 способен транспортироваться из цитоплазмы в ядро и служит коактиватором транскрипции генов липидного метаболизма. Хотя липин-1 не имеет ДНК-связывающего домена, было показано, что он регулирует транскрипцию путем взаимодействия с другими транскрипционными факторами. Например, он стимулирует дифференцировку и функционирование адипоцитов, взаимодействуя с транскрипционным фактором PPARgamma (Kim et al., 2013), а также контролирует экспрессию генов окисления жирных кислот путем взаимодействия с транскрипционным фактором PPARalpha (Bartoso et al., 2011). Липин-1 связывается с белковым комплексом mTORC1 и таким образом регулирует активность транскрипционного фактора SREBP, который, в свою очередь, влияет на множество путей биосинтеза жирных кислот, триглицеридов и холестерина (Peterson et al., 2011).

Согласно базе данных Gene NCBI, у крупного рогатого скота ген липина-1 (*LPIN1*) занимает около 136 тыс. п. н. на хромосоме 11, состоит из 25 экзонов и кодирует восемь транскриптов, которые транслируются в белки размером от 895 до 1010 аминокислот (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/537224>). Экспрессия мРНК гена *LPIN1* в печени и молочной железе коровы существенно повышается на пике лактации по сравнению с ее началом и сухостойным периодом (Bionaz, Loog, 2008; Li et al., 2020). Содержание лактирующих голштинских коров на диете с добавлением рыбьего жира и соевого масла, которая приводила к снижению выхода молочного жира, вызывало у них повышение экспрессии мРНК *LPIN1* в подкожной жи-



Корова ярославской породы.

ровой ткани (Thering et al., 2009). Воздействие агониста PPAR α росиглитазона на клетки молочной железы коровы *in vitro* приводило к активации экспрессии мРНК *LPINI* (Kadegowda et al., 2009).

Однонуклеотидные полиморфизмы rs137457402 и rs136905033 в этом гене были ассоциированы с содержанием пяти жирных кислот в молоке коров бурой швицкой породы (Pegolo et al., 2016). ОНП rs137457402 также был ассоциирован с процентным содержанием белка в молоке коров этой же породы (Cecchinato et al., 2014). В работе (Han B. et al., 2019) показана связь семи ОНП с удоем, процентным содержанием жира или белка, а также выходом жира или белка у китайских голштинов. Однако большинство этих ассоциаций были выявлены авторами только для первой или второй лактации. Два несинонимичных ОНП в шестом экзоне гена *LPINI* были ассоциированы с процентным содержанием жира и белка в молоке коров-гибридов голштино-фризской и джерсейской пород из Новой Зеландии (Du et al., 2021). Все вышесказанное свидетельствует, что ген *LPINI* является перспективным геном-кандидатом признаков молочной продуктивности. Однако неясно, насколько его эффект зависит от породы.

Ярославская молочная порода крупного рогатого скота (КРС) была выведена в XVIII–XIX вв. в России на территории бывшей Ярославской губернии (Дмитриев, 1978; Dmitriev, Ernst, 1989; Дунин, Данкверт, 2013; Столповский и др., 2022). Масть животных в основном черная, при этом голова, живот, нижняя часть конечностей и кончик хвоста – белые. Вокруг глаз имеются характерные черные отметины, напоминающие очки (см. рисунок). Порода создавалась путем разведения «в себе» северного великорусского скота, который был низкорослым и малопродуктивным, но хорошо адаптированным к местным климатическим условиям и скудной кормовой базе. Перво-

начально селекцию проводили по экстерьеру, затем – по удою и жирномолочности. В XIX–XX вв. ярославский скот скрещивали с тирольским, ангельским, симментальским, альгаузским, джерсейским, голландским и холмогорским скотом. В СССР проводили также скрещивание ярославских коров с быками остфризской и голштинской породы. Однако считается, что эти скрещивания оказали небольшое влияние, поскольку животные ярославской породы при этом сохранили свой специфический экстерьер (Дмитриев, 1978; Dmitriev, Ernst, 1989; Столповский и др., 2022).

В 2022 г. общая численность породы составляла около 30000 животных. Современный ярославский скот характеризуется высокой удойностью (6590 кг за 305 дней лактации) и жирномолочностью (4.13 %) (Шичкин и др., 2023). С помощью полногеномного генотипирования (Iso-Touru et al., 2016) и анализа микросателлитов (Abdelmanova et al., 2020) было показано, что ярославская порода обладает уникальной генетикой по сравнению с российскими и зарубежными породами КРС. Зарубежные породы оказали незначительное влияние на генофонд ярославского скота (Sermiyagin et al., 2018; Yurchenko et al., 2018b; Zinovieva et al., 2020).

Целью работы была оценка частоты аллелей и генотипов трех ОНП в гене *LPINI* и исследование ассоциации этих ОНП с показателями молочной продуктивности у коров ярославской породы.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили образцы крови от 142 коров ярославской породы из двух хозяйств Ярославской области. При изучении фенотипических данных использовалась информация ИАС «СЕЛЕКС». Фенотипические данные были взяты из карточек зоотехнического учета.

Таблица 1. Характеристики генотипированных ОНП

Идентификатор ОНП	Позиция (ARS-UCD1.2)	Локализация	Генотип	Частота генотипа	Аллель	Частота аллеля
rs110871255 (p.Met101Thr)	chr11:86127780	Экзон 5	GG	0.725	G	0.826
			GA	0.202	A	0.174
			AA	0.073		
rs207681322 (p.Pro395Ser)	chr11:86116295	Экзон 9	GG	0.931	G	0.958
			GA	0.054	A	0.042
			AA	0.015		
rs109039955	chr11:86082101	3'-нетранслируемый район	GG	0.537	G	0.739
			GA	0.404	A	0.261
			AA	0.059		

Выделение ДНК проводили стандартным методом фенол-хлороформной экстракции с предварительной протеолитической обработкой (Sambrook, Russell, 2006). Генотипирование ОНП rs110871255, rs109039955 и rs207681322 в гене *LPIN1* выполняли методом анализа полиморфизма длин рестриционных фрагментов после проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР-ПДРФ). Праймеры конструировали с помощью компьютерной программы Vector NTI (Lu, Moriyama, 2004). Специфичность каждой пары праймеров оценивали *in silico*, используя алгоритм primer-BLAST (Ye et al., 2012). Праймеры, условия ПЦР реакций и для эндонуклеазы рестрикции приведены в Приложении 1¹. Тест на отклонение от равновесия Харди-Вайнберга и неравновесие по сцеплению между исследуемыми ОНП рассчитывали с помощью программы PLINK v1.9 (опция --ld) (Purcell et al., 2007). Для этого генотипические данные были приведены к ред-формату, принимаемому программой.

Исследования ассоциации с удоем, выходом молочного жира и белка, а также с процентным содержанием жира и белка в молоке за 305 дней лактации. В анализ были взяты данные по четырем лактациям. Если длительность лактации у коровы не достигала 305 дней, то удои, выход жира и выход белка за фактический период нормировали на 305 дней по формуле (Wiggans, Van Vleck, 1979):

$$\hat{Y}_{305} = \left[1 + F_n \times \left(\frac{305-n}{n} \right) \right] \times Y_n,$$

где \hat{Y}_{305} – ожидаемая продуктивность за 305 дней; n – фактическая длительность лактации в днях; Y_n – продуктивность за фактический период лактации; F_n – корректирующий фактор (Shook's factor) для n -го дня, учитывающий снижение продуктивности в течение лактации (Hillers, Williams, 1981). Корректирующий фактор для n -го дня рассчитывается на основе данных продуктивности животных с длительностью лактации ≥ 305 дней по формуле

$$F_n = RY / [LP \times (305 - n)],$$

где RY – разность между продуктивностью за 305 дней и за n -е количество дней; LP – продуктивность за n -й день. Посуточные данные, необходимые для расчета соответствующих величин, были вычислены из уравнений кумулятивных кривых продуктивности (Приложение 2). Процентное содержание белка и жира для неполных

¹ Приложения 1 и 2 см. по адресу:

<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2024-28/appx6.pdf>

лактаций рассчитывали из нормированных на 305 дней данных.

Для статистического анализа использовали смешанную линейную модель, реализованную в R-пакете “lme4qtl” (функция “relmatLmer”) (Ziyatdinov et al., 2018). Эта модель позволяет при тестировании учитывать генетические связи между индивидами путем моделирования полигенных эффектов на основе матрицы родства. Расчет матрицы родства проводили с помощью R-пакета “kinship2” (функция “kinship”) (Sinnwell et al., 2014) на основе данных по родословным животных из учетных карточек. Генотипы кодировали значениями 0, 1 и 2 в соответствии с предполагаемым аддитивным вкладом аллелей ОНП в признак. В качестве дополнительных предикторов использовали сезон рождения коровы и сезон отела, который предшествовал лактации. Поскольку для более коротких лактаций ошибка при расчете ожидаемого удоя за 305 дней была, вероятно, выше, анализ проводили с помощью взвешивания (опция “weights” функции “relmatLmer”) по числу дней. Для лактаций длительностью 305 дней и более был взят вес в 305, для лактаций меньшей длительности – равный фактическому количеству дней лактации. Для поправки на множественные сравнения применяли метод Бенджамини-Хохберга (Benjamini, Hochberg, 1995), реализованный в R-пакете “qvalue” (функция “qvalue” с параметром lambda = 0) (Storey et al., 2023).

Результаты

Были успешно амплифицированы целевые фрагменты для 136 (ОНП rs109039955), 130 (ОНП rs207681322) и 109 (ОНП rs110871255) животных. Все три исследованных ОНП оказались полиморфными в изученной выборке животных (табл. 1). Распределения генотипов ОНП rs207681322 и rs110871255 достоверно отклонялись от равновесия Харди-Вайнберга ($p = 0.0141$ и $p = 0.0039$ соответственно), а ОНП rs109039955 – нет. Неравновесие по сцеплению между изучаемыми ОНП составило: $r^2 = 0.098$, $D' = 0.853$ для rs109039955 и rs207681322; $r^2 = 0.003$, $D' = 0.061$ для rs109039955 и rs110871255; $r^2 = 0.001$, $D' = 0.088$ для rs207681322 и rs110871255.

По результатам статистических тестов выявлено в общей сложности шесть ассоциаций двух ОНП с тремя признаками молочной продуктивности со второй по четвертую лактацию (табл. 2). Ассоциаций всех трех ОНП

Таблица 2. Ассоциации исследованных ОНП с признаками молочной продуктивности с первой по четвертую лактацию и соответствующие фенотипические значения (среднее ± стандартное отклонение) для различных генотипов

ОНП	Номер лактации	Генотип, число животных*	Удой, кг	Выход жира, кг	Выход белка, кг	Жир, %	Белок, %
rs110871255	1	GG (78)	4698 ± 838	218.7 ± 45.5	148.5 ± 26.5	4.66 ± 0.56	3.17 ± 0.20
		GA (21)	4936 ± 818	225.4 ± 43.1	155.9 ± 24.4	4.57 ± 0.47	3.17 ± 0.23
		AA (7–8)	4441 ± 607	196.2 ± 34.9	142.5 ± 13.3	4.54 ± 0.69	3.30 ± 0.18
		q-значение	0.7893	0.9428	0.6785	0.5054	0.3326
	2	GG (69)	5016 ± 692	230.9 ± 33.7	160.2 ± 22.0	4.63 ± 0.52	3.20 ± 0.22
		GA (20)	5341 ± 1011	245.9 ± 50.1	176.6 ± 35.8	4.62 ± 0.53	3.30 ± 0.24
		AA (7)	5237 ± 851	247.3 ± 56.7	166.2 ± 28.9	4.69 ± 0.53	3.18 ± 0.22
		q-значение	0.3782	0.1826	0.3406	0.4299	0.7893
	3	GG (56)	5367 ± 617	242.9 ± 35.3	168.2 ± 24.7	4.54 ± 0.56	3.13 ± 0.22
		GA (15)	5925 ± 1209	275.1 ± 38.4	196.0 ± 41.8	4.72 ± 0.58	3.31 ± 0.22
		AA (6)	5903 ± 843	281.8 ± 51.5	191.3 ± 20.9	4.79 ± 0.71	3.26 ± 0.23
		q-значение	0.0825	0.0135	0.072	0.2986	0.1826
	4	GG (41)	5485 ± 861	251.1 ± 42.8	179.2 ± 28.4	4.61 ± 0.69	3.27 ± 0.18
		GA (12)	6222 ± 885	291.9 ± 30.7	203.1 ± 28.4	4.74 ± 0.54	3.27 ± 0.21
		AA (4)	5836 ± 419	269.9 ± 41.7	186.1 ± 23.6	4.61 ± 0.49	3.18 ± 0.20
		q-значение	0.1826	0.0348	0.2986	0.5931	0.4299
rs207681322	1	GG (117–118)	4784 ± 873	220.9 ± 46.3	150.8 ± 25.9	4.63 ± 0.52	3.17 ± 0.21
		GA (7)	5034 ± 801	211.2 ± 48.8	153.7 ± 18.2	4.16 ± 0.41	3.07 ± 0.15
		AA (2)	5502 ± 503	239.6 ± 4.50	164.4 ± 12.0	4.37 ± 0.32	2.99 ± 0.06
		q-значение	0.211	0.6785	0.5911	0.3264	0.1728
	2	GG (106)	5106 ± 791	232.8 ± 37.1	163.2 ± 25.4	4.58 ± 0.50	3.20 ± 0.23
		GA (5)	6148 ± 739	278.2 ± 55.2	201.7 ± 29.3	4.50 ± 0.41	3.28 ± 0.18
		AA (2)	5655 ± 1059	257.0 ± 73.6	166.9 ± 32.1	4.51 ± 0.46	2.95 ± 0.01
		q-значение	0.043	0.12	0.1343	0.7904	0.3326
	3	GG (85)	5458 ± 835	245.5 ± 39.7	174.0 ± 29.1	4.53 ± 0.62	3.19 ± 0.23
		GA (4)	7116 ± 1560	289.7 ± 50.4	224.1 ± 61.0	4.11 ± 0.39	3.13 ± 0.16
		AA (1)	8195	303.6	238.7	3.70	2.91
		q-значение	2.54E-04	0.1826	0.021	0.104	0.3406
	4	GG (55)	5587 ± 883	258.7 ± 44.1	182.1 ± 29.9	4.66 ± 0.64	3.26 ± 0.19
		GA (3)	6320 ± 303	277.0 ± 44.6	199.6 ± 19.2	4.37 ± 0.57	3.15 ± 0.17
		AA (1)	8836	304.3	264.2	3.44	2.99
		q-значение	0.021	0.6399	0.12	0.111	0.1826
rs109039955	1	GG (73)	4732 ± 841	218.5 ± 48.1	149.9 ± 25.1	4.61 ± 0.51	3.18 ± 0.20
		GA (52)	4812 ± 855	217.5 ± 39.7	150.9 ± 26.3	4.54 ± 0.51	3.15 ± 0.21
		AA (8)	4883 ± 697	232.2 ± 29.4	152.4 ± 16.2	4.80 ± 0.74	3.14 ± 0.21
		q-значение	0.6087	0.6785	0.7977	0.7782	0.3264
	2	GG (66)	5067 ± 713	230.0 ± 36.5	163.3 ± 24.9	4.55 ± 0.47	3.23 ± 0.24
		GA (44)	5260 ± 856	238.1 ± 39.9	166.9 ± 28.5	4.55 ± 0.50	3.18 ± 0.22
		AA (7)	5475 ± 838	260.1 ± 46.9	177.0 ± 30.0	4.78 ± 0.75	3.24 ± 0.25
		q-значение	0.1826	0.1728	0.3148	0.7904	0.624
	3	GG (51)	5415 ± 697	243.2 ± 37.5	172.7 ± 26.8	4.50 ± 0.53	3.19 ± 0.24
		GA (35)	5541 ± 1053	245.6 ± 41.0	175.1 ± 37.0	4.48 ± 0.60	3.16 ± 0.21
		AA (6)	6101 ± 1322	278.2 ± 45.1	192.3 ± 34.1	4.65 ± 0.84	3.18 ± 0.24
		q-значение	0.23	0.1849	0.4253	0.9213	0.6087
	4	GG (35)	5560 ± 974	251.8 ± 41.7	181.7 ± 32.3	4.56 ± 0.55	3.27 ± 0.20
		GA (20)	5815 ± 652	268.3 ± 46.7	186.7 ± 22.8	4.61 ± 0.67	3.21 ± 0.18
		AA (6)	5668 ± 1901	266.3 ± 61.1	181.1 ± 56.7	4.88 ± 1.07	3.21 ± 0.21
		q-значение	0.7114	0.5911	0.9722	0.7893	0.3148

Примечание. Жирным шрифтом выделены ассоциации, достигающие статистической значимости ($q < 0.05$).

* В учет взяты животные, имеющие соответствующие фенотипические данные. Заметно меньшее число животных, генотипированных по ОНП rs110871255, связано с ограниченным количеством ДНК, доступной для анализа.

с признаками за первую лактацию не выявлено. Один ОНП (rs207681322) был ассоциирован с удоем ($q = 0.043$) за вторую лактацию. За третью лактацию один ОНП (rs110871255) был ассоциирован с выходом жира ($q = 0.0135$) и еще один (rs207681322) – с удоем ($q = 2.54E-04$) и выходом белка ($q = 0.021$). За четвертую лактацию один ОНП (rs110871255) был ассоциирован с выходом жира ($q = 0.0348$), а другой (rs207681322) – с удоем ($q = 0.021$).

Таким образом, ОНП rs110871255 был ассоциирован с выходом жира за третью и четвертую лактации, ОНП rs207681322 – с удоем за вторую, третью и четвертую лактации, а также с выходом белка за третью лактацию.

Обсуждение

При исследовании коров ярославской породы мы выявили три ОНП – rs110871255, rs207681322 и rs109039955 с частотой редкого аллеля 0.042–0.261. Распределения генотипов в локусах rs207681322 и rs110871255 существенно отличались от ожидаемых по равновесию Харди–Вайнберга за счет избытка редких гомозигот, что может быть связано с инбридингом, дрейфом генов или влиянием отбора в популяциях сельскохозяйственных животных (Hedrick, 2005). Отклонения от равновесия Харди–Вайнберга часто наблюдают при исследованиях микросателлитных ДНК-маркеров или ОНП у разных пород КРС (Melka, Schenkel, 2012; Madilindi et al., 2020; Ocampo et al., 2021). Следует отметить, что тесты на отклонения от равновесия Харди–Вайнберга используют для проверки случайного скрещивания в популяциях, а тесты на отклонения от ожидаемой частоты гомозигот применяют для оценки коэффициентов инбридинга (Haldane, 1954; Robertson, Hill, 1984). Неравновесие по сцеплению между изученными нами ОНП у коров ярославской породы существенно отличается от описанного ранее для этих же ОНП у китайских голштинов (Han B. et al., 2019). Известно, что паттерны неравновесия по сцеплению существенно варьируют между породами крупного рогатого скота (Porto-Neto et al., 2014).

Мы обнаружили достоверные ассоциации двух ОНП с признаками молочной продуктивности – выходом молока, жира и белка в ходе нескольких лактаций. Так, мы выявили, что аллель А ОНП rs207681322 положительно влиял на удои и выход белка. Ранее аналогичные ассоциации этого аллеля были выявлены для первой или второй лактации у китайских голштинов (Han B. et al., 2019). Аллель А rs110871255 в нашем исследовании положительно влиял на показатель выхода молочного жира. У животных голштинской породы этот же аллель был ассоциирован с повышенным процентным содержанием жира в ходе второй лактации (Han B. et al., 2019).

Обращая на себя внимание факт, что, в отличие от исследования (Han B. et al., 2019), мы обнаружили ассоциации не в первую, а в последующие лактации. Это может быть связано с влиянием как генетических факторов (разные породы), так и средовых (разные условия разведения). Необходимо подчеркнуть, что по вопросу влияния наследственных факторов на показатели молочной продуктивности в ходе лактаций до сих пор нет единого мнения. Ряд авторов считает, что наследуемость этих при-

знаков у голштинов в первую лактацию выше, чем в последующие (Dimov et al., 1995; Yamazaki et al., 2016; Lee et al., 2020). Однако недавнее наиболее крупномасштабное исследование почти 3.5 млн записей от более 1 млн коров голштинской породы выявило повышение наследуемости удоя, а также выхода жира и белка именно в третью и четвертую лактации по сравнению с первой и второй (Williams et al., 2022), что хорошо согласуется с нашими результатами. Наследуемость надоя в отдельные дни тестов была существенно выше за третью лактацию по сравнению с первой у голштинизированного местного скота из Таиланда (Buaban et al., 2020) и коров породы Sahiwal из Кении (Platsia et al., 2007).

Обнаруженные нами ассоциации соответствуют данным других авторов о влиянии гена *LPIN1* на лактацию, биосинтез липидов и общий уровень метаболизма. Экспрессия мРНК *LPIN1* достоверно повышалась в период лактации в молочной железе у человека (Mohammad, Raymond, 2013), свиней (Lv et al., 2015) и мышей (Han L.Q. et al., 2010). ОНП в гене *LPIN1* ассоциирован с процентным содержанием висцерального и внутримышечного жира у свиней (He et al., 2009). Мутация в гене *LPIN1*, которая приводит к экспрессии усеченного варианта белка, вызывает липодистрофию у крыс (Mul et al., 2011). Мыши *fld* с мутациями в гене *LPIN1* имеют фенотип, сходный с наследственной липодистрофией у человека, которая характеризуется потерей подкожного жира, стеатозом печени, инсулинорезистентностью и т. д. (Péterfy et al., 2001). В то же время сверхэкспрессия липина-1 в жировой ткани или скелетной мускулатуре вызывает ожирение у трансгенных мышей (Phan, Reue, 2005). Причем если экспрессия липина в жировой ткани стимулирует способность адипоцитов к накоплению жира, то в мышечной ткани его экспрессия влияет на показатели энергозатрат всего тела (температура, потребление пищи и кислорода). Подавление экспрессии липина-1 в мышечных клетках *in vitro* приводило к инсулинорезистентности (Huang et al., 2017). При этом наблюдалась отрицательная корреляция между уровнями мРНК *LPIN1* в жировой ткани и концентрациями глюкозы и инсулина в крови у человека и мыши (Suviolahti et al., 2006). Эти же авторы выявили ассоциацию ОНП в гене *LPIN1* с уровнем инсулина в крови в семьях с дислипидемией (Suviolahti et al., 2006). По их мнению, липин-1 играет существенную роль в гомеостазе глюкозы и генетические варианты в гене *LPIN1* влияют на показатели метаболизма. Действительно, генетические варианты в гене *LPIN1* у человека ассоциированы с развитием ряда метаболических синдромов (Brahe et al., 2013; Zhang et al., 2013).

Заключение

Таким образом, мы выявили достоверные ассоциации ОНП rs207681322 и rs110871255 в гене *LPIN1* с рядом показателей молочной продуктивности в ходе нескольких лактаций у коров ярославской породы, которые ранее были найдены другими авторами у животных голштинской породы. Полученные результаты могут быть использованы в маркер-ориентированной и геномной селекции в молочном животноводстве.

Список литературы / References

- Дмитриев Н.Г. Породы скота по странам мира. Л.: Колос, 1978 [Dmitriev N.G. Breed Cattle by Countries of the World. Leningrad: Kolos Publ., 1978 (in Russian)]
- Дунин И.М., Данкверт А.Г. (Ред.) Справочник пород и типов сельскохозяйственных животных, разводимых в Российской Федерации. М.: ВНИИплем, 2013 [Dunin I.M., Dankvert A.G. (Eds.) Breeds and Types of Farm Animals in the Russian Federation. Moscow: All-Russia Research Institute of Animal Breeding, 2013 (in Russian)]
- Сайдакова С.С., Морозова К.Н., Киселева Е.В. Липины: характеристика и функциональная роль в организме. *Цитология*. 2021; 63(1):17-29. DOI 10.31857/S0041377121010090 [Saydakova S.S., Morozova K.N., Kiseleva E.V. Lipin family proteins: structure, functions, and related diseases. *Cell Tissue Biol*. 2021;15(4):317-325. DOI 10.1134/S1990519X21040076]
- Столповский Ю.А., Гостева Е.Р., Солоднева Е.В. Генетические и селекционные аспекты истории развития скотоводства на территории России. М.: Акварель, 2022 [Stolpovsky Yu.A., Gosteva E.R., Solodneva E.V. Genetic and Selection Aspects of the History of the Development of Cattle Breeding on the Territory of Russia. Moscow: Akvarel' Publ., 2022 (in Russian)]
- Шичкин Г.И., Тяпугин Е.Е., Дунин И.М., Герасимова Е.В., Козлова Н.А., Мышкина М.С., Семенова Н.В., Дунин М.И., Тяпугин С.Е. Состояние молочного скотоводства в Российской Федерации. В: Ежегодник по племенной работе в молочном скотоводстве в хозяйствах Российской Федерации. М.: ВНИИплем, 2023;3-20 [Shichkin G.I., Tyapugin E.E., Dunin I.M., Gerasimova E.V., Kozlova N.A., Myshkina M.S., Semenova N.V., Dunin M.I., Tyapugin S.E. The state of dairy cattle breeding in the Russian Federation. In: Yearbook on Breeding Work in Dairy Cattle Breeding in Farms of the Russian Federation. Moscow: All-Russia Research Institute of Animal Breeding, 2023;3-20 (in Russian)]
- Abdelmanova A.S., Kharzinzova V.R., Volkova V.V., Mishina A.I., Dotssev A.V., Sermyagin A.A., Boronetskaya O.I., Petrikeeva L.V., Chinarov R.Y., Brem G., Zinovieva N.A. Genetic diversity of historical and modern populations of Russian cattle breeds revealed by microsatellite analysis. *Genes (Basel)*. 2020;11(8):940. DOI 10.3390/genes11080940
- Ahmad S.M., Bhat B., Bhat S.A., Yaseen M., Mir S., Raza M., Iqbal M.A., Shah R.A., Ganai N.A. SNPs in mammary gland epithelial cells unraveling potential difference in milk production between Jersey and Kashmiri cattle using RNA sequencing. *Front. Genet*. 2021;12:666015. DOI 10.3389/fgene.2021.666015
- Barroso E., Rodríguez-Calvo R., Serrano-Marco L., Astudillo A.M., Balsinde J., Palomer X., Vázquez-Carrera M. The PPAR β/δ activator GW501516 prevents the down-regulation of AMPK caused by a high-fat diet in liver and amplifies the PGC-1 α -Lipin 1-PPAR α pathway leading to increased fatty acid oxidation. *Endocrinology*. 2011;152(5):1848-1859. DOI 10.1210/en.2010-1468
- Bekele R., Taye M., Abebe G., Meseret S. Genomic regions and candidate genes associated with milk production traits in Holstein and its crossbred cattle: a review. *Int. J. Genomics*. 2023;2023:8497453. DOI 10.1155/2023/8497453
- Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol*. 1995;57(1):289-300. DOI 10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031
- Bionaz M., Looor J.J. *ACSL1*, *AGPAT6*, *FABP3*, *LPIN1*, and *SLC27A6* are the most abundant isoforms in bovine mammary tissue and their expression is affected by stage of lactation. *J. Nutr*. 2008;138(6):1019-1024. DOI 10.1093/jn/138.6.1019
- Brahe L.K., Ångquist L., Larsen L.H., Vimaleswaran K.S., Hager J., Viguerie N., Loos R.J., Handjieva-Darlenska T., Jebb S.A., Hlavaty P., Larsen T.M., Martinez J.A., Papadaki A., Pfeiffer A.F., van Baak M.A., Sørensen T.I., Holst C., Langin D., Astrup A., Saris W.H. Influence of SNPs in nutrient-sensitive candidate genes and gene-diet interactions on blood lipids: the DiOGenes study. *Br. J. Nutr*. 2013;110(5):790-796. DOI 10.1017/S0007114512006058
- Buaban S., Puangdee S., Duangjinda M., Boonkum W. Estimation of genetic parameters and trends for production traits of dairy cattle in Thailand using a multiple-trait multiple-lactation test day model. *Asian-Australas. J. Anim. Sci*. 2020;33(9):1387-1399. DOI 10.5713/ajas.19.0141
- Cecchinato A., Ribeca C., Chessa S., Cipolat-Gotet C., Maretto F., Casellas J., Bittante G. Candidate gene association analysis for milk yield, composition, urea nitrogen and somatic cell scores in Brown Swiss cows. *Animal*. 2014;8(7):1062-1070. DOI 10.1017/S1751731114001098
- Chen S.Y., Gloria L.S., Pedrosa V.B., Doucette J., Boerman J.P., Brito L.F. Unravelling the genomic background of resilience based on variability in milk yield and milk production levels in North American Holstein cattle through GWAS and Mendelian randomization analyses. *J. Dairy Sci*. 2023;107:1035-1053. DOI 10.3168/jds.2023-23650
- Chen Y., Rui B.B., Tang L.Y., Hu C.M. Lipin family proteins – key regulators in lipid metabolism. *Ann. Nutr. Metab*. 2015;66(1):10-18. DOI 10.1159/000368661
- Csaki L.S., Dwyer J.R., Fong L.G., Tontonoz P., Young S.G., Reue K. Lipins, lipinopathies, and the modulation of cellular lipid storage and signaling. *Prog. Lipid Res*. 2013;52(3):305-316. DOI 10.1016/j.plipres.2013.04.001
- Dimov G., Albuquerque L.G., Keown J.F., Van Vleck L.D., Norman H.D. Variance of interaction effects of sire and herd for yield traits of Holsteins in California, New York, and Pennsylvania with an animal model. *J. Dairy Sci*. 1995;78(4):939-946. DOI 10.3168/jds.S0022-0302(95)76709-1
- Dmitriev N.G., Ernst L.K. (Eds.) Animal Genetics Resources of the USSR. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1989
- Du X., Zhou H., Liu X., Li Y., Hickford J.G.H. Sequence variation in the bovine lipin-1 gene (*LPIN1*) and its association with milk fat and protein contents in New Zealand Holstein-Friesian \times Jersey (HF \times J)-cross dairy cows. *Animals (Basel)*. 2021;11(11):3223. DOI 10.3390/ani11113223
- Fang L., Cai W., Liu S., Canela-Xandri O., Gao Y., Jiang J., Rawlik K., Li B., Schroeder S.G., Rosen B.D., Li C.J., Sonstegard T.S., Alexander L.J., Van Tassell C.P., Van Raden P.M., Cole J.B., Yu Y., Zhang S., Tenesa A., Ma L., Liu G.E. Comprehensive analyses of 723 transcriptomes enhance genetic and biological interpretations for complex traits in cattle. *Genome Res*. 2020;30(5):790-801. DOI 10.1101/gr.250704.119
- Gutierrez-Reinoso M.A., Aponte P.M., Garcia-Herreros M. Genomic analysis, progress and future perspectives in dairy cattle selection: a review. *Animals (Basel)*. 2021;11(3):599. DOI 10.3390/ani11030599
- Haldane J.B.S. An exact test for randomness of mating. *J. Genet*. 1954; 52:631-635. DOI 10.1007/BF02985085
- Han B., Yuan Y., Liang R., Li Y., Liu L., Sun D. Genetic effects of *LPIN1* polymorphisms on milk production traits in dairy cattle. *Genes (Basel)*. 2019;10(4):265. DOI 10.3390/genes10040265
- Han L.Q., Li H.J., Wang Y.Y., Zhu H.S., Wang L.F., Guo Y.J., Lu W.F., Wang Y.L., Yang G.Y. mRNA abundance and expression of *SLC27A*, *ACC*, *SCD*, *FADS*, *LPIN*, *INSIG*, and *PPARGC1* gene isoforms in mouse mammary glands during the lactation cycle. *Genet. Mol. Res*. 2010;9(2):1250-1257. DOI 10.4238/vol9-2gmr814
- He X.P., Xu X.W., Zhao S.H., Fan B., Yu M., Zhu M.J., Li C.C., Peng Z.Z., Liu B. Investigation of *Lpin1* as a candidate gene for fat deposition in pigs. *Mol. Biol. Rep*. 2009;36(5):1175-1180. DOI 10.1007/s11033-008-9294-4
- Hedrick P.W. Genetics of Populations. Jones & Bartlett Learning, 2005
- Hillers J.K., Williams G.F. "Shook" factors and lactation milk yield. *Extension Bull. (Wash. State Univ.)*. 1981;EB0779

- Huang S., Huang S., Wang X., Zhang Q., Liu J., Leng Y. Downregulation of lipin-1 induces insulin resistance by increasing intracellular ceramide accumulation in C2C12 myotubes. *Int. J. Biol. Sci.* 2017;13(1):1-12. DOI 10.7150/ijbs.17149
- Ilatsia E.D., Muasya T.K., Muhuyi W.B., Kahi A.K. Genetic and phenotypic parameters for test day milk yield of Sahiwal cattle in the semi-arid tropics. *Animal.* 2007;1(2):185-192. DOI 10.1017/S175173110739263X
- Iso-Touru T., Tapio M., Vilkki J., Kiseleva T., Ammosov I., Ivanova Z., Popov R., Ozerov M., Kantanen J. Genetic diversity and genomic signatures of selection among cattle breeds from Siberia, eastern and northern Europe. *Anim. Genet.* 2016;47(6):647-657. DOI 10.1111/age.12473
- Kadegowda A.K., Bionaz M., Piperova L.S., Erdman R.A., Looor J.J. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation and long-chain fatty acids alter lipogenic gene networks in bovine mammary epithelial cells to various extents. *J. Dairy Sci.* 2009;92(9):4276-4289. DOI 10.3168/jds.2008-1932
- Khatkar M.S., Thomson P.C., Tammen I., Raadsma H.W. Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: review and meta-analysis. *Genet. Sel. Evol.* 2004;36(2):163-190. DOI 10.1186/1297-9686-36-2-163
- Kim H.E., Bae E., Jeong D.Y., Kim M.J., Jin W.J., Park S.W., Han G.S., Carman G.M., Koh E., Kim K.S. Lipin1 regulates PPAR γ transcriptional activity. *Biochem. J.* 2013;453(1):49-60. DOI 10.1042/BJ20121598
- Lee Y.M., Dang C.G., Alam M.Z., Kim Y.S., Cho K.H., Park K.D., Kim J.J. The effectiveness of genomic selection for milk production traits of Holstein dairy cattle. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 2020;33(3):382-389. DOI 10.5713/ajas.19.0546
- Li Q., Liang R., Li Y., Gao Y., Li Q., Sun D., Li J. Identification of candidate genes for milk production traits by RNA sequencing on bovine liver at different lactation stages. *BMC Genet.* 2020;21(1):72. DOI 10.1186/s12863-020-00882-y
- Lopdell T.J. Using QTL to identify genes and pathways underlying the regulation and production of milk components in cattle. *Animals (Basel).* 2023;13(5):911. DOI 10.3390/ani13050911
- Lu G., Moriyama E.N. Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite. *Brief. Bioinform.* 2004;5(4):378-388. DOI 10.1093/bib/5.4.378
- Lv Y., Guan W., Qiao H., Wang C., Chen F., Zhang Y., Liao Z. Veterinary Medicine and Omics (Veterinomics): metabolic transition of milk triacylglycerol synthesis in sows from late pregnancy to lactation. *OMICS.* 2015;19(10):602-616. DOI 10.1089/omi.2015.0102
- Madilindi M.A., Banga C.B., Bhebe E., Sanarana Y.P., Nxumalo K.S., Taela M.G., Magagula B.S., Mapholi N.O. Genetic diversity and relationships among three Southern African Nguni cattle populations. *Trop. Anim. Health Prod.* 2020;52(2):753-762. DOI 10.1007/s11250-019-02066-y
- Melka M.G., Schenkel F.S. Analysis of genetic diversity in Brown Swiss, Jersey and Holstein populations using genome-wide single nucleotide polymorphism markers. *BMC Res. Notes.* 2012;5:161. DOI 10.1186/1756-0500-5-161
- Mohammad M.A., Haymond M.W. Regulation of lipid synthesis genes and milk fat production in human mammary epithelial cells during secretory activation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2013;305(6):E700-E716. DOI 10.1152/ajpendo.00052.2013
- Mul J.D., Nadra K., Jagalur N.B., Nijman I.J., Toonen P.W., Médard J.J., Grès S., de Bruin A., Han G.S., Brouwers J.F., Carman G.M., Saulnier-Blache J.S., Meijer D., Chrast R., Cuppen E. A hypomorphic mutation in *Lpin1* induces progressively improving neuropathy and lipodystrophy in the rat. *J. Biol. Chem.* 2011;286(30):26781-26793. DOI 10.1074/jbc.M110.197947
- Nayak S.S., Panigrahi M., Rajawat D., Ghildiyal K., Sharma A., Parida S., Bhushan B., Mishra B.P., Dutt T. Comprehensive selection signature analyses in dairy cattle exploiting purebred and crossbred genomic data. *Mamm. Genome.* 2023;34(4):615-631. DOI 10.1007/s00335-023-10021-4
- Ocampo R.J., Martínez J.F., Martínez R. Assessment of genetic diversity and population structure of Colombian Creole cattle using microsatellites. *Trop. Anim. Health Prod.* 2021;53(1):122. DOI 10.1007/s11250-021-02563-z
- Pegolo S., Cecchinato A., Mele M., Conte G., Schiavon S., Bittante G. Effects of candidate gene polymorphisms on the detailed fatty acids profile determined by gas chromatography in bovine milk. *J. Dairy Sci.* 2016;99(6):4558-4573. DOI 10.3168/jds.2015-10420
- Persichilli C., Senczuk G., Mastrangelo S., Marusi M., van Kaam J.T., Finocchiaro R., Di Civita M., Cassandro M., Pilla F. Exploring genome-wide differentiation and signatures of selection in Italian and North American Holstein populations. *J. Dairy Sci.* 2023;106(8):5537-5553. DOI 10.3168/jds.2022-22159
- Péterfy M., Phan J., Xu P., Reue K. Lipodystrophy in the *fld* mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin. *Nat. Genet.* 2001;27(1):121-124. DOI 10.1038/83685
- Peterson T.R., Sengupta S.S., Harris T.E., Carmack A.E., Kang S.A., Balderas E., Guertin D.A., Madden K.L., Carpenter A.E., Finck B.N., Sabatini D.M. mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell.* 2011;146(3):408-420. DOI 10.1016/j.cell.2011.06.034
- Phan J., Reue K. Lipin, a lipodystrophy and obesity gene. *Cell Metab.* 2005;1(1):73-83. DOI 10.1016/j.cmet.2004.12.002
- Porto-Neto L.R., Kijas J.W., Reverter A. The extent of linkage disequilibrium in beef cattle breeds using high-density SNP genotypes. *Genet. Sel. Evol.* 2014;46(1):22. DOI 10.1186/1297-9686-46-22
- Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira M.A., Bender D., Maller J., Sklar P., de Bakker P.I., Daly M.J., Sham P.C. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* 2007;81(3):559-575. DOI 10.1086/519795
- Rajawat D., Panigrahi M., Kumar H., Nayak S.S., Parida S., Bhushan B., Gaur G.K., Dutt T., Mishra B.P. Identification of important genomic footprints using eight different selection signature statistics in domestic cattle breeds. *Gene.* 2022;816:146165. DOI 10.1016/j.gene.2021.146165
- Reue K., Zhang P. The lipin protein family: dual roles in lipid biosynthesis and gene expression. *FEBS Lett.* 2008;582(1):90-96. DOI 10.1016/j.febslet.2007.11.014
- Robertson A., Hill W.G. Deviations from Hardy-Weinberg proportions: sampling variances and use in estimation of inbreeding coefficients. *Genetics.* 1984;107(4):703-718. DOI 10.1093/genetics/107.4.703
- Ruvinskiy D., Igoshin A., Yurchenko A., Ilina A.V., Larkin D.M. Resequencing the Yaroslavl cattle genomes reveals signatures of selection and a rare haplotype on BTA28 likely to be related to breed phenotypes. *Anim. Genet.* 2022;53(5):680-684. DOI 10.1111/age.13230
- Sambrook J., Russell D.W. *The Condensed Protocols from Molecular Cloning: a Laboratory Manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006
- Sermiyagin A.A., Dotsev A.V., Gladyr E.A., Traspov A.A., Denisikova T.E., Kostyunina O.V., Reyer H., Wimmers K., Barbato M., Paronyan I.A., Plemayshov K.V., Sölkner J., Popov R.G., Brem G., Zinovieva N.A. Whole-genome SNP analysis elucidates the genetic structure of Russian cattle and its relationship with Eurasian taurine breeds. *Genet. Sel. Evol.* 2018;50(1):37. DOI 10.1186/s12711-018-0408-8
- Silpa M.V., König S., Sejian V., Malik P.K., Nair M.R.R., Fonseca V.F.C., Maia A.S.C., Bhatta R. Climate-resilient dairy cattle production: applications of genomic tools and statistical models. *Front. Vet. Sci.* 2021;8:625189. DOI 10.3389/fvets.2021.625189
- Singh A., Malla W.A., Kumar A., Jain A., Thakur M.S., Khare V., Tiwari S.P. Review: genetic background of milk fatty acid synthesis in bovines. *Trop. Anim. Health Prod.* 2023;55(5):328. DOI 10.1007/s11250-023-03754-6
- Siniouoglou S. Phospholipid metabolism and nuclear function: roles of the lipin family of phosphatidic acid phosphatases. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013;1831(3):575-581. DOI 10.1016/j.bbalip.2012.09.014

- Sinnwell J.P., Therneau T.M., Schaid D.J. The kinship2 R package for pedigree data. *Hum. Hered.* 2014;78(2):91-93. DOI 10.1159/000363105
- Storey J.D., Bass A.J., Dabney A., Robinson D. qvalue: Q-value estimation for false discovery rate control. R Package version 2.34.0. 2023. DOI 10.18129/B9.bioc.qvalue. (<https://bioconductor.org/packages/qvalue>)
- Suviolahti E., Reue K., Cantor R.M., Phan J., Gentile M., Naukkariinen J., Soro-Paavonen A., Oksanen L., Kaprio J., Rissanen A., Salomaa V., Kontula K., Taskinen M.R., Pajukanta P., Peltonen L. Cross-species analyses implicate Lipin 1 involvement in human glucose metabolism. *Hum. Mol. Genet.* 2006;15(3):377-386. DOI 10.1093/hmg/ddi448
- Teng J., Wang D., Zhao C., Zhang X., Chen Z., Liu J., Sun D., Tang H., Wang W., Li J., Mei C., Yang Z., Ning C., Zhang Q. Longitudinal genome-wide association studies of milk production traits in Holstein cattle using whole-genome sequence data imputed from medium-density chip data. *J. Dairy Sci.* 2023;106(4):2535-2550. DOI 10.3168/jds.2022-22277
- Thering B.J., Graunard D.E., Piantoni P., Looor J.J. Adipose tissue lipogenic gene networks due to lipid feeding and milk fat depression in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 2009;92(9):4290-4300. DOI 10.3168/jds.2008-2000
- Weller J.I., Ron M. Invited review: quantitative trait nucleotide determination in the era of genomic selection. *J. Dairy Sci.* 2011;94(3):1082-1090. DOI 10.3168/jds.2010-3793
- Weller J.I., Ezra E., Ron M. Invited review: a perspective on the future of genomic selection in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 2017;100(11):8633-8644. DOI 10.3168/jds.2017-12879
- Wiggans G.R., Van Vleck L.D. Extending partial lactation milk and fat records with a function of last-sample production. *J. Dairy Sci.* 1979;62(2):316-325. DOI 10.3168/jds.S0022-0302(79)83242-7
- Williams M., Sleator R.D., Murphy C.P., McCarthy J., Berry D.P. Exploiting genetic variability in the trajectory of lactation yield and somatic cell score with each progressing parity. *J. Dairy Sci.* 2022;105(4):3341-3354. DOI 10.3168/jds.2021-21306
- Yamazaki T., Hagiya K., Takeda H., Osawa T., Yamaguchi S., Nagamine Y. Effects of stage of pregnancy on variance components, daily milk yields and 305-day milk yield in Holstein cows, as estimated by using a test-day model. *Animal.* 2016;10(8):1263-1270. DOI 10.1017/S1751731116000185
- Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T.L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 2012;13:134. DOI 10.1186/1471-2105-13-134
- Yurchenko A.A., Daetwyler H.D., Yudin N., Schnabel R.D., Vander Jagt C.J., Soloshenko V., Lhasaranov B., Popov R., Taylor J.F., Larkin D.M. Scans for signatures of selection in Russian cattle breed genomes reveal new candidate genes for environmental adaptation and acclimation. *Sci. Rep.* 2018a;8(1):12984. DOI 10.1038/s41598-018-31304-w
- Yurchenko A., Yudin N., Aitnazarov R., Plyusnina A., Brukhin V., Soloshenko V., Lhasaranov B., Popov R., Paronyan I.A., Plemyashov K.V., Larkin D.M. Genome-wide genotyping uncovers genetic profiles and history of the Russian cattle breeds. *Heredity (Edinb).* 2018b;120(2):125-137. DOI 10.1038/s41437-017-0024-3
- Zhang R., Jiang F., Hu C., Yu W., Wang J., Wang C., Ma X., Tang S., Bao Y., Xiang K., Jia W. Genetic variants of *LPIN1* indicate an association with Type 2 diabetes mellitus in a Chinese population. *Diabet. Med.* 2013;30(1):118-122. DOI 10.1111/j.1464-5491.2012.03758.x
- Zinovieva N.A., Dotsev A.V., Sermyagin A.A., Deniskova T.E., Abdelmanova A.S., Kharzinova V.R., Sölkner J., Reyer H., Wimmers K., Brem G. Selection signatures in two oldest Russian native cattle breeds revealed using high-density single nucleotide polymorphism analysis. *PLoS One.* 2020;15(11):e0242200. DOI 10.1371/journal.pone.0242200
- Ziyatdinov A., Vázquez-Santiago M., Brunel H., Martinez-Perez A., Aschard H., Soria J.M. lme4qtl: linear mixed models with flexible covariance structure for genetic studies of related individuals. *BMC Bioinformatics.* 2018;19(1):68. DOI 10.1186/s12859-018-2057-x

ORCID

A.V. Igoshin orcid.org/0000-0002-1896-0072
R.B. Aitnazarov orcid.org/0000-0001-6929-7648
A.V. Ilina orcid.org/0000-0002-5046-1812
D.M. Larkin orcid.org/0000-0001-7859-6201
N.S. Yudin orcid.org/0000-0002-1947-5554

Благодарности. Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта № FWN-2022-0039.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 01.12.2023. После доработки 15.01.2024. Принята к публикации 15.01.2024.

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”.

Сетевое издание «Вавиловский журнал генетики и селекции» – реестровая запись СМИ
Эл № ФС77-85772, зарегистрировано Федеральной службой по надзору в сфере связи,
информационных технологий и массовых коммуникаций 14 августа 2023 г.

Издание включено 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, Russian Science Citation Index
на платформе Web of Science, Российский индекс научного цитирования, ВИНИТИ, Web of Science CC,
Scopus, PubMed Central, DOAJ, ROAD, Ulrich’s Periodicals Directory, Google Scholar.

Открытый доступ к полным текстам:

русскоязычная версия – на сайте ИЦиГ СО РАН, <https://vavilovj-icg.ru/>
и платформе Научной электронной библиотеки, elibrary.ru/title_about.asp?id=32440

англоязычная версия – на сайте vavilov.elpub.ru/index.php/jour
и платформе PubMed Central, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/3805/>

При перепечатке материалов ссылка обязательна.

✉ email: 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.

Дата публикации 29.02.2024. Формат 60 × 84 1/8. Уч.-изд. л. 16.3.

