

СОДЕРЖАНИЕ

Том 57, номер 1, 2021

Обзорные и теоретические статьи

- Теоретические подходы к формированию панелей ДНК-маркеров для определения этногеографического происхождения индивида в судебной экспертной деятельности
М. С. Парфенчик, С. А. Котова 5
- Симбиотические модели для реконструкции органеллогенеза
Н. А. Проворов 15
- Беременность как фактор адаптивной эволюции человека.
Роль естественного отбора в возникновении преэклампсии
В. Н. Сереброва, Е. А. Трифонова, В. А. Степанов 29

Генетика растений

- Ингибитор амилазы SbAl видов картофеля: вариабельность структуры и профиля экспрессии
Е. А. Дьяченко, А. В. Кулакова, А. А. Мелешин, А. В. Щенникова, Е. З. Кочиева 44
- Изменчивость хлоропластной ДНК и филогеография дуба черешчатого *Quercus robur* L. в восточной части ареала
С. А. Семерикова, И. Ю. Исаков, В. Л. Семериков 56

Генетика животных

- Молекулярно-генетические характеристики видов рода *Jordanita* Verity, 1946 (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridinae): ДНК-штрихкоды и соответствующие им аминокислотные последовательности
К. А. Ефетов, З. С. Лазарева, Е. В. Паршкова, Г. М. Тарманн 72
- Множественный хромосомный полиморфизм, хромосомной расы “эворон” эворонской полевки (Rodentia, Arvicolinae)
И. В. Картавецва, И. Н. Шереметьева, М. В. Павленко 82

Генетика человека

- Частота мутаций, ассоциированных с развитием наследственного гемохроматоза I типа, болезни Вильсона–Коновалова и семейной средиземноморской лихорадки, и особенности их распределения в русской популяции
Д. Д. Абрамов, В. В. Кадочникова, Е. Г. Якимова, М. В. Белоусова, А. В. Маерле, И. В. Сергеев, И. Б. Козлов, А. Е. Донников, И. А. Кофиади, Д. Ю. Трофимов 95

Краткие сообщения

- Разработка системы праймеров для секвенирования митохондриального генома северного оленя *Rangifer tarandus*
И. В. Артюшин, Е. А. Коноров, К. А. Курбаков, Ю. А. Столповский 103
- Тест-система для *in vitro* скрининга кандидатов в антимикубактериальные препараты на устойчивость, опосредованную MMPS5-MMPL5-транспортерами
К. В. Шур, С. Г. Фролова, Н. И. Акимова, В. Н. Даниленко, Д. А. Маслов 108

Русские Поволжья. Интенсивность метисации в конце XX века

Г. И. Ельчинова, Р. А. Зинченко

112

Результаты длительного мониторинга и эксперимента по обогащению генофонда популяций кустарниковой улитки *Bradybaena fruticum* (Müll.) на урбанизированных территориях

*В. М. Макеева, И. Д. Алазели, А. В. Смуров,
Д. В. Политов, Ю. С. Белоконь, М. М. Белоконь*

116

Contents

Vol. 57, No. 1, 2021

Reviews and Theoretical Articles

- The Theoretical Framework for the Panels of DNA Markers Formation in the Forensic Determination of an Individual Ethnogeographic Origin
M. S. Parfenchyk and S. A. Kotava 5
- Symbiotic Models for Reconstruction of Organellogenesis
N. A. Provorov 15
- Pregnancy as a Factor of Adaptive Human Evolution. The Role of Natural Selection in the Origin of Preeclampsia
V. N. Serebrova, E. A. Trifonova, and V. A. Stepanov 29
-

Plant Genetics

- Amylase Inhibitor SbAI in Potato Species: Variability of Structure and Expression Pattern
E. A. Dyachenko, A. V. Kulakova, A. A. Meleshin, A. V. Shchennikova, and E. Z. Kochieva 44
- Chloroplast DNA Variability and Phylogeography of Pedunculate Oak *Quercus robur* L. in the Eastern Part of the Range
S. A. Semerikova, I. Yu. Isakov, and V. L. Semerikov 56
-

Animal Genetics

- Molecular Genetic Characters of Species of the Genus *Jordanita* Verity, 1946 (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridinae): DNA Barcodes and Corresponding Amino Acid Sequences
K. A. Efetov, Z. S. Lazareva, E. V. Parshkova, and G. M. Tarmann 72
- Multiple Chromosomal Polymorphism of Chromosomal Race “Evoron” of the Evoron Vole (Rodentia, Arvicolinae)
I. V. Kartavtseva, I. N. Sheremetyeva, and M. V. Pavlenko 82
-

Human Genetics

- Frequency of Mutations Associated with the Development of Hereditary Hemochromatosis Type I, Wilson–Konovalov’s Disease and Familial Mediterranean Fever and Peculiarities of Their Distribution in the Russian Population
D. D. Abramov, V. V. Kadochnikova, E. G. Yakimova, M. V. Belousova, A. V. Maerle, I. V. Sergeev, I. B. Kozlov, A. E. Donnikov, I. A. Kofiadi, and D. Yu. Trofimov 95
-

Short Communications

- Primer System for Reindeer (*Rangifer tarandus*) Mitochondrial Genome Sequencing
I. V. Artyushin, E. A. Konorov, K. A. Kurbakov, and Y. A. Stolpovsky 103
- A Test-System for *in vitro* Screening Antimycobacterial Drug Candidates for MmpS5-MmpL5 Mediated Drug Resistance
K. V. Shur, S. G. Frolova, N. I. Akimova, V. N. Danilenko, and D. A. Maslov 108

Russian Volga Region. Intensity of Metisation at the End of the 20th Century

G. I. El'chinova and R. A. Zinchenko

112

The Results of a Long-Term Monitoring and Experiment to Enrich the Gene Pool
of Populations of the Bush Snail *Bradybaena fruticum* (Müll.) in Urbanized Territories

*V. M. Makeeva, I. D. Alazneli, A. V. Smurov,
D. V. Politov, Y. S. Belokon, and M. M. Belokon*

116

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ФОРМИРОВАНИЮ ПАНЕЛЕЙ ДНК-МАРКЕРОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭТНОГЕОГРАФИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ИНДИВИДА В СУДЕБНОЙ ЭКСПЕРТНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

© 2021 г. М. С. Парфенчик^{1, *}, С. А. Котова²

¹Центральный аппарат Государственного комитета судебных экспертиз
Республики Беларусь, Минск, 220030 Республика Беларусь

²Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз
Республики Беларусь, Минск, 220114 Республика Беларусь

*e-mail: maria.parfenchyk@gmail.com

Поступила в редакцию 25.12.2019 г.

После доработки 26.06.2020 г.

Принята к публикации 24.07.2020 г.

Установление этногеографического происхождения неизвестного индивида при криминалистических исследованиях может нести важную информацию для следствия. Данная информация может быть извлечена из биологических следов посредством использования технологий массового параллельного секвенирования ДНК и специально разработанных панелей маркеров. Формирование панелей маркеров, применяемых при установлении этногеографического происхождения индивида, происходит в два этапа: 1) получение данных о полиморфизме ДНК индивидов из различных популяций; 2) отбор и проверка отобранных маркеров аутомсомной, Y-, X-хромосомной ДНК. В случае, если эти маркеры ассоциированы с генетическими заболеваниями, их использование может быть ограничено в связи с необходимостью соблюдения медицинской тайны. В настоящей статье анализируются опубликованные в научно-практической литературе подходы к отбору маркеров, используемых при дифференцировке популяций с целью формирования панели маркеров и ее применения в судебной экспертизе в Республике Беларусь при установлении этногеографического происхождения неизвестного индивида.

Ключевые слова: судебная генетическая экспертиза, этногеографическое происхождение индивида, массовое параллельное секвенирование.

DOI: 10.31857/S0016675821010100

Технологии массового параллельного секвенирования позволяют извлечь из следов, оставленных на месте происшествия, биологическую информацию об индивиде, в том числе об его этногеографическом происхождении. Данные сведения могут быть использованы при сужении круга подозреваемых, особенно в тех случаях, когда свидетельских показаний недостаточно, они противоречивы либо вообще отсутствуют. Этногеографическое происхождение индивида может быть установлено посредством использования панелей маркеров, основанных на полиморфизме ДНК.

Наиболее информативными для определения происхождения индивида являются панели маркеров, построенные из единичных нуклеотидных замен (SNPs) аутомсомной ДНК в сочетании с SNPs половых хромосом, полиморфизмом микросателлитов или коротких tandemных повторов

(STRs). В научной литературе опубликованы панели маркеров, используемые для установления происхождения индивида на уровне континентов [1–4], дифференциации европейских популяций [5–8], а также популяций внутри страны (на примере Нидерландов [9]). Особое внимание уделяется вопросу установления географически смешанного происхождения индивида [10–12]. Ученые рассматривают особенности применения коммерческих наборов для установления происхождения индивида на базе технологий высокопроизводительного секвенирования [13–18].

Масштабного исследования белорусского этноса с применением технологий массового параллельного секвенирования до 2020 г. не проводилось, что выразилось в отсутствии данных о полиморфизме локусов ДНК, анализируемых с помощью указанных технологий и используемых в криминалистике. При этом остается открытым

вопрос о возможности широкогеномных маркеров, применяемых при установлении этногеографического происхождения неизвестного индивида, выявлять генетические различия между локальными белорусскими популяциями.

Настоящая работа посвящена анализу теоретических подходов к формированию панелей маркеров, направленных на установление этногеографического происхождения индивида и дифференциацию популяций, перспективных для применения в судебной экспертизе Республики Беларусь.

Далее будет рассмотрен опыт изучения генетического разнообразия белорусского этноса; затем – охарактеризованы основные этапы диагностирования этногеографического региона по полиморфизму ДНК и маркеры (SNP и STR маркеры аутосомной, Y-, X-хромосомной ДНК), используемые при установлении этногеографического происхождения индивида. Также будет уделено внимание вопросу использования данных о географическом распространении генетически обусловленных заболеваний при установлении этногеографического происхождения индивида.

ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛОРУССКОГО ЭТНОСА

Исследование белорусского этноса проводилось с помощью классических технологий VNTR, STR, ПДРФ анализа, праймер-специфичной ПЦР по маркерам X-, Y-хромосом [19, 20], митохондриальной и аутосомной ДНК [21], в том числе при сравнительном изучении населения стран Европы [22–24] и некоторых соседей – Польши [25–28], России [29, 30].

Отдельно стоит упомянуть изучение: генетической предрасположенности представителей различных популяций к таким заболеваниям как рак щитовидной железы [31], шизофрения [32]; мутаций в гене *GJB2*, приводящих к потере слуха [33]; полиморфизма генов, определяющих биотрансформацию лекарств [34]; полиморфизма гена аполипопротеина E (APOE), участвующего в регуляции липидного обмена [35]. В научном исследовании [36, с. 702] были показаны различия Северного (Подвинье) и Восточного (Поднепровье) регионов Беларуси по частотам ACE-генотипов ангиотензин-превращающего фермента, а также дифференциация популяции Поднепровья от других регионов Беларуси по частотам AGT-генотипов гена ангиотензиногена.

По маркерам аутосомной ДНК население Беларуси изучалось в контексте исследования других популяций Центрально-Восточной Европы (поляков, украинцев и русских) [23, с. 4]. При изучении белорусской популяции с помощью 18 STR-маркеров аутосомной ДНК не выявлено статистически достоверных различий по частоте

встречаемости аллелей в зависимости от региона страны [37, с. 275].

По данным исследования митохондриальной ДНК в генофонде населения Беларуси подавляющее большинство составляют гаплогруппы, типичные для центрально-восточных европейских популяций, но при этом наблюдается наличие двух редких гаплогрупп N1a3 и N3 [38].

По STR-маркерам Y-хромосомной ДНК выявлены гаплогруппы, характерные для восточно-европейских славян, северо-западных славян, южных славян и южных балтов, а также минорные гаплогруппы центрально- и восточно-азиатского происхождения как следствие ассимиляции в генофонде белорусов генофонда “литовских” татар [39–42]. Согласно полученным в исследовании [38] данным, около 80% Y-хромосом белорусов относятся к гаплогруппам R1a, I2a, N1c, что характерно для остальных восточно-европейских популяций (украинцев и русских); около 5% получила распространение среди белорусов гаплогруппа R1b; также небольшое распространение получили гаплогруппы I2b, N1b, J2, E1b1b1a.

В научной литературе имеются данные о возможности установления географической дифференциации на основе спектра исследованных генотипов [43, с. 284].

Так, например, в изученных выборках населения Беларуси [44] было выявлено неравномерное распределение гаплотипов Y-хромосомы с помощью 16 STR-маркеров. Согласно другому источнику, при изучении представителей четырех регионов Беларуси было показано, что по частотам локусов Y-хромосомы, входящих в “минимальный гаплотип”, изучаемая выборка неоднородна [45].

При изучении генетического разнообразия населения Беларуси с помощью микросателлитных локусов X-хромосомы была выявлена генетическая стратификация внутри страны – получились обособленными северо-западные выборки [46, 47].

Из вышесказанного следует, что белорусский этнос в общем генетически сходен с населением Центрально-Восточной Европы, однако даже по немногочисленным маркерам наблюдается отличие от ближайших стран-соседей, а также стратификация внутри страны, что создает потенциальную возможность для разработки научных и методических подходов к решению криминалистических задач нового типа по установлению этнической, региональной и популяционной принадлежности неизвестного индивида по характеристикам его ДНК. Для успешной реализации таких разработок необходимо провести популяционные исследования с целью поиска дополнительных маркеров, информативных в отношении дифференциации населения Республики Беларусь.

ЭТАПЫ ДИАГНОСТИРОВАНИЯ ЭТНОГЕОГРАФИЧЕСКОГО РЕГИОНА ПО ПОЛИМОРФИЗМУ ДНК

Диагностирование географического региона по полиморфизму ДНК происходит в два этапа: 1) отбор нуклеотидных замен, потенциально позволяющих решить поставленную задачу; 2) исследование образцов ДНК с помощью отобранных нуклеотидных замен и интерпретация данных.

1. Для отбора нуклеотидных замен, с помощью которых возможно различать популяции, используют данные о частотах аллелей в сравниваемых популяциях: чем больше разница по частоте встречаемости аллеля, тем выше его информативность (In) [48]. При этом для формирования панелей маркеров могут быть использованы другие критерии, такие как δ , F_{st} [49]. Стоит отметить, что в научной литературе отмечается наличие корреляции между In и F_{st} [50].

Учеными называются следующие принципы отбора нуклеотидных замен, при которых они должны быть: 1) широко распространены в геноме; 2) располагаться на достаточном расстоянии друг от друга, чтобы наследоваться независимо; 3) совместимы с коммерческими платформами; 4) сбалансировано подобраны для сравниваемых популяций. На случай возникновения проблемы при формировании мультиплекса желательно иметь альтернативные локусы [3, 10].

При отборе маркеров, расположенных на одной хромосоме, необходимо учитывать физическую связь между локусами (генетическое сцепление) и аллельную сцепленность в разных локусах (неравновесное сцепление генов). Первое может быть изучено с помощью наблюдаемой степени рекомбинации между маркерами внутри семейств, второе – путем сравнения наблюдаемых частот гаплотипов с ожидаемой частотой гаплотипов [51].

Поиск и отбор маркеров, информативных при установлении происхождения индивида, может быть произведен с помощью биоинформатического онлайн-ресурса – AncestrySNPminer, находящегося в свободном доступе. При использовании данного ресурса критериями информативности маркеров выступают: разница абсолютных частот аллелей (Δ) в изучаемых популяциях; информативное содержание Шеннона; информативное содержание Фишера; критерии F_{st} и In , а также композиционная мера (англ. composite measure), представляющая собой совокупный результат анализа маркеров по вышеуказанным пяти критериям [52].

2. После того как отобраны потенциально информативные генетические маркеры с их помощью производится анализ образцов ДНК для отнесения их к определенной популяции [53].

Анализ полиморфизма в изучаемых образцах ДНК проводится с использованием многомерных

методов статистики, которые включают различные способы анализа данных в зависимости от цели и специфики последних. Анализ главных компонент (англ. principal component analysis) позволяет представить генетические варианты в виде векторов главных компонент, тем самым выявить структуру большого массива данных. Однако для корректной разбивки данных требуется большое количество (тысячи и миллионы) SNPs. Помимо анализа главных компонент исследователи используют алгоритмы неконтролируемого машинного обучения. Результатом такого рода анализа является уже некая классификация исследуемых образцов в виде группирующихся вместе кластеров (популяций). При этом для точности анализа требуется не большое количество маркеров, а множество исследуемых популяций [54].

Учеными обсуждаются и сравниваются программные продукты, предназначенные для анализа полиморфизма в образцах ДНК: программное обеспечение “ELAI” из группы методов, учитывающих неравновесное сцепление нуклеотидных замен, может быть наиболее эффективным при установлении происхождения образца; “RFMIX” и “LOTTER”, не учитывающие неравновесное сцепление нуклеотидных замен, имеют преимущество в качестве возможности учесть большее количество параметров; “SWITCH” или “ELAI” могут быть использованы при необходимости рассчитать рекомбинационные события; “SUPORMIX” рекомендовано для изучения смешанного происхождения генотипа, без знания предковых популяций; “ALLOY” применимо для расчета смешанного происхождения индивида; “LAMPLD”, “RFMIX” и “LOTTER” подходят в случае, если анализу подлежит неполный гаплотип; “SEQMIX” успешно применимо при работе с низким покрытием прочитанных нуклеотидных последовательностей [55].

Обобщая вышесказанное, отметим, что в научной литературе для решения вопроса об этногеографическом происхождении неизвестного индивида определены критерии отбора ДНК-маркеров, информативных при разделении глобальных популяций, разработаны программные продукты для анализа и интерпретации полученных данных. При проведении исследования популяции в Беларуси с помощью технологий массового параллельного секвенирования можно воспользоваться уже выработанными принципами, критериями отбора и программными продуктами.

МАРКЕРЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ УСТАНОВЛЕНИИ ЭТНОГЕОГРАФИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ИНДИВИДА

В состав панелей, используемых при установлении этногеографического происхождения ин-

дива, как правило, входят SNP и STR маркеры, расположенные на аутосомах, X-, Y-хромосомах. Отдельные панели маркеров построены на нуклеотидном полиморфизме митохондриальной ДНК.

Для SNP-маркеров характерны следующие особенности: диаллельность, относительно низкий уровень мутабельности, возможность применения на деградированном биологическом материале. Основные направления их использования: 1) идентификационное; 2) установление родства (Y-хромосомная ДНК и митохондриальная ДНК); 3) определение географического происхождения; 4) предсказание фенотипа [56].

Однако наиболее распространенные в криминалистике ДНК-маркеры – это STRs, которые были выбраны благодаря их высокой полиморфности. При этом анализ “смешанных” генетических STR-профилей от двух и более индивидов весьма затруднителен из-за присутствия статтеров, которые могут маскироваться под истинные аллели. Также STR не обладают высокой информативностью при установлении этногеографического происхождения индивида. SNP-маркеры имеют ряд преимуществ в основном из-за отсутствия статтеров, а также благодаря более низкой скорости мутирования в сравнении с STR-локусами [56, 57].

Опубликовано множество панелей маркеров, информативных для установления географического происхождения индивида, на примере анализа различных популяций показана их результативность. Их использованию в криминалистике препятствует отсутствие единой базы данных о частотах аллелей по исследованным локусам в изучаемых популяциях. В связи с этим по общему мнению научного сообщества усилия лабораторий необходимо направить не на создание новых панелей маркеров, а на анализ большего числа популяций и образцов с помощью уже имеющихся [58].

Точность определения происхождения индивида повышается в случае использования разных типов маркеров. Например, 76.3% корректного определения географического происхождения индивида в случае использования только SNP-маркеров аутосомной ДНК и 84.9% при использовании одновременно SNP-, STR-маркеров аутосомной, Y-хромосомной и митохондриальной ДНК [59].

Следует подчеркнуть, что исследование STR-маркеров аутосом, X- и Y-хромосом с использованием технологии полногеномного секвенирования позволяет выявить дополнительные одонуклеотидные полиморфизмы (как в самих микросателлитных последовательностях, так и в участках, их фланкирующих) и которые не могут быть учтены при фрагментном анализе [60]. В связи с развитием технологий и методов ДНК-анализа коллективом

ученых опубликовано руководство по использованию STR-маркеров в криминалистике [61].

Далее будут рассмотрены особенности маркеров на Y- и X-хромосомах.

Y-хромосома содержит наибольший не подверженный рекомбинации участок ДНК в человеческом геноме, а благодаря высокому полиморфизму находит применение в криминалистике.

Выявленный нуклеотидный полиморфизм Y-хромосомы (245 маркеров) позволил в 2002 г. группе ученых (англ. Y Chromosome Consortium) сконструировать иерархичное дерево, состоящее из 153 гаплогрупп [62]. Данное дерево позднее не раз дополнялось [63], при этом увеличивалось число гаплогрупп и маркеров. В варианте 2008 г. дерево состоит из 311 гаплогрупп, включая две новые большие гаплогруппы (S и T), и включает порядка 600 бинарных маркеров [64]. В связи с развитием технологий секвенирования ДНК учеными активно обсуждается вопрос целесообразности использования как можно большего количества SNP-маркеров Y-хромосомы для построения филогенетического дерева, поскольку тысячи выявленных Y-SNPs могут внести неясность при интерпретации результатов. Поэтому предложено в качестве стандарта использовать 417 SNPs, позволяющих идентифицировать основные гаплогруппы, ввести единую номенклатуру гаплогрупп [65]. На онлайн-ресурсе PhyloTree Y [66] размещена актуальная версия указанного филогенетического дерева. Более полное дерево доступно на ресурсе Международного общества генетической генеалогии (англ. International Society of Genetic Genealogy; сокр. ISOGG) [67]. Соответственно выработаны подходы по установлению гаплогруппы неизвестного индивида по полиморфизму Y-хромосомы.

В дополнение к SNP-маркерам Y-хромосомы при определении гаплогруппы могут быть успешно применены STR-маркеры. Для популяционно-генетических, генеалогических, криминалистических исследований опубликовано 194 STR-маркера [68]. Обсуждается возможность использования быстромутирующих STR-маркеров Y-хромосомы [69–72].

X-хромосома имеет ряд особенностей, что делает ее уникальной в человеческом геноме. Женщины наследуют по одной X-хромосоме от каждого из родителей, в то время как мужчины – одну, материнскую. Одна из двух X-хромосом у женщин инактивируется на ранних этапах развития и остается неактивной в соматических клетках, а при гаметогенезе реактивируется, благодаря чему происходит рекомбинация между двумя X-хромосомами. У мужчин между X- и Y-хромосомами рекомбинация происходит только между небольшими участками. Гены в X-хромосоме, которые не входят в рекомбинирующий регион, принадлежат только X-хромосоме и присутствуют в единствен-

ной копии в геноме мужчин [73]. Таким образом, маркеры, расположенные на X-хромосоме, могут образовывать группы сцепления.

Например, X-STR-локусы, входящие в состав успешно используемого в криминалистике набора ArgusX-12, образуют четыре группы сцепления: 1) *DXS10148*, *DXS10135*, *DXS8378*; 2) *DXS7132*, *DXS10079*, *DXS10074*; 3) *DXS10103*, *HPRTB*, *DXS10101*; 4) *DXS10146*, *DXS10134*, *DXS7423*. Эффективность данного набора показана для популяций Швеции [51], Германии [74], Беларуси [46].

Помимо X-STR-маркеров в криминалистике при разделении основных континентальных популяций (африканской, американской, восточно-азиатской, европейской, южно-азиатской) могут быть использованы X-SNPs [75].

В научной литературе высказывается идея, что с помощью маркеров, расположенных на половых хромосомах, можно выявить межпопуляционные различия внутри локальной территории, даже если частоты аллелей относительно однородны в более глобальном регионе [76]. Это было продемонстрировано на примере Китая [77], Испании [78].

Актуальная информация о полиморфизме ДНК человека представлена в базе данных ALFRED [79] и криминалистическом ресурсе FROG-kb [80], а также в таких проектах как: “1000 Геномов” [81], “Карта гаплотипа” (англ. *MapMap*) [82], “Разнообразие генома человека” (англ. *The Human Genome Diversity Project*) [83], “Рак в Нью-Йорке” (англ. *New York Cancer Project*) [84]. Нуклеотидный полиморфизм человеческой ДНК, выявленный в рамках данных проектов, становится объектом установления взаимосвязи генетического полиморфизма и определенных характеристик (цвет глаз и волос, географический регион, предрасположенность к заболеваниям и т.д.) представителей различных популяций.

Таким образом, при установлении этногеографического происхождения индивида при проведении судебной экспертизы наиболее перспективными маркерами являются SNPs аутосом, а также Y- и X-хромосом. При этом в панель могут быть включены STR-маркеры ДНК, в том числе быстро мутирующие.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДАННЫХ О ГЕОГРАФИЧЕСКОМ РАСПРОСТРАНЕНИИ ГЕНЕТИЧЕСКИ ОБУСЛОВЛЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И ПРИЗНАКОВ ПРИ УСТАНОВЛЕНИИ ЭТНОГЕОГРАФИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ИНДИВИДА

Отдельным направлением исследований является перспектива использования данных о географическом распространении некоторых гене-

тически обусловленных заболеваний при дифференциации популяций.

В качестве примера научного консорциума, занимающегося установлением взаимосвязи между нуклеотидным полиморфизмом ДНК и генетически обусловленными заболеваниями и характеристиками людей, можно привести проект “Изучение популяционной структуры с использованием данных геномики и эпидемиологии” (англ. *The Population Architecture Using Genomics and Epidemiology Study*) [85]. В рамках названного исследования изучено распространение сахарного диабета 2-го типа, индекса массы тела, уровня жиров, сердечно-сосудистой недостаточности, рака и прочих биомаркеров в различных человеческих популяциях [86]. Установление взаимосвязи вышеуказанных параметров осложняется тем, что выборки из популяций составлены неравномерно и в основном изучены европейские популяции. Соответственно экстраполировать частоты встречаемости аллелей на другие регионы может быть не совсем корректно [87, 88].

Генетическое разнообразие человеческих популяций может быть обусловлено полигенной природой заболеваний, таких как ишемическая болезнь сердца, мерцательная аритмия, диабет 2-го типа, воспалительное заболевание кишечника, рак молочной железы [89]; или приспособлением к условиям среды, патогенам, демографическими процессами [90, 91].

Имеются данные о закономерностях географической приуроченности таких генетически детерминированных черт, как: склонность к шизофрении на примере популяций европейского и африканского происхождения [92]; диабет 2-го типа среди населения Гренландии [93], IgA нефропатии — главной причины почечной недостаточности среди лиц европейского, азиатского и афро-американского происхождения [94]; устойчивость к гипоксии населения Тибета [95].

Такая дополнительная информация, как наличие или предрасположенность к определенному генетическому заболеванию, как правило проявляющемуся фенотипически, может иметь большую значимость для идентификации индивида, биологический материал которого обнаружен на месте происшествия. Несмотря на это использование ее может быть ограничено в связи с необходимостью соблюдать медицинскую тайну [96–98].

Вместе с тем полагаем, что включение подобных маркеров в криминалистическую панель может повысить эффективность идентификации неизвестного индивида, при обязательном условии обеспечения защиты генетической информации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, для целей установления этно-географического происхождения неизвестного индивида и выявления различий между региональными популяциями Беларуси по полиморфизму ДНК имеющихся на сегодняшний день данных недостаточно. Результаты предыдущих исследований белорусского этноса были получены с помощью методов, проигрывающих по информативности технологиям массового параллельного секвенирования. Для решения криминалистических задач нового уровня в научной литературе описаны принципы отбора информативных ДНК-маркеров и формирования на их базе локусных панелей, а также предложены методы анализа и интерпретации полученных данных. Соответственно при выполнении поставленной задачи остается определиться с подходом при выборе ДНК-маркеров, источниками изучаемых генотипов, программным обеспечением. При этом можно использовать опыт изучения соседних популяций, а также маркеры, ассоциированные с генетическими заболеваниями (при условии соблюдения медицинской тайны).

Работа выполнена в рамках государственной научно-технической программы Союзного государства “Разработка инновационных геногеографических и геномных технологий идентификации личности и индивидуальных особенностей человека на основе изучения генофондов регионов Союзного государства” (ДНК-идентификация), 2017–2021 гг.

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

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kersbergen P., van Duijn K., Kloosterman A.D. et al.* Developing a set of ancestry-sensitive DNA markers reflecting continental origins of humans // *BMC Genetics*. 2009. V. 10. № 69. P. 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-10-69>
2. *Kosoy R., Nassir R., Tian C. et al.* Ancestry informative marker sets for determining continental origin and admixture proportions in common populations in America // *Human Mutat.* 2009. V. 30. № 1. P. 69–78. <https://doi.org/10.1002/humu.20822>
3. *Phillips C., Parson W., Lundsberg B. et al.* Building a forensic ancestry panel from the ground up: The EUROFORGEN Global AIM-SNP set // *Forensic Sci. Intern. Genet.* 2014. V. 11. P. 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.02.012>
4. *Bulbul O., Pakstis A.J., Soundararajan U. et al.* Ancestry inference of 96 population samples using microhaplo-
types // *Intern. J. Legal Med.* 2018. V. 132. № 3. P. 703–711. <https://doi.org/10.1007/s00414-017-1748-6>
5. *Lao O., Lu T.T., Nothnagel M. et al.* Correlation between genetic and geographic structure in Europe // *Current Biology: CB*. 2008. V. 18. № 16. P. 1241–1248. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.07.049>
6. *Moskvina V., Smith M., Ivanov D. et al.* Genetic differences between five European populations // *Human Heredity*. 2010. V. 70. № 2. P. 141–149. <https://doi.org/10.1159/000313854>
7. *Seldin M.F., Shigeta R., Villoslada P. et al.* European population substructure: clustering of northern and southern populations // *PLoS Genetics*. 2006. V. 2. № 9. P. 1339–1351. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020143>
8. *Tian C., Kosoy R., Nassir R. et al.* European population genetic substructure: further definition of ancestry informative markers for distinguishing among diverse European ethnic groups // *Mol. Medicine (Cambridge, Mass.)*. 2009. V. 15. P. 371–383. <https://doi.org/10.2119/molmed.2009.00094>
9. *Lao O., Altana E., Becker C. et al.* Clinal distribution of human genomic diversity across the Netherlands despite archaeological evidence for genetic discontinuities in Dutch population history // *Investigative Genet.* 2013. V. 4. № 1. P. 1–14. <https://doi.org/10.1186/2041-2223-4-9>
10. *Galanter J.M., Fernandez-Lopez J.C., Gignoux C.R. et al.* Development of a panel of genome-wide ancestry informative markers to study admixture throughout the Americas // *PLoS Genetics*. 2012. V. 8. № 3. P. 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002554>
11. *Kidd J.R., Friedlaender F.R., Speed W.C. et al.* Analyses of a set of 128 ancestry informative single-nucleotide polymorphisms in a global set of 119 population samples // *Investigative Genet.* 2011. V. 2. № 1. P. 1–13. <https://doi.org/10.1186/2041-2223-2-1>
12. *Nievergelt C.M., Maihofer A.X., Shekhtman T. et al.* Inference of human continental origin and admixture proportions using a highly discriminative ancestry informative 41-SNP panel // *Investigative Genet.* 2013. V. 4. № 1. P. 1–16. <https://doi.org/10.1186/2041-2223-4-13>
13. *Xavier C., Parson W.* Evaluation of the Illumina ForenSeq™ DNA Signature Prep Kit – MPS forensic application for the MiSeq FGx™ benchtop sequencer // *Forensic Sci. Intern. Genet.* 2017. V. 28. P. 188–194. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.02.018>
14. *Pereira V., Mogensen H.S., Borsting C., Morling N.* Evaluation of the Precision ID Ancestry Panel for crime case work: A SNP typing assay developed for typing of 165 ancestral informative markers // *Forensic Sci. Intern. Genet.* 2017. V. 28. P. 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.02.013>
15. *Hussing C., Huber C., Bytyci R. et al.* Sequencing of 231 forensic genetic markers using the MiSeq FGx™ forensic genomics system – an evaluation of the assay and software // *Forensic Sci. Res.* 2018. V. 3. № 2. P. 111–123. <https://doi.org/10.1080/20961790.2018.1446672>

16. Guo F., Yu J., Zhang L., Li J. Massively parallel sequencing of forensic STRs and SNPs using the Illumina® ForenSeq™ DNA Signature Prep Kit on the MiSeq FGx™ Forensic Genomics System // *Forensic Sci. Intern. Genet.* 2017. V. 31. P. 135–148. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.09.003>
17. Churchill J.D., Novroski N.M.M., King J.L. et al. Population and performance analyses of four major populations with Illumina's FGx Forensic Genomics System // *Forensic Sci. Intern. Genet.* 2017. V. 30. P. 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.06.004>
18. Apaga D.L.T., Dennis S.E., Salvador J.M. et al. Comparison of two massively parallel sequencing platforms using 83 single nucleotide polymorphisms for human // *Nature.* 2017. V. 7. № 1. P. 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00510-3>
19. Shyla A., Borovko S.R., Tillmar A.O. et al. Belarusian experience of the use of FamLinkX for solving complex kinship cases involving X-STR markers // *Forensic Sci. Intern. Genet. Suppl. Series.* 2015. V. 5. P. e539–e541. <https://doi.org/10.1016/j.fsigs.2015.09.213>
20. Borovko S., Shyla A., Korban V., Borovko A. Amelogenin test abnormalities revealed in Belarusian population during forensic DNA analysis // *Forensic Sci. Intern. Genet.* 2015. V. 15. P. 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.10.014>
21. Zhivotovsky L.A., Veremeichyk V.M., Mikulich A.I. et al. A comprehensive population survey on the distribution of STR frequencies in Belarus // *Forensic Sci. Intern.* 2007. V. 172. № 2–3. P. 156–160. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2007.01.009>
22. Karachanak-Yankova S., Nesheva D., Toncheva D., Galabov A.S. The uniparental genetic landscape of modern Slavic speaking populations // *Adv. Anthropology.* 2017. V. 7. № 4. P. 318–332. <https://doi.org/10.4236/aa.2017.74018>
23. Kushniarevich A., Utevska O., Chuhryaeva M. et al. Genetic heritage of the Balto-Slavic speaking populations: A synthesis of autosomal, mitochondrial and Y-chromosomal data // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 9. P. e0135820. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135820>
24. Балановский О.П. Изменчивость генофонда в пространстве и времени: синтез данных о геногеографии митохондриальной ДНК и Y-хромосомы: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М.: ФГБУ “Медико-генетический науч. центр” Российской акад. мед. наук, 2012. 47 с.
25. Soltyszewski I., Plocienniczak A., Fabricius H.A. et al. Analysis of forensically used autosomal short tandem repeat markers in Polish and neighboring populations // *Forensic Sci. Intern. Genetics.* 2008. V. 2. № 3. P. 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2008.02.003>
26. Rebała K., Mikulich A.I., Tsybovsky I.S. et al. Y-STR variation among Slavs: evidence for the Slavic homeland in the middle Dnieper basin // *J. Human Genet.* 2007. V. 52. № 5. P. 406–414. <https://doi.org/10.1007/s10038-007-0125-6>
27. Rebała K., Mikulich A.I., Tsybovsky I.S. et al. Common Y-chromosomal STR database for three closely related European populations // *Intern. Congress Series.* 2006. V. 1288. P. 177–179. <https://doi.org/10.1016/j.ics.2005.09.120>
28. Pepinski W., Niemcunowicz-Janica A., Skawronska M. et al. Allele distribution of 15 STR loci in a population sample of Byelorussian minority residing in the north-eastern Poland // *Forensic Sci. Intern.* 2004. V. 139. № 2–3. P. 265–267. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2003.11.013>
29. Балановский О.П., Тезако О.В. Генофонд белорусов по данным о трех типах генетических маркеров: аутосомных, митохондриальных, Y-хромосомы // *Актуальные вопр. антропологии.* 2008. Т. 2. С. 53–65.
30. Verbenko D.A., Pogoda T.V., Spitsyn V.A. et al. Apolipoprotein B 3'-VNTR polymorphism in Eastern European populations // *Eur. J. Human Genet.: EJHG.* 2003. V. 11. № 6. P. 444–451. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200986>
31. Nikitski A.V., Rogounovitch T.I., Bychkov A. et al. Genotype analyses in the Japanese and Belarusian populations reveal independent effects of rs965513 and rs1867277 but do not support the role of FOXE1 polyalanine tract length in conferring risk for papillary thyroid carcinoma // *Thyroid: Official J. Am. Thyroid Association.* 2017. V. 27. № 2. P. 224–235. <https://doi.org/10.1089/thy.2015.0541>
32. Kandratsenka H., Nestsiarovich A., Goloenko I. et al. Association of MIR137 with symptom severity and cognitive functioning in Belarusian schizophrenia patients // *Frontiers in Psychiatry.* 2018. V. 9. P. 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2018.00295>
33. Dzhemileva L.U., Barashkov N.A., Posukh O.L. et al. Carrier frequency of GJB2 gene mutations c.35delG, c.235delC and c.167delT among the populations of Eurasia // *J. Human Genet.* 2010. V. 55. № 11. P. 749–754. <https://doi.org/10.1038/jhg.2010.101>
34. Mikhalenka A., Chebotareva N., Krupnova E. et al. Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP1A2, CYP2D6, GST, NAT2 and transporter MDR1 in population of Belarus: comparison with selected European and Asian populations // *EUREKA: Life Sci.* 2016. V. 2. P. 27–36. <https://doi.org/10.21303/2504-5695.2016.00105>
35. Borinskaya S.A., Kal'ina N.R., Sanina E.D. et al. Polymorphism of the apolipoprotein E gene (APOE) in the populations of Russia and neighboring countries // *Rus. J. Genet.* 2007. V. 43. № 10. P. 1201–1207. <https://doi.org/10.1134/S1022795407100158>
36. Сивицкая Л.Н., Кушнеревич Е.И., Даниленко Н.Г. и др. Полиморфизм генов ренин-ангиотензиновой системы в шести этногеографических регионах Беларуси // *Генетика.* 2008. Т. 44. № 5. С. 702–709.
37. Tsybovskii I.S., Veremeichik V.M., Kotova S.A. et al. Developing forensic reference database by 18 autosomal STR for DNA identification in Republic of Belarus // *Rus. J. Genet.* 2017. V. 53. № 2. P. 275–284. <https://doi.org/10.1134/S1022795417020132>
38. Kushniarevich A., Sivitskaya L., Danilenko N. et al. Uniparental genetic heritage of Belarusians: encounter of rare middle eastern matrilineages with a central European mitochondrial DNA pool // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 6. P. e66499. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066499>

39. *Рожанский И., Цыбовский И.С., Богачева А.В. и др.* Белорусы: этногенез и связь с другими славянскими народами с позиции ДНК-генеалогии // Наука и инновации. 2013. Т. 3. № 21. С. 55–62.
40. *Pankratov V., Litvinov S., Kassian A. et al.* East Eurasian ancestry in the middle of Europe: genetic footprints of Steppe nomads in the genomes of Belarusian Lipka // Scientific Reports. 2016. V. 6. P. 30197. <https://doi.org/10.1038/srep30197>
41. *Кушнеревич Е.И., Давыденко О.Г.* Гаплогруппы Y-хромосом и происхождение национального генофонда // Наука и инновации. 2011. Т. 9. № 103. С. 12–15.
42. *Кушнеревич Е.И., Давыденко О.Г., Сивицкая Л.Н. и др.* Гаплогруппа R1A1A7(M458) Y-хромосомы современных белорусов и миграции предков славян на территории Беларуси // Генетика популяций и эволюция. 2011. Т. 9. № 1. С. 44–52.
43. *Богачева А.В., Цыбовский И.С., Киселева А.С. и др.* Исследование полиморфизма 20 STR-локусов Y-хромосомы у населения Беларуси с целью создания референтной базы данных // Генетика и биотехнология XXI века. Фундаментальные и прикладные аспекты: Материалы Междунар. науч. конф., 3–6 дек. 2008 г. / Под ред. Максимовой Н.П. и др. Минск: Изд. центр БГУ, 2008. С. 283–285.
44. *Цыбовский И.С., Киселева А.С., Микулич А.И. и др.* Исследование частот встречаемости гаплогрупп Y-хромосомы у населения Беларуси для целей экспертного ДНК-анализа // Судебная экспертиза. 2007. Т. 1. № 21. С. 123–131.
45. *Rebała K., Tsybovsky I.S., Bogacheva A.V. et al.* Forensic analysis of polymorphism and regional stratification of Y-chromosomal microsatellites in Belarus // Forensic Sci. Intern. Genet. 2011. V. 5. № 1. P. e17–e20. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2009.10.011>
46. *Rebała K., Kotova S.A., Rybakova V.I. et al.* Variation of X-chromosomal microsatellites in Belarus within the context of their genetic diversity in Europe // Forensic Sci. Intern. Genet. 2015. V. 16. P. 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.12.011>
47. *Котова С.А., Рыбакова В.И., Забавская Т.Н. и др.* Полиморфизм микросателлитных локусов X-хромосомы этнических белорусов в контексте судебно-экспертной идентификации личности // Докл. Национальной акад. наук Беларуси. 2016. Т. 60. № 2. С. 78–84.
48. *Rosenberg N.A., Li L.M., Ward R., Pritchard J.K.* Informativeness of genetic markers for inference of ancestry // Am. J. Hum. Genet. 2003. V. 73. № 6. P. 1402–1422. <https://doi.org/10.1086/380416>
49. *Halder I., Shriver M., Thomas M. et al.* A panel of ancestry informative markers for estimating individual biogeographical ancestry and admixture from four continents: utility and applications // Human Mutat. 2008. V. 29. № 5. P. 648–658. <https://doi.org/10.1002/humu.20695>
50. *Kidd K.K., Speed W.C., Pakstis A.J. et al.* Progress toward an efficient panel of SNPs for ancestry inference // Forensic Sci. Intern. Genet. 2014. V. 10. P. 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.01.002>
51. *Tillmar A.O.* Population genetic analysis of 12 X-STRs in Swedish population // Forensic Sci. Intern. Genet. 2012. V. 6. № 2. P. 80–81. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.07.008>
52. *Amirisetty S., Hershey G.K.K., Baye T.M.* AncestrySNPminer: a bioinformatics tool to retrieve and develop ancestry informative SNP panels // Genomics. 2012. V. 100. № 1. P. 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2012.05.003>
53. *Santos C., Phillips C., Gomez-Tato A. et al.* Inference of Ancestry in Forensic Analysis II: Analysis of Genetic Data // Forensic DNA Typing Protocols, Methods in Molecular Biology. N.Y.: Springer Sci., Business Media, 2016. V. 1420. P. 31. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3597-0_19
54. *Toma T.T., Dawson J.M., Adjeroh D.A.* Human ancestry identification under resource constraints – what can one chromosome tell us about human biogeographical ancestry? // BMC Med. Genomics. 2018. V. 11. Suppl. 5. P. 75–87. <https://doi.org/10.1186/s12920-018-0412-4>
55. *Geza E., Mugo J., Mulder N.J. et al.* A comprehensive survey of models for detecting local ancestry deconvolution in human genome // Briefings in Bioinform. 2018. V. 1. P. 1–16. <https://doi.org/10.1093/bib/bby044>
56. *Budowle B., van Daal A.* Forensically relevant SNP classes // BioTechniques: The Intern. J. Life Sci. Methods. 2008. V. 44. № 5. P. 603–610. <https://doi.org/10.2144/000112806>
57. *Kidd K.K., Speed W.C., Pakstis A.J. et al.* Evaluating 130 microhaplotypes across a global set of 83 populations // Forensic Sci. Intern. Genet. 2017. V. 29. P. 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.03.014>
58. *Soundararajan U., Yun L., Shi M., Kidd K.K.* Minimal SNP overlap among multiple panels of ancestry informative markers argues for more international collaboration // Forensic Sci. Intern. Genet. 2016. V. 23. P. 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.01.013>
59. *Builer K. Gettings.* Forensic Ancestry and Phenotype SNP Analysis and Integration with Established Forensic Markers: thesis doctor of philosophy. Washington: The George Washington Univ., 2013. 140 p.
60. *Churchill J.D., Novroski N.M.M., King J.L. et al.* Characterization of genetic sequence variation of 58 STR loci in four major population groups // Forensic Sci. Intern. Genet. 2016. V. 25. P. 214–226. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.06.004>
61. *Phillips C., Devesse L., Ballard D. et al.* Global patterns of STR sequence variation: Sequencing the CEPH human genome diversity panel for 58 forensic STRs using the Illumina ForenSeq DNA Signature Prep Kit // Electrophoresis. 2018. V. 39. № 21. P. 2708–2724. <https://doi.org/10.1002/elps.201800117>
62. *Y Chromosome Consortium.* A nomenclature system for the tree of human Y-chromosomal binary haplogroups // Genome Research. 2002. V. 12. № 2. P. 339–348. <https://doi.org/10.1101/gr.217602>
63. *Jobling M.A., Tyler-Smith C.* The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age // Genetics. 2003. V. 4. P. 598–612.

64. *Karafet T.M., Mendez F.L., Meilerman M.B. et al.* New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree // *Genome Res.* 2008. V. 18. № 5. P. 830–838. <https://doi.org/10.1101/gr.7172008>
65. *van Oven M., van Geystelen A., Kayser M. et al.* Seeing the wood for the trees: a minimal reference phylogeny for the human Y chromosome // *Human Mutat.* 2014. V. 35. № 2. P. 187–191. <https://doi.org/10.1002/humu.22468>
66. PhyloTree Y – Minimal reference phylogeny for the human Y chromosome: Y tree, Y-SNPs, haplogroups [Electronic resource]. Mode of access: <http://www.phyloree.org/Y/>. Date of access: 28.07.2019.
67. ISOGG 2019 Y-DNA Haplogroup Tree [Electronic resource]. Mode of access: <https://isogg.org/tree/>. Date of access: 28.07.2019.
68. *Kayser M., Kittler R., Erler A. et al.* A comprehensive survey of human Y-chromosomal // *Am. J. Human Genet.* 2004. V. 74. № 6. P. 1183–1197. <https://doi.org/10.1086/421531>
69. *Kayser M.* Forensic use of Y-chromosome DNA: a general overview // *Human Genet.* 2017. V. 136. № 5. P. 621–635. <https://doi.org/10.1007/s00439-017-1776-9>
70. *Jobling M.A., Tyler-Smith C.* Human Y-chromosome variation in the genome-sequencing era // *Nature Rev. Genet.* 2017. V. 18. № 8. P. 485–497. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.36>
71. *de Knijff P.* Messages through Bottlenecks: On the combined use of slow and fast evolving polymorphic markers on the human Y chromosome // *Am. J. Human Genet.* № 67. P. 1055–1061. [https://doi.org/10.1016/S0002-9297\(07\)62935-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9297(07)62935-8)
72. *Ballantyne K.N., Goedbloed M., Fang R. et al.* Mutability of Y-chromosomal microsatellites: rates, characteristics, molecular bases, and forensic implications // *Am. J. Human Genet.* 2010. V. 87. № 3. P. 341–353. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.08.006>
73. *Ross M.T., Grafham D.V., Coffey A.J. et al.* The DNA sequence of the human X chromosome // *Nature.* 2005. V. 434. № 7031. P. 325–337. <https://doi.org/10.1038/nature03440>
74. *Edelmann J., Lutz-Bonengel S., Naue J., Hering S.* X-chromosomal haplotype frequencies of four linkage groups using the Investigator Argus X-12 Kit // *Forensic Sci. Intern. Genet.* 2012. V. 6. № 1. P. 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.01.001>
75. *Prieto-Fernández E., Kleinbielen T., Baeta M., de Pancorbo M.M.* In-silico evaluation based on public data: In search of forensically efficient tri- and tetrallelic X-SNPs // *Forensic Sci. Intern. Genet.* 2018. V. 32. P. 5–6. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.11.008>
76. *Zarrabeitia M.T., Pinheiro F., de Pancorbo M.M. et al.* Analysis of 10 X-linked tetranucleotide markers in mixed and isolated populations // *Forensic Sci. Intern. Genet.* 2009. V. 3. № 2. P. 63–66. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2008.10.001>
77. *Zhang S., Bian Y., Li L. et al.* Population genetic study of 34 X-chromosome markers in 5 main ethnic groups of China // *Scientific Reports.* 2015. V. 5. P. 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep17711>
78. *Zarrabeitia M.T., Mijares V., Riancho J.A.* Forensic efficiency of microsatellites and single nucleotide polymorphisms on the X chromosome // *Intern. J. Legal Med.* 2007. V. 121. № 6. P. 433–437. <https://doi.org/10.1007/s00414-007-0169-3>
79. ALFRED: allele frequency database [Electronic resource]. Mode of access: <https://alfred.med.yale.edu/alfred/recordinfo.asp?UNID=SI664874J>. Date of access: 27.07.2019.
80. FROG-kb [Electronic resource]. Mode of access: <http://frog.med.yale.edu/FrogKB/>. Date of access: 03.11.2019.
81. *Auton A., Brooks L.D., Durbin R.M. et al.* A global reference for human genetic variation // *Nature.* 2015. V. 526. № 7571. P. 68–74. <https://doi.org/10.1038/nature15393>
82. International HapMap Project [Electronic resource]. Mode of access: <https://www.genome.gov/10001688/international-hapmap-project>. Date of access: 27.07.2019.
83. Stanford University [Electronic resource]. Mode of access: <https://www.hagsc.org/hgdp/>. Date of access: 07.08.2019.
84. The New York Cancer Project [Electronic resource]. Mode of access: https://www.einstein.yu.edu/centers/cancer/support/research/N_Y_Cancer_Project.htm. Date of access: 07.08.2019.
85. Population Architecture Using Genomics and Epidemiology (PAGE) Consortium NHGRI [Electronic resource]. Mode of access: <https://www.genome.gov/Funded-Programs-Projects/Population-Architecture-Using-Genomics-and-Epidemiology>. Date of access: 15.03.2020.
86. *Matise T.C., Ambite J.L., Buyske S. et al.* The next PAGE in understanding complex traits: design for the analysis of Population Architecture Using Genetics and Epidemiology (PAGE) study // *Am. J. Epidemiology.* 2011. V. 174. № 7. P. 849–859. <https://doi.org/10.1093/aje/kwr160>
87. *Martin A.R., Gignoux C.R., Walters R.K. et al.* Human demographic history impacts genetic risk prediction across diverse populations // *Am. J. Human Genet.* 2017. V. 100. № 4. P. 635–649. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.03.004>
88. *Carlson C.S., Matise T.C., North K.E. et al.* Generalization and dilution of association results from European GWAS in populations of non-European ancestry: the PAGE study // *PLoS Biology.* 2013. V. 11. № 9. P. 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001661>
89. *Khera A.V., Chaffin M., Aragam K.G. et al.* Genome-wide polygenic scores for common diseases identify individuals with risk equivalent to monogenic mutations // *Nature Genet.* 2018. V. 50. № 9. P. 1219–1224. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0183-z>
90. *Barreiro L.B., Ben-Ali M., Quach H. et al.* Evolutionary dynamics of human Toll-like receptors and their different contributions to host defense // *PLoS Genetics.* 2009. V. 5. № 7. P. 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000562>

91. *Prohaska A., Racimo F., Schork A.J. et al.* Human disease variation in the light of population genomics // *Cell*. 2019. V. 177. № 1. P. 115–131. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.052>
92. *Curtis D.* Polygenic risk score for schizophrenia is more strongly associated with ancestry than with schizophrenia // *Psychiatric Genet.* 2018. V. 28. № 5. P. 85–89. <https://doi.org/10.1097/YPG.0000000000000206>
93. *Moltke I., Grarup N., Jørgensen M.E. et al.* A common Greenlandic TBC1D4 variant confers muscle insulin resistance and type 2 diabetes // *Nature*. 2014. V. 512. № 7513. P. 190–193. <https://doi.org/10.1038/nature13425>
94. *Kirylyuk K., Li Y., Sanna-Cherchi S. et al.* Geographic differences in genetic susceptibility to IgA nephropathy: GWAS replication study and geospatial risk analysis // *PLoS Genet.* 2012. V. 8. № 6. P. 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002765>
95. *Yi X., Liang Y., Huerta-Sanchez E. et al.* Sequencing of 50 human exomes reveals adaptation to high altitude // *Science*. 2010. V. 329. № 5987. P. 75–78. <https://doi.org/10.1126/science.1190371>
96. *Rosenbaum S.* Insurance discrimination on the basis of health status: An overview of discrimination practices, federal law, and federal reform options // *J. Law, Medicine & Ethics*. 2009. V. 37. № 2. P. 101–120. <https://doi.org/10.1111/j.1748-720X.2009.00423.x>
97. *Perepechina I.O.* Legislative framework and value of the forensic DNA examination of health-related information for crime investigation // *Forensic Sci. Intern.: Genetics Suppl. Series*. 2013. V. 4. № 1. P. e360–e361. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2013.10.183>
98. *Bradbury C., Köttgen A., Staubach F.* Off-target phenotypes in forensic DNA phenotyping and biogeographic ancestry inference: A resource // *Forensic Sci. Intern. Genet.* 2019. V. 38. P. 93–104. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.10.010>

The Theoretical Framework for the Panels of DNA Markers Formation in the Forensic Determination of an Individual Ethnogeographic Origin

M. S. Parfenchyk^{a,*} and S. A. Kotava^b

^aThe Central Office of the State Forensic Examination Committee of the Republic of Belarus, Minsk, 220030 Republic of Belarus

^bScientific and Practical Center of the State Forensic Examination Committee of the Republic of Belarus, Minsk, 220114 Republic of Belarus

*e-mail: maria.parfenchyk@gmail.com

Knowledge of the ancestry of an unknown individual from forensic DNA may provide to law enforcement investigation with important information. This information can be acquired from biological traces by means of massively parallel sequencing (MPS) technologies and developed panels of ancestry informative DNA markers (AIM panels). Developing of forensic AIM panelstakes two steps: 1) getting information about DNA polymorphism of individuals from different populations; 2) selection of polymorphic DNA patterns (autosomal, Y-, X-chromosomal) and validation of selected markers. The necessity of keeping medical secrecy in the context of protection of human rights may limit the usage of ancestry informative markers suitable for forensic needs if they are also associated with genetic diseases and physical traits. The article deals with the analysis of published strategies for selecting markers capable to differentiate populations with the aim of creating a panel of ancestry informative markers and applying it in the forensic analysis in the Republic of Belarus.

Keywords: forensic genetic analysis, ancestry informative markers, massively parallel sequencing.

ОБЗОРНЫЕ
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 576.6:575.8+631.461.52

СИМБИОТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ
ДЛЯ РЕКОНСТРУКЦИИ ОРГАНЕЛЛОГЕНЕЗА

© 2021 г. Н. А. Проворов*

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии,
Санкт-Петербург, 196602 Россия

*e-mail: provorovnik@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.02.2020 г.

После доработки 26.03.2020 г.

Принята к публикации 09.06.2020 г.

Различные группы протеобактерий и цианобактерий, а также одноклеточных водорослей, образующих эндосимбиозы с растениями и животными, представлены в качестве моделей для реконструкции органеллогенеза (преобразования симбиотических микроорганизмов в клеточные органеллы) как наиболее яркого проявления симбиогенной эволюции, основанной на формировании партнерами объединенных систем наследственности. Органеллогенез включает следующие преобразования: факультативные ненаследуемые внутриклеточные симбионты → облигатные наследуемые эндоцитобионты → геном-содержащие органеллы → безгеномные органеллы. Эти преобразования сопровождаются утратой микроорганизмами генетической индивидуальности – способности к самостоятельному поддержанию и экспрессии геномов, вплоть до их полной элиминации. Сравнительный анализ различных групп симбиотических бактерий показал, что важным условием их трансформации в органеллы (первичного органеллогенеза) является высокая геномная пластичность, которая проявляется при факультативной и облигатной зависимости от хозяев. Для этих бактерий характерны направленные изменения геномной организации (переход от унитарного типа генома к многокомпонентному и редуцированному типам), а также способность симбиотически специализированных генов сохранять активность при переносе в неродственные организмы. Эти свойства характерны для α -протеобактерий и цианобактерий – предков митохондрий и пластид, но не выявлены у β - и γ -протеобактерий, *Bacteroidetes* и *Firmicutes*, для которых, несмотря на наличие многочисленных эндосимбиотических форм, преобразований в органеллы не зарегистрировано. Удобной моделью для изучения вторичного органеллогенеза, осуществляемого эукариотическими микроорганизмами, являются динофлагелляты *Symbiodinium* (*Alveolata*), которые: 1) содержат хлоропласты, возникшие из красных водорослей; 2) образуют с беспозвоночными животными внутриклеточные симбиозы, в которых выполняют функции пластид. Изучение органеллогенеза позволяет приступить к реконструкции ранних этапов становления жизни, включая анализ эволюционных соотношений метаболизма и наследственности, а также ДНК- и РНК-геномов.

Ключевые слова: органеллогенез, симбиогенез, митохондрии и пластиды, протеобактерии и цианобактерии, одноклеточные водоросли, горизонтальный и эндосимбиотический перенос генов, ДНК- и РНК-геномы.

DOI: 10.31857/S0016675821010112

Преобразование микроорганизмов в клеточные органеллы – магистральный путь биологической эволюции, который привел к становлению эукариот как принципиально нового, по сравнению с прокариотами, типа геномной организации [1]. Изучение этой эволюции восходит к трудам А.С. Фаминцына [2] и К.С. Мережковского [3], впервые обосновавших гипотезу о возникновении хлоропластов растений из фототрофных микроорганизмов. Возникшая на основе этой гипотезы теория серийных эндосимбиозов [4] позволяет: а) рассматривать эволюцию эукариотической клетки как многостадийный процесс вовле-

чения новых микросимбионтов в генетическую систему хозяина; б) изучать молекулярные механизмы симбиогенеза (в первую очередь, эндосимбиотический перенос генов [5]) и приступить к анализу его экологических факторов. Рассматривая органеллогенез как эволюционный путь, который связывает различные типы симбиотических бактерий с клеточными органеллами, мы можем выделить несколько этапов их эволюции (рис. 1):

1) вселение в археоты аэробных α -протеобактерий, давших начало митохондриям. При этом возникли первичные эукариоты, современные

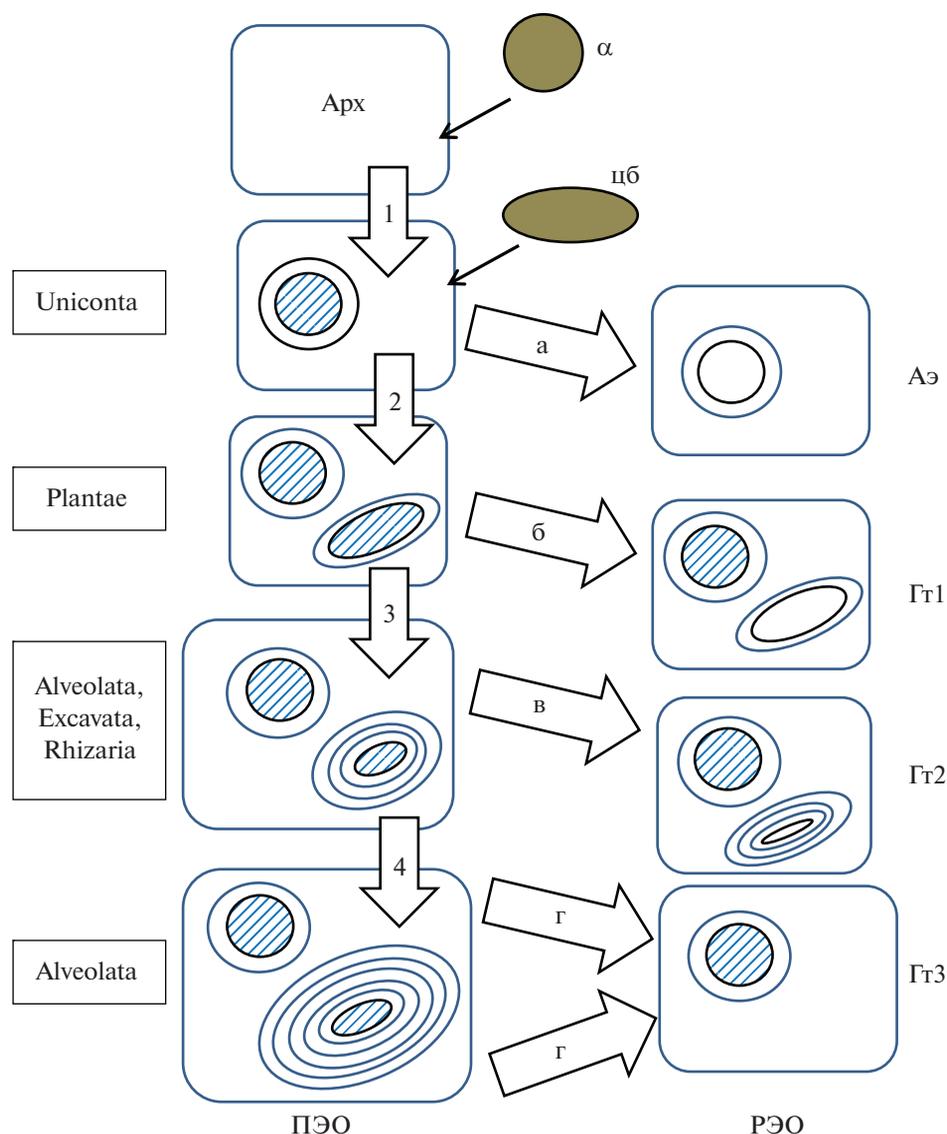


Рис. 1. Прогрессивная и редукционная эволюция органелл. Прогрессивная эволюция органелл (ПЭО) включает: 1) вселение в археоты (Арх) α -протеобактерий (α) с образованием митохондрий; 2) вселение в эукариоты (супергруппа Uniconta) цианобактерий (цб) с образованием первичных (двухмембранных) пластид (супергруппа Plantae); 3) образование вторичных (содержат более двух мембран) пластид путем вселения зеленых или красных водорослей в представителей супергрупп Alveolata, Excavata и Rhizaria; 4) образование третичных пластид путем вселения несущих вторичные пластиды альвеолят в гетеротрофные (лишенные пластид) альвеоляты. Редукционная эволюция органелл (РЭО) включает: а) утрату митохондриальных геномов с образованием анаэробных эукариот (Аэ), содержащих гидрогеносомы или митосомы; б) утрату геномов первичных пластид с образованием гетеротрофных (паразитических, микрогетеротрофных) представителей супергруппы Plantae (Гт1); в) утрату геномов вторичных пластид с образованием гетеротрофных (паразитических) представителей супергруппы Alveolata (Гт2); г) образование гетеротрофных альвеолят путем полной утраты пластид (Гт3). Серой заливкой обозначены бактерии с полноразмерными геномами, штриховкой – возникшие из них органеллы с рудиментарными геномами, белым цветом – безгеномные органеллы.

представители которых составляют супергруппу Uniconta, включающую животных и грибы;

2) вселение в первичные эукариоты цианобактерий, давших начало первичным (двухмембранным) пластидам, характерным для супергруппы Plantae (глаукофитовые, красные и зеленые водоросли, а также возникшие из них наземные растения);

3) вселение в эукариоты зеленых или красных водорослей, давших начало вторичным (содержащим более двух мембран) пластидам, выявленным в супергруппах Alveolata, Excavata и Rhizaria. Некоторые из возникших при этом форм (например, гаптофиты) сформировали внутриклеточные симбиозы с другими альвеолятами и дали начало третичным, а возможно и четвертичным пластидам.

Помимо указанных этапов прогрессивной эволюции эукариотической клетки, происходила и ее редуцирующая эволюция, включавшая переходы: а) аэробных форм к анаэробизму путем частичной или полной утраты геномов митохондриями, которые трансформировались в O_2 -чувствительные гидрогеносомы и митосомы; б) фототрофных форм к гетеротрофности путем глубокой редукации или полной утраты пластидных геномов, а иногда и самих пластид (рис. 1).

Приступая к реконструкции эволюционного пути, который связывает различные типы симбиотических микроорганизмов с органеллами эукариотических клеток, мы должны определить критерии для их разграничения. Ниже будет показано, что органеллы, в отличие от облигатных внутриклеточных симбионтов, утратили генетическую индивидуальность — способность к поддержанию и экспрессии геномов, а иногда и полностью лишены их. Однако даже безгеномные органеллы способны осуществлять сложные биохимические программы, используя генные продукты (белки, РНК), поступающие из цитозоля клетки-хозяина, а иногда и из других симбиогенно возникших органелл [5].

Широко обсуждаемые в литературе молекулярные механизмы органеллогенеза были изучены на примерах митохондрий и пластид, находящихся на завершающих этапах этого эволюционного пути [1, 5]. Более ранним его этапам, на которых бактерии еще сохраняли полноразмерные геномы, уделяется мало внимания. В то же время именно эти этапы, на которых произошел переход свободноживущих организмов к внутриклеточному симбиозу, могут быть достаточно полно реконструированы на примерах бактерий, характеризующихся факультативной либо облигатной зависимостью от эукариот-хозяев (табл. 1). Для этих бактерий характерна тесная интеграция с хозяевами: в системе симбиоза гены партнеров работают столь же согласованно, как гены свободноживущего (унитарного) организма. Функциональная интеграция микросимбионтов и хозяев, наблюдаемая в системах факультативного и облигатного взаимодействия, создает условия для их более глубокой, структурной интеграции, основанной на физическом объединении геномов органелл и клетки-хозяина.

α -ПРОТЕОБАКТЕРИИ

Эта эволюционно молодая и генетически пластичная группа бактерий — один из наиболее активных участников органеллогенеза, давший начало АТФ-продуцирующим митохондриям. Согласно данным сравнительной геномики они возникли на основе нескольких групп аэробных α -протеобактерий: основная часть митохондриального генома была сформирована представителями порядков Rhizo-

biales и Rickettsiales, а также факультативными аэробами, близкими к *Rhodobacter* [1, 6]. В связи с этим удобной моделью для реконструкции начальных этапов органеллогенеза могут считаться клубеньковые бактерии (ризобии), способные к автономному существованию и имеющие полноразмерные геномы, а при взаимодействии с бобовыми растениями образующие симбиосомы — внутриклеточные компартменты, которые рассматривают как временные N_2 -фиксирующие органеллы растительной клетки — аммонийопласты [7]. Подобно органеллам симбиосомы содержат глубоко дифференцированные формы бактерий — бактериоиды, окруженные эукариотическими мембранами. Они функционируют в тесной кооперации с пластидами и митохондриями, образуя с ними объединенные пути азотно-углеродного обмена. Для бактериоидов быстрорастущих ризобий сем. Rhizobiaceae характерна необратимая утрата репродуктивной активности, основанная на функциональной репрессии большей части генома. Она сопровождается резким уменьшением пространства между про- и эукариотическими мембранами, что характерно для органелл [5].

Выделяют два этапа эволюции ризобий, на которых: а) первичные медленно растущие формы (*Bradyrhizobium*) образовались из свободноживущих фототрофных N_2 -фиксаторов, близких к *Rhodopseudomonas*; б) вторичные быстрорастущие формы (например, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Neorhizobium* из сем. Rhizobiaceae) возникли путем переноса *sym*-генов, возникших у первичных ризобий, в почвенные и ассоциированные с растениями бактерии [8].

Наиболее эффективными реципиентами *sym*-генов являются агробактерии, вызывающие у двудольных растений онкотрансформацию путем передачи в их хромосомы Т-ДНК, входящей в состав *Ti(Ri)*-плазмид. Эти плазмиды имеют с *Sym*-плазмидами ризобий обширные области гомологии, которые, однако, не содержат *sym*-генов [9]. По-видимому, генные системы образования N_2 -фиксирующих клубеньков и онкотрансформации возникли у этих бактерий независимо, а затем эволюционировали на общем генетическом фоне, что обеспечило широкое распространение симбиотической системы в сем. Rhizobiaceae.

Для первичных ризобий характерно возрастание геномов (от 5–6 млн пн у *Rhodopseudomonas* до 7–10 млн пн у *Bradyrhizobium*), связанное с увеличением их аксессуарных частей, что вызвало резкое расширение пангеномов [10]. У вторичных ризобий сем. Rhizobiaceae выявлены многокомпонентные геномы, которые в дополнение к хромосомам содержат крупные репликоны (мегаплазмиды, хромиды), несущие кластеры *sym*-генов. Адаптивная значимость такой реорганизации, по-видимому, определяется повышенной мобильностью *sym*-ге-

Таблица 1. Симбиотические бактерии – модели для реконструкции органеллогенеза [5]

Зависимость от хозяев	Генетически изученные представители	Таксономическое положение	Хозяева	Локализация в хозяевах	Функции	Геномы
Факультативная	Клубеньковые бактерии (ризобии)	α -Протеобактерии (Rhizobiales)	Бобовые растения	Внутри- или внеклеточная	N_2 -фиксация	Увеличенные (до 10 100 тпн), многокомпонентные*
	<i>Nostoc puliciforme</i>	Многоклеточные цианобактерии (Nostocales)	Растения и грибы	Внутри- или межклеточная	N_2 -фиксация	Увеличенные (более 9000 тпн)**
Облигатная	Репродуктивные паразиты беспозвоночных (<i>Wolbachia</i>)	α -Протеобактерии (Rickettsiales)	Членистоногие и нематоды	Внутриклеточная	Регуляция соотношения полов	Редуцированные (700–1400 тпн)
	Паразиты животных (<i>Rickettsia</i>)	α -Протеобактерии (Rickettsiales)	Животные	Внутриклеточная	Инфекционные заболевания	Редуцированные (1100–1600 тпн)
	Хроматофоры	Одноклеточные цианобактерии (Synecococcales)	<i>Paulinella chromatophora</i> (Rhizaria)	Внутриклеточная	Фотосинтез	Редуцированные (1000 тпн)
	<i>Nostoc azollae</i>	Многоклеточные цианобактерии (Nostocales)	Водный папоротник <i>Azolla</i>	Внеклеточная	N_2 -фиксация	Редуцированные (5500 тпн)**

* У “первичных” ризобий (*Bradyrhizobium*) размеры геномов составляют 7000–10100 тпн, у их вероятных предков (*Rhodospirillum rubrum*) – 5000–5500 тпн. Многокомпонентные геномы, содержащие метаплазмиды и хромиды, характерны для “вторичных” ризобий (Rhizobiales). ** У свободноживущих форм *Nostoc* размер генома составляет 7000–7300 тпн.

нов в популяциях ризобий, которая обеспечивает их изменчивость, необходимую для ко-адаптации с высокополиморфными популяциями растений. Важно отметить, что клубеньковые бактерии – это полифилетичная группа, которая включает в себя не только ряд независимо возникших групп α -протеобактерий (пор. Rhizobiales), но и некоторые β -протеобактерии [5], указывая на способность *сум*-генов к экспрессии в различном генетическом окружении.

В основе эволюции ризобий лежат геномные перестройки, определившие: а) переформатирование системы N_2 -фиксации, которое позволило ей функционировать в эндосимбиотических нишах; б) утрату фотосинтеза, функционально замещаемого образованием хитин-подобных Nod-факторов – индукторов образования клубеньков, заселение которых позволяет бактериям активно использовать продукты растительного фотосинтеза [8]. Эволюция Nod-факторов включала приобретение ризобиями генов синтеза хитин-подобных веществ от неродственных организмов – микоризных грибов, либо от синтезирующих муреин грамположительных бактерий [11].

Не менее сложные геномы характерны для ризосферных и эндофитных N_2 -фиксаторов рода *Azospirillum*, содержащих несколько хромид, которые, как и хромосомы, несут гены 16S рРНК и тРНК. Однако у этих бактерий связь между формированием многокомпонентного генома и симбиозом не столь очевидна, как у ризобий: на хромиде азоспирилл не выявлено генов, вовлеченных во взаимодействия с растениями, хотя для некоторых из этих генов показана хромосомная локализация [12, 13].

Передача генов из α -протеобактерий в ядерные хромосомы хозяев выявлена лишь у некоторых паразитов (антагонистических симбионтов) эукариот. Среди них наиболее изучены агробактерии – близкие родичи ризобий из сем. Rhizobiaceae. Т-ДНК, передаваемая агробактериями в растительные клетки через системы секреции 4-го типа (СС4Т), содержит гены образования опухолей и синтеза опинов – особых метаболитов, потребляемых “генетическими паразитами”. Хотя Т-ДНК передается в вегетативные клетки широкого спектра покрытосеменных, данные о закреплении бактериальных генов в растительных геномах имеются лишь для некоторых видов двудольных, например для льнянок, в связи с чем функции приобретенных растениями трансгенов остаются неясными [14].

Весьма интенсивный, хотя и не столь упорядоченный перенос генов в эукариотические клетки осуществляют бактерии рода *Wolbachia* – репродуктивные паразиты насекомых и нематод, которые, как и агробактерии, имеют СС4Т [15]. Зарегистрирован перенос в хромосомы насекомых

крупных сегментов генома вольбахий, а иногда и целых хромосом, которые могут составлять до 2% генома хозяина [16]. Однако адаптивные эффекты этого переноса неясны, поскольку большинство перемещенных генов выявляются у хозяев в неактивной форме.

Хотя для бактерий порядка Rickettsiales эволюция изучена не столь подробно, как для Rhizobiales, для них могут быть выделены общие эволюционные закономерности. Так, способность к внутриклеточному симбиозу с эукариотами, как и высокая геномная пластичность, связанная с наличием особых палиндромных последовательностей, возникла у предков риккетсий задолго до редукции их геномов. У жестких патогенов из группы тифа (*Rickettsia prowazekii*, *R. typhi*) выявлена утрата генов репарации ДНК, указывая на начавшуюся редукцию матричных процессов, характерную для органелл. И наконец, риккетсии, так же как вольбахии и агробактерии, имеют СС4Т, хотя их участие в переносе бактериальных генов в клетки эукариот пока не доказано [17].

ЦИАНОБАКТЕРИИ

Цианобактерии, давшие начало первичным пластидам супергруппы Plantae, проявляют генетическое родство с представителями порядка Nostocales [18], которые, таким образом, могут быть использованы для реконструкции ранних этапов органеллогенеза. Род *Nostoc* включает симбиотически активные цианобактерии, способные формировать внутриклеточные симбиозы с цветковыми растениями (*Gunnera*) и грибами-гломеромицетами (*Geosiphon*). Эти цианобиоты служат для хозяев источниками соединений азота, получаемых в ходе нитрогеназной реакции, а при симбиозе с грибами – также и соединений углерода, образуемых в ходе фотосинтеза. Объединенная метаболическая система, которую формируют цианобактерии и растения, сходна с системой обмена С- и N-соединениями N_2 -фиксирующих гетероцист и фотосинтезирующих вегетативных клеток в филаментах *Nostoc* [19].

У факультативного симбионта растений *N. punctiforme* геном увеличен по сравнению со свободноживущими формами *Nostoc* на 25–30%. У облигатного симбионта *N. azollae* геном уменьшен на 20–25%, причем по некоторым показателям (количество некодирующих последовательностей и генов тРНК) он приближается к геному пластид [20], подтверждая правомерность использования *Nostoc* как модели для реконструкции органеллогенеза.

Другая модель, перспективная для реконструкции органеллогенеза, представлена одноклеточными цианобактериями *Synechococcus*, из которых возникли хроматофоры простейшего *Paulinella chromatophora* (супергруппа Rhizaria). Для этих

эндосимбионтов характерна более глубокая, чем для *N. azollae*, редукция: хроматофоры утратили свыше 70% генома свободноживущих предков [21]. При этом свыше 20 генов фотосистемы I перенесены из хроматофоров в ядро хозяина, указывая на начавшийся процесс объединения геномов партнеров. По всей видимости, хроматофоры *Paulinella* возникли из цианобактерий, поедаемых простейшими: близкий к *P. chromatophora* вид *P. ovata*, не имеющий хроматофоров и использующий цианобактерии в пищу, содержит гомологи ряда генов *Synechococcus*. Важность развития этой модели определяется родством *Synechococcus* и одноклеточной цианобактерии *Gloeomargarita*, которая, согласно данным протеомного анализа, близка к первичным пластидам [22].

γ-ПРОТЕОБАКТЕРИИ

Эта генетически изученная группа бактерий включает ряд факультативных и облигатных паразитов и мутуалистов животных и растений, которые эволюционно связаны со свободноживущими формами, обитающими в водных и почвенных экосистемах [23]. Для симбиотических форм характерен двухэтапный сценарий эволюции генома, позднее подтвержденный и для других бактерий. На первом этапе происходит существенное (на 20–25%) расширение геномов, обусловленное приобретением симбиотически специализированных генных кластеров. На втором этапе наблюдается возвращение геномов к исходным размерам, определяемое элиминацией негативных регуляторов симбиоза [24]. Например, патогенные формы *Escherichia coli*, превосходя комменсальные формы по размеру генома [25], сохраняют его унитарную структуру. Более специализированные патогены – шигеллы, иногда рассматриваемые как подвид *E. coli*, не отличаются от нее по размеру генома и по числу плазмид. У еще более специализированных патогенов – сальмонелл, способных к стабильному поддержанию в клетках кишечного эпителия и макрофагах, при сравнении с *E. coli* выявлено упрощение генома, связанное с уменьшением числа плазмид [26].

Сходная эволюционная динамика характерна для фитопатогенов рода *Erwinia*, которые по геномной организации не отличаются от эпифитов. У эволюционно молодого патогена *E. tracheiphila* повышено содержание мобильных элементов, фагов и псевдогенов, что свидетельствует о возвращении генетической пластичности бактерий при переходе к паразитизму. У “старого” патогена *E. amylovora*, а также у эпифита *E. billingiae* число этих элементов невелико, указывая на стабилизацию генома [27].

Более сложная организация генома характерна для бактерий сем. *Vibrionaceae*, которые содержат две хромосомы. У жесткого паразита *Vibrio cholerae*

они имеют размер 3.0 и 1.1 Mb [28], у светящегося симбионта морских животных *V. fischeri* 2.9 и 1.3 Mb [29], тогда как сапрофитный вид *V. natriegens* имеет хромосомы размером 3.2 и 1.9 Mb [30]. Таким образом, у *Vibrio* структура генома не связана с симбиотическими свойствами и может рассматриваться как общая характеристика этих бактерий.

Облигатно-симбиотические внутриклеточные формы γ-протеобактерий широко распространены у насекомых. Наиболее изученной является *Buchnera* – симбионт тлей, снабжающий хозяев незаменимыми аминокислотами. Для него характерна глубокая геномная редукция (сохраняется 10–15% генов свободноживущих предков), которая определяет неспособность к автономному существованию бактерий, передаваемых вертикально (трансовариально) при размножении хозяев [31].

Важно отметить, что преобразование свободноживущих γ-протеобактерий в генетически редуцированные облигатные симбионты резко изменяет соотношение различных групп “операционных” (кодирующих метаболизм и развитие клетки) генов. Например, у *Baumannia*, *Blochmannia*, *Buchnera*, *Ishikawaella* и *Wigglesworthia* повышена, по сравнению с *E. coli*, доля генов, которые контролируют синтез аминокислот и витаминов, поставляемых хозяевам. Однако при этом снижена доля генов, кодирующих регуляцию, транспорт и подвижность: эти функции упрощены или отсутствуют у бактерий, постоянно обитающих в строго контролируемой внутриклеточной среде [32]. Не менее выражено различие по стабильности для разных групп “информационных” генов, кодирующих матричные процессы: у облигатных симбионтов число генов рекомбинации, репарации и транскрипции снижено, а число генов трансляции повышено по сравнению со свободноживущими формами [33].

Важно отметить, что некоторые γ-протеобактерии – эндоцитобионты насекомых – по организации генома вплотную приблизились к органеллам. Так, в геноме *Carsonella* – симбионта псиллид, имеющем размер 160 тпн, отсутствует ряд генов репликации, транскрипции и трансляции [34]. Однако органеллы, возникшие из γ-протеобактерий, не описаны, что может быть связано с недостаточной пластичностью их геномов либо с низкой активностью переноса генов в хромосомы хозяев.

β-ПРОТЕОБАКТЕРИИ

Протеобактерии β-группы реализуют разнообразные жизненные стратегии: они могут быть паразитами либо мутуалистами животных или растений, в том числе симбиотическими N₂-фиксаторами, образующими клубеньки у тропических бобовых. Отсутствие связи между размером

генома и способностью к симбиозу показано для рода *Burkholderia*, в который наряду со свободноживущими формами входят паразиты животных и растений, а также для рода *Paraburkholderia*, включающего N_2 -фиксирующие симбионты бобовых [35, 36].

Для *Burkholderia* характерны многокомпонентные геномы, содержащие 2–3 хромосомы (1000–4000 тпн) и до трех плазмид. Патогенные для человека виды *B. mallei* и *B. pseudomallei* различаются по размеру генома (5400–5950 и 7000–7450 тпн соответственно) и обычно лишены плазмид. Наиболее крупные геномы (свыше 9000 тпн) выявлены у свободноживущих видов *B. fungorum* и *B. xenovorans*. Максимальное число плазмид (3) зарегистрировано у фитопатогена *B. gladioli*, у которого общий размер генома составил 8899 тпн, хотя известны и бесплазмидные патогены с более компактными геномами [37]. Таким образом, у буркхольдерий, как и у γ -протеобактерий, приобретение симбиотических свойств не сказывается на организации генома. Однако с симбиозом тесно связан его состав: патогенные формы имеют системы секреции 3-го типа, а также протеолитические и антифунгальные активности, которые не выявляют у свободноживущих штаммов [38].

Более простая, унитарная структура генома выявлена у эндофитной N_2 -фиксирующей β -протеобактерии *Azoarcus*, которая имеет узкий круг хозяев, включая некоторые злаковые растения (*Leptochloa fusca*, *Oryza sativa*) [39]. Геном этой бактерии имеет небольшой размер (4300–4400 тпн, 3900–4000 генов) и не содержит плазмид. В нем не выявляются системы секреции 3-го и 4-го типов, а также синтеза фитотоксинов и лактонов гомосерина, участвующих в регуляции генов вирулентности различных бактерий [40]. Проникновение *Azoarcus* в растения вызывает у них ограниченный иммунный ответ, который снижает скорость размножения бактерий и, что особенно важно, вызывает их переход в некультивируемое состояние, сопряженный с индукцией высокой нитрогеназной активности [41]. *Azoarcus*, в отличие от ризобий и азоспирилл, имеет ген *nifL*, который подавляет экспрессию оперона *nifHDK* аммонием или кислородом у свободноживущих diaзотрофов [42].

Мутуалистические симбионты животных среды β -протеобактерий немногочисленны, однако они могут обладать весьма глубокой специализацией к хозяевам. Например, *Nasuia deltocephalini-cola* – симбионт цикады *Macrostelus quadrilineatus*, снабжающий хозяина незаменимыми аминокислотами, имеет наименьший среди эндоситобионтов насекомых геном – всего 112 тпн [43].

ОДНОКЛЕТОЧНЫЕ ВОДОРОСЛИ

Выше мы рассмотрели модели для реконструкции первичного органеллогенеза, который включает вселение α -протеобактерий в археи, а также цианобактерий в эукариоты с образованием двухмембранных органелл. Значительно менее разработаны модели вторичного органеллогенеза, связанного с вселением в эукариотические клетки эукариотических же симбионтов. Хотя вторичный органеллогенез документирован только для пластид, выявление облигатных внутриклеточных паразитов-эукариот, содержащих митосомы – производные митохондрий [44], предполагает возможность возникновения вторичных форм и для этих органелл.

Удобную модель для реконструкции вторичного органеллогенеза представляют динофлагелляты – одноклеточные эукариоты из супергруппы Alveolata, которые обитают в морской или пресной воде [45]. Около 50% динофлагеллят являются автотрофными, остальные – миксотрофными или гетеротрофными, в том числе и паразитическими формами [46]. Для гетеротрофных динофлагеллят характерны пластиды с редуцированными геномами, а иногда и полностью лишённые геномов, но сохранившие способность к имплементации сложных биохимических процессов, включая синтез изопреноидов, тетрапироллов и Fe-S-кластеров.

Наиболее изучен среди динофлагеллят род *Symbiodinium*, многие его представители являются фотосинтезирующими симбионтами беспозвоночных – губок, кишечнополостных, моллюсков, червей и фораминифер. Этот род разделяют на 8–9 клад, в которых выявляются как свободноживущие, так и симбиотические формы [47]. Последние обладают слабо выраженной специфичностью к хозяевам: симбионты фораминифер встречаются в пяти из восьми основных клад *Symbiodinium* [48].

Одно из доказательств специализации *Symbiodinium* к симбиозу было получено при изучении синтеза микоспорин-подобных аминокислот (МПА), защищающих светособирающий комплекс от УФ-лучей. Гены синтеза МПА были, по-видимому, получены *Symbiodinium* от красных водорослей – предков вторичных пластид. Эти гены выявлены у представителей базальной клады А, но отсутствуют в специализированной клade С. Возможно, что утрата синтеза МПА была связана с переходом *Symbiodinium* к симбиозу, при котором функцию защиты фотосинтетического аппарата от УФ выполняет хозяин [49].

Наиболее изучены симбиозы *Symbiodinium* с кишечнополостными – коралловыми полипами, имеющими огромное экологическое значение [48]. Коралловые рифы, занимающие менее 1% площади мирового океана, предоставляют ниши для более чем 30% морских организмов и являются одним из основных резервуаров биоразнообразия

на Земле. Поэтому деградация коралловых рифов, связанная с утратой фотобионтов (обесцвечением кораллов), несет огромную угрозу сохранению биосферы [50]. Стабильное поддержание *Symbiodinium* в животных свидетельствует об установлении в организме-хозяине генетического гомеостаза, регулируемого на клеточном и организменном уровне [49]. Однако вертикального наследования фотобионтов при половом размножении хозяев не наблюдается, в связи с чем симбиотические штаммы *Symbiodinium* сохраняют способность к автономному существованию, осуществляя как автотрофное, так и гетеротрофное, основанное на фагоцитозе питание [50].

Общий размер прокариотического пластома *Symbiodinium* составляет 25–50 тпн [45]. Для него характерна сильная фрагментация, которая может рассматриваться как предпосылка для полной утраты генома [46]. Большинство сохранившихся в пластомах генов расположены по одному в составе мини-плазмид, размеры которых составляют 1.8–3.3 (до 6.1) тпн. Иногда на одной мини-плазмиде находится несколько (до 4) генов [44]. Всего на мини-плазмидах выявляют 12–17 генов, кодирующих рРНК и белки фотосистемы I [46]. У некоторых штаммов *Symbiodinium* выявлены “пустые” мини-плазмиды, которые не содержат кодирующих последовательностей [45]. Несмотря на глубокую редукцию генома, пластиды *Symbiodinium* осуществляют фотосинтез и трансляцию, используя генные продукты (белки, РНК), синтезируемые в цитозоле клетки-хозяина и поступающие в пластиды через аппарат Гольджи, а не через мембранные транспортеры Тис/Тос, функционирующие в первичных пластидах.

Цитологический и геномный анализ динофлагеллят показал, что вторичный органеллогенез сопровождается гораздо более сложными генетическими процессами, чем первичный органеллогенез, так как вторичные пластиды имеют многокомпонентные геномы, состоящие из рудиментарного ядра красной водоросли (нуклеоморфа) и прокариотического пластома. Обе части генома подвергаются редукционной эволюции, причем наименьшей стабильностью характеризуется нуклеоморф: у большинства динофлагеллят он отсутствует, хотя его генетические маркеры часто выявляются в хромосомах хозяина [49]. У *S. minutum* свыше 90% генов фотосинтеза перенесены из прокариотических геномов в ядерные хромосомы, которые постоянно находятся в конденсированной форме [45]. Транскрипты пластидных генов фотосинтеза подвергаются интенсивному редактированию, не характерному для генов, перенесенных в геном хозяина [46].

Сравнительный анализ различных групп динофлагеллят показал, что в их эволюции происходили неоднократные утраты исходной, возник-

шей из красных водорослей пластиды, в которой синтезируются хлорофиллы *a* и *c*, а также особый каротиноид – перидинин. У ряда динофлагеллят произошла ее замена на третичные пластиды, возникшие из других альвеолят (гаптофитов, диатомовых водорослей) либо из зеленых водорослей [51]. Во втором случае пластиды синтезируют хлорофиллы *a* и *b*, сохраняя многие клеточные компоненты зеленых водорослей – рудиментарное ядро (нуклеоморф), 80S рибосомы и вакуоли. Общей чертой вновь приобретенных третичных пластид является наличие маркеров исходной перидинин-синтезирующей пластиды. Это может быть связано с тем, что процесс замены пластид включал стадию сосуществования вторичной и третичной органелл, между которыми происходил интенсивный перенос генов [22]. По-видимому, он явился основой чрезвычайно широкой генетической и экологической диверсификации динофлагеллят, выделяющей их среди других одноклеточных эукариот.

Другая перспективная модель вторичного органеллогенеза представлена системой “*Chlorella–Paramecium*” [52]. Образующая ее инфузория-хозяин относится к альвеолятам и является гетеротрофом, который утратил имевшиеся ранее вторичные пластиды и поэтому преадаптирован к приобретению новых пластид. Клетки хлореллы поступают в простейшее через ротовое отверстие и переходят в пищеварительные вакуоли, часть из которых преобразуется в симбиосомы, располагающиеся вблизи поверхности клетки-хозяина и осуществляющие фотосинтез. Эта модель иллюстрирует преобразование трофической цепи в симбиоз, приводящее к формированию генетически интегрированной биосистемы на основе отношений “хищник–жертва”.

В качестве модели для изучения эволюции вторичных пластид можно рассматривать также “клептопласты” моллюска *Elysia*, извлекаемые им из пищевого объекта – желто-зеленой водоросли *Vaucheria*. Эта водоросль, входящая в супергруппу Alveolata (Heterokonta), содержит пластиды, возникшие из одноклеточных красных водорослей [53], в связи с чем приобретение клептопластов, длительно поддерживаемых в эпителиальных клетках животного, может рассматриваться как проявление вторичного органеллогенеза.

ВОЗМОЖЕН ЛИ ОРГАНЕЛЛОГЕНЕЗ БЕЗ СИМБИОГЕНЕЗА?

Несмотря на огромный массив данных, указывающих на симбиогенную природу ДНК-содержащих органелл эукариотической клетки, экспериментальные данные для анализа генетических процессов, сопровождающие их возникновение, очень немногочисленны. В частности, эндосимбиозы бактерий и археот, на основе которых мог-

ли возникнуть первичные эукариоты, пока не идентифицированы, хотя в ряде работ описаны археотные “кандидаты” в предки эукариот. Одними из них являются локиархеоты — анаэробные организмы из донных осадков Арктики, имеющие актиновый цитоскелет и способные к эндоцитозу, который мог обеспечить приобретение аэробных α -протеобактерий — предшественников митохондрий [54].

Большой интерес представляет вопрос о том, возможно ли у прокариот не связанное с симбиозом обособление геном-содержащих клеточных компартментов? До сих пор не может считаться полностью опровергнутой гипотеза аутогенеза, которая предполагает возникновение органелл на основе структурной дифференциации и функциональной специализации мембранных компартментов анцестральной клетки. Выдвинутая в конце XIX в. в применении к пластидам эта гипотеза была отклонена К.С. Мережковским на основании генетической непрерывности данных органелл [55]. Однако в 1970-х гг. гипотеза аутогенеза была возрождена Т. Кавалер-Смитом [56], полагавшим, что в основе эволюции эукариот лежало происходившее у прокариот обособление клеточных компартментов вместе с кодирующими их функции участками генома. Сторонники аутогенеза проводили параллели между органеллогенезом и возникновением новых органов — процессами, основанными на обособлении функционально специализированных структур у предковых форм.

О возможности аутогенной эволюции клеточных органелл у прокариот свидетельствуют результаты изучения грамотрицательной бактерии *Gemmata obscuriglobus* (Planctomycetes). Эта бактерия имеет крупный геном (около 9000 тпн, свыше 8000 генов), кодирующий синтез стеролов и способность к эндоцитозу, характерные для эукариот [57]. В клетках *G. obscuriglobus* выявлен ДНК-содержащий компартмент, который может рассматриваться как аналог ядра. Их сходство выявляется, в частности, при анализе мембранных белков, образующих поровые комплексы. Возможно, что гены про- и эукариот, кодирующие эти комплексы, имеют общее происхождение, связанное с дивергенцией от общих предков либо с горизонтальным переносом генов (ГПГ) [58].

По мнению ряда авторов, первичные эукариоты возникли путем вселения α -протеобактерий в клеточные организмы, обладавшие ядрами, которые могли иметь либо аутогенное, либо симбиогенное происхождение, в том числе и возникать на основе гигантских вирусов [59]. Другие авторы полагают, что предшественниками ядер были археотные клетки, вселившиеся в δ -протеобактерии либо в планкомицеты [60]. В связи с этим большой интерес представляют внутриклеточные симбиозы, в которых хозяевами являются бакте-

рии. К их числу относится симбиоз β -протеобактерии *Tremblaya princeps*, которая выявлена в бактериоцитах червеца *Planococcus citri*, с γ -протеобактерией *Moranella endobia*, обитающей в клетках *T. princeps*. Стимулом для образования данной “матрешки” могла стать избыточная редукция генома *T. princeps* (139 тпн), вызванная ослаблением отбора в популяциях эндоцитобионтов (в связи с постоянством среды их обитания) и компенсируемая менее редуцированным симбионтом *M. endobia*, геном которого превышает 500 тпн [61]. Показано, что у *T. princeps* отсутствуют многие факторы трансляции, включая аминоксил-тРНК-синтазы и фактор элонгации EF-Ts, которые поступают от *M. endobia*.

Одним из нерешенных вопросов теории симбиогенеза остается последовательность возникновения ядра и митохондрий. Согласно “градуалистическому” сценарию митохондрии возникли путем вселения α -протеобактерий в первичные эукариоты, образовавшиеся путем обособления у архей геном-содержащего ядра и других мембранных структур — эндоплазматического ретикулома, аппарата Гольджи, пероксисом [1]. В качестве ближайших родичей первичных эукариот было предложено рассматривать архезоев — внутриклеточных паразитов животных (метамонады, трихомонады, энтамебы), которые лишены митохондрий и обладают упрощенной, по сравнению со свободноживущими эукариотами, клеточной структурой [44]. Однако в настоящее время представление об архезоях как о переходных формах между про- и эукариотами оставлено, поскольку: а) у архезоев выявлены митосомы — безгеномные производные митохондрий; б) филогенетический анализ показал, что архезои — это специализированная группа эукариот, а не сестринская по отношению к ним группа [62].

В связи с этим более обоснованным представляется “симбиотический” сценарий формирования внутриклеточных компартментов, согласно которому предки митохондрий, вселившиеся в археи, послужили генераторами возникновения ядра и других внутриклеточных структур, сформировавшихся из продуцируемых митохондриями мембранных везикул. В пользу этого сценария свидетельствует то, что синтез липидов, локализованный у прокариот в плазматических мембранах, у эукариот происходит в мембранах эндоплазматического ретикулома (ЭПР) и аппарата Гольджи [1].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Реконструкция симбиогенной эволюции эукариот — чрезвычайно актуальное и увлекательное направление современной биологии, связанное с выяснением путей становления структурно-функционального и генетического разнообразия клеточных организмов. Способность к стабильному существо-

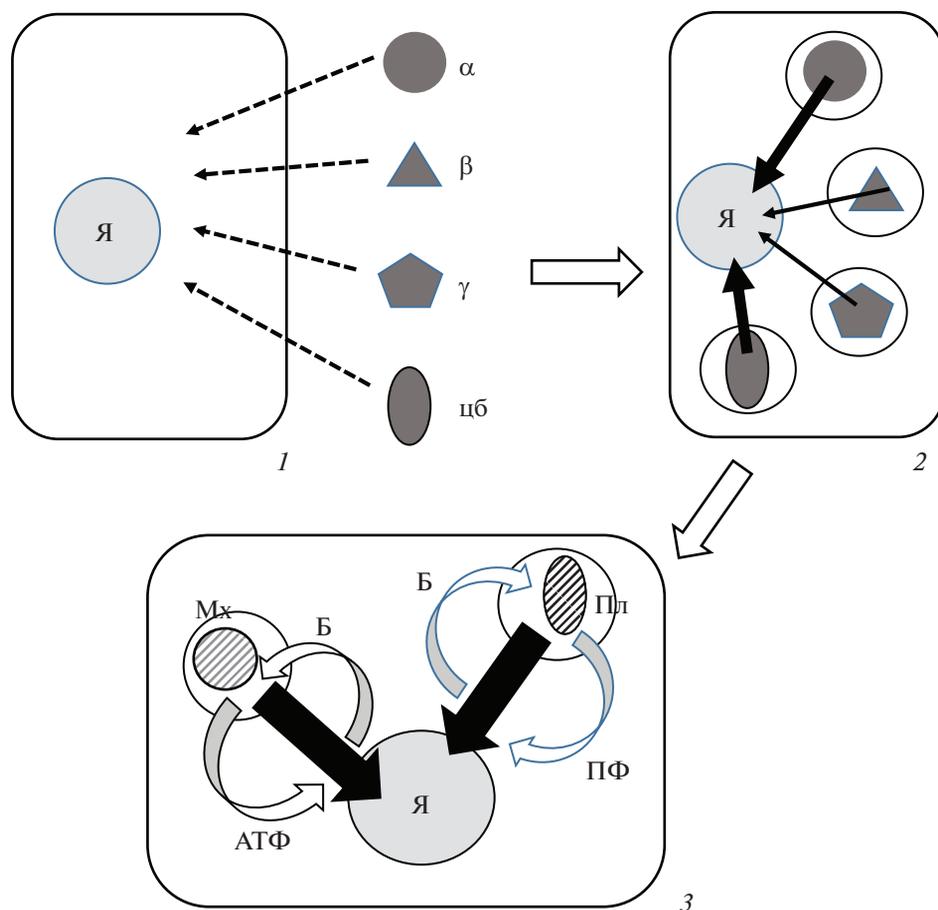


Рис. 2. Основные этапы органеллогенеза. 1 – приобретение представителями археот, которые согласно “градуалистическому” сценарию органеллогенеза [1] имели ядра (Я), эндосимбионтов, относящихся к различным группам протеобактерий (α , β , γ) или к цианобактериям (цб); 2 – горизонтальный перенос генов (его интенсивность обозначает толщина стрелок) из симбионтов в Я клетки-хозяина (наиболее эффективные доноры генов – α -протеобактерии и цианобактерии – дали начало митохондриям и пластидам); 3 – эндосимбиотический перенос (обозначен черными стрелками) из митохондрий (Мх) и пластид (Пл) в Я генов, которые кодируют белки (Б), синтезируемые в цитозоле клетки-хозяина и транспортируемые в органеллы. Мх служат для хозяев донорами АТФ, Пл – донорами продуктов фотосинтеза (ПФ).

ванию в клетках эукариот, которая может рассматриваться как начальный этап формирования органелл, выявлена во многих группах протеобактерий (α , β , γ) и цианобактерий (гетероцистные, негетероцистные), а также у одноклеточных водорослей. У клубеньковых бактерий (ризобий), которые относятся к α -протеобактериям, переход к внутриклеточному симбиозу сопровождался усложнением генома и повышением его пластичности, включая перенос *sym*-генов в неродственные бактерии [8]. Он привел к возникновению способности формировать на корнях бобовых N_2 -фиксирующие клубеньки более чем в 10 семействах α -протеобактерий, объединяемых в отряд Rhizobiales, а также у некоторых β -протеобактерий. В то же время у γ -протеобактерий (например, у сальмонелл) внутриклеточный симбиоз не связан с усложнением геномной организа-

ции, и горизонтальный перенос генов вирулентности ограничен сем. Enterobacteriaceae [22, 25].

Таким образом, высокая геномная пластичность, проявляемая на ранних стадиях коэволюции бактерий с хозяевами, должна рассматриваться как важнейшая предпосылка для перехода симбионтов на путь органеллогенеза, послужившего основой программы серийных эндосимбиозов [4]. Для некоторых α -протеобактерий (*Agrobacterium*, *Wolbachia*) и цианобактерий (*Synechococcus*) показан горизонтальный перенос генов в хозяев, который можно рассматривать как начальный этап геномной интеграции партнеров, его завершение связано с эндосимбиотическим переносом генов из органелл в ядерные хромосомы (рис. 2).

Важно отметить, что преобразование бактерий в клеточные органеллы представляет собой результат утраты эндосимбионтами генетической

индивидуальности – способности к самостоятельному поддержанию и экспрессии геномов [5]. Эта утрата явилась предпосылкой для образования симбионтами и их хозяевами объединенных систем наследственности, она привела к резкому расширению адаптивного потенциала партнеров. Наиболее широкий круг генетических процессов реализуется при вторичном органеллогенезе, моделью которого являются одноклеточные фототрофные эукариоты, в первую очередь жгутиконосцы *Symbiodinium*. В число этих процессов входит глубокая редукция, а иногда и полная утрата эндосимбионтами эукариотических ядер (нуклеоморфов), сопровождаемая переносом их генов в хромосомы хозяев [22, 45].

Сравнительный анализ факультативных и облигатных симбионтов эукариот открыл широкие возможности для реконструкции ранних этапов органеллогенеза, связанных с переходом микроорганизмов к существованию во внутриклеточных нишах (табл. 1). Однако используемые для этого модели ограничены лишь некоторыми бактериями и водорослями, поселяющимися в клетках эукариот. Пока еще мало доступны для изучения внутриклеточные симбиозы, в которых хозяевами являются прокариоты. Весьма дискуссионным остается вопрос о возникновении ядра, которое либо предшествовало приобретению митохондрий первичными эукариотами, возникшими из археот путем обособления ДНК-содержащих компартментов (“градуалистический” сценарий), либо явилось результатом вселения α -протеобактерий в безъядерную археотную клетку (“симбиотический” сценарий) [1].

Данные о том, что в геномах эукариот бактериальные по происхождению гены, контролируемые в основном клеточный метаболизм, более многочисленны, чем археотные гены, определяющие матричные процессы, согласуются с развиваемой рядом авторов гипотезой о возникновении ядра из археотных клеток, вселившихся в бактерии [60]. Очевидно, что мозаичные геномы эукариот могут рассматриваться как продукты реорганизации надорганизменных систем наследственности, возникших на ранних этапах органеллогенеза в связи с формированием симбиозов между разными типами прокариот [63].

Изучение процессов органеллогенеза, основанных на глубокой редукции эндосимбиотических бактерий и их рекомбинации с клеткой-хозяином, открывает широкие возможности для анализа процессов возникновения и ранней эволюции жизни. В частности, формирование безгеномных органелл, которое, по-видимому, представляло собой результат их реверсии к анцестральным формам организации клетки, может рассматриваться как доказательство первичности метаболизма по отношению к геному. Важно отметить, что система

РНК-направляемого синтеза белков (трансляции) как связующее звено между клеточным метаболизмом и кодирующим его геномом проявила в ходе редуцированной эволюции гораздо большую стабильность, чем ДНК-зависимые матричные процессы (репликация, рекомбинация, репарация, транскрипция), подтверждая гипотезу о первичности РНК-генома по отношению к ДНК-геному. В связи с этим заслуживает внимания гипотеза о возникновении ДНК-геномов прокариот на основе РНК-геномов анцестральных клеточных или доклеточных форм жизни [64].

Реконструкция органеллогенеза имеет важное прикладное значение, связанное с созданием новых генетических систем, которые кодируют заранее заданные полезные свойства, например способность растений к фиксации N_2 , либо животных к фиксации CO_2 [65]. Правомерность постановки этих задач подтверждается выявлением глубоко редуцированных N_2 -фиксирующих симбионтов у некоторых фототрофных организмов [66], а также широким распространением фото- и хемобионтов, поддерживаемых в клетках животных [67].

Работа поддержана грантом РФФИ 19-16-00081.

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Martin W.* Symbiogenesis, gradualism, and mitochondrial energy in eukaryote origin // *Period. Biol.* 2017. V. 119. № 3. P. 141–158. <https://doi.org/10.18054/pb.v119i3.5694>
2. *Фаминцын А.С.* О роли симбиоза в эволюции организмов // *Зап. Импер. акад. наук, физ.-мат. отд. Серия 8.* 1907. Т. 20. № 3. С. 1–14.
3. *Мережковский К.С.* Теория двух плазм как основа симбиогенеза, нового учения о происхождении организмов. Казань: Типо-литография Импер. ун-та, 1909. 102 с.
4. *Margulis L., Sagan D.* *Acquiring Genomes. A theory of the Origins of Species.* N.Y.: Basic Books, 2002. 320 p.
5. *Проворов Н.А., Тихонович И.А., Воробьев Н.И.* Симбиоз и симбиогенез. С.-Петербург: Информ-Навигатор, 2018. 464 с.
6. *Georgiades K., Raoult D.* The rhizome of *Reclinomonas americana*, *Homo sapiens*, *Pediculus humanus* and *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria // *Biology Direct.* 2011. V. 6: 55. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-6-55>
7. *de la Peña T.C., Fedorova E., Pueyo J.J., Lucas M.M.* The symbiosome: legume and rhizobia co-evolution toward a nitrogen-fixing organelle? // *Front. Plant Sci.* 2018. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02229>

8. *Проворов Н.А., Андронов Е.Е.* Эволюция клубеньковых бактерий: реконструкция процессов видообразования, обусловленных перестройками генома в системе симбиоза // *Микробиология*. 2016. Т. 85. № 2. С. 195–206.
<https://doi.org/10.7868/S0026365616020166>
9. *Prakash R.K., Schilperoort B.A.* Relationship between *nif*-plasmids of fast-growing *Rhizobium* species and *Ti*-plasmids of *Agrobacterium tumefaciens* // *J. Bacteriol.* 1982. V. 149. № 3. P. 1129–1134.
10. *Tian C.F., Zhou Y.L., Zhang Y.M. et al.* Comparative genomics of rhizobia nodulating soybeans suggests extensive recruitment of lineage-specific genes in adaptations // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. № 22. P. 8629–8634.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1120436109>
11. *Hirsch A.M., Lum M.R., Downie J.A.* What makes the rhizobia-legume symbiosis so special? // *Plant Physiol.* 2001. V. 127. № 4. P. 1484–1492.
<https://doi.org/10.1104/pp.010866>
12. *Wisniewski-Dyé F., Lozano L., Acosta-Cruz E. et al.* Genome sequence of *Azospirillum brasilense* CBG497 and comparative analyses of *Azospirillum* core and accessory genomes provide insight into niche adaptation // *Genes*. 2012. V. 3. № 4. P. 576–602.
<https://doi.org/10.3390/genes3040576>
13. *Blaha D., Sanguin H., Robe P. et al.* Physical organization of phytobeneficial genes *nifH* and *ipdC* in the plant growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum lipoferum* 4VI // *FEMS Microbiol. Lett.* 2005. V. 244. № 1. P. 157–163.
<https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.01.034>
14. *Matveeva T.V., Lutova L.A.* Horizontal gene transfer from *Agrobacterium* to plants // *Front. Plant Sci.* 2014. V. 5. Article 326.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00326>
15. *Wu M., Sun L.V., Vamathevan J. et al.* Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipientis* wMel: a streamlined genome overrun by mobile genetic elements // *PLoS Biology*. 2004. V. 2. № 3. P. 327–341.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020069>
16. *Nikoh N., McCutcheon J.P., Kudo T. et al.* Bacterial genes in the aphid genome: absence of functional gene transfer from *Buchnera* to its host // *PLoS Genet.* 2010. V. 6. № 2. e1000827.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000827>
17. *Blanc G., Ogata H., Robert C. et al.* Lateral gene transfer between obligate intracellular bacteria: evidence from the *Rickettsiamassiliae* genome // *Genome Res.* 2007. V. 17. № 11. P. 1657–1664.
<https://doi.org/10.1101/gr.6742107>
18. *Deusch O., Landan G., Roettger M. et al.* Genes of cyanobacterial origin in plant nuclear genomes point to a heterocyst-forming plastid ancestor // *Molec. Biol. Evol.* 2008. V. 25. № 4. P. 748–761.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msn022>
19. *Meeks J.C., Elhai J.* Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2002. V. 66. № 1. P. 94–121.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.66.1.94-121.2002>
20. *Ran L., Larsson J., Vigil-Stenman T. et al.* Genome erosion in a nitrogen-fixing vertically transmitted endosymbiotic multicellular cyanobacterium // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 9.
<https://doi.org/10.1371/annotation/835c5766-5128-41c4-b636-adfe0c503103>
21. *Nowack E.C., Grossman A.R.* Trafficking of protein into the recently established photo-synthetic organelles of *Paulinella chromatophora* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. № 14. P. 5340–5345.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1118800109>
22. *Ponce-Toledo R.I., Deschamps P., López-García P. et al.* An early-branching freshwater cyanobacterium at the origin of plastids // *Current Biology*. 2017. V. 27. № 3. P. 386–391.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.11.056>
23. *Hata H., Natori T., Mizuno T. et al.* Phylogenetics of family Enterobacteriaceae and proposal to reclassify *Escherichia hermannii* and *Salmonella subterranea* as *Atlantibacter hermannii* and *Atlantibacter subterranea* gen. nov., comb. nov. // *Microbiol. Immunol.* 2016. V. 60. № 5. P. 303–311.
<https://doi.org/10.1111/1348-0421.12374>
24. *Merhej V., Georgiades K., Raoult D.* Postgenomic analysis of bacterial pathogens repertoire reveals genome reduction rather than virulence factors // *Brief. Fuct. Genom.* 2013. V. 12. № 4. P. 291–304.
<https://doi.org/10.1093/bfpg/elt015>
25. *Rasko D.A., Rosovitz M.J., Myers G.S. et al.* The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates // *J. Bacteriol.* 2008. V. 190. № 20. P. 6881–6893.
<https://doi.org/10.1128/JB.00619-08>
26. *Call D.R., Kang M.-S., Daniels J., Besser T.E.* Assessing genetic diversity in plasmids from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* using a mixed-plasmid microarray // *J. Appl. Microbiol.* 2006. V. 100. № 1. P. 15–28.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02775.x>
27. *Shapiro L.R., Scully E.D., Straub T.J. et al.* Horizontal gene acquisitions, mobile element proliferation and genome decay in the host-restricted plant pathogen *Erwinia tracheiphila* // *Genome Biol. Evol.* 2016. V. 8. № 3. P. 649–664.
<https://doi.org/10.1093/gbe/evw016>
28. *Dutilh B.E., Thompson C.C., Vicente A.C. et al.* Comparative genomics of 274 *Vibrio cholerae* genomes reveals mobile functions structuring three niche dimensions // *BMC Genomics*. 2014. 15: 654.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-654>
29. *Ruby E.G., Urbanowski M., Campbell J. et al.* Complete genome sequence of *Vibrio fischeri*: a symbiotic bacterium with pathogenic congeners // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. № 8. P. 3004–3009.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0409900102>
30. *Lee H.H., Ostrov N., Wong B.G. et al.* *Vibrio natriegens*, a new genomic powerhouse // *bioRxiv preprint*. 2016.
<https://doi.org/10.1101/058487>
31. *Douglas A.E.* The molecular basis of bacterial–insect symbiosis // *J. Mol. Biol.* 2014. V. 426. № 10. P. 3830–3837.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.04.005>

32. *Nikoh N., Hosokawa T., Oshima K. et al.* Reductive evolution of bacterial genome in insect gut environment // *Genome Biol. Evol.* 2011. V. 3. № 3. P. 702–714. <https://doi.org/10.1093/gbe/evr064>
33. *Moran N.A., McCutcheon J.P., Nakabachi A.* Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts // *Annu. Rev. Genet.* 2008. V. 42. P. 165–190. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130119>
34. *Nakabachi A., Yamashita A., Toh H. et al.* The 160-kilobase genome of the bacterial endosymbiont *Carsonella* // *Science*. 2006. V. 314. № 5797. P. 267–270. <https://doi.org/10.1126/science.1134196>
35. *Beukes C.W., Palmer M., Manyaka P. et al.* Genome data provides high support for generic boundaries in *Burkholderia sensu lato* // *Front Microbiol.* 2017. V. 8: 1154. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01154>
36. *Estrada-de los Santos P., Palmer M., Chávez-Ramírez B. et al.* Whole genome analyses suggests that *Burkholderia sensu lato* contains two additional novel genera (*Mycetohabitans* gen. nov., and *Trinickia* gen. nov.): implications for the evolution of diazotrophy and nodulation in the Burkholderiaceae // *Genes*. 2018. V. 9. № 8. P. 389–401. <https://doi.org/10.3390/genes9080389>
37. *Johnson S.L., Bishop-Lilly K.A., Ladner J.T. et al.* Complete genome sequences for 59 *Burkholderia* isolates, both pathogenic and near neighbor // *Genome Announc.* 2015. V. 3. № 2. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00159-15>
38. *Coenye T., Vandamme P.* Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches // *Environ. Microbiol.* 2003. V. 5. P. 719–729. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00471.x>
39. *Karg T., Reinhold-Hurek B.* Global changes in protein composition of N_2 -fixing *Azoarcus* sp. strain BH72 upon diazosome formation // *J. Bacteriol.* 1996. V. 178. № 11. P. 5748–5754. <https://doi.org/10.1128/jb.178.19.5748-5754.1996>
40. *Krause A., Ramakumar A., Bartels D. et al.* Complete genome of the mutualistic, N_2 -fixing grass endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72 // *Nature Biotechnol.* 2006. V. 24. № 11. P. 1385–1391. <https://doi.org/10.1038/nbt1243>
41. *Miché L., Battistoni F., Gemmer S. et al.* Upregulation of jasmonate-inducible defense proteins and differential colonization of roots of *Oryza sativa* cultivars with the endophyte *Azoarcus* sp. // *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2006. V. 19. № 5. P. 502–511. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0502>
42. *Egener T., Hurek T., Reinhold-Hurek B.* Endophytic expression of *nif* genes of *Azoarcus* strain BH72 in rice roots // *Molec. Plant-Microbe Interact.* 1999. V. 12. № 4. P. 813–819. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.9.813>
43. *Bennett G.M., Moran N.A.* Small, smaller, smallest: the origins and evolution of ancient dual symbioses in a phloem-feeding insect // *Genome Biol. Evol.* 2013. V. 5. № 9. P. 1675–1688. <https://doi.org/10.1093/gbe/evt118>
44. *Cavalier-Smith T.* Kingdom protozoa and its 18 phyla // *Microbiol. Rev.* 1993. V. 57. № 4. P. 953–994.
45. *Barbrook A.C., Voolstra C.R., Howe C.J.* The chloroplast genome of a *Symbiodinium* sp. clade C3 isolate // *Protist.* 2014. V. 165. № 1. P. 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2013.09.006>
46. *Mungpakdee S., Shinzato C., Takeuchi T. et al.* Massive gene transfer and extensive RNA editing of a symbiotic dinoflagellate plastid genome // *Genome Biol. Evol.* 2014. V. 6. № 6. P. 1408–1422. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu109>
47. *Pochon X., Putnam H.M., Gates R.D.* Multi-gene analysis of *Symbiodinium* dinoflagellates: a perspective on rarity, symbiosis and evolution // *PeerJ.* 2014. 2: e394. <https://doi.org/10.7717/peerj.394>
48. *Pochon X., Pawlowski J.* Evolution of the soritids – *Symbiodinium* symbiosis // *Symbiosis.* 2006. V. 42. № 2. P. 77–88.
49. *Shoguchi E., Beedesse G., Tada I. et al.* Two divergent *Symbiodinium* genomes reveal conservation of a gene cluster for sunscreen biosynthesis and recently lost genes // *BMC Genomics.* 2018. V. 19. P. 458. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4857-9>
50. *Shinzato C., Mungpakdee S., Satoh N., Shoguchi E.* A genomic approach to coral–dinoflagellate symbiosis: studies of *Acropora digitifera* and *Symbiodinium minutum* // *Front Microbiol.* 2014. V. 5. P. 336. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00336>
51. *Waller R.F., Koreny L.* Plastid complexity in dinoflagellates: a picture of gains, losses, replacements and revisions // *Adv. Botan. Res.* 2017. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2017.06.004>
52. *Kodama Y., Fujishima M.* Infection of *Paramecium bursaria* by symbiotic *Chlorella* species // *Endosymbionts in Paramecium*, Microbiology Monographs 12 / Ed. Fujishima M. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2009. P. 31–55. https://doi.org/10.1007/978-3-540-92677-1_2
53. *Rumpho M.E., Worful J.M., Lee J. et al.* Horizontal gene transfer of the algal nuclear gene *psbO* to the photosynthetic sea slug *Elysia chlorotica* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. № 46. P. 17867–17871. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804968105>
54. *Spang A., Saw J.H., Jørgensen S.L. et al.* Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes // *Nature.* 2015. V. 521. № 7551. P. 173–179. <https://doi.org/10.1038/nature14447>
55. *Проворов Н.А.* К.С. Мережковский и происхождение эукариотической клетки: 111 лет теории симбиогенеза // *С.-х. биология.* 2016. Т. 51. № 5. С. 746–758. <https://doi.org/10.15389/agrobiol.2016.5.746rus>
56. *Cavalier-Smith T.* The origin of nuclei and of eukaryotic cells // *Nature.* 1975. V. 256. № 5517. P. 463–468.
57. *Franke J.D., Blomberg W.R., Todd R.T. et al.* Assembly of a complete genome sequence for *Gemmata obscuriglobus* reveals a novel prokaryotic rRNA operon gene architecture // *Ant. Leeuwenhoek.* 2018. V. 111. № 11. P. 2095–2105. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1102-0>
58. *Sagulenko E., Nouwens A., Webb R.I. et al.* Nuclear pore-like structures in a compartmentalized bacterium //

- PLoS One. 2017. V. 12. № 2: e0169432.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169432>
59. Claverie J.M. Viruses take center stage in cellular evolution // *Genome Biol.* 2006. V. 7. P. 110.
<https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-6-110>
60. Martin W., Roettger M., Kloesges T. et al. Modern endosymbiotic theory: getting lateral gene transfer into the equation // *J. Endocyt. Cell Res.* 2012. V. 23. P. 1–5.
61. Husnik F., Nikoh N., Koga R. et al. Horizontal gene transfer from diverse bacteria to an insect genome enables a tripartite nested mealybug symbiosis // *Cell.* 2013. V. 153. № 5. P. 1567–1578.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.040>
62. Aanen D.K., Eggleton P. Symbiogenesis: beyond the endosymbiosis theory? // *J. Theor. Biol.* 2017. V. 434. № 1. P. 99–103.
<https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2017.08.001>
63. Ku C., Nelson-Sathi S., Roettger M. et al. Endosymbiotic gene transfer from prokaryotic pangenomes: inherited chimerism in eukaryotes // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. № 33. P. 10139–10146.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1421385112>
64. Проворов Н.А., Тихонович И.А., Воробьев Н.И. Симбиогенез как модель для реконструкции ранних этапов эволюции генома // *Генетика.* 2016. Т. 52. № 2. С. 137–145.
<https://doi.org/10.7868/S0016675816020107>
65. Проворов Н.А., Онищук О.П. Эколого-генетические основы конструирования высокоэффективных азотфиксирующих микробно-растительных систем // *Эколог. генетика.* 2019. Т. 17. № 1. С. 11–18.
<https://doi.org/10.17816/ecogen17111-18>
66. Kneip C., Lockhart P., Voss C., Maier U.G. Nitrogen fixation in eukaryotes – new models for symbiosis // *BMC Evol. Biol.* 2007. 7: 55.
<https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-55>
67. Nakagawa S., Takai K. Deep-sea vent chemoautotrophs: diversity, biochemistry and ecological significance // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2008. V. 65. № 1. P. 1–14.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00502.x>

Symbiotic Models for Reconstruction of Organellogenesis

N. A. Provorov*

All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, St.-Petersburg, 196602 Russia

*e-mail: provorovnik@yandex.ru

Various groups of proteobacteria and cyanobacteria as well as unicellular algae capable of endosymbioses with eukaryotes, are addressed as the models for reconstruction of organellogenesis (transformation of symbiotic microbes into cellular organelles) as a major result of symbiogenesis – evolution based on formation of the integral systems of heredity by the tightly interacting partners. Organellogenesis includes the following transitions: facultative non-inherited intracellular symbionts → obligatory inherited endocytobionts → genome-containing organelles → genome-free organelles. We demonstrated that organellogenesis is accompanied by the loss of bacterial genetic individuality – the ability to maintain and express own genomes, including their complete elimination. Comparative analysis of various endosymbiotic bacteria groups showed that the major prerequisite for their transformation into organelles (primary organellogenesis) is a high genomic plasticity expressed at the early stages of organellogenesis, under the facultative or obligatory dependences on hosts. It is manifested as a directed change of genomic architectures (transitions of the unitary genome type to a multicomponent and to a reduced type) as well as in the export of functionally active genes into the non-related organisms. These properties are characteristic for α -proteobacteria and cyanobacteria – ancestors of mitochondria and plastids, but not for β - and γ -proteobacteria, Bacteroidetes and Firmicutes which, although include multiple endosymbiotic forms, have not been transformed into organelles. A convenient model for analyzing the secondary organellogenesis implemented by eukaryotic microorganisms is represented by dinoflagellates *Symbiodinium* (Alveolata) which: 1) harbor chloroplasts derived from red algae; 2) develop intracellular symbioses with invertebrates behaving as their plastids. Reconstruction of organellogenesis allows us to address the early stages of organic evolution including the trade-off between metabolism and heredity as well as between the RNA- or DNA-based genomes.

Keywords: organellogenesis, symbiogenesis, mitochondria and plastids, proteobacteria and cyanobacteria, unicellular algae, horizontal and endosymbiotic gene transfer, DNA- and RNA-based genomes.

БЕРЕМЕННОСТЬ КАК ФАКТОР АДАПТИВНОЙ ЭВОЛЮЦИИ ЧЕЛОВЕКА. РОЛЬ ЕСТЕСТВЕННОГО ОТБОРА В ВОЗНИКНОВЕНИИ ПРЕЭКЛАМПСИИ

© 2021 г. В. Н. Сереброва¹ *, Е. А. Трифонова¹, В. А. Степанов¹

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

*e-mail: vika.serebrova@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 20.03.2020 г.

После доработки 12.05.2020 г.

Принята к публикации 17.06.2020 г.

В обзоре рассмотрены данные о значимой роли беременности в адаптивной эволюции современного человека. В аспекте эволюционной медицины основное внимание уделяется тяжелой гипертензивной патологии беременности — преэклампсии (ПЭ). Обобщены имеющиеся на сегодняшний день эволюционные гипотезы о возникновении, причинах расовой и этнической вариативности частоты развития данной патологии в популяциях человека. Приведены исследования, предполагающие вклад адаптивной эволюции в формирование наследственной предрасположенности к развитию ПЭ. Продемонстрированы собственные результаты, впервые выявившие значимую роль очищающего отбора в формировании генетической архитектуры ПЭ по системе регуляторных однонуклеотидных полиморфных вариантов новых генов-кандидатов данной патологии.

Ключевые слова: естественный отбор, адаптивная эволюция, эволюционная медицина, преэклампсия, плацента.

DOI: 10.31857/S0016675821010148

Изучение возникновения, распространения, особенностей этиопатогенеза и генетической архитектуры многофакторных заболеваний (МФЗ) человека в контексте эволюции является перспективным и активно развивающимся направлением. Несмотря на существующие предположения о том, что в современных популяциях человека большинство генетических вариантов, предрасполагающих к развитию МФЗ, имеют нейтральное эволюционное происхождение [1–4], множество проведенных на сегодняшний день исследований демонстрируют значимый вклад естественного отбора и адаптивных факторов в структуру генетической компоненты распространенных болезней [5–21].

Генофонд современного человека отражает историю разнообразных процессов генетической адаптации с момента расселения *Homo sapiens* из Африки, связанной с новыми условиями окружающей среды, с которыми пришлось столкнуться человеку эпохи позднего плейстоцена около 125–12 тыс. лет назад. Так, увеличению репродуктивной приспособленности в новых средовых условиях, вероятно, способствовали фенотипы, обеспечивающие терморегуляцию в условиях низких температур, толерантность к гипоксии на большой высоте и светлую пигментацию кожи в регионах с низ-

ким количеством солнечного света. Кроме того, эпоха неолита (около 12–4 тыс. лет назад) ознаменовалась переходом от присваивающего типа хозяйства охотников-собирателей к производящему — земледелию и скотоводству. Такая смена культуры также могла способствовать адаптивной эволюции человека в результате распространения оседлого образа жизни, роста плотности населения и изменения типа питания [22, 23].

Следует отметить, что приобретенная в ходе эволюции генетическая адаптация способствует формированию благоприятных фенотипов, которые могут оказывать вредное воздействие в случае изменений в условиях окружающей среды и образе жизни, поскольку адаптивные закрепления генетических модификаций происходят значительно медленнее перемен в образе жизни, характерных для современного общества [23–25]. На сегодняшний день все больше данных свидетельствует о возможном негативном эффекте ряда адаптивных изменений в геноме современного человека — формировании болезней и патологических состояний, например таких как ожирение, гипертония, воспалительные и аутоиммунные процессы, аллергия, диабет, онкологические заболевания [19, 23–26]. Ярким примером такого

эффекта является гипотеза “экономных генов”, предложенная J.V. Neel [27]. Данная гипотеза предполагает, что генотипы, ассоциированные с развитием диабета в современных популяциях, обладали адаптивным преимуществом у охотников-собирателей, которые вели кочевой образ жизни [25, 27], в то время как переход к сидячему образу жизни и увеличение доступности пищевых ресурсов определяют повышенный риск развития ожирения и диабета 2-го типа [25, 28, 29]. Еще одним примером может служить “гигиеническая гипотеза” [30], согласно которой усиленный иммунный ответ, обеспечивавший борьбу с инфекциями в прошлом, в настоящее время благодаря широкому использованию антибиотиков и вакцинации способствует развитию воспалительных и аутоиммунных заболеваний [25, 31, 32]. Таким образом, посредством изучения адаптивных изменений в человеческом геноме и генофонде популяций, возникших в условиях новой среды обитания, можно не только приблизиться к пониманию процессов формирования генетического разнообразия и роли их фенотипических проявлений в развитии болезней и здоровья человека, но также попытаться оценить возможный вклад “недостающей наследуемости” (англ. “missing heritability”) при МФЗ [18, 22, 23, 25, 26].

В настоящем обзоре приводятся данные, которые демонстрируют значимую роль такого физиологического состояния как беременность в ходе адаптивной эволюции современного человека. Кроме того, в аспекте эволюционной медицины рассматривается одно из наиболее тяжелых гипертензивных расстройств беременности многофакторной этиологии – преэклампсия (ПЭ). Проведено обобщение имеющихся на сегодняшний день эволюционных гипотез происхождения данной патологии, а также обсуждаются результаты исследований, посвященных изучению роли естественного отбора в формировании генетической архитектуры ПЭ.

РОЛЬ БЕРЕМЕННОСТИ В АДАПТИВНОЙ ЭВОЛЮЦИИ ЧЕЛОВЕКА

В процессе адаптивной эволюции современного человека, согласно E.A. Brown с соавт. [33], большая роль отводится средовым факторам, оказывающим влияние на фертильность и беременность. Значимое давление отбора в недавней эволюции человека опосредовано путем распространения инфекционных заболеваний в связи с ростом плотности населения, добавления в пищевой рацион зерна и молочных продуктов, изменения уровня кислорода и ультрафиолетового излучения в ходе расселения человека, однако более серьезный эффект данные селективные факторы могли оказывать во время беременности. Такое предположение основано на большей уяз-

вимости организма беременной женщины к действию разнообразных средовых факторов в связи с чрезвычайными энергетическими, физическими и иммунологическими затратами для обеспечения потребностей плода [33–40].

Одним из основных селективных факторов, влияющих на фертильность и протекание беременности вследствие изменения биодоступности поступающих с пищей нутриентов, является ультрафиолетовое излучение. Ярким примером действия направленного отбора может служить формирование баланса между синтезом витамина D3 и стабильностью фолиевой кислоты во время беременности, о чем свидетельствует последовательное изменение содержания в коже меланина в соответствии с уровнем воздействия солнечного ультрафиолетового излучения [41, 42]. Так, развитие дефектов нервной трубки у плода редко встречается среди женщин с темной пигментацией кожи, поскольку высокое содержание меланина предотвращает разрушение фолиевой кислоты и формирование летальных пороков развития [41, 43]. Таким образом, среди населения Африки, Юго-Восточной Азии, Австралии и Тихоокеанского региона действие направленного отбора способствовало увеличению продукции меланина в коже для обеспечения стабильности фолиевой кислоты во время беременности. В то же время избыточное для более высоких широт содержание меланина в коже препятствует синтезу витамина D3, который необходим для усиления всасывания кальция, играющего ключевую роль в формировании скелета, в развитии жизненно важных органов и иммунной системы у плода, а также поддержании метаболизма костной системы матери [33, 44, 45].

Высокая частота заболеваемости инфекционными болезнями рассматривается в качестве одного из мощнейших когда-либо действовавших на человека эволюционных факторов, возникшего в результате увеличения плотности населения в связи с переходом к оседлому образу жизни около 10 тыс. лет назад [46]. Несмотря на то что заболевания инфекционной природы в большинстве случаев представляют существенную угрозу, еще более значимым селективным фактором они являются для беременных женщин, поскольку в результате физиологического подавления иммунной системы организм матери становится особенно уязвимым. Такая высокая чувствительность организма беременных женщин к различным инфекционным агентам может приводить к спонтанным абортam, более высокой заболеваемости и смертности по сравнению с общей частотой в популяции [33, 40].

Кроме того, предполагается значимый вклад беременности в формирование приспособленности в ответ на изменение диеты, обусловленной

возникновением и развитием сельского хозяйства, скотоводства и рыболовства в ходе недавней эволюции человека [19, 33]. Так, способность человека усваивать молоко во взрослом возрасте могла появиться в результате адаптивной эволюции, благодаря своему влиянию на репродуктивную приспособленность [47]. В первую очередь молоко обеспечивало стерильный источник жидкости, что было особенно важным для населения жаркого, засушливого климата Африки и Ближнего Востока [47]. Принимая во внимание чувствительность беременной женщины к загрязненным продуктам [48], способность к употреблению стерильного свежего молока, вероятно, обладала адаптивным преимуществом. Кроме того, молоко является источником дополнительного кальция, полезного для развития и нормального функционирования костной системы, а также для репродуктивной зрелости женского организма, поскольку достаточный уровень кальция в организме отчасти обеспечивает формирование широкого таза, что необходимо для благоприятного родоразрешения [33]. Еще одной важной особенностью является высокая калорийность жира, по сравнению с белками и углеводами, что вероятно в значительной степени помогало матери во время беременности и лактации прокормить потомство. Следует отметить, что молоко и другие животные жиры содержат холестерин, который является предшественником стероидных гормонов, обеспечивающих фертильность, а также влияет на раннее развитие и рост плода [49]. Примечательно, что недостаточное содержание холестерина в рационе коррелирует со сниженным уровнем половых гормонов [50], способствуя подавлению функции яичников. Таким образом, высокое содержание жира, холестерина и кальция в молоке способствует увеличению калорийности рациона, ускоренному развитию скелета, повышению фертильности, формируя тем самым адаптивное преимущество для женщин, употребляющих молочные продукты.

В настоящее время активно изучается роль адаптивной эволюции в формировании патологий беременности. Так, например, возникновение токсикоза все чаще рассматривают не с точки зрения патологического состояния, а в качестве адаптивного преимущества, закрепленного благодаря действию естественного отбора в популяциях человека [51, 52]. Показано, что более высокие шансы для успешного вынашивания эмбриона/плода наблюдаются в случае, если беременность сопровождается тошнотой и рвотой, чем при отсутствии симптомов токсикоза [52–54]. Согласно гипотезе M. Profet [52], токсикоз во время беременности необходим для защиты развивающегося эмбриона/плода, поскольку ограничивает потребление матерью токсических веществ в пищу. Примечательно, что наиболее интенсивные симптомы токсикоза наблюдаются на сроке 6–8 нед. беременности, ко-

гда органогенез у эмбриона особенно чувствителен к внешним факторам [52, 53]. Важно отметить, что традиционная диета у популяций с низкой частотой возникновения токсикоза состоит преимущественно из продуктов растительного, а не животного происхождения, которые из-за частого содержания патогенных микроорганизмов и паразитов представляют потенциальную опасность как для развивающегося эмбриона/плода, так и для беременной женщины [51, 53–56]. Тошнота при беременности, вероятно, направлена на предотвращение употребления в пищу токсинов, характерных для эпохи плейстоцена, а не современных ядов. Это согласуется и с результатами исследований, в которых показано, что токсикоз является сдерживающим фактором от употребления кофе – горького растительного алкалоида и слабо препятствует употреблению алкоголя [57]. По-видимому, это связано с тем, что количество алкоголя, необходимое для развития фетального алкогольного синдрома, стало доступно только с возникновением сельского хозяйства [52, 53, 58]. Следует отметить, что лучшим условием для развивающегося эмбриона/плода является расход энергетических резервов тела беременной женщины, а не употребление ею потенциально опасной пищи, в особенности мясной, которая до широкого распространения холодильников нередко содержала большое количество микроорганизмов и их токсинов [51–53].

Примером тонко настроенного метаболизма, соответствующего различающимся условиям окружающей среды и особенностям традиционной диеты, может служить возникновение гестационного сахарного диабета (ГСД). Известно, что заболеваемость ГСД для современных популяций обратно пропорциональна количеству потребляемых высокогликемических углеводов и молочных продуктов, входящих в состав традиционной диеты [33, 59–64]. Поскольку данная патология способствует развитию макросомии в случае несоответствия слишком крупного плода размерам малого таза матери, ГСД до появления кесарева сечения являлся одной из причин перинатальной заболеваемости и смертности, а также часто приводил к массивным кровотечениям во время родов [39, 65]. В связи с чем сниженная гликемическая реакция европейцев на принятие пищи, по сравнению с другими популяциями, может быть результатом направленного отбора на изменение метаболизма материнского организма в соответствии с особой диетой [33, 62–67].

Таким образом, результаты проведенных на сегодняшний день исследований демонстрируют, что при рассмотрении эффектов отбора на разных этапах эволюции человека нельзя недооценивать роль беременности в формировании приспособленности к действию разнообразных факторов, поскольку данное физиологическое состояние ха-

рактируется значительным расходом ресурсов организма, необходимых для выживания в новых быстро меняющихся условиях окружающей среды. Кроме того, результатами ряда исследований [33, 54] подтверждается предполагаемый вклад адаптивной эволюции в формирование патологических состояний беременности, в связи с чем их изучение в контексте эволюционной медицины может представлять существенный интерес для понимания причин возникновения, особенностей этиопатогенеза, расовой и этнической вариативности частоты развития данных осложнений.

РОЛЬ ЕСТЕСТВЕННОГО ОТБОРА В ПРОИСХОЖДЕНИИ ПЭ

Болезнь с точки зрения эволюционной медицины рассматривается как результат несоответствия адаптивных изменений в геноме человека и генофонде популяций, произошедших в прошлом, современным условиям окружающей среды и образу жизни [26]. В настоящем обзоре в контексте эволюционной медицины наиболее подробно рассмотрены причины возникновения ПЭ у человека. Данная патология, именуемая также “болезнью теорий”, заслуживает особого внимания, поскольку является грозным гипертензивным осложнением беременности, этиопатогенез которого, несмотря на десятилетия исследований, остается слабоизученным [68–72]. Кроме того, в настоящее время отсутствуют прогностические биомаркеры и эффективная фармакологическая терапия ПЭ, которая признана тяжелой патологией беременности и определяет высокую частоту материнской и перинатальной заболеваемости и смертности, составляющих в мировом масштабе не менее 63 тыс. случаев в год [71, 73, 74]. Согласно наиболее распространенной гипотезе, основная причина развития ПЭ заключается в нарушении процессов формирования плацентарной ткани на ранних сроках гестации вследствие аномальной инвазии цитотрофобласта и неполного ремоделирования спиральных артерий матки [71, 74–76].

Несмотря на большое количество исследований, направленных на изучение генетической архитектуры ПЭ и применение различных подходов (анализ “случай–контроль”, полногеномный анализ сцепления в родословных (GWLS), полногеномное исследование ассоциаций (GWAS)), к настоящему времени не удалось выявить главные гены предрасположенности к развитию данной патологии, поскольку полученные результаты являются достаточно противоречивыми [3, 77, 79–84]. Таким образом, изучение ПЭ в аспекте эволюционной медицины представляет особый интерес для поиска новых генетических маркеров, которые согласно эволюционным гипотезам могут быть вовлечены в патогенез данного осложнения бере-

менности. Кроме того, такой подход можно рассматривать в качестве одного из способов обнаружения “недостающей наследуемости”, что, вероятно, позволит приблизиться к пониманию генетической архитектуры такого заболевания многофакторной природы как ПЭ.

Вклад естественного отбора на микроэволюционном уровне в происхождение ПЭ

Первая эволюционная теория возникновения ПЭ была сформулирована D. Haig в 1993 г. [85]. Согласно данной гипотезе в основе патологии лежит “генетический конфликт интересов”, обусловленный действием отбора не только на гены плода, обеспечивающие высокий уровень поступления питательных веществ, но и на гены матери, которые оказывают обратный эффект путем ограничения потребностей плода для сохранения общих ресурсов организма [85]. В связи с этим у женщин с ПЭ эндотелиальная дисфункция может быть интерпретирована как попытка плода компенсировать недостаточное поступление питательных веществ с маточно-плацентарным кровотоком [83].

Так называемый “генетический конфликт интересов” происходит между тремя независимыми группами генов (материнские гены, гены плода, унаследованные от матери, и гены плода, унаследованные от отца), представляющих различные интересы, что в свою очередь способствует непрерывному процессу эскалации этого конфликта [85]. Согласно R. Rijnenborg с соавт. [86], такую связь между данными группами генов можно рассматривать в качестве особой формы “гонки вооружений” (гипотезы “Черной королевы”, в оригинале “Красной королевы” – англ. Red Queen hypothesis) в пределах одного вида, возникающей в процессе адаптации к последовательному добавлению новых этапов в уже существующее и хорошо сбалансированное взаимодействие между матерью и плодом. Примером такого взаимодействия может служить возникновение второй волны инвазии трофобласта наряду с индукцией восстановления материнской ткани. Поскольку у эволюции нет конечной цели, как и в “гонке вооружений” между хищником и жертвой, в соревновании матери и плода не может быть настоящего победителя [86]. Важно отметить, что с точки зрения гипотезы “Черной королевы” возникновение ПЭ является побочным результатом адаптивной эволюции, сформировавшимся в процессе непрерывной “гонки вооружений” между матерью и плодом, nasledующим как материнские, так и отцовские гены [86].

Особый интерес в эволюционном контексте представляет существование расовых и этнических различий частоты развития ПЭ в современных популяциях человека [71, 74, 87, 88]. Минимальная частота данной патологии отмечается у

представителей монголоидной расы и составляет от 1.2 до 1.9%, в то время как европеоиды и негроиды имеют более высокие значения данного показателя, находящиеся в диапазоне от 2 до 5% [87–91]. Наблюдаемые различия в частоте возникновения ПЭ среди представителей разных этнических групп, вероятно, могут быть обусловлены адаптивной эволюцией, действующей на протяжении формирования генофондов данных популяций с момента расселения *Homo sapiens* из Африки около 100 тыс. лет назад.

Так, вариабельность частоты развития ПЭ среди современных популяций человека может зависеть от характерного для традиционной диеты количества потребляемой соли [92]. При изучении ПЭ в г. Нью-Йорк заболеваемость данной патологией была минимальна среди иммигрантов из Японии (1.2%), Тайваня (0.9%) и Ирана (0.6%) [88] по сравнению с частотой 2–8% беременностей в других развитых странах [70, 71, 93]. Примечательно, что именно японцы и иранцы отличаются наибольшим уровнем потребления соли, который обусловлен традиционной диетой на основе морепродуктов (Япония) и высоким засолением почв (Иран) [94]. В связи с этим можно предположить, что потребляющие большое количество соли популяции могли находиться под действием сильного отбора, элиминирующего генетические факторы риска ПЭ в условиях отсутствия современной медицинской помощи [33]. Еще одним средовым фактором, который мог влиять на формирование межпопуляционных различий в частоте возникновения ПЭ, является высотная гипоксия. Так, популяции, проживающие в высокогорных регионах (жители высокогорья в Андах, тибетцы), благодаря адаптации к гипоксическому воздействию новых средовых условий получили устойчивость к развитию ПЭ [33, 95, 96]. Кроме того, согласно работе, опубликованной А. Nakimuli с соавт. [88], возникновение ПЭ в современных популяциях человека можно рассматривать и как результат действия естественного отбора, направленного на сдерживание размеров плода, поскольку оптимальный вес для новорожденного должен составлять 2.5–3.5 килограмма, тогда как больший вес увеличивает риск осложнений во время родов [88]. Следует также отметить, что женщины африканского происхождения по сравнению с европейскими женщинами имеют меньшие размеры малого таза, что согласуется с более высокой частотой встречаемости ПЭ среди представителей негроидной расы [88, 97].

В связи с этим изучение роли действия естественного отбора на микроэволюционном уровне в формировании генетической архитектуры ПЭ наряду с сопоставлением полученных результатов со средовыми особенностями и традиционным образом жизни современных популяций, вероятно, будет способствовать пониманию причин, лежащих в

основе межэтнической вариабельности возникновения данной патологии беременности.

Вклад естественного отбора на макроэволюционном уровне в происхождение ПЭ

Изучение возникновения ПЭ как результата действия естественного отбора на макроэволюционном уровне представляет большой интерес, поскольку формирование данного осложнения беременности характерно, прежде всего, для человека [7, 75, 76, 98, 99], тогда как только редкие сообщения свидетельствуют о развитии этой патологии среди обезьян: горилл [100, 101], шимпанзе [102], макак [103]. В связи с тем, что плацента является ключевым звеном этиопатогенеза ПЭ, эволюционный подход к анализу генетической архитектуры данного заболевания по системе генов, вовлеченных в молекулярные процессы, происходящие в плацентарной ткани, вероятно, позволит выявить причины и основные механизмы возникновения данной патологии беременности у человека.

В контексте ведущей роли плаценты в развитии ПЭ существенный интерес представляет гипотеза Е.Т. Abrams и J.N. Rutherford [104], согласно которой риск развития гестационных осложнений, связанных с аномалиями плаценты (ПЭ, послеродовое кровотечение), может быть следствием действия естественного отбора на гены, продукты которых вовлечены в регуляцию глубины инвазии трофобласта и ремоделирования спиральных артерий. Следует отметить, что глубокая инвазия трофобласта характерна только для гемохориального типа плаценты, при этом недостаточный уровень его инвазии является предрасполагающим фактором для развития ПЭ [76, 86, 99, 105, 106], тогда как эпителиохориальный тип плацентации обеспечивает защитный эффект против развития данного осложнения беременности [7]. Ранее предполагалось, что в ходе эволюции на основе видов с эпителиохориальным типом плаценты возникли новые виды млекопитающих с высокоинвазивной плацентацией, однако результаты исследований, посвященных сравнению уровня плацентации в большом разнообразии таксонов, убедительно свидетельствуют об обратном [107–110]. Согласно M.G. Elliot [7] самые ранние плацентарные млекопитающие обладали гемохориальным и эндотелиохориальным типами плацентации, тогда как эпителиохориальный тип плаценты является сравнительно недавним эволюционным приобретением, возникшим в нескольких таксономических группах независимо друг от друга. Именно гемохориальную плаценту человека в некоторых отношениях можно назвать “примитивной”, поскольку происхождение данного типа плаценты последовательно прослеживается до самых ранних видов млекопитающих, жив-

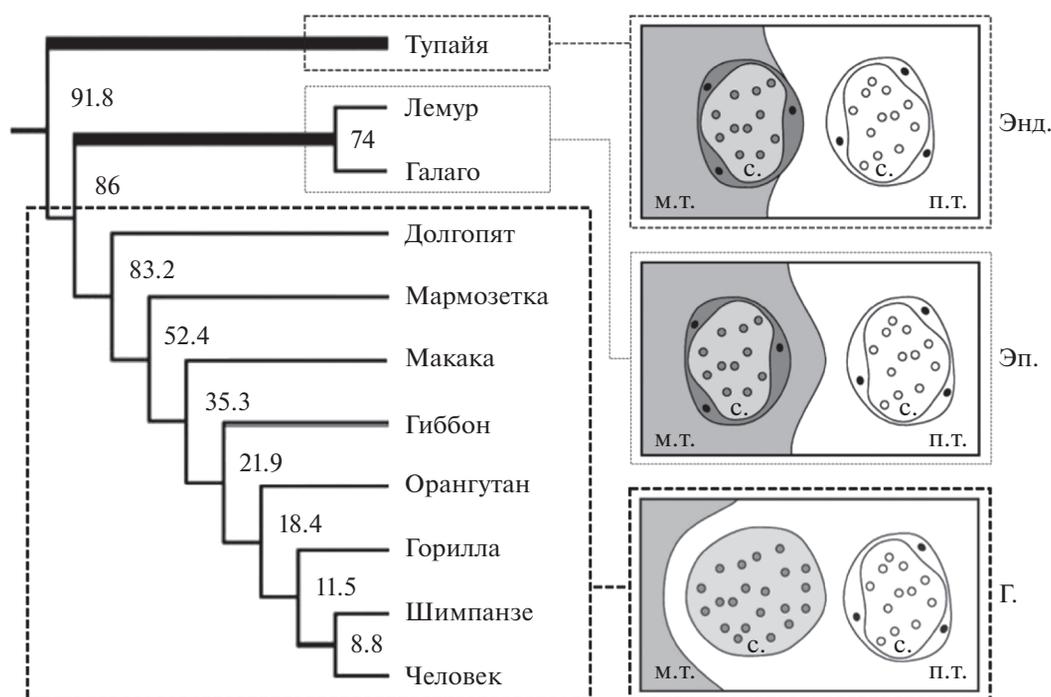


Рис. 1. Филогенетическое дерево грандотряда Euarchonta с характеристикой гистологического типа плацентации его представителей (по [107] в собственной модификации). Цифрами обозначено предположительное время расхождения филогенетических групп (млн лет). Черной широкой линией обозначен независимый переход от гемохориального типа плаценты к менее инвазивному типу. На правой части рисунка схематично отражена степень инвазивности представленных типов плацентации. Энд. — эндотелиохориальный, Эп. — эпителиохориальный, Г. — гемохориальный гистологический тип плаценты, м.т. — материнская ткань, п.т. — плодная ткань, с. — сосуд.

ших около 200 млн лет назад [7]. Характеристика типов плацентации у представителей грандотряда Euarchonta представлена на рис. 1.

Существует предположение, согласно которому высокоинвазивная гемохориальная плацента необходима для развития большего размера головного мозга, тогда как риск возникновения ПЭ у человека является платой за высокий уровень когнитивных способностей вида [111–114]. Тем не менее значительное количество работ демонстрирует, что виды животных с гемохориальной плацентацией не обладают большими размерами головного мозга в сравнении с видами, которые имеют другие типы плаценты [115–118]. Согласно предположению M.G. Elliot [7] у человека гемохориальный тип плаценты обеспечивает быстрое внутриутробное развитие мозга, обладая при этом высокой ценой в виде возможного формирования ПЭ. Так, при рассмотрении характера плацентации в контексте всего класса млекопитающих человек и другие приматы, вероятно, имеют неподходящий им тип плаценты. Кроме того, гипотеза M.G. Elliot предполагает, что инвазивная гемохориальная плацента человека может являться не следствием адаптивной эволюционной стратегии, а отражением “случайного закрепления” неблагоприятного фенотипа. В связи с этим цен-

тральная эволюционная проблема беременности человека может заключаться не в том, “почему человеческая плацента настолько инвазивна?”, а в том, “почему человеческая плацента не эпителиохориального типа?” [7].

Результаты, полученные M.G. Elliot и V.J. Crespi [106], подтверждают гипотезу о том, что при ПЭ у человека сниженная плацентарная инвазия обеспечивается общим набором генов и патофизиологических механизмов, лежащих в основе незначительной плацентарной инвазии у представителей надотряда Euarchontoglires (грызуны, зайцеобразные, тупаи, шерстокрылы и приматы). Кроме того, свидетельствуют о конвергентной эволюции менее инвазивных (эндотелиохориального и эпителиохориального) типов плаценты. Так, анализ 16578 белок-кодирующих генов в 18 таксонах (из которых 14 имеют гемохориальный, 2 — эпителиохориальный, 2 — эндотелиохориальный тип плаценты) позволил выявить 1254 гена, подвергавшихся адаптивной эволюции, направленной на уменьшение инвазивных свойств плаценты.

Примечательно, что полученные данные находят отражение в гипотезе, предложенной ранее рядом авторов [86, 104, 105, 116], которая рассматривает риск развития ПЭ как результат действия естественного отбора на макроэволюци-

Таблица 1. Эволюция инвазивных свойств плацентарной ткани у представителей отряда Primates [106]

Отряд Primates (Приматы)		Тип плаценты		Уровень инвазии трофобласта	Ремоделирование спиральных артерий	
		гист.	анат.			
Подотряд Strepsirrhini (Мокроносовые приматы)		Эп.	Диф.	Не происходит	Не происходит	
Подотряд Haplorhini (Сухоносовые приматы)	Парвоотряд Platyrrhini (обезьяны Нового Света)	Г.	Дис.	Минимальная	Эндотелий сосуда не затронут	
	Парвоотряд Catarrhini (обезьяны Старого Света)	Семейство Cercopithecoidea (Мартышковые)	Г.	Дис.	Неглубокая	Расширение внутри д.о.
		Семейство Hylobatidae (Гиббоновые)	Г.	Дис.	Неглубокая	Расширение внутри д.о.
		Семейство Hominoidea (Гоминиды)	Г.	Дис.	Глубокая	Расширение внутри д.о., проходящее в миометрий

Примечание. гист. – гистологический тип плаценты, анат. – анатомический тип плаценты, Эп. – эпителиохориальный, Г. – гемохориальный, Диф. – диффузный, Дис. – дискоидальный, д.о. – децидуальная оболочка.

онном уровне по генам, кодирующим белки, вовлеченные в формирование плацентарной ткани. Так, R. Pijnenborg с соавт. [86] предположили, что в эволюции степени инвазивности плаценты в линии предков человекообразных обезьян участвовал положительный отбор, направленный на гены, продукты которых определяют степень глубины инвазии цитотрофобласта и ремоделирование спиральных артерий. Данное предположение согласуется с результатами исследования E.J. Crosley с соавт. [105], которые показали ассоциацию одной ветви филогенетического дерева с повышением инвазивных свойств плаценты вследствие эволюции спиральных артерий. Так, малая глубина инвазии трофобласта и расширение спиральных артерий внутри децидуальной оболочки характерны для представителей семейства Hylobatidae (гиббон), тогда как глубокая степень инвазии трофобласта и ремоделирование спиральных артерий, проходящее в миометрий, наблюдаются у представителей подсемейства Hominoidea – человека, шимпанзе, гориллы (табл. 1) [105, 116]. Изучение роли действия естественного отбора на формирование генетической структуры белок-кодирующих участков 18 тыс. генов, экспрессирующихся в плацентарной ткани при физиологической беременности, позволило выявить действие положительного отбора для 295 генов на ветках предков Hominoidea (человек, шимпанзе, горилла, орангутан) и для 264 генов на ветках предков Hominoidea (человек, шимпанзе, горилла)

[105]. Примечательно, что согласно результатам функциональной аннотации данных генов значительная часть из них имеет отношение к риску развития ПЭ.

Поскольку возникновение ПЭ характерно, прежде всего, для представителей подсемейства Hominoidea и наблюдается преимущественно у человека, помимо изучения существующих особенностей строения плацентарной ткани среди различных видов отряда Primates, интерес может представлять и исследование физиологических различий, наблюдаемых во время беременности среди представителей данных видов. Так, продолжительность беременности у человека превышает срок гестации у гориллы, шимпанзе и орангутана, что, вероятно, свидетельствует об эволюционных преимуществах продолжительного гестационного периода [119]. Кроме того, еще одной отличительной чертой человека являются необычно крупные новорожденные [120], что, по-видимому, коррелирует с большими размерами головного мозга [121]. Даже по сравнению с другими приматами у человека эти особенности в сочетании с гемохориальным типом плаценты способны приводить к высокому риску окислительного стресса и сосудистого повреждения в плаценте во время беременности, что, вероятно, также играет важную роль в патогенезе ПЭ [7].

Вышеизложенное демонстрирует, что изучение роли действия естественного отбора среди представителей эволюционной линии отряда Pri-

mates в формировании структуры генов, продукты которых вовлечены в развитие плацентарной ткани, вероятно, позволит выявить механизмы, лежащие в основе возникновения у человека такого тяжелого осложнения беременности как ПЭ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ, ПОСВЯЩЕННЫЕ ОЦЕНКЕ РОЛИ ЕСТЕСТВЕННОГО ОТБОРА В РАЗВИТИИ ПЭ

Несмотря на значительное количество эволюционных гипотез о причинах возникновения ПЭ, до настоящего времени существовали только косвенные свидетельства возможного вклада естественного отбора в формирование данного осложнения беременности, как на микроэволюционном, так и на макроэволюционном уровне [68, 122–124]. Важно отметить, что в экспериментальных исследованиях поиск сигналов естественного отбора не проводился, тогда как выводы о роли эволюционных факторов в формировании ПЭ основаны на предположениях и существующих гипотезах.

В своем ранее проведенном исследовании [125], результаты которого были частично опубликованы [126, 127], мы впервые применили эволюционный подход к анализу формирования генетической архитектуры ПЭ. Полученные результаты демонстрируют значимый вклад адаптивных изменений регуляторных однонуклеотидных полиморфных вариантов (rSNP) новых генов-кандидатов ПЭ, выявленных впервые благодаря исследованиям транскриптома плацентарной ткани, в структуру наследственной предрасположенности к данной патологии беременности. Так, действие слабого очищающего отбора в ряду представителей эволюционной линии парвотряда Catarrhini (человек, шимпанзе, орангутан и макака-резус) с помощью нового вычислительного ресурса INSIGHT выявлено для двух rSNP: rs2227262 гена *NDRG1*, ассоциированного с ПЭ у якутов [126], и rs10985257 гена *CORO2A*, ассоциированного с ПЭ у русских [127]. Такой тип отбора свидетельствует о консервативном характере данных rSNP, способствуя удержанию производных аллелей на низком уровне. Важно отметить, что оба гена являются новыми генами-кандидатами ПЭ, для которых при данной патологии характерна гиперэкспрессия в плацентарной ткани [128–132].

Высокая концентрация белка *NDRG1* в плаценте при ПЭ, вероятно, следует рассматривать в качестве компенсаторного механизма, направленного на уменьшение степени повреждения клеток трофобласта [133, 134]. Так, ассоциированный с ПЭ предковый аллель *C* rSNP rs2227262 путем повышения уровня экспрессии гена *NDRG1* в условиях гипоксии может защищать клетки трофобласта от повреждений, а также способствовать их дифференцировке. Такое предположение основано на данных базы “RegulomeDB”, согласно которым

rSNP rs2227262 располагается в сайте связывания с транскрипционным фактором POLR2A (RNA Polymerase II Subunit A) – крупнейшим каталитическим компонентом РНК-полимеразы II. Вероятно, предковый аллель *C* обеспечивает необходимый уровень экспрессии гена *NDRG1* в условиях гипоксии при неглубокой инвазии трофобласта, однако данный уровень может быть недостаточным для представителей семейства Hominidae, поскольку вследствие увеличения инвазивных свойств плаценты клетки трофобласта в большей степени подвергаются повреждающему действию гипоксии [126]. Примечательно, что полученные результаты согласуются с гипотезой M.G. Elliot [7], в которой предполагается, что инвазивная гемохориальная плацента человека может являться не следствием адаптивной эволюционной стратегии, а отражением “случайного закрепления” неблагоприятного фенотипа.

Известно, что продукт гена *CORO2A* участвует в мембранном транспорте, клеточной подвижности, а также может быть вовлечен в формирование воспалительного ответа [135]. Наибольший интерес представляет расположение ассоциированного с ПЭ rSNP rs10985257 в сайте связывания с транскрипционным фактором, модулятором окислительного стресса – СЕВРВ (CCAAT/Enhancer Binding Protein Beta), гиперэкспрессия которого в условиях гипоксии способствует нарушению инвазии вневорсинчатого трофобласта и поверхностной плацентации [136]. Кроме того, СЕВРВ является репрессором другого транскрипционного фактора – MYC (MYC Proto-Oncogene, VHLH Transcription Factor) [137], что обеспечивает дифференцировку Т-клеток в сторону Т-хелперов 2-го типа, которые играют важную роль в успешной беременности, тогда как смещение баланса в пользу Т-хелперов 1-го типа наблюдается при ПЭ [138]. Примечательно, что транскрипционный фактор MYC ингибирует транскрипцию гена *NDRG1*, что в условиях гипоксии может оказывать неблагоприятный эффект в виду протективной функции белка *NDRG1* в отношении клеток трофобласта [133]. Таким образом, rSNP rs10985257 посредством взаимодействия с транскрипционным фактором СЕВРВ может быть вовлечен в этиопатогенез ПЭ как на стадии формирования плаценты, так и на более поздних этапах беременности. Согласно нашему исследованию [127], действие слабого очищающего отбора приводит к элиминации ассоциированного с ПЭ производного аллеля *C* rSNP rs10985257 гена *CORO2A*, который с низкой частотой встречается в популяциях человека. Полученные результаты можно рассматривать с точки зрения гипотезы “генетического конфликта интересов” D. Haig [85]. Согласно данной гипотезе, отбор действует не только на гены плода, которые повышают поступление питательных веществ, но и на гены матери, которые стремятся ограничить

потребности плода для сохранения общих ресурсов организма.

Таким образом, нами получены результаты, которые свидетельствуют о существенном вкладе естественного отбора в структуру наследственной подверженности и популяционной специфичности к развитию ПЭ. Кроме того, проведенное исследование продемонстрировало применимость эволюционного подхода к анализу формирования генетической архитектуры ПЭ, который может использоваться в будущих исследованиях, посвященных изучению данной патологии беременности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Появление анатомически современного человека в Африке согласно результатам археологических, генетических и геномных исследований датируется периодом около 200 тыс. лет назад, с последующей (около 80–50 тыс. лет назад) быстрой миграцией по всему миру [139]. В ходе расселения из Африки человек эпохи позднего плейстоцена (около 125–12 тыс. лет назад) столкнулся с необходимостью адаптации к быстро меняющимся условиям окружающей среды и образу жизни. Примечательно, что на данном этапе именно беременность могла внести существенный вклад в формирование адаптивной эволюции, поскольку такое физиологическое состояние характеризуется значительным расходом общих ресурсов организма, необходимых для выживания в новых условиях.

Важно отметить, что благоприятные фенотипы, закрепленные в геноме современного человека в ходе эволюции, могут оказывать и негативный эффект, который проявляется в виде формирования болезней и патологических состояний при изменении условий окружающей среды и образа жизни. Таким образом, изучение болезней многофакторной этиологии с точки зрения эволюционной медицины является высокоперспективным направлением исследований. Применение такого подхода не только будет способствовать более глубокому пониманию механизмов возникновения, распространения и патогенетики МФЗ, но также может препятствовать развитию данных заболеваний в случае своевременного изменения условий, лежащих в основе формирования патологического процесса [140].

Особый интерес в контексте эволюционной медицины представляет изучение ПЭ – тяжелого гипертензивного осложнения беременности. Поскольку возникновение ПЭ характерно для представителей подсемейства *Homininae* и наблюдается преимущественно у человека, изучение роли естественного отбора на макроэволюционном уровне в формировании генетической архитекту-

ры данной патологии, вероятно, позволит по-новому взглянуть на причины ее происхождения и особенности этиопатогенеза. Кроме того, наличие в современных популяциях человека расовых и этнических различий в частоте развития ПЭ может указывать на возможный вклад адаптивной эволюции, действующей на протяжении формирования генофондов данных популяций.

Обобщение имеющихся на сегодняшний день эволюционных гипотез о происхождении и распространении ПЭ свидетельствует о том, что возникновение данной патологии беременности является следствием действия естественного отбора на макроэволюционном уровне по генам, продукты которых вовлечены в регуляцию уровня инвазии трофобласта и ремоделирование спиральных артерий матки, тогда как вариабельность частоты развития ПЭ среди современных популяций человека может быть объяснена концепцией деканализации. Примечательно, что, несмотря на предполагаемую роль естественного отбора, экспериментальные исследования с целью подтверждения вклада адаптивной эволюции в развитие ПЭ не проводились. В связи с чем большое значение представляют результаты нашего предыдущего исследования [125–127], которые впервые продемонстрировали значимую роль естественного отбора в формировании генетической архитектуры ПЭ по системе rSNP новых генов-кандидатов данной патологии, выявленных благодаря анализу транскриптома плацентарной ткани.

Следует отметить, что изучение роли естественного отбора, как на макроэволюционном, так и на микроэволюционном уровне, в формировании генетической архитектуры ПЭ будет способствовать не только выявлению новых генетических маркеров и лучшему пониманию механизмов, лежащих в основе этиопатогенеза данного осложнения беременности, но также может пролить свет на происхождение и распространение этой тяжелой патологии в современных популяциях человека.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-29-13045.

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

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Speakman J.R.* Thrifty genes for obesity and metabolic syndrome time to call off the search? // *Diab. Vasc. Dis. Res.* 2006. № 3. P. 7–11.
2. *Helgason A., Palsson S., Thorleifsson G. et al.* Refining the impact of *TCF7L2* gene variants on type 2 diabetes and adaptive evolution // *Nat. Genet.* 2007. V. 39. P. 218–225.
3. *Dudley J.T., Kim Y., Liu L. et al.* Human genomic disease variants: a neutral evolutionary explanation // *Genome. Res.* 2012. V. 22. № 8. P. 1383–1394. <https://doi.org/10.1101/gr.133702.111>
4. *Qi L., Campos H.* Genetic predictors for cardiovascular disease in Hispanics // *Trends. Cardiovasc. Med.* 2011. V. 21. № 1. P. 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2012.01.002>
5. *Corbo R.M., Gambina G., Scacchi R.* How contemporary human reproductive behaviors influence the role of fertility-related genes: the example of the *p53* gene // *PLoS. One.* 2012. V. 7. № 4. e35431. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035431>
6. *Di Rienzo A., Hudson R.R.* An evolutionary framework for common diseases: the ancestral susceptibility model // *Trends. Genet.* 2005. V. 21. № 11. P. 596–601.
7. *Elliot M.G.* Oxidative stress and the evolutionary origins of preeclampsia // *J. Reprod. Immunol.* 2016. V. 114. P. 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2016.02.003>
8. *Kirwan J.D., Bekaert M., Commins J.M. et al.* A phylo-medicine approach to understanding the evolution of auditory sensory perception and disease in mammals // *Evol. Appl.* 2013. V. 6. № 3. P. 412–422. <https://doi.org/10.1111/eva.12047>
9. *Gibson G.* Decanalization and the origin of complex disease // *Nat. Rev. Genet.* 2009. V. 10. P. 134–140. <https://doi.org/10.1038/nrg2502>
10. *Neel J.V., Weder A.B., Julius S.* Type II diabetes, essential hypertension and obesity as “syndromes of impaired genetic homeostasis”: thrifty genotype hypothesis enters the 21st century // *Perspect. Biol. Med.* 1998. V. 42. № 1. P. 44–74.
11. *Schmalhausen I.I.* Factors of Evolution: The Theory of Stabilizing Selection. Philadelphia: Blakiston, 1949. 327 p.
12. *McGrath J.J., Hannan A.J., Gibson G.* Decanalization, brain development and risk of schizophrenia // *Transl. Psychiatry.* 2011. V. 1. e14. <https://doi.org/10.1038/tp.2011.16>
13. *Алтухов Ю.П., Корочкин Л.И., Рычков Ю.Г.* Наследственное биохимическое разнообразие в процессах эволюции и индивидуального развития // *Генетика.* 1996. Т. 32. № 11. С. 1450–1473.
14. *Perlman R.L.* Why disease persists: an evolutionary nosology // *Med. Health. Care. Philos.* 2005. V. 8. № 3. P. 343–350.
15. *Schork N.J., Cardon L.R., Xu X.* The future of genetic epidemiology // *Trends. Genet.* 1998. V. 14. P. 266–271.
16. *Tishkoff S.A., Reed F.A., Ranciaro A. et al.* Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe // *Nat. Genet.* 2007. V. 39. P. 31–40.
17. *Chakravarty M.V., Booth F.W.* Eating, exercise and “thrifty” genotypes: connecting the dots toward an evolutionary understanding of modern chronic diseases // *J. Appl. Physiol.* 2004. V. 96. P. 3–10.
18. *Степанов В.А.* Эволюция генетического разнообразия и болезни человека // *Генетика.* 2016. Т. 52. № 7. С. 852–864. <https://doi.org/10.7868/S0016675816070109>
19. *Rossier B.C., Bochud M., Devuyst O.* The hypertension pandemic: An evolutionary perspective // *Physiology (Bethesda).* 2017. V. 32. № 2. P. 112–125. <https://doi.org/10.1152/physiol.00026.2016>
20. *Dolgova O., Lao O.* Evolutionary and medical consequences of archaic introgression into modern human genomes // *Genes (Basel).* 2018. V. 9. № 7. P. 1–12. <https://doi.org/10.3390/genes9070358>
21. *Kruzel-Davila E., Wasser W.G., Skorecki K.* APOL1 nephropathy: A population genetics and evolutionary medicine detective story // *Semin. Nephrol.* 2017. V. 37. № 6. P. 490–507. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2017.07.002>
22. *Scheinfeldt L.B., Tishkoff S.A.* Recent human adaptation: genomic approaches, interpretation and insights // *Nat. Rev. Genet.* 2013. V. 14. № 10. P. 692–702. <https://doi.org/10.1038/nrg3604>
23. *Vasseur E., Quintana-Murci L.* The impact of natural selection on health and disease: uses of the population genetics approach in humans // *Evol. Appl.* 2013. V. 6. № 4. P. 596–607. <https://doi.org/10.1111/eva.12045>
24. *Shi H., Su B.* Molecular adaptation of modern human populations // *Int. J. Evol. Biol.* 2011. V. 2011. Article ID 484769. 8 p. <https://doi.org/10.4061/2011/484769>
25. *Saeb A.T., Al-Naqeb D.* The impact of evolutionary driving forces on human complex diseases: A population genetics approach // *Scientifica (Cairo).* 2016. V. 2016. Article ID 2079704. 10 p. <https://doi.org/10.1155/2016/2079704>
26. *Пузырев В.П., Кучер А.Н.* Эволюционно-онтогенетические аспекты патогенетики хронических болезней человека // *Генетика.* 2011. Т. 47. № 12. С. 1573–1585.
27. *Neel J.V.* Diabetes mellitus: a “thrifty” genotype rendered detrimental by “progress”? // *Am. J. Hum. Genet.* 1962. V. 14. P. 353–362.
28. *Ayub Q., Moutsianas L., Chen Y. et al.* Revisiting the thrifty gene hypothesis via 65 loci associated with susceptibility to type 2 diabetes // *Am. J. Hum. Genet.* 2014. V. 94. № 2. P. 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.12.010>
29. *Myles S., Lea R.A., Ohashi J. et al.* Testing the thrifty gene hypothesis: the Gly482Ser variant in *PPARGC1A* is associated with BMI in Tongans // *BMC. Med. Genet.* 2011. V. 12. № 10. P. 1–7. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-12-10>
30. *Strachan D.P.* Hay fever, hygiene, and household size // *BMJ.* 1989. V. 299. № 6710. P. 1259–1260.
31. *Okada H., Kuhn C., Feillet H. et al.* The ‘hygiene hypothesis’ for autoimmune and allergic diseases: an update // *Clin. Exp. Immunol.* 2010. V. 160. № 1. P. 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04139.x>

32. *Sironi M., Clerici M.* The hygiene hypothesis: an evolutionary perspective // *Microbes. Infect.* 2010. V. 12. № 6. P. 421–427.
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.02.002>
33. *Brown E.A., Ruvolo M., Sabeti P.C.* Many ways to die, one way to arrive: how selection acts through pregnancy // *Trends. Genet.* 2013. V. 29. № 10. P. 585–592.
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.03.001>
34. *Butte N.F.* Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus // *Am. J. Clin. Nutr.* 2000. V. 71. P. 1256S–1261S.
<https://doi.org/10.1093/ajcn/71.5.1256s>
35. *Kaufmann P., Mayhew T.M., CharnockJones D.S.* Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy // *Placenta.* 2004. V. 25. № 2–3. P. 114–126.
36. *Sladek S.M., Magness R.R., Conrad K.P.* Nitric oxide and pregnancy // *Am. J. Physiol.* 1997. V. 272. P. R441–R463.
37. *Hermida R.C., Ayala D.E., Mojón A. et al.* Blood pressure patterns in normal pregnancy, gestational hypertension, and preeclampsia // *Hypertension.* 2000. V. 36. № 2. P. 149–158.
38. *James A.H., Bushnell C.D., Jamison M.G. et al.* Incidence and risk factors for stroke in pregnancy and the puerperium // *Obstet. Gynecol.* 2005. V. 106. № 3. P. 509–516.
39. *Jolly M.C., Sebire N.J., Harris J.P. et al.* Risk factors for macrosomia and its clinical consequences: a study of 350,311 pregnancies // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2003. V. 111. № 1. P. 9–14.
40. *Robinson D.P., Klein S.L.* Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis // *Horm. Behav.* 2012. V. 62. № 3. P. 263–271.
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.02.023>
41. *Jablonski N.G., Chaplin G.* Colloquium paper: human skin pigmentation as an adaptation to UV radiation // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. P. 8962–8968.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0914628107>
42. *Steindal A.H., Tam T.T., Lu X.Y. et al.* 5-Methyltetrahydrofolate is photosensitive in the presence of riboflavin // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2008. V. 7. № 7. P. 814–818.
<https://doi.org/10.1039/b718907a>
43. *Fleming A., Copp A.J.* Embryonic folate metabolism and mouse neural tube defects // *Science.* 1998. V. 280. № 5372. P. 2107–2109.
44. *Holick M.F.* Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis // *Am. J. Clin. Nutr.* 2004. V. 79. № 3. P. 362–371.
45. *Norman A.W.* From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health // *Am. J. Clin. Nutr.* 2008. V. 88. № 2. P. 491S–499S.
46. *Campino S., Kwiatkowski D., Dessein A.* Mendelian and complex genetics of susceptibility and resistance to parasitic infections // *Semin. Immunol.* 2006. V. 18. № 6. P. 411–422.
47. *Ingram C.J., Mulcare C.A., Itan Y.* Lactose digestion and the evolutionary genetics of lactase persistence // *Hum. Genet.* 2009. V. 124. № 6. P. 579–591.
<https://doi.org/10.1007/s00439-008-0593-6>
48. *Pouillot R., Hoelzer K., Jackson K.A. et al.* Relative risk of listeriosis in foodborne diseases active surveillance network (FoodNet) sites according to age, pregnancy, and ethnicity // *Clin. Infect. Dis.* 2012. V. 54. P. S405–S410.
<https://doi.org/10.1093/cid/cis269>
49. *Herrera E.* Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn // *Endocrine.* 2002. V. 19. № 1. P. 43–55.
50. *Goldin B.R., Adlercreutz H., Gorbach S.L. et al.* Estrogen excretion patterns and plasma levels in vegetarian and omnivorous women // *N. Engl. J. Med.* 1982. V. 307. № 25. P. 1542–1547.
51. *Flaxman S.M., Sherman P.W.* Morning sickness: a mechanism for protecting mother and embryo // *Q. Rev. Biol.* 2000. V. 75. № 2. P. 113–148.
52. *Profet M.* Pregnancy sickness as adaptation: a deterrent to maternal ingestion of teratogens // *The Adapted Mind: Evolutionary Psychology and the Generation of Culture / Eds Barkow J.H., Cosmides L., Tooby J.* N.Y.: Oxford Univ. Press, 1992. P. 327–365.
53. *Palmer J., Palmer L.* *Evolutionary Psychology: The Ultimate Origins of Human Behavior.* New Jersey, 2001. 304 p.
54. *Sherman P.W., Flaxman S.M.* Nausea and vomiting of pregnancy in an evolutionary perspective // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2002. V. 186. № 5. P. 190–197.
55. *Lacasse A., Rey E., Ferreira E. et al.* Epidemiology of nausea and vomiting of pregnancy: prevalence, severity, determinants, and the importance of race/ethnicity // *BMC Pregnancy Childbirth.* 2009. V. 9. № 6.
<https://doi.org/10.1186/1471-2393-9-26>
56. *Pepper G.V., Craig Roberts S.* Rates of nausea and vomiting in pregnancy and dietary characteristics across populations // *Proc. Biol. Sci.* 2006. V. 273. № 1601. P. 2675–2679.
57. *Little R.E., Hook E.B.* Maternal alcohol and tobacco consumption and their association with nausea and vomiting during pregnancy // *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 1979. V. 58. № 1. P. 15–17.
58. *Tanaka T.* *The San, Hunter-Gatherers of the Kalahari.* Univ. Tokyo Press, 1980. 200 p.
59. *Hoyt G., Hickey M.S., Cordain L.* Dissociation of the glycaemic and insulinaemic responses to whole and skimmed milk // *Br. J. Nutr.* 2005. V. 93. № 2. P. 175–177.
60. *Zhang C., Ning Y.* Effect of dietary and lifestyle factors on the risk of gestational diabetes: review of epidemiologic evidence // *Am. J. Clin. Nutr.* 2011. V. 94. № 6. P. 1975S–1979S.
<https://doi.org/10.3945/ajcn.110.001032>
61. *Savitz D.A., Janevic T.M., Engel S.M. et al.* Ethnicity and gestational diabetes in New York City, 1995–2003 // *BJOG.* 2008. V. 115. № 8. P. 969–978.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2008.01763.x>
62. *Atkinson F.S., Foster-Powell K., Brand-Miller J.C.* International tables of glycemic index and glycemic load values: 2008 // *Diabetes. Care.* 2008. V. 31. № 12. P. 2281–2283.
<https://doi.org/10.2337/dc08-1239>

63. *Itan Y., Jones B.L., Ingram C.J. et al.* A worldwide correlation of lactase persistence phenotype and genotypes // *BMC. Evol. Biol.* 2010. V. 10. P. 36–47. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-36>
64. *Ströhle A., Hahn A.* Diets of modern hunter-gatherers vary substantially in their carbohydrate content depending on ecoenvironments: results from an ethnographic analysis // *Nutr. Res.* 2011. V. 31. № 6. P. 429–435. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2011.05.003>
65. *Langer O., Yogev Y., Most O. et al.* Gestational diabetes: the consequences of not treating // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2005. V. 192. № 4. P. 989–997.
66. *Dickinson S., Colagiuri S., Faramus E. et al.* Postprandial hyperglycemia and insulin sensitivity differ among lean young adults of different ethnicities // *J. Nutr.* 2002. V. 132. № 9. P. 2574–2579.
67. *Henry C.J., Lightowler H.J., Newens K. et al.* Glycaemic index of common foods tested in the UK and India // *Br. J. Nutr.* 2008. V. 99. № 4. P. 840–845.
68. *Robillard P.Y., Dekker G., Chaouat G. et al.* Historical evolution of ideas on eclampsia/preeclampsia: A proposed optimistic view of preeclampsia // *J. Reprod. Immunol.* 2017. V. 123. P. 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2017.09.006>
69. *Boeldt D.S., Bird I.M.* Vascular adaptation in pregnancy and endothelial dysfunction in preeclampsia // *J. Endocrinol.* 2017. V. 232. № 1. P. R27–R44.
70. *Gathiram P., Moodley J.* Pre-eclampsia: its pathogenesis and pathophysiology // *Cardiovasc. J. Afr.* 2016. V. 27. № 2. P. 71–78. <https://doi.org/10.5830/CVJA-2016-009>
71. *Tannetta D., Sargent I.* Placental disease and the maternal syndrome of preeclampsia: missing links? // *Curr. Hypertens. Rep.* 2013. V. 15. № 6. P. 590–599. <https://doi.org/10.1007/s11906-013-0395-7>
72. *Ridder A., Giorgione V., Khalil A. et al.* Preeclampsia: The relationship between uterine artery blood flow and trophoblast function // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 13. P. 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms20133263>
73. *Адамян Л.В., Артымук Н.В., Башмакова Н.В. и др.* Клинические рекомендации “Гипертензивные расстройства во время беременности, в родах и послеродовом периоде. Преэклампсия. Эклампсия”. М., 2016. 72 с.
74. *Burton G.J., Redman C.W., Roberts J.M. et al.* Pre-eclampsia: pathophysiology and clinical implications // *BMJ.* 2019. V. 366. № 12381. P. 1–15. <https://doi.org/10.1136/bmj.12381>
75. *Robillard P.Y., Dekker G., Chaouat G. et al.* High incidence of early onset preeclampsia is probably the rule and not the exception worldwide. 20th anniversary of the reunion workshop. A summary // *J. Reprod. Immunol.* 2019. V. 133. P. 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2019.05.003>
76. *Turco M.Y., Moffett A.* Development of the human placenta // *Development.* 2019. V. 146. № 22. P. 1–14. <https://doi.org/10.1242/dev.163428>
77. *Buurma A.J., Turner R.J., Drissen J.H. et al.* Genetic variants in pre-eclampsia: a meta-analysis // *Hum. Reprod. Update.* 2013. V. 19. № 3. P. 289–303. <https://doi.org/10.1093/humupd/dms060>
78. *Staines-Urias E., Paez M.C., Doyle P. et al.* Genetic association studies in pre-eclampsia: systematic meta-analyses and field synopsis // *Int. J. Epidemiol.* 2012. V. 41. № 6. P. 1764–1775. <https://doi.org/10.1093/ije/dys162>
79. *Yang W., Zhu Z., Wang J. et al.* Evaluation of association of maternal IL-10 polymorphisms with risk of preeclampsia by A meta-analysis // *J. Cell. Mol. Med.* 2014. V. 18. № 12. P. 2466–2477. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12434>
80. *Zhang G., Zhao J., Yi J. et al.* Association between gene polymorphisms on chromosome 1 and susceptibility to pre-eclampsia: An updated meta-analysis // *Med. Sci. Monit.* 2016. V. 22. P. 2202–2214.
81. *Zhou L., Cheng L., He Y. et al.* Association of gene polymorphisms of FV, FII, MTHFR, SERPINE1, CTLA4, IL10, and TNFalpha with pre-eclampsia in Chinese women // *Inflamm. Res.* 2016. V. 65. № 9. P. 717–724. <https://doi.org/10.1007/s00011-016-0953-y>
82. *Johnson M.P., Brennecke S.P., East C.E. et al.* Genome-wide association scan identifies a risk locus for preeclampsia on 2q14, near the inhibin, beta B gene // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 3. e33666. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033666>
83. *Williams P.J., Pipkin F.B.* The genetics of pre-eclampsia and other hypertensive disorders of pregnancy // *Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 2011. V. 25. № 4. P. 405–417. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2011.02.007>
84. *Zhao L., Bracken M.B., DeWan A.T.* Genome-wide association study of pre-eclampsia detects novel maternal single nucleotide polymorphisms and copy-number variants in subsets of the Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) study cohort // *Ann. Hum. Genet.* 2013. V. 77. № 4. P. 277–287. <https://doi.org/10.1111/ahg.12021>
85. *Haig D.* Genetic conflicts in human pregnancy // *Q. Rev. Biol.* 1993. V. 68. № 4. P. 495–532.
86. *Pijnenborg R., Vercruyse L., Hanssens M.* Fetal-maternal conflict, trophoblast invasion, preeclampsia, and the red queen // *Hypertens. Pregnancy.* 2008. V. 27. № 2. P. 183–196. <https://doi.org/10.1080/10641950701826711>
87. *Gong J., Savitz D., Stein C. et al.* Maternal ethnicity and preeclampsia in New York city, 1995–2003 // *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* 2012. V. 26. № 1. P. 45–52. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3016.2011.01222.x>
88. *Nakimuli A., Chazara O., Byamugisha J. et al.* Pregnancy, parturition and preeclampsia in women of African ancestry // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2014. V. 210. № 6. P. 510–520. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2013.10.879>

89. *Goffinet F.* Epidemiology // Ann. Fr. Anesth. Reanim. 2010. V. 29. № 3. P. e7–e12.
<https://doi.org/10.1016/j.annfar.2010.02.010>
90. *Steegers E.A., von Dadelszen P., Duvekot J.J. et al.* Preeclampsia // Lancet. 2010. V. 376. № 9741. P. 631–644.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60279-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60279-6)
91. *Xiao J., Shen F., Xue Q. et al.* Is ethnicity a risk factor for developing preeclampsia? An analysis of the prevalence of preeclampsia in China // J. Hum. Hypertens. 2014. V. 28. № 11. P. 694–698.
<https://doi.org/10.1038/jhh.2013.148>
92. *Reyes L., Garcia R., Ruiz S. et al.* Nutritional status among women with pre-eclampsia and healthy pregnant and non-pregnant women in a Latin American country // J. Obstet. Gynaecol. Res. 2012. V. 38. № 3. P. 498–504.
<https://doi.org/10.1111/j.1447-0756.2011.01763.x>
93. *Mol B.W.J., Roberts C.T., Thangaratinam S. et al.* Preeclampsia // Lancet. 2016. V. 387. № 10022. P. 999–1011.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00070-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00070-7)
94. *Brown I.J., Tzoulaki I., Candeias V. et al.* Salt intakes around the world: implications for public health // Int. J. Epidemiol. 2009. V. 38. № 3. P. 791–813.
<https://doi.org/10.1093/ije/dyp139>
95. *Wilson M.J., Lopez M., Vargas M. et al.* Greater uterine artery blood flow during pregnancy in multigenerational (Andean) than shorter-term (European) high-altitude residents // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2007. V. 293. № 3. P. R1313–R1324.
96. *Ahmed S.I.Y., Ibrahim M.E., Khalil E.A.G.* High altitude and pre-eclampsia: Adaptation or protection // Med. Hypotheses. 2017. V. 104. P. 128–132.
<https://doi.org/10.1016/j.mehy.2017.05.007>
97. *Handa V.L., Lockhart M.E., Fielding J.R. et al.* Racial differences in pelvic anatomy by magnetic resonance imaging // Obstet. Gynecol. 2008. V. 111. № 4. P. 914–920.
<https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e318169ce03>
98. *Agius A., Sultana R., Camenzuli C. et al.* An update on the genetics of pre-eclampsia // Minerva. Ginecol. 2017. V. 70. № 4. P. 465–479.
<https://doi.org/10.23736/S0026-4784.17.04150-8>
99. *Robillard P.Y., Hulsey T.C., Dekker G.A. et al.* Preeclampsia and human reproduction. An essay of a long term reflection // J. Reprod. Immunol. 2003. V. 59. № 2. P. 93–100.
100. *Baird J.* Eclampsia in a lowland gorilla // Am. J. Obstet. Gynecol. 1981. V. 141. № 3. P. 345–346.
101. *Thornton J.G., Onwude J.L.* Convulsions in pregnancy in related gorillas // Am. J. Obstet. Gynecol. 1992. V. 167. № 1. P. 240–241.
102. *Stout C., Lemmon W.B.* Glomerular capillary endothelial swelling in a pregnant chimpanzee // Am. J. Obstet. Gynecol. 1969. V. 105. № 2. P. 212–215.
103. *Krugner-Higby L., Luck M., Hartley D. et al.* High-risk pregnancy in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): a case of ectopic, abdominal pregnancy with birth of a live, term infant, and a case of gestational diabetes complicated by pre-eclampsia // J. Med. Primatol. 2009. V. 38. № 4. P. 252–256.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0684.2009.00349.x>
104. *Abrams E.T., Rutherford J.N.* Framing postpartum hemorrhage as a consequence of human placental biology: an evolutionary and comparative perspective // Am. Anthropol. 2011. V. 113. № 3. P. 417–430.
<https://doi.org/10.1111/j.1548-1433.2011.01351.x>
105. *Crosley E.J., Elliot M.G., Christians J.K. et al.* Placental invasion, preeclampsia risk and adaptive molecular evolution at the origin of the great apes: evidence from genome-wide analyses // Placenta. 2013. V. 34. № 2. P. 127–132.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.12.001>
106. *Elliot M.G., Crespi B.J.* Genetic recapitulation of human pre-eclampsia risk during convergent evolution of reduced placental invasiveness in eutherian mammals // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2015. V. 370. № 1663. P. 20140069.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0069>
107. *Vogel P.* The current molecular phylogeny of eutherian mammals challenges previous interpretations of placental evolution // Placenta. 2005. V. 26. № 8–9. P. 591–596.
108. *Carter A.M., Enders A.C.* Comparative aspects of trophoblast development and placentation // Reprod. Biol. Endocrinol. 2004. V. 2. № 46. P. 1–15.
109. *Elliot M., Crespi B.* Phylogenetic evidence for early hemochorial placentation in eutheria // Placenta. 2009. V. 30. № 11. P. 949–967.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.08.004>
110. *Mess A., Carter A.M.* Evolutionary transformations of fetal membrane characters in Eutheria with special reference to Afrotheria // J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol. 2006. V. 306. № 2. P. 140–163.
111. *Cole L.A., Khanlian S.A., Kohorn E.I.* Evolution of the human brain, chorionic gonadotropin and hemochorial implantation of the placenta: insights into origins of pregnancy failures, preeclampsia and choriocarcinoma // J. Reprod. Med. 2008. V. 53. № 8. P. 549–557.
112. *Eisenberg J.F.* The Mammalian Radiations: An Analysis of Trends in Evolution, Adaptation and Behavior. Univ. Chicago Press, 1983. 610 p.
113. *Chaline J.* Increased cranial capacity in hominid evolution and preeclampsia // J. Reprod. Immunol. 2003. V. 59. № 2. P. 137–152.
114. *Robillard P.Y., Dekker G.A., Hulsey T.C.* Evolutionary adaptations to pre-eclampsia/eclampsia in humans: low fecundability rate, loss of oestrus, prohibitions of incest and systematic polyandry // Am. J. Reprod. Immunol. 2002. V. 47. № 2. P. 104–111.
115. *Capellini I., Venditti C., Barton R.* Placentation and maternal investment in mammals // Am. Nat. 2011. V. 177. № 1. P. 86–98.
<https://doi.org/10.1086/657435>
116. *Carter A.M., Pijnenborg R.* Evolution of invasive placentation with special reference to non-human primates. // Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.

2011. V. 25. № 3. P. 249–257.
<https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2010.10.010>
117. *Elliot M., Crespi B.* Placental invasiveness and brain-body allometry in eutherian mammals // *J. Evol. Biol.* 2008. V. 21. № 6. P. 1763–1778.
<https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2008.01590.x>
118. *Martin R.D.* The evolution of human reproduction: a primatological perspective // *Am. J. Phys. Anthropol.* 2007. V. 134. № 45. P. 59–84.
119. *Dunsworth H.M., Warrener A.G., Deacon T. et al.* Metabolic hypothesis for human altriciality // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. № 38. P. 15212–15216.
120. *Pawlowski B.* Why are human newborns so big and fat? // *Hum. Evol.* 1998. V. 13. № 1. P. 65–72.
121. *Cunnane S.C., Crawford M.A.* Survival of the fattest: fat babies were the key to evolution of the large human brain // *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 2003. V. 136. № 1. P. 17–26.
122. *Than N.G., Romero R., Xu Y. et al.* Evolutionary origins of the placental expression of chromosome 19 cluster galectins and their complex dysregulation in pre-eclampsia // *Placenta.* 2014. V. 35. № 11. P. 855–865.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.07.015>
123. *Zadora J., Singh M., Herse F. et al.* Disturbed placental imprinting in preeclampsia leads to altered expression of DLX5, a human-specific early trophoblast marker // *Circulation.* 2017. V. 136. № 19. P. 1824–1839.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028110>
124. *Kaartokallio T., Wang J., Heinonen S. et al.* Exome sequencing in pooled DNA samples to identify maternal pre-eclampsia risk variants // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 1–9.
<https://doi.org/10.1038/srep29085>
125. *Сереброва В.Н.* Эволюционно-генетический анализ роли регуляторных участков генома в формировании структуры наследственной предрасположенности к преэклампсии: Дис. ... канд. мед. наук. Томск, 2018. 258 с.
126. *Сереброва В.Н., Трифонова Е.А., Степанов В.А.* Эволюционно-генетический анализ роли регуляторных участков гена *NDRG1* в формировании структуры наследственной предрасположенности к преэклампсии в популяциях различного этнического происхождения // *Мед. генетика.* 2018. Т. 17. № 1(187). С. 32–36.
127. *Сереброва В.Н., Трифонова Е.А., Степанов В.А.* Эволюционно-генетический анализ роли регуляторных участков гена *CORO2A* в формировании наследственной предрасположенности к преэклампсии у русских и якутов // *Науч. результаты биомед. исследований.* 2018. Т. 4. № 3. С. 38–48.
<https://doi.org/10.18413/2313-8955-2018-4-3-0-4>
128. *Трифорова Е.А., Габидулина Т.В., Ершов Н.И. и др.* Характеристика транскриптома плацентарной ткани у женщин с физиологической беременностью и преэклампсией // *Acta Naturae.* 2014. Т. 6. № 2(21). С. 77–90.
129. *Nishizawa H., Ota S., Suzuki M. et al.* Comparative gene expression profiling of placentas from patients with severe pre-eclampsia and unexplained fetal growth restriction // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2011. V. 9: 107.
<https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-107>
130. *Sitras V., Paulssen R.H., Gronaas H. et al.* Differential placental gene expression in severe preeclampsia // *Placenta.* 2009. V. 30. № 5. P. 424–433.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.01.012>
131. *Loset M., Mundal S.B., Johnson M.P. et al.* A transcriptional profile of the decidua in preeclampsia // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2011. V. 204. № 1. P. 1–27.
<https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.08.043>
132. *Meng T., Chen H., Sun M. et al.* Identification of differential gene expression profiles in placentas from preeclamptic pregnancies versus normal pregnancies by DNA microarrays // *OMICS.* 2012. V. 16. № 6. P. 301–311.
<https://doi.org/10.1089/omi.2011.0066>
133. *Chen B., Nelson D.M., Sadovsky Y.* N-Myc downregulated gene 1 (*NdrG1*) modulates the response of term human trophoblasts to hypoxic injury // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 5. P. 2764–2772.
134. *Louwen F., Muschol-Steinmetz C., Reinhard J. et al.* A lesson for cancer research: placental microarray gene analysis in preeclampsia // *Oncotarget.* 2012. V. 3. № 8. P. 759–773.
135. *Huang W., Ghisletti S., Saijo K. et al.* Coronin 2A mediates actin-dependent de-repression of inflammatory response genes // *Nature.* 2011. V. 470. № 7334. P. 414–418.
<https://doi.org/10.1038/nature09703>
136. *Zhuang B., Luo X., Rao H. et al.* Oxidative stress-induced C/EBP β inhibits β -catenin signaling molecule involving in the pathology of preeclampsia // *Placenta.* 2015. V. 36. № 8. P. 839–846.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.06.016>
137. *Tinel M., Berson A., Elkahwaji J. et al.* Downregulation of cytochromes P450 in growth-stimulated rat hepatocytes: role of c-Myc induction and impaired C/EBP binding to DNA // *J. Hepatol.* 2003. V. 39. № 2. P. 171–178.
138. *Gathiram P., Moodley J.* Pre-eclampsia: its pathogenesis and pathophysiology // *Cardiovasc. J. Afr.* 2016. V. 27. № 2. P. 71–78.
<https://doi.org/10.5830/CVJA-2016-009>
139. *Henn B.M., Cavalli-Sforza L.L., Feldman M.W.* The great human expansion // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. № 44. P. 17758–17764.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1212380109>
140. *Wells J.C.K., Nesse R.M., Sear R. et al.* Evolutionary public health: introducing the concept // *Lancet.* 2017. V. 390. № 10093. P. 500–509.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30572-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30572-X)

Pregnancy as a Factor of Adaptive Human Evolution. The Role of Natural Selection in the Origin of Preeclampsia

V. N. Serebrova^{a,*}, E. A. Trifonova^a, and V. A. Stepanov^a

*^aResearch Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center
of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634050 Russia*

**e-mail: vika.serebrova@medgenetics.ru*

The review discusses data on the significant role of pregnancy in the adaptive evolution of modern humans. In the aspect of evolutionary medicine, the main focus is on severe hypertensive pathology of pregnancy – preeclampsia (PE). In this paper we summarized currently known evolutionary hypotheses about the origin, causes of racial and ethnic variability in the frequency of development of this pathology in human populations. Presented studies which suggesting the contribution of adaptive evolution in the formation of a hereditary predisposition to the development of PE. We demonstrated our results which firstly showed the significant role of negative selection in the formation of the genetic architecture of PE via the regulatory single-nucleotide polymorphisms of the new candidate genes for this pathology.

Keywords: natural selection, adaptive evolution, evolutionary medicine, preeclampsia, placenta.

ИНГИБИТОР АМИЛАЗ *SbAI* ВИДОВ КАРТОФЕЛЯ:
ВАРИАбельНОСТЬ СТРУКТУРЫ И ПРОФИЛЯ ЭКСПРЕССИИ© 2021 г. Е. А. Дьяченко^{1, *}, А. В. Кулакова¹, А. А. Мелешин², А. В. Щенникова¹, Е. З. Кочиева¹¹Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”
Российской академии наук, Москва, 119071 Россия²Всероссийский научно-исследовательский институт картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха,
Московская область, Люберецкий район, п. Красково, 140051 Россия

*e-mail: dyachenko-el@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.02.2020 г.

После доработки 27.04.2020 г.

Принята к публикации 08.07.2020 г.

Деградация крахмала в растениях опосредуется амилазами, активность которых посттрансляционно регулируется ингибиторами. Предполагается, что работа гена ингибитора амилаз *SbAI* связана с устойчивостью картофеля к холодострессу. Изучение возможных корреляций вариативности гена *SbAI* с холодостойкостью видов картофеля позволит повысить степень понимания регуляции метаболизма крахмала в процессе развития растения и его реакции на стресс. В настоящем исследовании идентифицированы полногеномные последовательности гомологов гена *SbAI* у 12 видов картофеля секции *Petota*. Выявлено 36 аллельных вариантов гена и 31 вариант белка. Сопоставление с данными по сортам *Solanum tuberosum* показало, что сортовой полиморфизм в 1.4–1.7 раза превышает межвидовую, однако видам соответствует большее число аллельных вариантов. Филогенетический анализ показал, что аллельные варианты *SbAI* видов *S. demissum*, *S. acaule* и *S. stoloniferum* разнесены по разным кладам. Профиль экспрессии гена *SbAI* определен в различных органах видов *S. tuberosum* (сорт Надежда), *S. rybinii*, *S. chacoense* и *S. kurtzianum*. В листе *S. chacoense* уровень экспрессии гена в 13, 50 и 250 раз выше, чем у *S. tuberosum*, *S. kurtzianum* и *S. rybinii* соответственно. Различный уровень экспрессии *SbAI* в листьях видов может быть следствием разного исходного содержания в листьях как синтезируемого крахмала, так и редуцирующих сахаров. В клубне *S. tuberosum* уровень выше в 5.2, 8.6 и 430 раз, чем у *S. kurtzianum*, *S. chacoense* и *S. rybinii*. В корне *S. rybinii* уровень *SbAI* в 2.4 раза выше, чем у *S. chacoense*, и в 42.3 раза выше, чем у *S. kurtzianum* и *S. tuberosum*. Показано отсутствие корреляции уровня экспрессии *SbAI* с холодостойкостью видов. Полученные данные профиля экспрессии позволяют предположить, что разные виды и сорта картофеля могут по-разному регулировать содержание крахмала в клубнях.

Ключевые слова: дикорастущие клубнеобразующие виды картофеля, ингибитор амилаз *SbAI*, холодостойкость, филогения, экспрессия генов.

DOI: 10.31857/S0016675821010045

Низкие температуры являются одним из наиболее распространенных факторов, запускающих механизмы адаптации или толерантности растений и определяющих географическое распределение и расхождение видов. В процессе холодной акклиматизации в растении значительно изменяются транскриптомные данные и включается биосинтез и накопление различных криопротекторов с одновременным преобразованием состава клеточных мембран [1, 2]. Одна из его самых первых значительных метаболических реакций на холод — накопление растворимых сахаров за счет дегградации крахмала [3]. Сначала происходит фосфорилирование амилопектиновых полимеров на поверхности крахмальных гранул, что повышает их гидрофильность и доступность для гидролитических

ферментов — α -амилаз (AMY, EC 3.2.1.1), β -амилаз (BAM, EC 3.2.1.2) и изоамилаз (EC 3.2.1.68) [3].

Такая важная сельскохозяйственная культура как картофель (*Solanum tuberosum*) является чувствительным к холоду растением: температура ниже нуля может привести к повреждению надземной биомассы и задержке развития. Между метаболизмом крахмала в гетеротрофных клубнях и фотосинтезирующих листьях картофеля есть глубокие различия. В клубнях крахмал накапливается по мере развития и хранится в течение длительного времени, поддерживая энергетические потребности, а после пробуждения клубня активно разлагается, подпитывая рост побегов [4]. В листьях же крахмал синтезируется днем и разлагается ночью, поддерживая

энергоснабжение биологических процессов [4]. В клубнях деградация крахмала опосредуется амилазами: StBAM9 связывается с крахмальным зерном и высвобождает растворимые глюканы, которые гидролизуются в амилопластах с помощью StBAM1 и затем в цитозоле при участии StAmy23 [5–7]. В листьях, в ночной деградации транзитного крахмала активное участие принадлежит β -амилазам и изоамилазам [8]. Несмотря на различия, в регуляции метаболизма крахмала в клубнях и листьях существует много параллелей [4].

Активность амилаз регулируется белковыми ингибиторами на посттрансляционном уровне. Известно, как минимум, шесть классов растительных ингибиторов α -амилаз белковой природы с разной третичной структурой, которые способны связываться с каталитическим центром α -амилазы с помощью водородных связей, блокируя его или изменяя конформацию фермента [9].

Один из классов ингибиторов амилаз – семейство AAI_LTSS (Alpha-Amylase Inhibitors, Lipid Transfer and Seed Storage), играющее важную роль в защите растений от насекомых и патогенов, в транспорте липидов между внутриклеточными мембранами и хранении питательных веществ. Представителем семейства является белок Amylase Inhibitor *Solanum berthaultii* (SbAI, другое название classical arabinogalactan protein (AGP) 4-like) [6], пространственная структура которого (с характерными восемью остатками цистеина, образующими четыре дисульфидных мостика) консервативна для различных видов растений [10] (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=352835>). В базе данных NCBI имеется множество гомологов SbAI, однако информация об их функции крайне ограничена. Для двух отдаленных гомологов показана связь с устойчивостью к тле (PERK10, XP_009766757.1 [11]) и с формированием семян (JAGGER, AGP4, NP_196605.1 [12]). Несмотря на низкий уровень гомологии между SbAI и описанными гомологами, становится понятна важность роли SbAI в развитии растения.

Впервые ген *SbAI*, как следует из его названия, клонирован и охарактеризован у клубнеобразующего вида картофеля *S. berthaultii* [6]. Интересной особенностью белка SbAI оказалась его способность подавлять активность не только α -амилаз, но и β -амилаз: было подтверждено экспериментально, что SbAI взаимодействует с амилазами StAmy23, StBAM1 и StBAM9 [6]. Кроме того, удалось обнаружить положительную корреляцию уровня экспрессии гена *SbAI* в клубнях картофеля с устойчивостью клубней к холодовому осахариванию (cold-induced sweetening, CIS) [6]. Интересно, что имеется также обратная корреляция между уровнем экспрессии *SbAI* и генов амилаз *StAmy23*, *StBAM1* и *StBAM9*, несмотря на то что

взаимодействие ингибитора с амилазами происходит на белковом уровне [6].

Повышение содержания редуцирующих сахаров является сигналом к росту активности SbAI и подавлению активности амилаз. Ответ SbAI на сахара, а также на низкие температуры в значительной степени зависит от генотипа картофеля. Кроме *S. berthaultii*, имеется огромное разнообразие видов и сортов картофеля, различающихся по степени холодо- и CIS-устойчивости и особенностям метаболизма крахмала. Однако информация об ортологах SbAI крайне мало.

Поэтому целью данной работы стала оценка вариабельности ингибитора амилаз SbAI у клубнеобразующих видов картофеля (род *Solanum*, секция Petota) и поиск возможных корреляций полиморфизма и профиля экспрессии гена с характеристиками вида. Для этого были впервые идентифицированы полногеномные последовательности гомологов гена *SbAI* дикорастущих и примитивных культурных видов картофеля, охарактеризованы их структура, филогения, аллельная вариабельность и аминокислотный полиморфизм кодируемых белков, определены профили экспрессии гена в различных органах анализируемых образцов картофеля.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. Образцы 12 дикорастущих клубнеобразующих видов картофеля секции Petota и сорта Надежда *S. tuberosum* (табл. 1) выращивали в 2019 г. при нормальных температурных условиях (23/25°C, 16/8 ч – день/ночь, теплица). Из молодых листьев выделяли геномную ДНК калий-ацетатным методом [13] для идентификации полногеномных последовательностей гомологов гена *SbAI*. В сентябре 2019 г. были собраны ткани (лист, стебель, бутон, цветок, стolon, корень, клубень) для выделения РНК и анализа профиля экспрессии идентифицированных гомологов гена *SbAI*.

Идентификация гомологов гена *SbAI*. Геномную ДНК растений использовали для амплификации полногеномных последовательностей гомологов гена *SbAI* с помощью ПЦР с праймерами SbaI_F/SbaI_R (табл. 2; [14]). Фрагменты ожидаемой длины (около 2 тыс. пн) вырезали из геля (Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit, Zymo Research, США), клонировали (Quick-TA Kit; Евроген, РФ) и секвенировали (по 3–5 клонов каждого вида) с дополнительными праймерами (табл. 2; [14]) на автоматическом секвенаторе ABI 310 Capillary DNA Analyzer (Applied Biosystems, США; ЦКП “Биоинженерия” РАН).

Структура и филогения гомологов гена *SbAI* и кодируемых ими белков. Структуру, вариабельность и филогению полученных последователь-

Таблица 1. Характеристики гомологов *SbAI* у видов картофеля и томата

Вид	Каталожный номер/ NCBI ID	Плоидность; W/C*, **	CR*	Аллели – ген/белок	Ген, пн	кДНК, пн	Белок, а.о.	Замещения/индели, а.о.	
								список	количество
<i>Solanum ascaule</i> Bitter	ВИР 9784/ MT074624–MT074626	4X/6X; W (clades 4, 3)	++	1/1	1817	630	209	S94P ; A133T; A136P; E163A; A205V	5/0
				2/2	1868	618	205	V15G ; P130S ; E163V; F192L/T135_P138del	4/1
	31–2012/ MT074627–MT074629			3/3	1868	618	205	V15G ; G67A; E163V; F192L/T135_P138del	4/1
				4/4	1868	618	205	V15G ; R63I ; E163V; F192L/T135_P138del	4/1
<i>Solanum rybinii</i> Juz & Bukasov (= <i>Solanum</i> <i>tuberosum</i> subsp. <i>andigenum</i>)	9342/ MT074630–MT074632	4X; C (4 cultivated)	+	5/5	1818	630	209	A133T; A136P; E163A; N172S; A205V	5/0
				6/6	1867	618	205	M149V; E163V; F192L/T135_P138del	3/1
	ВИР 24267/ MT074633–MT074636	2X; W (4 south; 4B)	–	7/7	1763	618	205	S78T; E163V/T135_P138del	2/1
				8/8	1763	618	205	S78T; E163V; A196V/T135_P138del	3/1
<i>Solanum</i> <i>berthaultii</i> Hawkes	3678/ MT074637–MT074638	2X; W (4 south)	+	9/9	1807	630	209	A136P; E163V	2/0
				10/10	1803	627	208	A136P; E163V/S137del	2/1
				11/11	1811	630	209	T123R; A136P; E163V	3/0
<i>Solanum</i> <i>chacoense</i> Bitter	15176/34/ MT074639–MT074640	6X; W (4 south, 3)	+	12/12	1801	627	208	V15G ; A136P; E163V/S137del	3/1
				13/13	1802	630	209	A136P; E163V; M207I	3/0
				14/14	1781	621	206	A136P; A152T; E163V; P179S; A196V; F197L; M207I/G202_I204del	7/1
				15/15	1781	621	206	P86A ; A136P; A152T; E163V; P179S; A196V; F197L; M207I/G202_I204del	8/1
<i>Solanum</i> <i>demissum</i> Lindl.				16/16	1822	630	209	A133T; A136P; E163A; A205V	4/0
				17/17	1858	609	202	V15G ; E163V/T135_P138del; G202_I204del	2/2

Таблица 1. Продолжение

Вид	Каталожный номер/ NCBI ID	Плодность; W/C*. **	CR*	Аллели – ген/белок	Ген, пн	кДНК, пн	Белок, а.о.	Замещения/индели, а.о.	
								список	количество
<i>Solanum gourlayi</i> (= <i>Solanum brevistipule</i> Bitter)	GB 18038/ MT074641–MT074642	2X/4X; W (4 south)	+	18/9	1796	630	209	A136P; E163V	2/0
				19/18	1869	630	209	A136P; E163V; P179S	3/0
<i>Solanum jamesii</i> Torr.	ВИР 15203/ MT074643–MT074644	2X; W (1 + 2)	–	20/19	1808	618	205	A17V; T53A; E163V; P179S; T1811/T135_P138del	5/1
				21/19	1813	618	205	A17V; T53A; E163V; P179S; T1811/T135_P138del	5/1
<i>Solanum kurtzianum</i> Bitter & Wittm.	ВИР 11969/ MT074645–MT074646	2X; W (4 south)	+	22/18	1788	630	209	A136P; E163V; P179S	3/0
				23/20	1788	630	209	T64A; A136P; E163V; P179S; G189S	5/0
<i>Solanum stoloniferum</i> Schltdl. & Bouchet	ВИР 12483/ MT074647–MT074648	4X; W (1 + 2, 3, 4 south)	–	24/21	1795	630	209	A136P; E163V; P179S; F201V	4/0
				25/18	1795	630	209	A136P; E163V; P179S	3/0
<i>Solanum stoloniferum</i> Schltdl. & Bouchet	ВИР 21618/ MT074649–MT074651	4X; W (1 + 2, 3, 4 south)	–	26/22	1857	642	213	T53A; E124K; T135S; E163V; P179S/P138_S139insTSAP	5/1
				27/23	1805	630	209	A136P; E163V	2/0
<i>Solanum suscrense</i> Hawkes	ВИР 23598/ MT074652–MT074653	4X; W (4 B)	–	28/24	1858	642	213	T53A; T135S; E163V; P179S/P138_S139insTSAP	4/1
				29/25	1797	621	206	L350 ; A136P; A152T; E163V; P179S; A196V; F197L; M2071/G202_I204del	8/1
<i>Solanum suscrense</i> Hawkes	ВИР 23598/ MT074652–MT074653	4X; W (4 B)	–	30/26	1797	621	206	A2D; Q84H; A136P; A152T; E163V; P179S; A196V; F197L; M2071/G202_I204del	9/1

Таблица 1. Окончание

Вид	Каталожный номер/ NCBI ID	Плоидность; W/C*. **	CR*	Аллели – ген/белок	Ген, пн	кДНК, пн	Белок, а.о.	Замещения/индели, а.о.	
								список	количество
<i>Solanum vertei</i> Bitter & Wittm.	ВИР 20332/ MT074654–MT074656	2X; W (4 south; 4B)	++	31/27	1779	621	206	A136P; A152T; E163V; P179S; A196V; F197L; M2071/G202_I204del	7/1
				32/28	1781	621	206	H4R; S46T; C74W ; T92A; A136P; A152T; E163V; P179S; N180Y; M2071/G202_I204del	10/1
				33/29	1777	621	206	S46T; G57D; A136P; A152T; E163V; P179S; A196V; F197L; M2071/G202_I204del	9/1
<i>Solanum verrucosum</i> Schtdl.	ВИР 24467/ MT074657–MT074659	2X; W (4 south; 4B)	+	34/30	1805	630	209	A136P; E163V; F201L	3/0
				35/31	1805	630	209	T27A; A136P; E163V; A185T; F201L	5/0
				36/30	1805	630	209	A136P; E163V; F201L	3/0
<i>Solanum tuberosum</i>	GeneID: 102591697 NW_006239139.1 (302246...304341)***	cv. DM 1-3 516 R44	Нет данных	–	1848	630	209	–	
<i>Solanum lycopersicum</i>	Gene ID: 101255064 NC_015440.3 (122217..124105)***	cv. Heinz 1706	Нет данных	–	1670	627	208	T53A; S78T; M93L; T112S; P113V; S132P; A133S; T135S; A136P; A145P; A152T; E163V; F192L; I198S; F201V; A205V; F206V; M207L; L208V/Y209del	19/1
<i>Solanum pennellii</i>	Gene ID: 107012074 NC_028639.1 (120187..122094)***	LA0716	Нет данных	–	1706	627	208	T53A; S78T; M93L; T112S; P113A; S132P; T135S; A136P; A145P; A152T; E163V; F192L; A205V; F206V; M207L; L208V/Y209del	16/1

Примечание. * [17]; ** [23–25]; *** согласно GenBank NCBI. CR – cold resistance (холодоустойчивость). W – дикорастище, C – культивируемые. Замещения приведены в сравнении с гомологом SbAl *Solanum tuberosum* cv. DM 1-3 516 R44. Радикальные замещения выделены полужирным шрифтом и подчеркнуты.

Таблица 2. Список праймеров, использованных в работе

Название	Последовательность (5' → 3')	Назначение
SbAIrtF	TTGTAACATGGCTCGCGTTC	РВ-ПЦР (<i>SbAI</i>) [18]
SbAIrtR	TGTTGGTGAAGCACTTGGAG	
ef1αF	ATTGGAACCGGATATGCTCCA	РВ-ПЦР (<i>ef1α</i>) [19]
ef1αR	TCCTTACCTGAACGCCTGTCA	
sec3F	GCTTGCACACGCCATATCAAT	РВ-ПЦР (<i>sec3</i>) [20]
sec3R	TGGATTTTACCACCTTCCGCA	
SbaI_F	АСТАТGGCTTTTCAТТАCTCTA	Аmplификация полногеномной последовательности гомологов <i>SbAI</i> ; секвенирование [14]
SbaI_R	TTACATCAAAGAATAGTTGTATAAC	
SbaI_in1R	TCTGTGAGAATAGTCTCTTGC	Секвенирование гомологов <i>SbAI</i> [14]
SbaI_ex1F	GTAACATGGCTCGCGTTC	
SbaI_ex3F	AACAGAGGCTCCAAGTGC	
SbaI_in3R	GGATAGTTTGTGCAACATAACTT	

ностей анализировали с помощью пакета программ MEGA 7.0 [15]. Возможное влияние замещений аминокислотных остатков на структуру гомологов *SbAI* оценивали с использованием программы PROVEAN (<http://provean.jcvi.org/index.php>) [16]. Пространственную структуру белков-гомологов *SbAI* предсказывали с помощью Phyre2 [17].

Профили экспрессии гомологов *SbAI*. Препараты суммарной РНК выделяли (RNeasy Plant Mini Kit; Qiagen, Германия) из листа, стебля, бутона, цветка, столона, корня и клубня образцов четырех видов картофеля (включая сорт Надежда *S. tuberosum*) и использовали для синтеза кДНК (GoScript; Promega, США). Анализ профиля экспрессии гомологов *SbAI* проводили методом количественной ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР) в трех технических повторах. Для этого применяли ранее разработанные праймеры SbAIrtF/SbAIrtR (табл. 2; [18]), набор “Реакционная смесь для проведения РВ-ПЦР в присутствии SYBR GreenI и ROX” (ЗАО Синтол, Россия) и следующие условия: 95°C – 5 мин; 40 циклов (95°C – 15 с, 60°C – 50 с). Для нормализации экспрессии использовали референсные гены *EF1α* и *SEC3* и праймеры к ним (табл. 2; [19, 20]). Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPadPrism v. 7.02 (<https://www.graphpad.com>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация и структурный анализ генов-гомологов *SbAI* у видов картофеля

Были идентифицированы (амплифицированы, клонированы, секвенированы) полногеномные последовательности гомологов гена *SbAI* у образцов 12 видов картофеля (табл. 1). Гомологи имели характерную для *SbAI* четырехэкзонную

структуру, однако различались по общей длине (от 1763 пн у *S. tuberosum* ssp. *andigenum* до 1869 пн у *S. gourlay*) и по размеру кДНК (от 609 пн у *S. demissum* до 642 пн у *S. stoloniferum*) (табл. 1). По сравнению со *SbAI S. tuberosum* cv. DM 1–3 516 R44 (Gene ID: 102591697; далее использовался как референс при сравнениях) варибельность полногеномных последовательностей идентифицированных гомологов составила 19.3% (381 SNPs), а кДНК – 12.6% (82 SNPs) (табл. 1).

Кодируемые белки *SbAI* характеризовались наличием консервативных для AAI_LTSS-семейства доменов LTP_2 (в позиции 16–102 а.о. – у всех) и PRK14971 superfamily (в позиции 77–189 а.о. по *SbAI S. tuberosum* cv. DM 1–3 516 R44; 77–196 а.о. по выравниванию). Около 13–14% последовательности каждого белка составляли остатки пролина, что подтверждает принадлежность гомологов к AGP-семейству Про-обогащенных белков. Также это свидетельствует о высокой способности *SbAI* взаимодействовать с другими белками, как это было показано ранее для Про-обогащенных мотивов [21]. Также все исследуемые гомологи содержали консенсусные для AAI_LTSS-белков восемь остатков цистеина, формирующих дисульфидные мостики, в позициях 30, 41, 58, 59, 72, 74, 99 и 108 (соответствует домену LTP_2).

Третичные структуры всех анализируемых гомологов *SbAI* были предсказаны с помощью Phyre2 на основе известных матриц (PDB ID c2rknA “x-ray structure of the self-defense and signaling protein DIR1 from *Arabidopsis thaliana*” и c2ljoA “3d solution structure of lipid transfer protein lc-ltp2”). С достоверностью >90% были моделированы 38–40% аминокислотных остатков (~30–107 а.о., что соответствует домену LTP_2), остальные – *ab initio*. Около 60% последовательности, куда полностью входит домен PRK14971, имеет неупорядоченную структуру, вследствие чего достоверные предска-

зания вторичной структуры данной области отсутствуют. Домен LTP_2 укладывается в пучок из четырех—пяти спиралей, стабилизированных четырьмя дисульфидными мостиками. Сравнение анализируемых белков с известной структурой мембранных белков (PDBID sc6thA_, “membrane protein, syndecan-2”) позволило предсказать наличие на С-конце всех гомологов SbAI трансмембранной спирали (~189–207 а.о.), важной для передачи сигнала через клеточную мембрану. Показанное структурное соответствие анализируемых гомологов SbAI указывает на высокую вероятность сходства их функций у разных видов картофеля.

Гомологи SbAI 12 анализируемых видов картофеля содержали 41 замещение аминокислотных остатков (а.о.; 19.25% от выравненной длины 213 а.о.), одну нейтральную вставку (P138_S139insTSAP) и три нейтральные делеции (T135_P138del, S137del и G202_I204del) (табл. 1). Радикальных замещений а.о. было найдено всего семь, и все они (а также вставка и первые две делеции) локализовались в консервативных доменах. Больше всего замещений (включая радикальные) содержали гомологи SbAI образцов видов *S. acaule*, *S. sucreuse*, *S. vernei* и *S. chacoense*. По одному радикальному замещению имели также некоторые варианты SbAI *S. berthaultii* и *S. demissum*. Интересно, что гомологи SbAI видов томата имели в 2–10 раз больше замещений а.о. в сравнении с *S. tuberosum*, однако все они носили нейтральный характер (табл. 1).

Всего было выявлено 36 аллельных вариантов гена и 31 вариант белка (табл. 1). Наибольшее число аллельных вариантов соответствовало видам *S. acaule*, *S. berthaultii* и *S. kurtzianum*. Какая-либо корреляция количества вариантов с пloidностью анализируемых видов отсутствовала. Так, у гексаплоида *S. demissum* вариантов оказалось меньше, чем у диплоида *S. berthaultii* (табл. 1).

Мы сравнили полученные результаты с данными по ранее идентифицированным и охарактеризованным последовательностям гомологов гена *SbAI* у отечественных и зарубежных сортов и линий картофеля *S. tuberosum* [14]. Оказалось, что общий и экзонный полиморфизм сортовых последовательностей (27.0 и 21.3% соответственно) [14] в 1.4–1.7 раза превышает выявленную в настоящем исследовании межвидовую вариабельность. Однако для видов было идентифицировано большее число (~1.5 раза) аллельных вариантов, чем для сортов (36 сортам соответствовали 70 аллельных вариантов гена и 69 — белка [14]).

Дикорастущий картофель достаточно давно используется в селекционных программах, и в родословных большинства сортов можно найти, как минимум, один из шести видов (*S. demissum*, *S. acaule*, *S. chacoense*, *S. stoloniferum*, *S. vernei* и *S. spagazzinii*), которые являются донорами при-

знаков устойчивости к различным биотическим и абиотическим стрессовым факторам; прочие виды картофеля (*S. verrucosum* и другие) в сортах встречаются реже [22]. Большая вариабельность *SbAI* у сортов, чем у видов, может быть связана с тем, что родословная сорта включает больше одного, а часто и несколько видов картофеля.

Филогенетика полногеномных последовательностей гомологов *SbAI* видов картофеля

Чтобы оценить степень родства видов и сортов картофеля, был проведен филогенетический анализ полногеномных последовательностей соответствующих гомологов *SbAI*; в качестве внешней группы использовали *SbAI* видов томата *S. lycopersicum* и *S. pennellii* (рис. 1).

На дендрограмме произошло разделение сортов и видов картофеля на несколько клад. Выделилась группа из четырех аллельных вариантов *S. acaule* и одного *S. demissum*, тогда как оставшиеся аллельные варианты данных видов объединились в другую группу внутри соседнего большого кластера (рис. 1). Кроме этой группы кластер содержит клады, состоящие: 1) из трех подкластеров, объединяющих аллели нескольких сортов/линий (Голубизна, Браво, Горняк, Старт, Ирбитский, Фаворит, Арлекин, Крепыш и 3-43-6) и видов (*S. berthaultii*, *S. gourlay*, *S. tuberosum* subsp. *andigenum*, *S. stoloniferum* и *S. verrucosum*); 2) из аллелей одних только видов (*S. sucreuse*, *S. vernei*, *S. tuberosum* и *S. chacoense*); 3) из четырех аллелей *S. kurtzianum*; 4) из двух аллелей subsp. *andigenum* и аллеля сорта Фиолетовый; 5) из аллелей трех видов (*S. gourlay*, *S. jamesii* и *S. stoloniferum*) и сортов/линий (3-43-6, Крепыш, Фиолетовый и Кузнечанка) (рис. 1).

Таким образом, выявленные аллельные варианты пяти видов (*S. acaule*, *S. demissum*, subsp. *andigenum*, *S. gourlay* и *S. stoloniferum*), а также аллели одной линии (3-43-6) и двух сортов (Фиолетовый и Крепыш) оказались разнесены по разнымкладам. Варианты *SbAI* семи из 11 взятых в анализ сортов составляют единый подкластер, тогда как остальные сорта попадают в кластеры, образованные аллельными вариантами видов.

Ранее было показано, что филогенетически виды картофеля делятся на три клады (“clade 1 + 2”, “clade 3” и “clade 4”), где “clade 4” делится на подклады “4 south”, “4 north” и “4 cultivated”, или же на “4A” и “4B” [23–25]. При этом аллельные варианты одного вида могут попадать в разные клады [23]. Обнаруженный в нашем исследовании разброс аллельных вариантов *S. acaule* и *S. demissum* по разнымкладам подтверждает показанный ранее сложный состав аллелей этих двух видов. Считается, что аллели *S. acaule* и *S. demissum* в основном принадлежат кладе 4, однако оба вида

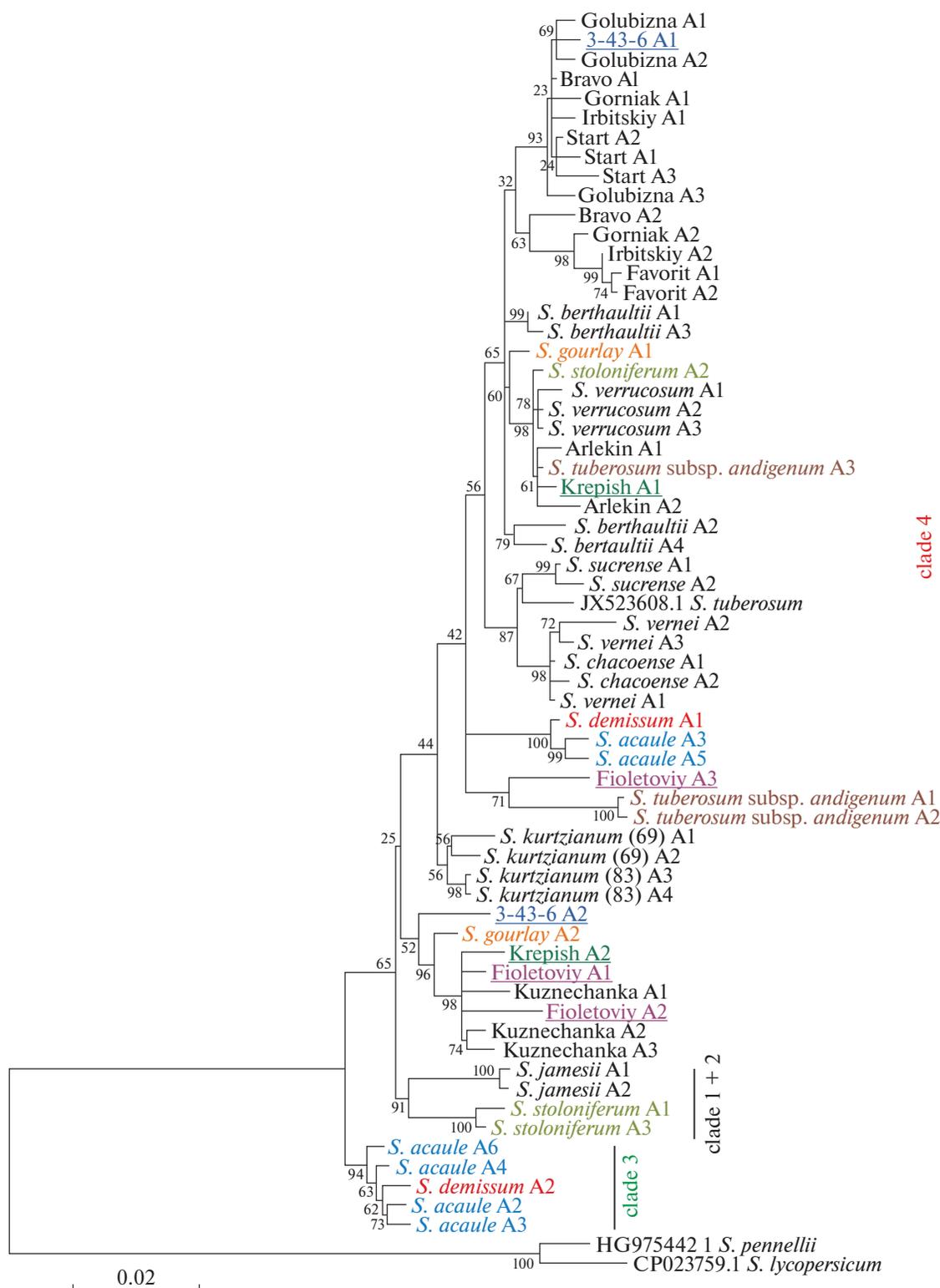


Рис. 1. Филогенетическая дендрограмма видов и сортов картофеля, основанная на полногеномной последовательности гомологов гена *SbAI*. Построена в MEGA 7.0, с использованием метода максимального правдоподобия (Maximum Likelihood), модели Tamura 3 и 1000 бутстрэп-реплик. Гомологи *SbAI Solanum lycopersicum* и *Solanum pennellii* использованы в качестве внешней группы. Используются аллельные варианты 10 сортов *S. tuberosum* (Голубизна, Крепыш, Bravo, Фиолетовый, Ирбитский, Фаворит, Старт, Горняк, Арлекин и Кузнечанка; на дендрограмме названия даны в латинской транслитерации) и линия 3-43-6. “А” после названия вида/сорта обозначает аллельный вариант. Значения бутстрэп указаны в узлах.

имеют хотя бы по одному аллелю клады 3 [23]. В нашем же случае два аллельных варианта *S. demissum* распределились поровну между кладами 3 и 4, а вот из шести аллелей *S. acaule* четыре попали в кладу 3 и только два в кладу 4 (рис. 1). У еще одного вида со сложным составом аллелей — *S. stoloniferum* один из трех аллелей *SbAI* оказался в кладе 4, а два других объединились в одну группу с аллелями *S. jamesii* (рис. 1), который принадлежит кладе 1 + 2. Это подтверждает выявленное ранее присутствие у *S. stoloniferum* аллелей клады 1 + 2 [23]. Показанное распределение аллельных вариантов линии 3-43-6 и сортов Фиолетовый и Крепыш по отдаленным кластерам дендрограммы может отражать комплексную родословную образцов, связанную со сложными межвидовыми скрещиваниями.

Вариабельность профиля экспрессии гомологов гена *SbAI* видов картофеля

Для сравнительного анализа экспрессии гена *SbAI* были выбраны образцы клубнеобразующих видов секции *Petota* — *S. tuberosum* (сорт Надежда в качестве контроля), *S. rybinii* (= *S. tuberosum* subsp. *andigenum*, клада 4B) и двух дикорастущих видов *S. chacoense* и *S. kurtzianum* (клада 4 south) [22].

Предварительно профиль экспрессии гена *SbAI* был определен в ряде органов *S. tuberosum*. В не запасующих вегетативных органах (стебле, листе, бутоне, цветке и корне) наблюдался низкий уровень транскрипции гена, тогда как в клубне транскрипция резко усиливалась (рис. 2). Значительный рост экспрессии гена в запасующих органах в сравнении с другими вегетативными тканями свидетельствует об участии *SbAI* в предохранении резервного крахмала клубня от гидролиза.

С учетом полученных результатов экспрессию *SbAI* у трех выбранных видов *S. rybinii*, *S. chacoense* и *S. kurtzianum* определяли в листе (фотосинтезирующий орган), корне и stolone (подземные не запасующие органы), а также в клубне (подземный запасующий орган). Транскрипты гена были выявлены во всех анализируемых органах всех образцов с относительным уровнем транскрипции в интервале 0.00025–0.3 (рис. 2), что соответствовало ранее определенному профилю экспрессии *SbAI* у двух сортов картофеля [5].

Транскрипция *SbAI* *S. kurtzianum* повторяла профиль *SbAI* *S. tuberosum*, за исключением менее выраженного роста уровня транскрипции *SbAI* в клубнях, в то время как *S. rybinii* и *S. chacoense* имели другие профили экспрессии гена (рис. 2).

Согласно суточной динамике метаболизма крахмала в листьях, днем (когда собирали листья образцов на анализ) должен происходить интенсивный синтез и накопление крахмала [26], и в данной ткани ожидался повышенный уровень

экспрессии *SbAI*. Однако в листьях анализируемых образцов транскрипция носила следовый характер, за исключением *S. chacoense*, где уровень экспрессии гена был выше в 13, 50 и 250 раз, чем у *S. tuberosum*, *S. kurtzianum* и *S. rybinii* соответственно (рис. 2). Известно, что виды *S. rybinii*, *S. chacoense*, *S. kurtzianum*, а также сорт Надежда (взятый как представитель *S. tuberosum*) обладают хорошей устойчивостью к низким температурам [22]. Поэтому корреляции уровня экспрессии *SbAI* в листе с холодостойкостью образцов не отмечено.

В этой связи интересны данные о разной реакции двух сортов картофеля на холодной стресс: в листьях *Desiree* экспрессия генов деградации крахмала росла с одновременным накоплением редуцирующих сахаров, в то время как у *Russet-Burbank* данные характеристики почти не менялись [3]. Это позволило заключить, что активация гидролиза крахмала зависит не только от понижения температуры, но и от содержания редуцирующих сахаров при нормальных условиях: в листьях *Russet Burbank* моносахаридов исходно было достаточно, чтобы, не повышая их концентрации, перенести охлаждение [3]. Более того, на примере пяти видов картофеля была показана корреляция между исходным количеством крахмала и степенью роста экспрессии *SbAI* в листе в ответ на холодной стресс [18].

Поэтому различный уровень экспрессии гена ингибитора амилаз *SbAI* в листьях анализируемых видов может быть следствием разного исходного содержания в листьях как синтезируемого крахмала, так и редуцирующих сахаров.

Интересно, что при нормальных условиях уровень экспрессии *SbAI* в листьях никак не коррелирует со степенью устойчивости клубней к холодному осахариванию. Так, ранее было показано, что в листьях чувствительного и устойчивого к CIS сортов картофеля ген ингибитора амилаз экспрессируется на одинаковом уровне [5]. Однако в клубнях *SbAI* транскрибируется высоко у CIS-чувствительного сорта и низко у CIS-устойчивого [5].

В настоящей работе самая высокая экспрессия *SbAI* в клубне была у *S. tuberosum* — выше в 5.2, 8.6 и 430 раз, чем у *S. kurtzianum*, *S. chacoense* и *S. rybinii* соответственно (рис. 2). Это может свидетельствовать о меньшей подверженности клубней образцов *S. tuberosum* и *S. kurtzianum* холодному осахариванию.

В случае корня и stolона ситуация различалась. Так, *S. rybinii* с минимальной экспрессией *SbAI* в клубне показал самый высокий уровень транскрипции в корне — в 2.4 раза выше, чем у *S. chacoense*, и в целых 42.3 раза выше, чем у *S. kurtzianum* и *S. tuberosum* (рис. 2).

Полученные данные профиля экспрессии “корень—stolon—клубень” позволяют предположить, что разные виды и сорта картофеля могут

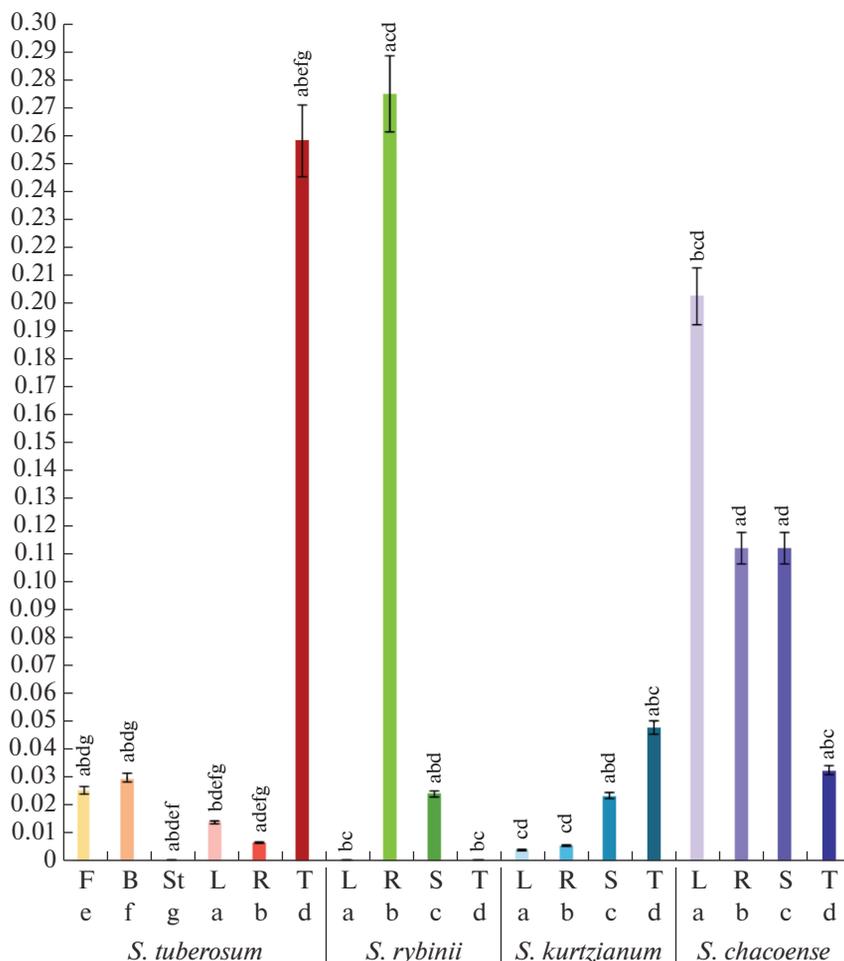


Рис. 2. Профиль экспрессии гена ингибитора амилаз *SbAI* в различных органах (стебель – St, лист – L, бутон – B, цветок – F, корень – R, стolon – S, клубень – T) образцов четырех видов картофеля: *Solanum tuberosum* (сорт Надежда), *Solanum kurtzianum*, *Solanum chacoense*, *Solanum rybinii*. Буквами над столбиками указаны достоверные различия ($P < 0.01$) в уровне экспрессии *SbAI* между отдельными органами внутри одного вида. Каждому органу присвоено свое буквенное обозначение (a–g). Например, для *S. tuberosum* экспрессия в цветке (e) достоверно отличается от экспрессии в листе (a), корне (b), клубне (d) и стебле (g), соответственно над столбиком abcdg.

по-разному регулировать содержание крахмала в клубнях: одни предупреждают его распад, ингибируя активность амилаз уже в корнях и столонах; другие – останавливают деградацию крахмала непосредственно в запасующих органах.

Представленные результаты свидетельствуют о том, что говорить о корреляции непосредственно между уровнем экспрессии гена ингибитора амилаз и холодоустойчивостью или CIS-устойчивостью растения картофеля пока преждевременно. Для корректных заключений необходимо учитывать исходные (предстрессовые) транскриптомные, протеомные и биохимические данные каждого конкретного генотипа в нормальных условиях развития.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 17-29-08017) и ФНТП развития сельского хозяйства РФ на 2017–2025 гг. (подпрограмма

“Развитие селекции и семеноводства картофеля в Российской Федерации”). Растения выращивали с использованием экспериментальной установки искусственного климата ЭУИК (Институт биотехнологии ФИЦ Биотехнологии РАН).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dametto A., Sperotto R.A., Adamski J.M. et al. Cold tolerance in rice germinating seeds revealed by deep RNAseq analysis of contrasting indica genotypes // Plant Sci. 2015. V. 238. P. 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.05.009>
2. Leuendorf J.E., Frank M., Schmülling T. Acclimation, priming and memory in the response of *Arabidopsis thaliana* seedlings to cold stress // Sci. Rep. 2020. V. 10. № 1. Article 689. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56797-x>

3. *Sitnicka D., Orzechowski S.* Cold-induced starch degradation in potato leaves – intercultivar differences in the gene expression and activity of key enzymes // *Biol. Plantarum*. 2014. V. 58. № 4. P. 659–666. <https://doi.org/10.1007/s10535-014-0453-2>
4. *Van Harsseelaar J.K., Lorenz J., Senning M. et al.* Genome-wide analysis of starch metabolism genes in potato (*Solanum tuberosum* L.) // *BMC Genomics*. 2017. V. 18. № 1. Article 37. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3381-z>
5. *Zhang H., Hou J., Liu J. et al.* Amylase analysis in potato starch degradation during cold storage and sprouting // *Potato Res.* 2014. V. 57. P. 47–58. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.124991>
6. *Zhang H., Liu J., Hou J. et al.* The potato amylase inhibitor gene *SbAI* regulates cold-induced sweetening in potato tubers by modulating amylase activity // *Plant Biotech. J.* 2014. V. 12. № 7. P. 984–993. <https://doi.org/10.1111/pbi.12221>
7. *Hou J., Zhang H., Liu J. et al.* Amylases StAmy23, StBAM1 and StBAM9 regulate cold-induced sweetening of potato tubers in distinct ways // *J. Exp. Bot.* 2017. V. 68. № 9. P. 2317–2331. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx076>
8. *Møller M.S., Svensson B.* Structural biology of starch-degrading enzymes and their regulation // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2016. V. 40. P. 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.07.006>
9. *Wang Z., Chen M., Zhang Y. et al.* A cupin domain is involved in α -amylase inhibitory activity // *Plant Sci.* 2018. V. 277. P. 285–295. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.10.001>
10. *Lay F., Anderson M.* Defensins-components of the innate immune system in plants // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2005. V. 6. P. 85–101. <https://doi.org/10.2174/1389203053027575>
11. *Liang D., Chen M., Qi X. et al.* QTL mapping by SLAF-seq and expression analysis of candidate genes for aphid resistance in cucumber // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7. Article 1000. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01000>
12. *Pereira A.M., Nobre M.S., Pinto S.C. et al.* “Love is strong, and you’re so sweet”: JAGGER is essential for persistent synergiddegeneration and polytubeyblock in *Arabidopsis thaliana* // *Mol. Plant.* 2016. V. 9. № 4. P. 601–614. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.01.002>
13. *Дьяченко Е.А., Слугина М.А.* Внутривидовой полиморфизм гена сахарозсинтазы *Sus1* у образцов *Pisum sativum* L. // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2018. Т. 22. № 1. С. 108–114. <https://doi.org/10.18699/VJ18.338>
14. *Дьяченко Е.А., Кулакова А.В., Мелешин А.А., Кочива Е.З.* Аллельная вариабельность гена ингибитора амилаз *AI* у сортов и линий картофеля // С.-х. биология. 2019. Т. 54. № 5. С. 970–977. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2019.5.970rus>
15. *Kumar S., Stecher G., Tamura K.* MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets // *Mol. Biol. Evol.* 2016. V. 33. № 7. P. 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
16. *Choi Y., Sims G.E., Murphy S. et al.* Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 10. Article e46688. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046688>
17. *Kelley L.A., Mezulis S., Yates C.M. et al.* The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis // *Nat. Prot.* 2015. V. 10. P. 845–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>
18. *Слугина М.А., Филюшин М.А., Мелешин А.А. и др.* Различия в экспрессии гена ингибитора амилаз *SbAI* при длительном низкотемпературном хранении клубней и кратковременном холодовом стрессе у картофеля // Генетика. 2020. Т. 56. № 3. С. 361–365. <https://doi.org/10.1134/S1022795420030163>
19. *Lopez-Pardo R., de Galarreta J.I.R., Ritter E.* Selection of housekeeping genes for qRT-PCR analysis in potato tubers under cold stress // *Mol. Breed.* 2013. V. 31. № 1. P. 39–45. <https://doi.org/10.1007/s11032-012-9766-z>
20. *Tang X., Zhang N., Si H., Calderón-Urrea A.* Selection and validation of reference genes for RT-qPCR analysis in potato under abiotic stress // *Plant Methods*. 2017. V. 13. Article 85. <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0238-7>
21. *Williamson M.P.* The structure and function of proline-rich regions in proteins // *Biochem. J.* 1994. V. 297. P. 249–260. <https://doi.org/10.1042/bj2970249>
22. *Machida-Hirano R.* Diversity of potato genetic resources // *Breed Sci.* 2015. V. 65. № 1. P. 26–40. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.65.26>
23. *Cai D., Rodríguez F., Teng Y. et al.* Single copy nuclear gene analysis of polyploidy in wild potatoes (*Solanum* section *Petota*) // *BMC Evol. Biol.* 2012. V. 12. Article 70. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-70>
24. *Huang B., Ruess H., Liang Q. et al.* Analyses of 202 plastid genomes elucidate the phylogeny of *Solanum* section *Petota* // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. Article 4454. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40790-5>
25. *Rodríguez F., Ghislain M., Clausen A.M. et al.* Hybrid origins of cultivated potatoes // *Theor. Appl. Genet.* 2010. V. 121. № 6. P. 1187–1198. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1422-6>
26. *Zeeman S.C., Smith M.C., Smith A.M.* The diurnal metabolism of leaf starch // *Biochem. J.* 2007. V. 401. P. 13–28. <https://doi.org/10.1042/BJ20061393>

Amylase Inhibitor SbAI in Potato Species: Variability of Structure and Expression Pattern

E. A. Dyachenko^{a,*}, A. V. Kulakova^a, A. A. Meleshin^b, A. V. Shchennikova^a, and E. Z. Kochieva^a

^a*Institute of Bioengineering, Federal Research Center Fundamentals of Biotechnology,
Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

^b*Lorch Potato Research Institute, Moscow region, pos. Kraskovo, 140051 Russia*

*e-mail: dyachenko-el@yandex.ru

Starch degradation in plants is mediated by amylases, the activity of which is post-translationally regulated by inhibitors. It is assumed that the SbAI amylase inhibitor activity is associated with potato cold stress resistance. The study of possible correlations of the SbAI variability with the potato species cold resistance will improve the understanding of the starch metabolism regulation during plant development and stress response. In the present study, the genome sequences of SbAI homologs were identified in 12 potato species of section Petota. In total, 36 allelic variants of the gene and 31 variants of the protein were revealed. Comparison with data on *S. tuberosum* cultivars showed that cultivar SbAI polymorphism is 1.4–1.7 times higher than interspecific, but the species possess a larger number of allelic variants. Phylogenetic analysis revealed that for *S. demissum*, *S. acaule* and *S. stoloniferum*, each species SbAI allelic variants did not get into one clade. The SbAI gene expression pattern has been determined in various organs of the species *S. tuberosum* (cultivar Nadezhda), *S. rybinii*, *S. chacoense* and *S. kurtzianum*. In leaves, *S. chacoense* SbAI expression was 13, 50, and 250 times higher than in *S. tuberosum*, *S. kurtzianum*, and *S. rybinii*, respectively. Varied levels of SbAI expression in the species may be due to different initial contents of both synthesized starch and reducing sugars in the leaves. In tubers, *S. tuberosum* SbAI expression was 5.2, 8.6 and 430 times higher than in *S. kurtzianum*, *S. chacoense* and *S. rybinii*. In roots, *S. rybinii* SbAI expression was 2.4 times higher than in *S. chacoense*, and 42.3 times higher than in *S. kurtzianum* and *S. tuberosum*. The absence of correlation between the SbAI expression level and the species cold resistance was shown. The obtained expression data suggest that different potato species and cultivars may differently regulate tuber starch content.

Keywords: wild tuber-bearing potato species, amylase inhibitor SbAI, cold resistance, phylogeny, gene expression.

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ХЛОРОПЛАСТНОЙ ДНК И ФИЛОГЕОГРАФИЯ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО *Quercus robur* L. В ВОСТОЧНОЙ ЧАСТИ АРЕАЛА

© 2021 г. С. А. Семерикова¹, *, И. Ю. Исаков², В. Л. Семериков¹

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

²Воронежский государственный лесотехнический университет им. Г.Ф. Морозова, кафедра лесных культур, селекции и лесомелиорации, Воронеж, 394087 Россия

*e-mail: s.a.semerikova@ipae.uran.ru

Поступила в редакцию 28.02.2020 г.

После доработки 16.04.2020 г.

Принята к публикации 09.06.2020 г.

Изменчивость хлоропластной ДНК была исследована в 42 популяциях дуба черешчатого *Q. robur* L. в европейской части России, Беларуси, Польше, Украине, на Урале и на Кавказе. В качестве генетических маркеров были использованы рестриктивный анализ и секвенирование, а также микросателлитные локусы хлоропластной ДНК (cpSSR). Для успешной амплификации и секвенирования были разработаны новые праймеры, специфичные для дуба. Впервые получены нуклеотидные последовательности трех фрагментов (*psaA-trnS*, *psbC-trnD* и *trnT-trnF*) для *Q. robur*, с определением филогенетических взаимоотношений 13 выявленных гаплотипов. В восточной части ареала присутствуют несколько дивергентных линий хлоропластной ДНК. Группы гаплотипов имеют неслучайное географическое распространение, вероятно отражающее историю заселения дубом данных районов. Обнаружена резкая дифференциация популяций по составу гаплотипов и уровню изменчивости: в восточной части Русской равнины и на Урале распространены два гаплотипа, исчезающих на западе — в Северо-Западной России, в Беларуси, Польше и на Западной Украине, где найдено девять гаплотипов, которые отсутствуют на востоке. Географическая структура изменчивости хлоропластной ДНК дуба черешчатого в Восточной Европе имеет сходные черты с таковой у липы мелколистной (Семерикова и др., 2020) — другого представителя европейских умеренных лесов, у которой, как и у дуба в этой части ареала, наблюдаются резкие различия между западными и восточными популяциями. По-видимому, это обусловлено послеледниковой колонизацией у обоих видов из разных, длительное время изолированных, источников, часть которых располагалась на востоке исследуемой территории. На Урале выявляется параллельная дифференциация дуба и липы между южной частью (бассейны рек Урала и Белой) и более северными районами (бассейн р. Уфы и Средний Урал), что может быть объяснено разными историями заселения этих областей широколиственной растительностью.

Ключевые слова: филогеография, *Quercus robur*, хлоропластная ДНК, cpSSR, PCR-RFLP, ледниковые рефугиумы, послеледниковая реколонизация, широколиственные породы, популяционная структура.

DOI: 10.31857/S0016675821010136

Род *Quercus* (Fagaceae) насчитывает более 400 видов [1], распространенных на огромных территориях Северного полушария, отличающихся большим разнообразием условий, что демонстрирует его необычную эволюционную успешность [2]. На этом фоне дуб черешчатый (*Quercus robur* L.) представляет собой уникальный пример адаптации к новой среде обитания. Эта умеренно теплолюбивая порода занимает наибольший среди 30 европейских видов дуба ареал [3]. На больших пространствах дуб черешчатый является единственным представителем рода *Quercus*, оставляя далеко на западе ближайших конкурентов, вторгаясь в область континентального климата Восточной Европы с

устойчивыми отрицательными зимними температурами, выдерживая морозы ниже -40°C .

Филогеографические исследования европейских дубов, проводимые в 90-х–2000-х годах [4–8], обнаружили специфический характер пространственной структуры изменчивости матерински наследуемой хлоропластной ДНК (хпДНК): ареалы гаплотипов были ориентированы с юго-запада на северо-восток, начинаясь в отдельных районах юга Европы и заканчиваясь на побережье Северного или Балтийского моря или на северной границе распространения дубов. Такие географические распределения гаплотипов были интерпретированы как результат послеледникового расселения из ре-

фугиумов, располагавшихся вблизи Средиземного моря [5, 6]. Палеопалинологические данные в основном соответствовали этой гипотезе [9]. В то же время палеонтологические исследования экосистем Европы позднего плейстоцена, включающие восточные области [10, 11], выявляли присутствие пыльцы дуба в отложениях последнего ледникового максимума (LGM) и конца плейстоцена в некоторых областях Русской равнины. Кроме того, быстрое появление дуба в крайних северо-восточных местонахождениях (до верховьев Печоры) в климатический оптимум голоцена (6–8 тыс. л. н.) и приближенные расчеты скорости расселения дуба [12] сильно противоречили предположению [6] о распространении дуба в эти районы в послеледниковые исключительно из балканского рефугиума.

В отношении другого представителя европейских умеренных лесов — липы мелколистной (*Tilia cordata* Mill.) ранее на основе анализа изменчивости хпДНК [13] была показана возможность сохранения рефугиумов на востоке ареала во время одного или нескольких последних ледниковых интервалов, с последующим расселением в послеледниковые по Русской равнине, что может свидетельствовать о существенных особенностях динамики популяций и ареалов европейских широколиственных видов на востоке их распространения [13].

Восточная часть ареала дуба черешчатого, в особенности на территории России, была недостаточно изучена в ранних работах по филогеографии европейских дубов [4–6] ввиду ограниченности выборок и, что более важно, отсутствия данных секвенирования, позволяющих надежно сопоставить гаплотипы, выявленные с помощью метода PCR-RFLP (полиморфизм длин рестриктных фрагментов) из разных популяций и регионов. Более поздние исследования структуры изменчивости хпДНК дуба в Восточной Европе ограничивались Польшей [14, 15], Балканами [16], Румынией [17] и Беларусью [18, 19]. В большинстве из них также использовался анализ четырех изменчивых хлоропластных фрагментов [5] с помощью метода PCR-RFLP, который так и не был дополнен данными секвенирования. Недостатки PCR-RFLP состоят в проблеме сопоставления гаплотипов между разными исследованиями (на основе описания подвижности рестриктных фрагментов) и в возможных ошибках генотипирования. Кроме того, при использовании только метода PCR-RFLP увеличивается возможность неточного определения филогенетических отношений между выявленными гаплотипами, так как большая часть точковых замен, составляющая основную часть изменчивости, остается неученной.

Кроме PCR-RFLP, при исследовании полиморфизма хпДНК применялись хлоропластные

микросателлиты (срSSR), в том числе специально разработанные для дуба [20]. В Беларуси с помощью этих маркеров исследовалась популяционно-генетическая структура дуба черешчатого [18, 19]. В ряде работ были использованы оба типа хлоропластных маркеров, где было показано соответствие наиболее частых гаплотипов, выявленных с помощью срSSR и с помощью PCR-RFLP [15]. Однако стандартизация данных между лабораториями и сопоставление гаплотипов из разных исследований на основании подвижностей аллелей срSSR локусов [21], без точного определения числа повторов в микросателлитах, часто невозможны без использования секвенирования.

Целью данного исследования являлось уточнение филогеографии дуба черешчатого на востоке его ареала — в европейской части России и на прилегающих территориях. Проверялись гипотезы возможной послеледниковой колонизации из рефугиумов юга Европы или возможности существования источников расселения на Русской равнине и/или Урале.

Были использованы микросателлитные локусы [18, 20] и ранее применявшиеся во многих исследованиях европейских дубов некодирующие фрагменты хпДНК [4, 5]. В последнем случае мы разработали видоспецифичные праймеры, что значительно улучшило амплификацию и позволило получить нуклеотидные последовательности фрагментов, с определением филогенетических отношений выявленных гаплотипов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Были изучены выборки из 42 популяций дуба черешчатого *Quercus robur* в восточной части ареала вида — на Урале, в европейской части России, Беларуси, Польше, Украине (далее — основной ареал) и на Северном Кавказе (рис. 1, табл. 1). Объем популяционных выборок составлял в среднем 19 деревьев, расстояние между отдельными деревьями было не менее 50 м. Всего исследовано 789 деревьев. Выделение геномной ДНК проводилось с помощью СТАВ-метода [22] из свежих или высушенных в силикагеле листьев.

В предварительном исследовании 182 образца, представляющие разные части ареала, были изучены методом рестриктного анализа ПЦР фрагментов (PCR-RFLP), с использованием четырех фрагментов хлоропластной ДНК, амплифицированных с помощью “универсальных” праймеров [23, 24]. Анализировались следующие сочетания фрагмент/рестриктаза: *trnD-trnT* (DT) и *psbC-trnD* (CD)/*TaqI*, *psaA-trnS* (AS) и *trnT-trnF* (TF)/*HinfI* [4, 5]. Продукты рестрикции разделялись в 6%-ном полиакриламидном денатурирующем геле с последующим серебряным окрашиванием. Уникальная комбинация рестриктных бэн-

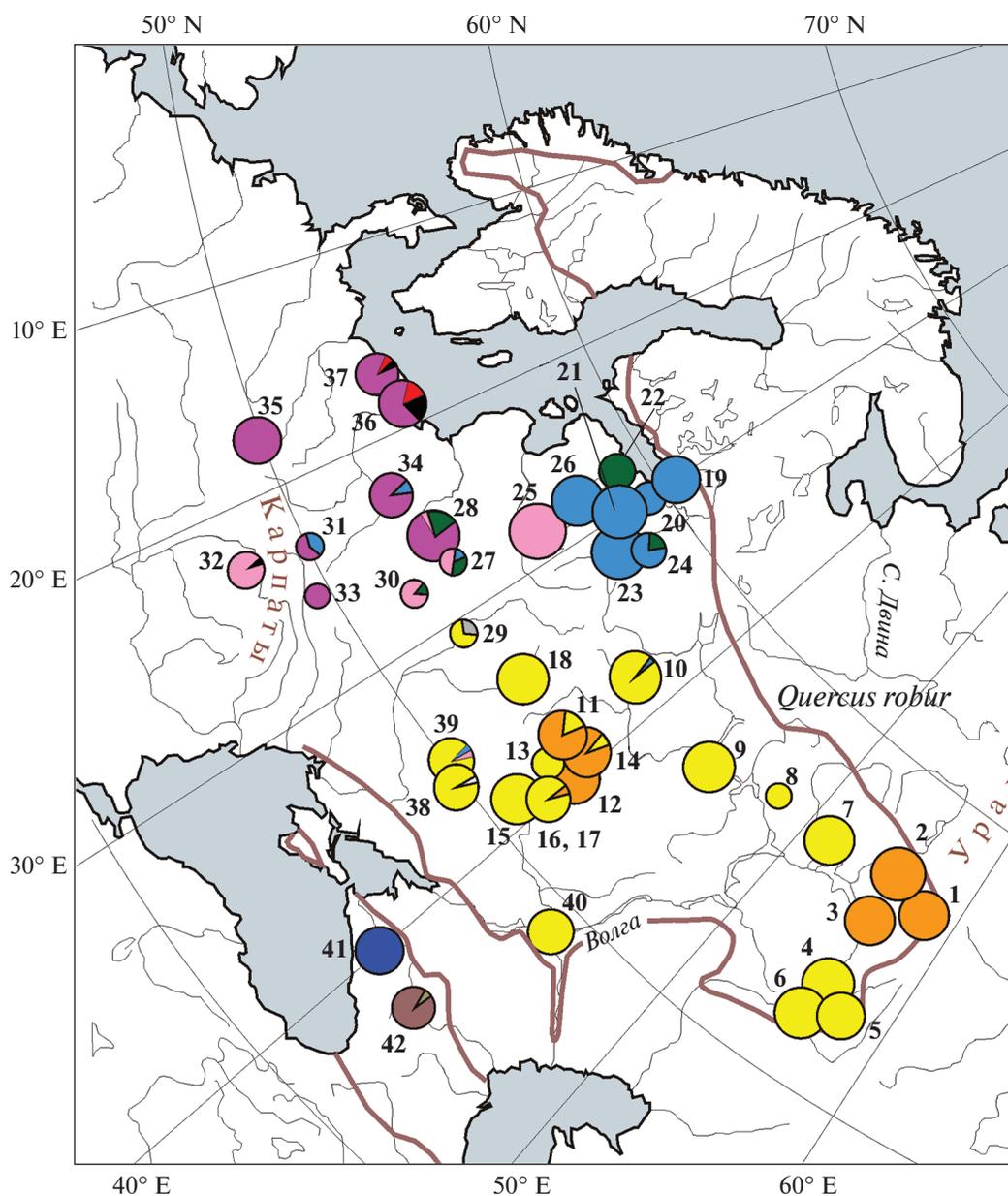


Рис. 1. Географическое распределение 13 хлоропластных гаплотипов в восточной части ареала *Quercus robur*. Цифрами обозначены номера популяций из табл. 1. Площадь диаграмм пропорциональна размеру выборки. Цветовые обозначения гаплотипов соответствуют рис. 2, 3. Частоты гаплотипов в популяциях приведены в табл. 1.

дов определялась как гаплотип. Одновременно с PCR-RFLP применялись срSSR [20]. Ранее с их помощью исследовалась популяционно-генетическая структура дуба в Беларуси [18, 19], где была подтверждена изменчивость шести локусов. Структура срSSR праймеров и режим амплификации описаны в работе [20]. При анализе длин микросателлитов продукты ПЦР разделялись в денатурирующем полиакриламидном геле, как и продукты PCR-RFLP. Варианты размеров, или аллели, типировались визуально. Для исключения ошибки при сравнении электрофореграмм в каждый старт

наносились известные стандарты размеров, взятые из предыдущих анализов. Вариация электрофоретической подвижности каждого из исследованных срSSR локусов рассматривалась как вариант размера фрагмента с разницей между ближайшими по подвижности фрагментами в один нуклеотид (далее как аллель). Наиболее короткому варианту присваивался номер 1, фрагменту длиннее на один нуклеотид – номер 2 и т.д. Комбинация аллелей определялась как гаплотип. Шесть локусов ($\mu dt1$, $\mu dt3$, $\mu dt4$, $\mu cd4$, $\mu cd5$, $\mu kk4$) нами были проверены на 16 образцах дуба из разных частей

Таблица 1. Характеристика исследованных популяций дуба черешчатого *Q. robur* L.

№ п/п	Популяция	Координаты		Объем выборки	N	H	Гаплотипы (число особей)
		с.ш.	в.д.				
1	Поташка	56°13'41"	58°47'46"	23	1	0	A-II (23)
2	Нижеиргинская	56°55'08"	57°26'49"	27	1	0	A-II (27)
3	Чандар	55°21'27"	56°40'39"	23	1	0	A-II (23)
4	Юмагузино	53°01'53"	56°29'50"	25	1	0	A-I (25)
5	Зилаир	52°16'55"	57°34'55"	21	1	0	A-I (21)
6	Малиновка	51°46'45"	56°50'17"	25	1	0	A-I (25)
7	Нечкинский н-парк	56°49'51"	53°54'12"	23	1	0	A-I (23)
8	Йошкар-Ола	56°37'27"	47°55'11"	6	1	0	A-I (6)
9	Нижний Новгород	55°38'48"	43°35'19"	24	1	0	A-I (24)
10	Москва	55°37'28"	37°33'12"	26	2	0.0769	A-I (25), B (1)
11	Плющань	52°49'00"	38°59'00"	23	2	0.1660	A-I (2), A-II (21)
12	Морозова гора	52°36'00"	38°55'00"	24	1	0	A-II (24)
13	Преображенский м-р	52°26'00"	38°58'00"	12	1	0	A-I (12)
14	Казенный лес	52°34'00"	38°57'00"	24	2	0.2899	A-I (4), A-II (20)
15	Ступино	51°57'17"	39°24'30"	21	1	0	A-I (21)
16	Усмань	51°52'58"	39°39'57"	5	1	0	A-I (5)
17	Воронеж	51°43'50"	39°13'28"	15	2	0.1333	A-I (14), A-II (1)
18	Брянская обл.	53°12'00"	34°34'00"	24	1	0	A-I (24)
19	Ольгино	59°59'57"	30°01'60"	21	1	0	B (21)
20	Сергиевка	59°53'30"	29°50'16"	10	1	0	B (10)
21	Луга	58°52'16"	29°50'56"	27	1	0	B (27)
22	Велькота	59°34'44"	28°48'16"	12	1	0	C (12)
23	Савино	58°33'21"	31°26'35"	27	1	0	B (27)
24	Юрьево	58°29'36"	31°15'04"	14	2	0.3626	C (3), B (11)
25	Себежский н-парк	56°04'35"	28°20'10"	29	1	0	D (29)
26	Печоры	57°54'38"	27°50'59"	24	1	0	B (24)
27	Минск	53°54'42"	27°38'43"	6	3	0.7333	C (2), B (1), D (3)
28	Крыжовка	53°56'58"	27°19'31"	26	3	0.4277	C (6), D (1), S (19)
29	Гомель	52°21'10"	31°07'31"	7	2	0.4762	A-I (5), G (2)
30	Лясковичи	52°06'57"	2°09'35"	7	2	0.2857	C (1), D (6)
31	Винники (Львов)	49°48'23"	24°07'55"	6	3	0.7333	D (2), S (3), R(1)
32	г. Шаян	48°04'00"	23°21'00"	13	1	0	D (13)
33	Тернополь	49°49'08"	25°17'05"	5	1	0	S (5)
34	Гродно	53°42'06"	23°46'39"	19	2	0.1988	B (2), S (17)
35	Краков, Карпаты	50°00'26"	19°48'06"	21	1	0	S (21)
36	Куршская коса	55°08'45"	20°48'11"	21	3	0.5238	S (14), R (4), Y(3)
37	Светлогорск	54°56'43"	20°05'15"	17	3	0.2279	S (15), R (1), Y (1)
38	Белогорье	50°36'40"	35°59'51"	20	2	0.1000	A-I (19), N (1)
39	Готня	50°37'57"	35°55'45"	21	3	0.1857	A-I (19), B (1), D(1)
40	Волгоград	49°24'18"	44°54'12"	24	1	0	A-I (24)
	Сев. Кавказ						
41	Убинская	44°42'20"	38°31'27"	23	1	0	Z (23)
42	Псебай	44°02'28"	40°45'38"	18	2	0.1111	E-I (17), E2 (1)
	Среднее			18.8			
	Всего			789			

Примечание. N – число гаплотипов, H – несмешенное гаплотипическое разнообразие [32].

ареала. Изменчивыми оказались пять локусов. Локус *μck4* был мономорфным. Следует отметить, что в исследованиях дуба в Беларуси [18, 19] данный локус также был мало изменчив. Дальнейший анализ проводился с использованием пяти *cpSSR* локусов.

Было установлено, что *cpSSR* метод позволяет идентифицировать 11 гаплотипов, выявляемых при помощи PCR-RFLP метода (см. Результаты, табл. 2). Еще два гаплотипа кавказского региона требовали для идентификации сочетания *cpSSR* и PCR-RFLP маркеров. Это обстоятельство позволило использовать комбинацию пяти *cpSSR* локусов для широкомасштабного анализа географического распределения гаплотипов. Такой анализ был проведен для 789 деревьев дуба из всех популяций (рис. 1, табл. 1). В каждом географическом регионе все выявленные с помощью *cpSSR* локусов и метода PCR-RFLP гаплотипы были исследованы посредством секвенирования фрагментов, использованных для PCR-RFLP.

В связи с неудовлетворительными амплификацией и секвенированием с помощью универсальных праймеров [23], на основании пластовов пяти особей *Q. robur* (https://quercusportal.pierroton.inra.fr/index.php?p=GENOMIC_SEQ), в программе Primer 3 [25] нами были разработаны новые внешние и внутренние праймеры для трех фрагментов AS, CD и TF, специфичные для *Quercus* (далее фрагменты обозначены как ASq, CDq и TFq). Новые внешние праймеры располагались вблизи сайтов отжига универсальных праймеров, поэтому размер ПЦП-фрагментов при их использовании существенно не изменился и не повлиял на анализ RFLP, что сделало возможным сравнить наши данные с результатами других исследований [5]. Условия ПЦП и описание праймеров приведены в табл. 3. С использованием новых внешних и внутренних праймеров фрагменты ASq, CDq и TFq были полностью секвенированы для всех гаплотипов. Фрагмент DT [24] также был секвенирован у 11 образцов разных гаплотипов дуба черешчатого. Качество секвенирования данного фрагмента было низким из-за значительно количества микросателлитов. Число изменчивых сайтов фрагмента DT, кроме микросателлитов, оказалось небольшим, и для секвенирования этот фрагмент далее не использовался.

Фрагменты ASq, CDq и TFq были секвенированы у 34 образцов дуба черешчатого. Для наиболее распространенных гаплотипов у дуба было отсеквенировано по несколько особей (от двух до семи) из разных популяций и регионов (рис. 2), для редких гаплотипов — по одному образцу. Секвенирование осуществлялось с использованием внешних и внутренних праймеров (табл. 3), ПЦП-продукты очищали с помощью набора ExoSAP-IT (Affimetrix). Редактирование и выравнивание по-

Таблица 2. Хлоропластные гаплотипы и описание соответствующих им аллелей хлоропластных микросателлитных локусов (*cpSSR*) для *Q. robur*

Гаплотип	<i>cpSSR</i> локус [20]				
	<i>μdt1</i> ¹	<i>μdt3</i>	<i>μdt4</i>	<i>μcd4</i>	<i>μcd5</i>
A-I	3 (A) ₁₁	1 (A) ₉	1 (A) ₉	2 (T) ₁₁	1 (A) ₉
A-II	3 (A) ₁₁	1 (A) ₉	1 (A) ₉	1 (T) ₁₀	1 (A) ₉
C	2 (A) ₁₀	1 (A) ₉	1 (A) ₉	1 (T) ₁₀	2 (A) ₁₀
B, E-I, E-II	2 (A) ₁₀	2 (A) ₁₀	2 (A) ₁₀	1 (T) ₁₀	1 (A) ₉
D	2 (A) ₁₀	4 (A) ₁₂	2 (A) ₁₀	1 (T) ₁₀	1 (A) ₉
S	2 (A) ₁₀	3 (A) ₁₁	2 (A) ₁₀	1 (T) ₁₀	1 (A) ₉
G	2 (A) ₁₀	3 (A) ₁₁	2 (A) ₁₀	2 (T) ₁₁	1 (A) ₉
R	1 (A) ₉	3 (A) ₁₁	2 (A) ₁₀	2 (T) ₁₁	1 (A) ₉
N	1 (A) ₉	3 (A) ₁₁	2 (A) ₁₀	1 (T) ₁₀	1 (A) ₉
Y	2 (A) ₁₀	2 (A) ₁₀	3 (A) ₁₁	2 (T) ₁₁	1 (A) ₉
Z	2 (A) ₁₀	2 (A) ₁₀	2 (A) ₁₀	2 (T) ₁₁	1 (A) ₉
Позиция ²	35327	34341	35148	31835	32198

¹ Приводятся номера аллелей в порядке убывания подвижности на геле и число повторов в микросателлите по данным секвенирования (см. Результаты).

² Положение в хлоропластном геноме *Quercus lobata*, CM012305 [29].

лученных последовательностей выполняли вручную в программе BioEdit [26].

Для филогенетического анализа нуклеотидные последовательности трех хлоропластных фрагментов (ASq, CDq и TFq) были конкатенированы в общие последовательности. Филогенетическое дерево гаплотипов было построено с использованием байесовского подхода (BI) и метода максимальной экономии (MP) в программах [27, 28], как описано в [13]. Кроме 13 гаплотипов, обнаруженных нами в исследуемой части ареала, в анализ были включены последовательности соответствующих фрагментов восточноазиатского вида дуба *Quercus mongolica* Fisch ex Ledeb. (полный хлоропластный геном, номер в GenBank MK564083). В качестве внешней группы был использован американский вид дуба *Quercus lobata* Nee (CM012305) [29], поскольку евроазиатские виды секции *Quercus* монофилетичны по хпДНК по отношению к американским видам той же секции, включая *Q. lobata* [30]. В анализ были включены все точковые мутации и инделы, за исключением мутаций числа микросателлитных повторов ввиду их высокой изменчивости и возможной гомоплазии. Для изучения взаимоотношений га-

Таблица 3. Фрагменты хлДНК, использованные в исследовании *Q. robur*, праймеры и условия ПЦР

Фрагмент	Праймер	Направление	Нуклеотидная последовательность праймера (5'-3')	Позиция ¹	Амплификация	Секвенирование	Условия ПЦР	
							T (°C) отжига	время элонгации, мин
ASq	ASq(A)	F	GCCCATTCCTCGAAAGAAGT	47070	+	+	60	4
	ASq(S)	R	AATGTACGCCCTTCAACCAC	50858	+	+ ⁴		
	ASq(A3) ²	F	TTTCTCCSACSTTCSAGAAGAA	48276		+ ⁴	60	3
CDq	ASq(A2) ²	R	AAGGTAATTGAGCAGCGGTGT	48464	+ ⁵	+ ⁴		
	ASq(S3) ²	R	TTTGTGGGATCAITTTCTCTCG	49961	+ ⁵	+		
	CD(C) ³	F	CCAGTTCAAATCTGGGTGTC	30645	+	+ ⁴	60	3
TFq	CDq(D)	R	AAAGGATTACTAACAATTTGGGAGA	34291	+	+ ⁴		
	CDq(D2) ²	R	TTGACTGTTTTCGGTTCTTATCAATG	32686		+ ⁴	60	3
	CDq(C2) ²	F	TGAAATGAAGGTCACAAAAAGAAA	31307	+ ⁵	+		
TFq	CDq(D3) ²	F	TCCGCTTGTTCATTTAAGACAT	32600	+ ⁵	+		
	TFq(A)	F	TGCGATGCTCTAACCTCTGA	52204	+	+ ⁴	60	3
	TFq(F)	R	TGGTGACACGAGGATTTTCA	54073	+	+ ⁴		
TFq	TFq(f3) ²	R	CGGGTCGTCATTAATCAATTTG	53419		+		
	TFq(a3) ²	F	TGGGGTTGACTTCTTTACGTT	53297		+		

Примечание.

¹ Положение в хлоропластном геноме *Quercus lobata*, CM012305 [29].

² Внутренние праймеры для секвенирования, разработанные для *Quercus*.

³ Праймер [23].

⁴ Основные праймеры для секвенирования (см. Результаты).

⁵ Дополнительный праймер для ПЦР, при необходимости.

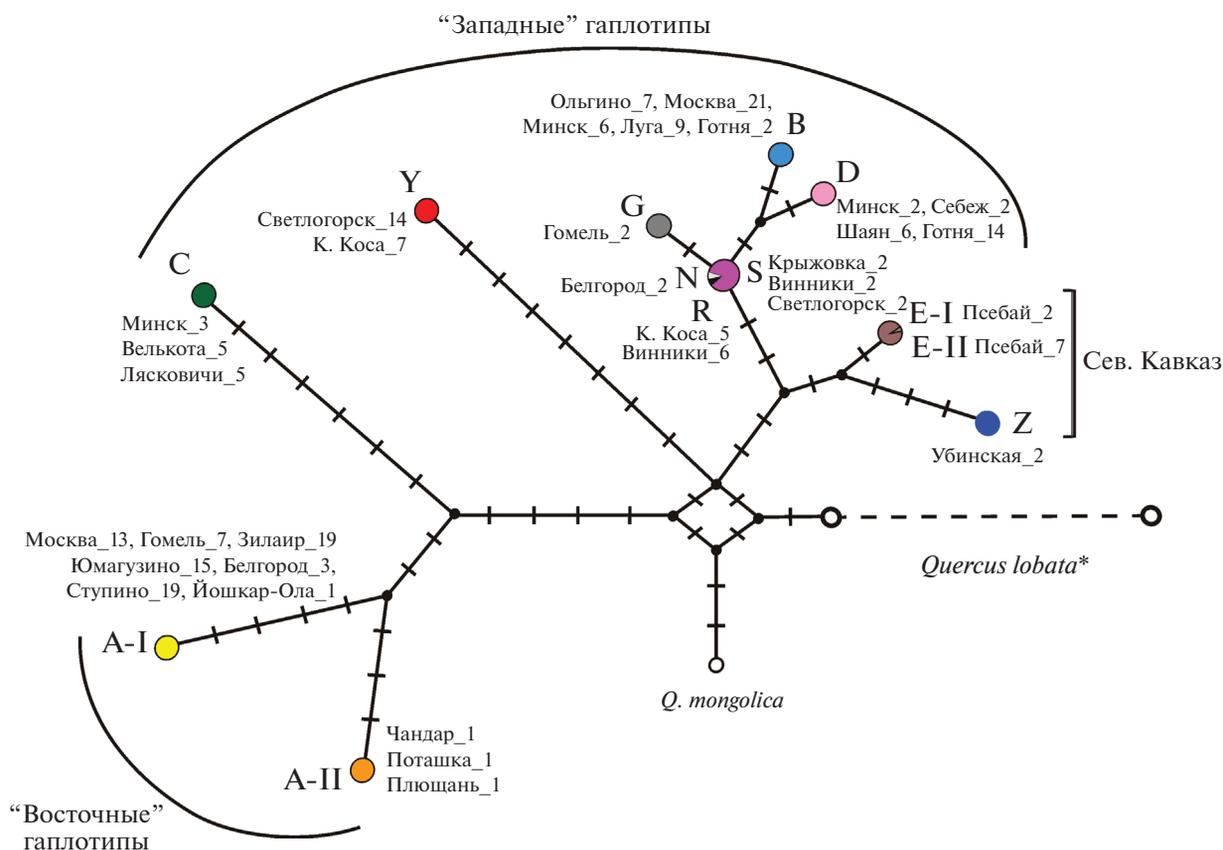


Рис. 2. Филогенетическая сеть 13 гаплотипов дуба черешчатого, гаплотипов *Q. mongolica* и *Q. lobata*, построенная на основе нуклеотидных последовательностей трех фрагментов хпДНК с помощью метода “reduced median” в программе NETWORK [31]. Черные поперечные линии обозначают мутации. Для гаплотипов *Q. robur* указаны образцы, секвенированные для данного гаплотипа из разных популяций, с указанием номера образца. * При построении филогенетической сети не учитывались мутации, специфичные для внешней группы *Q. lobata*.

плотипов был также использован подход “reduced median” в программе NETWORK [31]. В этом случае в анализ также были включены все точечные мутации и инделы, без учета микросателлитных повторов и парсимонически неинформативных мутаций внешней группы (рис. 2).

Нуклеотидное разнообразие π хлоропластных фрагментов [32] вычислялось с помощью DnaSP v 10.1 [33]. С помощью пакета программ Arlequin ver 3.5 [34] для каждой популяции оценивались общее число гаплотипов (N) и несмещенное гаплотипическое разнообразие (H) [32], а также проводился анализ молекулярной дисперсии (AMOVA). В последнем случае кроме частот гаплотипов учитывались генетические дистанции между гаплотипами, вычисленные на основе нуклеотидных замен и перестроек в трех фрагментах хпДНК. Использовались при этом следующие уровни изменчивости: внутри популяций, между популяциями, внутри групп популяций и между группами. Анализ пространственной структуры генетической изменчивости в программе SAMOVA [35] проводился путем поиска такой кластери-

зации географически соседствующих популяций на K групп, при которой доля изменчивости, соответствующая различиям между группами, была бы наибольшей. Рассматривалось число $K = 2-4$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате исследования 789 индивидуумов в 42 выборках дуба по совокупности результатов двух анализов (PCR-RFLP и cpSSR) было обнаружено 13 гаплотипов (A-I, A-II, B, C, D, Y, S, G, R, N, E-I, E-II, Z). В cpSSR локусах $\mu dt1$, $\mu dt3$, $\mu dt4$, $\mu cd4$ и $\mu cd5$ было выявлено от двух до четырех аллелей, комбинация которых составляла 11 гаплотипов (табл. 2), при этом локус $\mu cd5$ был малоизменчив и не увеличивал числа выявленных гаплотипов. Гаплотипы B (западная часть исследуемой области основного ареала дуба) и E-I, E-II (Кавказ) имели одинаковое сочетание cpSSR аллелей, но хорошо идентифицировались рестриктивным анализом (комбинация TF/*Hinf*I). Редкий гаплотип (E-II) маркировался изменчивостью рестриктивных

Таблица 4. Нуклеотидная изменчивость фрагментов хлоропластной ДНК, использованных для филогеографического исследования *Quercus robur* в восточной части ареала

Фрагмент	Длина выровненных последовательностей, пн ¹	Средняя длина последовательностей, пн	Число мутаций: точковые/инсерции, делеции, инверсии/микросателлиты	Общее число мутаций (информативных ²)	Нуклеотидное разнообразие π	Номера последовательностей в GenBank
ASq	3756	3682	8/5/4	17 (5)	0.00050 ± 0.00014	MT180918–MT180930
CDq	3587	3567	11/4/3	18 (6)	0.00082 ± 0.00018	MT180905–MT180917
TFq	1833	1807	10/3/4	17 (4)	0.00132 ± 0.00031	MT180931–MT180943
Всего	9176	9056	29/12/11	52 (15)		
Всего с внешней группой			74/20/13	107 (15)		

¹ Длина выровненных последовательностей вместе с *Q. mongolica* и внешней группой *Q. lobata*.

² Не учитывались микросателлитные повторы.

фрагментов в комбинациях CDq/*TaqI* и ASq/*HinfI*. При секвенировании особей одного гаплотипа из разных частей ареала дуба новых мутаций и гаплотипов не выявлено. Особи, типированные по совокупности анализов PCR-RFLP и *cpSSR* и имевшие один гаплотип, но происходящие из разных частей ареала, имели полностью совпадающие последовательности во всех фрагментах. В пределах восточноевропейской части основного ареала дуба для идентификации гаплотипов было достаточно анализа *cpSSR*, что было подтверждено данными секвенирования.

Длина выровненных последовательностей фрагментов составила: CDq – 3587 пар нуклеотидов (пн), ASq – 3756 пн, TFq – 1833 пн. Полученные последовательности для 13 гаплотипов *Q. robur* помещены в GenBank (табл. 4). Всего в трех фрагментах у гаплотипов дуба без учета внешней группы обнаружено 52 изменчивых сайта, из них 28 точковых мутаций, 11 инделов (инсерций, делеций и инверсий) и 8 микросателлитных повторов. Без учета микросателлитов, 15 признаков были парсимонически информативными в пределах *Q. robur*. Наибольшее нуклеотидное разнообразие было у фрагмента TFq ($\pi = 0.00132$), наименьшее – у ASq и CDq ($\pi = 0.00050$ и $\pi = 0.00082$ соответственно, табл. 4). Наибольшее число мутаций было выявлено при секвенировании с использованием восьми

праймеров: ASq(S), ASq(A3), ASq(A2); CD(C), CDq(D), CDq(D2); TFq(A), TFq(F) (табл. 3). Не было выявлено изменчивости при секвенировании с внутренних праймеров CDq(D3) и ASq(S3) в соответствующих частях данных фрагментов.

При секвенировании было установлено число повторов во всех микросателлитах, в том числе тех, которые использовались для генотипирования (табл. 2). При этом число повторов соответствовало подвижности аллелей при электрофоретическом анализе, что подтвердило правильность типирования *cpSSR* гаплотипов. Наиболее подходящим праймером при секвенировании фрагмента CDq для установления числа повторов в микросателлите $\mu cd4$ был праймер CDq(C2), в микросателлите $\mu cd5$ – CDq(D2), при секвенировании фрагмента DT в микросателлитах $\mu dt1$ и $\mu dt4$ – DT(T), $\mu dt3$ – DT(D) [24].

Филогенетические деревья MP и BI оказались сходными между собой и с сетью гаплотипов. На рис. 3 представлено байесовское дерево (BI), с указанием значений статистических поддержек клад обоих деревьев. Разрешение дерева в базальной части слабое, гаплотипы дуба черешчатого не образуют монофилетической группы и дуб монгольский входит в одну из клад гаплотипов *Q. robur*. Выделяются две достаточно дивергентные клады (линии), куда входит большинство встреченных

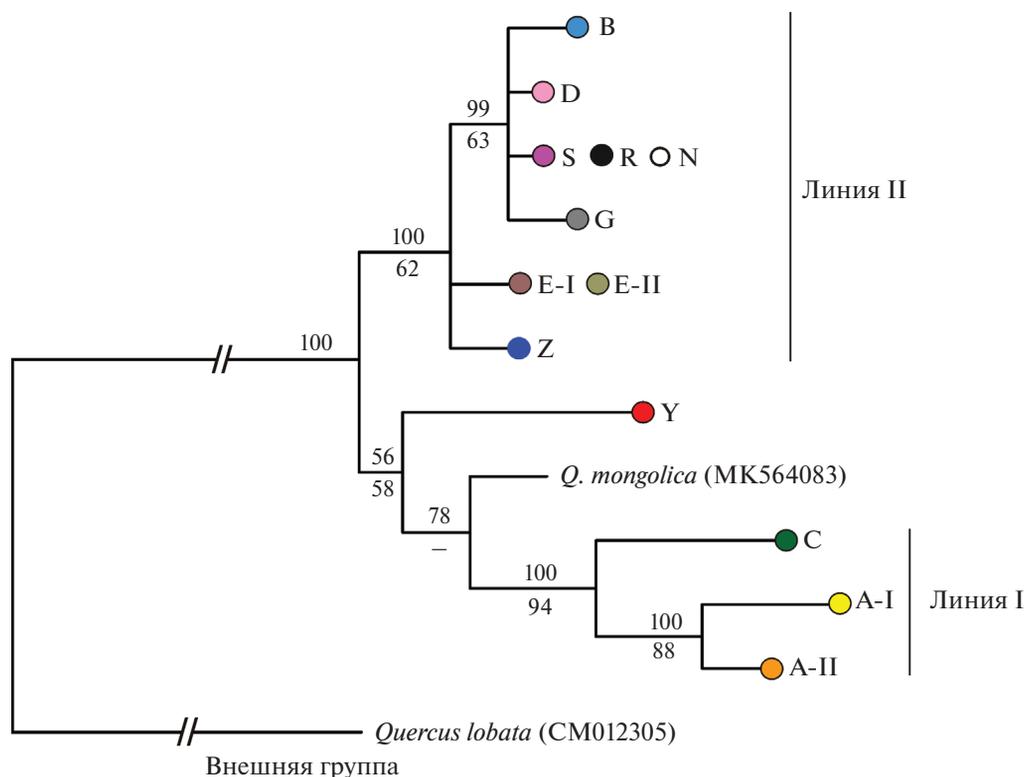


Рис. 3. Филогенетическое дерево 13 гаплотипов *Quercus robur*, гаплотипов *Q. mongolica* и *Q. lobata*, построенное с помощью байесовского метода (50%-ный консенсус) на основе нуклеотидных последовательностей трех фрагментов хпДНК общей длиной 9176 пн. Над линиями приведена статистическая поддержка байесовским методом (значения апостериорной вероятности, %), под линиями – бутстреп-поддержка (MP, 1000 репликаций). Для гаплотипов *Q. mongolica* и *Q. lobata* приводятся номера пластов из GenBank.

гаплотипов дуба черешчатого: линия I имеет поддержку 100/90% (BI /MP), линия II – 100/61% (рис. 3). Внутри линии I выделяется субклада родственных гаплотипов A-I и A-II (100/88), внутри линии II – субклада гаплотипов B, S, D, G, R и N (100/63). В одну кладу с линией I с невысокой поддержкой объединяются *Q. mongolica* и гаплотип Y дуба черешчатого.

Гаплотипы внутри регионов распределены неравномерно, и в основной части ареала выявлена отчетливая дифференциация запад–восток (рис. 1). Начиная с юго-востока Беларуси (Гомель) на восток – в Центральной России, в Поволжье и на Урале в популяциях дуба абсолютно преобладают два “восточных” гаплотипа A-I и A-II. Гаплотип A-II не обнаружен западнее Липецкой области, а гаплотип A-I – западнее Гомельской области. Друг от друга они отличаются значительно (9 мутаций, из них 4 точковых, 3 индела, 2 микросателлита). Филогенетически родственный им гаплотип C отличается от двух “восточных” гаплотипов еще большим количеством мутаций. Он встреча-

ется на северо-западе: в Ленинградской, Новгородской областях и в Беларуси.

На западе исследуемой части основного ареала дуба преобладают гаплотипы линии II (рис. 1), три из которых встречаются наиболее часто (S, B, D). Гаплотипы S, R, N близкородственны, отличались друг от друга только числом повторов в 2–4 микросателлитах. Так как число микросателлитных повторов не учитывалось при филогенетическом анализе взаимоотношений гаплотипов, на филогенетическом дереве и сети гаплотипов они занимают одинаковую позицию.

Наблюдается достаточно резкая граница между ареалами “восточных” и “западных” гаплотипов. Так, в Московской, Белгородской, Гомельской областях единично встречаются “западные” гаплотипы B, D, N, G, а в более западных и северо-западных районах встречаются исключительно “западные” гаплотипы из разных неродственных линий: гаплотип C линии I, гаплотипы B, D, S, R, G, N линии II, дивергентный гаплотип Y, который был обнаружен в Калининградской области и сильнее всего отличался от всех остальных га-

Таблица 5. Иерархический анализ генетической изменчивости дуба черешчатого в восточной части ареала (AMOVA), популяции разделены на три группы: 1) основной ареал, популяции с “восточными” гаплотипами; 2) основной ареал, популяции с “западными” гаплотипами; 3) Сев. Кавказ

Источник изменчивости	Число степеней свободы	Сумма квадратов	Компонента изменчивости	Доля изменчивости (%)
Между группами	2	2401.617	5.57249	75.27
Между популяциями внутри групп	39	1033.159	1.40120	18.93
Внутри популяций	747	321.307	0.43013	5.81
Индексы фиксации		Вероятность		
F_{SC}	0.76513	<0.00001		
F_{ST}	0.94190	<0.00001		
F_{CT}	0.75265	<0.00001		

плотипов. С невысокой поддержкой (56/58) гаплотип Y объединяется с линией I, однако по совокупности признаков обнаруживает предковые для обеих линий черты и на сети гаплотипов занимает промежуточное положение между ними (рис. 2).

В западных областях в южном направлении гаплотипическое разнообразие возрастает (табл. 1). В Ленинградской и Новгородской областях в популяциях встречается чаще один, иногда два гаплотипа. В центральных районах Беларуси и в Калининградской области — обычно три гаплотипа, причем часто из разных линий.

В двух изученных на Кавказе выборках были обнаружены три эндемичных гаплотипа (Z, E-I и E-II), которые входят в линию II. Кавказские гаплотипы образуют между собой (только на сети гаплотипов и на дереве MP) слабо поддержанную кладу (рис. 3) благодаря общей инсерции во фрагменте TFq. Гаплотипы E-I и E-II близкородственны и различаются двумя микросателлитными повторами.

Анализ пространственной структуры генетической изменчивости с помощью SAMOVA при числе групп $K = 2$ отделил восток основного ареала (область основного распространения гаплотипов A-I, A-II и C) от остальных популяций. При этом доля изменчивости, соответствующая дифференциации групп, составляла $F_{CT} = 0.75$. При числе групп $K = 3$ и 4 произошло последовательное отделение от восточной группы областей распространения гаплотипов A-II и C. При априорном разделении популяций на три группы (AMOVA): 1) восток основной части ареала (область распро-

странения гаплотипов A-I и A-II), 2) запад и 3) Кавказ, индекс F_{CT} был 0.75 и $F_{ST} = 0.94$ (табл. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе было впервые проведено широкомасштабное исследование структуры изменчивости хлоропластной ДНК *Q. robur* на Русской равнине и в прилегающих областях (рис. 1), с использованием данных секвенирования. Получены последовательности трех фрагментов хпДНК общей длиной более 9050 пн, определено взаимоотношение 13 выявленных гаплотипов, получено частотное распределение гаплотипов дуба для 789 образцов в 42 популяциях. Установлена картина дифференциации популяций, дающая информацию о прошлом дуба черешчатого в восточной части ареала.

Совершенствование маркеров хлоропластной ДНК и возможность сопоставления результатов с данными предыдущих исследований

Нами были разработаны видоспецифичные праймеры (табл. 3) для амплификации и секвенирования трех регионов хпДНК дуба черешчатого, что позволило отказаться от ненадежных “универсальных” праймеров [23] и в то же время давало возможность сопоставлять выявленные гаплотипы с PCR-RFLP гаплотипами, описанными в более ранних исследованиях на основе “универсальных” праймеров [5, 6]. С использованием набора новых праймеров была достигнута хорошая амплификация всех образцов, с меньшей зависимостью от качества ДНК. Новые праймеры соответствуют пластомам некоторых других дубов

(например, дуба скального *Q. petraea* (Matt.) Liebl., а также американского вида *Q. lobata*), что позволит исследовать с их помощью не только дуб черешчатый, но и близкие виды.

Для типирования были использованы одновременно маркеры PCR-RFLP и локусы сrSSR. Было установлено, что для надежного типирования в пределах исследованной области, за исключением Кавказа, достаточно проанализировать четыре локуса сrSSR, что значительно снижает трудоемкость исследования. Для выявленных гаплотипов были получены последовательности трех наиболее изменчивых фрагментов, использованных в PCR-RFLP анализе, которые позволят в дальнейшем однозначно сопоставлять гаплотипы из разных проектов.

При сравнении на основе комбинаций аллелей сrSSR локусов полученных нами гаплотипов с выявленными в Беларуси [18] удалось установить их полное соответствие, по крайней мере в отношении гаплотипов, наиболее частых на территории Беларуси: № 3 (согласно [18]) совпадает с гаплотипом А-I из нашего исследования, № 1 – с “нашим” D, № 2 – С, № 4 – S, № 5 – В. Показанное в работах [18, 19] географическое распределение гаплотипов на территории Беларуси во многом совпадает с нашими результатами: например, по обоим наборам данных гаплотип А-I (№ 3 по [18]) распространен в Гомельской области. Таким образом, использование сrSSR маркеров для типирования гаплотипов хпДНК дуба черешчатого не только эффективно, но и дает полностью воспроизводимые результаты. Следует учитывать, что сравнительно высокая скорость мутирования сrSSR локусов увеличивает возможность гомопластических мутаций, однако было показано, что при типировании в одном регионе вероятность гомоплазии минимальна [15]. В нашем исследовании в пределах одного региона (40 выборки основного ареала) таких случаев не было выявлено: все сrSSR гаплотипы совпали с PCR-RFLP гаплотипами и с данными секвенирования. Однако при расширении области исследования до нескольких регионов возможность проявления гомоплазии возрастает. В нашей работе таким примером является совпадение набора сrSSR аллелей у гаплотипов Е-I, Е-II (Кавказ) и гаплотипа В из основного ареала (табл. 2). Следовательно, одинаково типизируемые сrSSR гаплотипы из разных регионов должны проверяться данными секвенирования.

Сопоставление выявленных нами гаплотипов путем сравнения электрофоретических бэндов, полученных в ходе PCR-RFLP, а также рестриктных фрагментов, ожидаемых на основе нуклеотидных последовательностей, со схемами и таблицами по-

движностей рестриктных бэндов у гаплотипов, выявленных в более ранних исследованиях [4, 5], как правило, не позволяет однозначно сопоставить большинство гаплотипов. С высокой вероятностью установлено соответствие гаплотипа D с гаплотипом 6, гаплотипа С с гаплотипом 14 [4, 5]. Большинство гаплотипов не получили полных аналогов.

В то же время для *Q. robur* и *Q. petraea* имеется коллекция полных последовательностей хлоропластных геномов (пластомов) 22 деревьев [(https://quercusportal.pierroton.inra.fr/index.php?p=GENOMIC_SEQ)], происходящих из популяций с известным составом гаплотипов, идентифицированных согласно [5]. Мы исследовали части данных пластомов, соответствующие изученным нами трем фрагментам, и ни один из пластомов полностью не совпал с последовательностями, полученными нами для 13 гаплотипов восточной части ареала. К сожалению, для гаплотипов, описанных в работах [4–6] для восточной части ареала (номера 5, 6, 14, 15, 16 по [4–6]) и по своему географическому распространению, возможно, совпадающих с нашими, пластомы отсутствуют, что ограничивает возможности сопоставления результатов исследования структуры изменчивости хпДНК дуба черешчатого в нашей работе и работах [4–6]. Однако большинство сайтов, изменчивых в полученных нами последовательностях, были изменчивы и в последовательностях пластомов. По многим изменчивым сайтам выявленные нами гаплотипы, относящиеся к линии I (А-I, А-II и С), были сходными с гаплотипами 17 и 18 (пластомы образцов из Грузии и Турции), которые принадлежат к линии Е (восточно-балканская линия, согласно [5]), что подтверждает соответствие “нашей” линии I и линии Е из работ [5]. Еще по нескольким мутациям можно предполагать, что линия II и дивергентная ветвь гаплотипа Y соответствуют линиям А (Балканской) и С (Апеннинской) [5].

Дифференциация популяций дуба черешчатого в восточной части ареала и гипотеза сохранения дуба в LGM на Русской равнине и на Урале

По составу гаплотипов, уровню изменчивости и в соответствии с результатами SAMOVA популяции дуба черешчатого в основной части ареала делятся на западную и восточную группы. Согласно выводам Petit с соавт. [6], Северо-Восточная Европа, включая Беларусь, Прибалтику и северо-запад России, были заселены гаплотипами линий А и С, распространявшимися из балканского и апеннинского рефугиумов. В то же время, по мнению авторов [6], большая часть Русской равнины была заселена главным образом гап-

типами 15 и 16 линии E, распространявшимися из Восточных Балкан. Можно предположить, что данные гаплотипы соответствуют нашим гаплотипам A-I и A-II, абсолютно доминирующим на Русской равнине, однако схема рестриктных бэндов [5] гаплотипов 15 и 16 не соответствует рестриктному паттерну гаплотипов A-I и A-II. Гаплотипы 15 и 16 отсутствуют среди пластовов, что также не позволяет сравнить их с нашими данными. Однако же, если допускать соответствие между гаплотипами A-I, A-II и 15, 16, следует обратиться к предположениям, выдвинутым в работе [6] относительно путей их расселения на востоке ареала дуба черешчатого. Если следовать Petit с соавт. [6], в голоцене на восток из балканского рефугиума распространились только гаплотипы линии E, а гаплотипы линии A – только на север. Действительно, в долине Днестра и в низовьях Дуная предполагается наличие рефугиума широколиственной флоры [10]. Однако в Румынии гаплотипы линии E (включая гаплотипы 15 и 16) существуют наряду с гаплотипами других линий согласно [8]. По новым данным [17], гаплотипы линии A являются преобладающими в популяциях дуба в Румынии, а гаплотипы линии E были встречены лишь в двух выборках. Это порождает вопрос: совпадают ли гаплотипы, описанные из Румынии и с Русской равнины в работах [4–6], а также совпадают ли они с выявленными в нашем исследовании гаплотипами A-I и A-II? Такой вопрос оправдан ввиду возможных проблем с идентификацией гаплотипов в ходе экспериментов с PCR-RFLP. Так, в работе Petit с соавт. [5] описаны многочисленные редкие гаплотипы, которые не подтвердились в ряде повторных исследований, и нет возможности их надежно идентифицировать на базе исключительно гель-электрофореза [16]. Например, гаплотип 15' из Румынии в работе [17] не совпал по рестриктным бэндам с гаплотипом 15, распространенным на Русской равнине по данным [6]. Таким образом, вполне возможно, что гаплотипы A-I и A-II отсутствуют или весьма редки западнее Русской равнины. Возможно, их локализация на востоке Русской равнины и резкая генетическая дифференциация восток–запад обусловлены колонизацией этой части ареала дуба из разных, длительное время изолированных источников, один из которых располагался на восточных территориях (Русская равнина, Предуралье), а другие – в Центральной и Западной Европе, включая Карпаты и Средиземноморье. Таким образом, только анализ значительного количества популяционных выборок с территории Южной Украины и Румынии, подкрепленный результатами секвенирования, может ответить на

вопрос о пути расселения гаплотипов A-I и A-II по Русской равнине.

Согласно последним палеоботаническим данным, пыльца дуба присутствовала во время LGM в незначительных количествах в некоторых областях центра Русской равнины [10, 11]. Возможность существования ледниковых убежищ дуба в восточной части его ареала позволяет объяснить его быстрое расселение: например, пыльца дуба появляется в нескольких разрезах Предуралья во время плейстоцен-голоценового рубежа (BAIC, 12.4–10.9 тыс. л. н.) [10]. Уже в раннем голоцене дуб произрастал во многих районах современного распространения [36, ссылки], значительно превышая во время климатического оптимума голоцена современный ареал на севере [12].

Ранее в популяционном исследовании морфологических признаков дуба черешчатого, охватывавшем европейскую часть Советского Союза [36], было установлено, что популяции, расположенные в западной части (примерно к западу от линии Таллин – Воронеж), гетерогенны по признаку опущения листовой пластинки, т.е. встречаются деревья как с неопущенными, так и с опущенными листьями. В то же время к востоку деревья с неопущенными листьями почти полностью исчезают. Более того, было обращено внимание, что признак опущения связан с признаком времени распускания листьев и начала весеннего роста побегов, который также весьма изменчив, и на западе Русской равнины встречаются как рано, так и поздно распускающиеся деревья (т.н. ранняя и поздняя формы) [36, ссылки]. Деревья с опущенными листьями были в основном поздно распускающимися. В восточной части рано распускающиеся деревья, как и неопущенные формы, практически отсутствовали. Эти наблюдения позволили выдвинуть гипотезу о нескольких источниках колонизации Русской равнины после окончания последнего оледенения, происходившей как с западных территорий, так и с востока [36].

Интересно отметить, что граница распространения “западных” и “восточных” гаплотипов дуба черешчатого в значительной степени соответствует границе продвижения на восток “западных” гаплотипов хпДНК липы мелколистной, которая примерно соответствует 32° в.д. [13]. Это, по-видимому, указывает на возможную общую историю распространения широколиственных видов в восточной части их ареала из общих ледниковых убежищ.

По результатам предыдущих исследований дуба [6] предполагалось, что заселение северо-западных территорий России проходило из балканского рефугиума (линия A по [6]), что совпадает с распространением гаплотипов линии II по на-

шим обозначениям (B, D, S и др.) (рис. 1). В то же время, по нашим данным, гаплотип С (линия I) также принял участие в заселении северо-запада через Беларусь вплоть до Ленинградской области. То есть в данном регионе представлены филогенетически неродственные гаплотипы из разных линий, при этом имеющие сходные пути колонизации: гаплотип С, по нашим данным, не обнаружен на востоке, и область его распространения совпадает с гаплотипами линии II. Видимо, дивергенция внутри линии I на “восточные” гаплотипы А-I и А-II и “западный” гаплотип С произошла задолго до формирования современного ареала. Представляет интерес происхождение гаплотипа С. Предположительно, он соответствует гаплотипу 14 по [4, 5], который на западе был найден только в Закарпатье [4], но не отмечался в многочисленных изученных популяциях дуба более южных районов, включая область предполагаемых балканских рефугиумов [6, 8, 16], что ставит вопрос о вторичном, более северном, европейском рефугиуме дуба в Карпатах.

Дивергентный гаплотип Y, присутствующий в популяциях дуба в Калининградской области, по некоторым мутациям сходен с пластами, относящимися к линии С (Апеннинской) в обозначении [5], и совпадает с гаплотипом I по характеру географического распространения вдоль Балтийского побережья [6, 7, 14].

Кроме присутствия нескольких дивергентных линий, в западных областях северной части ареала обнаружены близкородственные гаплотипы, различающиеся одной – тремя мутациями, в основном микросателлитными повторами, т.е. имеющие недавнее общее происхождение (S, R, G, N). Подобные близкородственные гаплотипы присутствуют и на Кавказе, в то время как в восточной части основного ареала таких гаплотипов нет. Это указывает, вероятно, на бутылочное горлышко, через которое проходила северо-восточная популяция дуба, и на относительно небольшой возраст этого события, не позволивший накопиться дочерним гаплотипам.

Несколько генетико-популяционных исследований дуба черешчатого в России [37–39] не показали снижения изменчивости ядерных маркеров (аллозимных, ядерных микросателлитов) в восточных популяциях дуба, по сравнению с центральной частью ареала. Однако на крайнем юго-востоке была отмечена высокая степень дифференциации популяций [39], предположительно вследствие генетического дрейфа или как результат происхождения из нескольких южноуральских ледниковых рефугиумов [39]. При этом надо отметить, что ядерные маркеры имеют больший эффективный размер популяции по сравнению с

хлоропластными, что снижает их чувствительность к генетическому дрейфу. Дифференциация дуба на Урале также обнаружена в нашем исследовании по маркерам хпДНК: в северных популяциях (бассейн р. Уфы и Средний Урал) фиксирован гаплотип А-II, в южной части – А-I (рис. 1), повторяя в значительной степени картину дифференциации уральских популяций липы [13], что может быть объяснено заселением этих областей широколиственной растительностью из разных рефугиумов.

Для более обоснованной филогеографической интерпретации наблюдаемой на Русской равнине структуры изменчивости хпДНК дуба черешчатого необходимо исследование всех прилегающих территорий, в том числе Кавказа, для ареалов дубов которого характерен значительный разрыв с лесной зоной Восточной Европы [36]. Ранее предполагалась связь между популяциями дуба Русской равнины и Кавказа в виде миграции на Кавказ с северных территорий [6] и в обратном направлении [4]. В нашем исследовании были проанализированы две популяции дуба черешчатого на Кавказе, которые содержали разные, хотя и родственные гаплотипы, отсутствующие в изученных популяциях основного ареала Восточной Европы. Филогенетически данные гаплотипы принадлежат линии II, соответствующей линии А (балканской) по [5]. Однако, согласно [6], на Кавказе были встречены только гаплотипы линий E и F. Это несоответствие предположительно объясняется тем, что были изучены разные кавказские популяции, а также тем, что в работе [5] применялся только рестриктивный анализ. Возможные ошибки при его интерпретации привели к ошибкам при построении филогенетического дерева гаплотипов, не совпадающего с полученным в нашей работе. Было установлено, что при применении PCR-RFLP анализа данных фрагментов, как описано в [5], в преобладающем большинстве фиксируются мутации, меняющие длину фрагмента (инсерции-делеции и микросателлиты). Точковые замены при этом почти не выявляются, хотя по результатам секвенирования тех же фрагментов (табл. 4) их доля в изменчивости преобладала и большинство парсимонично информативных мутаций относятся именно к точковым заменам. Возможно, данные секвенирования, полученные в нашей работе, позволили более точно определить взаимоотношения гаплотипов разных линий.

Изменчивость использованных в нашей работе трех фрагментов хпДНК значительно выше, чем у некоторых других хлоропластных маркеров, применявшихся ранее для филогеографических исследований дуба черешчатого. Для фрагментов *trnH-psbA* и *trnK-matK* у видов дубов в Грузии

описано только пять изменчивых сайтов, в том числе один микросателлит [40]. У *Q. robur* было выделено четыре гаплотипа, распространение которых отчетливо дифференцировало популяции в Грузии в направлении восток–запад, однако результаты этого исследования [40] не были сопоставлены с гаплотипами и линиями, полученными в других работах [4–6]. Дальнейшие исследования популяций дуба в крымско-кавказском регионе, с более полным географическим охватом и применением новых, более изменчивых маркеров, должны прояснить связи популяций отдельных областей этого обширного и сложного региона между собой и с европейской частью ареала дуба черешчатого и родственных видов.

Авторы благодарят Л.И. Агафонова, Б.К. Ганнибала, Г.Ю. Конечную, Н.В. Семерикова, А.Н. Созонтова, Е.Г. Филиппова, Ю.Я. Хрунык за участие в сборе образцов дуба, А.И. Цивилева, К.А. Паниковскую за помощь в лабораторных анализах и анонимного рецензента за конструктивные замечания.

Работа выполнена в рамках государственного задания Института экологии растений и животных УрО РАН и при финансовой поддержке РФФИ, проект № 18-04-01061А.

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

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Denk T., Grimm G.W., Manos P.S. et al.* An updated infrageneric classification of the oaks: review of previous taxonomic schemes and synthesis of evolutionary patterns // *Oaks Physiological Ecology. Exploring the Functional Diversity of Genus Quercus L.* / Eds Gil-Pelegrin E., Peguero-Pina J.J., Sancho-Knapik D. Cham, Switzerland: Springer, 2017. V. 7. P. 13–38.
2. *Kremer A., Hipp A.L.* Oaks: an evolutionary success story // *New Phytologist*. 2020. V. 226. № 4. P. 987–1011. <https://doi.org/10.1111/nph.16274>
3. Ареалы деревьев и кустарников СССР / Под ред. Соколова С.Я., Связевой О.А., Кубли В.А. Л.: Наука, 1977. Т. 1. 164 с. 91 карта.
4. *Dumolin-Lapegue S., Demesure B., Fineschi S. et al.* Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent // *Genetics*. 1997. V. 146. № 4. P. 1475–1487.
5. *Petit R.J., Csaikl U.M., Bordacs S. et al.* Chloroplast DNA variation in European white oaks – Phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations // *Forest Ecol. Management*. 2002. V. 156. № 1–3. P. 5–26. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(01\)00645-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(01)00645-4)
6. *Petit R.J., Brewer S., Bordacs S. et al.* Identification of refugia and postglacial colonisation routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence // *Forest Ecol. Management*. 2002. V. 156. P. 49–74. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(01\)00634-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(01)00634-X)
7. *Csaikl U.M., Glaz I., Baliuckas V. et al.* DNA variation of white oak in the Baltic countries and Poland // *Forest Ecol. Management*. 2002. V. 156. № 1–3. P. 211–222. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(01\)00644-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(01)00644-2)
8. *Bordacs S., Popescu F., Slade D. et al.* Chloroplast DNA variation of white oaks in northern Balkans and in the Carpathian Basin // *Forest Ecol. Management*. 2002. V. 156. № 1–3. P. 197–209. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(01\)00643-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(01)00643-0)
9. *Brewer S., Cheddadi R., de Beaulieu J.-L. et al.* The spread of deciduous *Quercus* throughout Europe since the last glacial period // *Forest Ecol. Management*. 2002. V. 156. № 1–3. P. 27–48. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(01\)00646-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(01)00646-6)
10. Эволюция экосистем Европы при переходе от плейстоцена к голоцену (24–8 тыс. л. н.) / Под ред. Марковой А.К., ван Кольфсхотен Т. М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2008. 556 с.
11. *Markova A.K., Simakova A.N., Puzachenko A.Y.* Ecosystems of Eastern Europe at the time of maximum cooling of the Valdai glaciation (24–18 kyr BP) inferred from data on plant communities and mammal assemblages // *Quaternary Intern.* 2009. V. 201. P. 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2008.05.020>
12. *Денисов А.К.* Послеледниковая динамика северной границы ареала дуба черешчатого в СССР и филоценогенез дубрав севера // *Лесоведение*. 1980. № 1. С. 3–11.
13. *Семерикова С.А., Исаков И.Ю., Семериков В.Л.* Изменчивость хлоропластной ДНК отражает историю *Tilia cordata* s. l. в восточной части ареала // *Генетика*. 2020. Т. 56. № 2. С. 188–200. <https://doi.org/10.1134/S0016675820020113>
14. *Dering M., Lewandowski A., Ufnalski K., Kedzierska A.* How far to the east was the migration of white oaks from the Iberian refugium? // *Silva Fennica*. 2008. V. 42. № 3. P. 327–335. <https://doi.org/10.14214/sf.240>
15. *Chmielewski M., Meyza K., Chybicki I.J. et al.* Chloroplast microsatellites as a tool for phylogeographic studies: the case of white oaks in Poland // *iForest—Biogeosci. and Forestry*. 2015. V. 8. P. 765–771. <https://doi.org/10.3832/ifor1597-008>
16. *Slade D., Skvorc Z., Ballian D. et al.* The chloroplast DNA polymorphisms of white oaks of section *Quercus* in the Central Balkans // *Silvae Genetica*. 2008. V. 57.

- № 4–5. P. 227–234.
<https://doi.org/10.1515/sg-2008-0035>
17. Curtu A.L., Sofletea N., Toader A.V., Enescu M.C. Leaf morphological and genetic differentiation between *Quercus robur* L. and its closest relative, the drought-tolerant *Quercus pedunculiflora* K. Koch. // *Annals Forest Sci.* 2011. V. 68. № 7. P. 1163–1172.
<https://doi.org/10.1007/s13595-011-0105-z>
 18. Ковалевич О.А., Каган Д.И., Падутов В.Е. SSRP-анализ хлоропластной ДНК дуба черешчатого, произрастающего в Беларуси // Докл. НАН Беларуси. 2011. Т. 55. № 6. С. 100–104.
 19. Ковалевич О.А. Геноегеография дуба черешчатого на территории Беларуси по данным анализа хлоропластной ДНК: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Гомель: Ин-т леса НАН Беларуси, 2013. 24 с.
 20. Deguilloux M.F., Dumolin-Lapegue S., Gielly L. et al. A set of primers for the amplification of chloroplast microsatellites in *Quercus* // *Mol. Ecol. Notes.* 2003. V. 3. № 1. P. 24–27.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00339.x>
 21. Blanc-Jolivet C., Liesebach M. Tracing the origin and species identity of *Quercus robur* and *Quercus petraea* in Europe: a review // *Silvae Genetica.* 2015. V. 64. № 4. P. 182–193.
<https://doi.org/10.1515/sg-2015-0017>
 22. Devey M.E., Bell J.C., Smith D.N. et al. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD and microsatellite markers // *Theor. Appl. Genet.* 1996. V. 92. № 6. P. 673–679.
<https://doi.org/10.1007/BF00226088>
 23. Demesure B., Sodzi N., Petit R.J. A set of universal primers for amplification of polymorphic noncoding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants // *Mol. Ecol.* 1995. V. 4. № 1. P. 129–131.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1995.tb00201.x>
 24. Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J. Universal primers for amplification of 3 non-coding regions of chloroplast DNA // *Plant Mol. Biol.* 1991. V. 17. № 5. P. 1105–1109.
<https://doi.org/10.1007/BF00037152>
 25. Rozen S., Skaletsky H.J. Primer 3 on the WWW for general users and for biologist programmers // *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* / Eds. Krawetz S., Misener S. Totowa, N.J.: Humana Press, 2000. P. 365–386.
 26. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // *Nucl. Acids Symp. Series.* 1999. V. 41. P. 95–98.
 27. Ronquist F., Huelsenbeck J.P. MrBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // *Bioinformatics.* 2003. V. 19. № 12. P. 1572–1574.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>
 28. Swofford D.L. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods). Version 4.0 beta10. Sunderland: Sinauer Associates, Massachusetts, 2002.
 29. Sork V.L., Fitz-Gibbon S.T., Puiu D. et al. First draft assembly and annotation of the genome of a California endemic oak *Quercus lobata* Nee (Fagaceae) // *G3: Genes Genomes Genet.* 2016. V. 6. № 11. P. 3485–3495.
<https://doi.org/10.1534/g3.116.030411>
 30. Pham K.K., Hipp A.L., Manos P.S., Cronn R.C. A time and a place for everything: phylogenetic history and geography as joint predictors of oak plastome phylogeny // *Genome.* 2017. V. 60. № 9. P. 720–732.
<https://doi.org/10.1139/gen-2016-0191>
 31. Bandelt H.J., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // *Mol. Biol. Evol.* 1999. V. 16. № 1. P. 37–48.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
 32. Nei M. *Molecular Evolutionary Genetics.* N.Y.: Columbia Univ. Press, 1987. 512 p.
 33. Librado P., Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // *Bioinformatics.* 2009. V. 25. № 11. P. 1451–1452.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
 34. Excoffier L., Lischer H. ARLEQUIN ver. 3.5: An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. Bern: Computational and Molecular Population Genetics Lab (CMPG). Institute of Ecology and Evolution, Univ. Bern, Bern, Switzerland, 2011. 174 p.
 35. Dupanloup I., Schneider S., Excoffier L. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations // *Mol. Ecol.* 2002. V. 11. № 12. P. 2571–2581.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01650.x>
 36. Семериков Л.Ф. Популяционная структура древесных растений (на примере видов дуба европейской части СССР и Кавказа). М.: Наука, 1986. 140 с.
 37. Gomory D., Yakovlev I., Zhelev P. et al. Genetic differentiation of oak populations within the *Quercus robur/Quercus petraea* complex in Central and Eastern Europe // *Heredity.* 2001. V. 86. P. 557–563.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.2001.00874.x>
 38. Габитова А.А., Янбаев Ю.А., Редькина Н.Н. О высоком генетическом полиморфизме популяций дуба черешчатого на западном макросклоне Южного Урала // Вестник Башкирского ун-та (сер. Биология). 2015. Т. 20. № 3. С. 854–856.
 39. Degen B., Yanbaev R., Yanbaev Y. Genetic differentiation of *Quercus robur* in the South-Ural // *Silvae Genetica.* 2019. V. 68. № 1. P. 111–115.
<https://doi.org/10.2478/sg-2019-0019>
 40. Ekhaia J., Simeone M.C., Silakadze N., Abdaladze O. Morphological diversity and phylogeography of the Georgian durmast oak (*Q. petraea* subsp. *iberica*) and related Caucasian oak species in Georgia (South Caucasus) // *Tree Genet. Genom.* 2018. V. 14. № 2.
<https://doi.org/10.1007/s11295-018-1232-6>

Chloroplast DNA Variability and Phylogeography of Pedunculate Oak *Quercus robur* L. in the Eastern Part of the Range

S. A. Semerikova^{a,*}, I. Yu. Isakov^b, and V. L. Semerikov^a

^a*Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch of Russian Academy of Science, Ekaterinburg, 620144 Russia*

^b*Voronezh State University of Forestry and Technologies named after G.F. Morozov, Department of Forest Stands, Breeding and Reclamation, Voronezh, 39408 Russia*

*e-mail: s.a.semerikova@ipae.uran.ru

Chloroplast DNA variability was studied in 42 populations of pedunculate oak *Q. robur* L. in the European part of Russia, Belarus, Poland, Ukraine, the Urals, and the Caucasus. Restriction analysis and sequencing as well as chloroplast microsatellite loci (cpSSR) were used as genetic markers. For successful amplification and sequencing, new oak-specific primers have been developed. For the first time, nucleotide sequences of three fragments (*psaA-trnS*, *psbC-trnD* and *trnT-trnF*) were obtained for *Q. robur*, and the phylogenetic relationships of 13 identified haplotypes were revealed. Several divergent lineages of chloroplast DNA are present in the eastern part of the range. Haplotype groups have a non-random geographical distribution, probably reflecting the history of oak population in these areas. A sharp differentiation of populations by haplotype composition and level of variability was found: two haplotypes are distributed in the eastern part of the Russian Plain and in the Urals, disappearing in the west – in northwestern Russia, Belarus, Poland and Western Ukraine, where nine haplotypes were found that are absent in east. The geographical structure of variability of the pedunculate oak chloroplast DNA in Eastern Europe has similar features to that of small-leaved linden (Semerikova et al., 2020), another representative of European temperate forests, which, like oak in this part of the range, show clear differences between western and eastern populations. Apparently, this is due to post-glacial colonization in both species from different, isolated for a long time, sources, some of which were located in the east of the study area. In the Urals, a parallel differentiation of oak and linden between the southern part (basins of the Ural and Belaya rivers) and more northern regions (the basin of the Ufa River and Middle Urals) is revealed, which can be explained by different scenarios of the settlement of these areas with deciduous vegetation.

Keywords: phylogeography, *Quercus robur*, chloroplast DNA, cpSSR, PCR-RFLP, glacial refugia, postglacial migration, temperate forest tree, population structure.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВИДОВ РОДА
Jordanita Verity, 1946 (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridinae):
ДНК-ШТРИХКОДЫ И СООТВЕТСТВУЮЩИЕ
ИМ АМИНОКИСЛОТНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

© 2021 г. К. А. Ефетов¹*, З. С. Лазарева¹, Е. В. Паршкова¹, Г. М. Тарманн²

¹Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, 295051 Россия

²Тирольские государственные музеи Фердинанда, отдел естествознания, Халль, 6060 Австрия

*e-mail: efetov@ma.cfuv.ru

Поступила в редакцию 04.02.2020 г.

После доработки 20.03.2020 г.

Принята к публикации 14.04.2020 г.

Проанализированы качественный и количественный состав нуклеотидных последовательностей 5'-региона гена первой субъединицы митохондриальной цитохромоксидазы – *COI* (расшифрованных нами в рамках международного проекта по ДНК-штрихкодированию) и варибельность соответствующих аминокислотных последовательностей у представителей рода *Jordanita Verity, 1946*. В участке *COI* длиной 219 аминокислотных остатков количество варибельных позиций составило 14.2%, что значительно превышает имеющиеся в литературе данные для *Lepidoptera*. Выявлена 31 точка варибельности аминокислот, при этом две из них локализованы на близком расстоянии к активному центру фермента.

Ключевые слова: ДНК-штрихкодирование, цитохромоксидаза, *Jordanita, Zygaenidae*, аминокислотная последовательность, варибельные сайты.

DOI: 10.31857/S001667582012005X

Начиная с 2003 г., в молекулярно-генетических исследованиях все большее признание и распространение приобретает изучение 5'-региона гена первой субъединицы митохондриальной цитохромоксидазы (*COI*) длиной 658 пар нуклеотидов. Этот участок гена был предложен как универсальный маркер для идентификации видов с целью использования в качестве “штрихкода ДНК” [1]. Он кодирует часть молекулы *COI*, которая является одним из строительных блоков сложного белка оксидазы цитохрома С. Этот протеин представляет собой гомодимер, каждая часть которого, в свою очередь, состоит из нескольких аминокислотных цепей. Также он содержит некоторые небелковые лиганды: два атома железа, связанных с гемовыми группами, три атома меди, по одному атому цинка и магния [2, 3]. Цитохром-оксидаза является последним ферментом в цепи переноса электронов, передающим их на кислород. Поэтому изменения в структуре соответствующего участка гена, приводящие к изменениям в аминокислотной последовательности и пространственной структуре данного белка, могут влиять на энергетический обмен. Изменения в участках, располагающихся вблизи активных центров, или в областях, контактирующих с простетическими

группами, имеют наиболее выраженный эффект [4]. Следовательно, выявление и анализ аминокислотных замен в данном фрагменте *COI* у различных таксонов живых организмов являются актуальной задачей. Кафедра биохимии и лаборатория биотехнологии Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского участвует в международном проекте по секвенированию ДНК “*ZYGMO*” с 2009 г. В рамках этого проекта проводится изучение нуклеотидных последовательностей фрагмента 5'-участка митохондриального гена *COI* у различных представителей семейства *Zygaenidae* [5].

Данное семейство (представленное пятью подсемействами) имеет широкое распространение во всех зоогеографических регионах земного шара [6–12]. К настоящему времени известно более 1000 видов *Zygaenidae*, и число описанных видов увеличивается с каждым годом [13–21]. Распространение подсемейства *Zygaeninae* ограничено преимущественно Палеарктической и Эфиопской зоогеографическими областями. Большинство видов *Chalcosiinae* обитают в Восточной и Южной Азии, и только два вида, относящиеся к роду *Aglaope Latreille, 1809*, распространены в Западной

Палеарктике. Procridae обитают по всему миру за исключением Антарктиды. Callizygaeninae распространены только в Индомалайской зоогеографической области [22], Inouelinae – в Восточной Азии [23].

Представители семейства Zygaenidae ранее были изучены нами с помощью морфологических, кариологических, биологических методов [24–32]. В настоящей публикации мы обсудим результаты изучения ДНК-штрихкодов и соответствующих им аминокислотных последовательностей, полученных для видов рода *Jordanita* Verity, 1946 (Zygaenidae, Procridae).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал для изучения ДНК от представителей различных видов рода *Jordanita* получен в результате собственных сборов авторов, в некоторых случаях предоставлен зарубежными учеными или кураторами европейских музеев. С помощью стерильных инструментов отделялась конечность каждого исследуемого экземпляра и помещалась в специальную микропробирку. Выделение ДНК из образцов, амплификация и секвенирование проводились в канадском Центре ДНК-штрихкодирования (The Canadian Centre for DNA Barcoding, Biodiversity Institute of Ontario, University of Guelph, Гуэлф, Канада) в соответствии со стандартными протоколами [33, 34], а также в Институте проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН (Москва) в рамках проекта программы развития ФГАОУ ВО “Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского” “Академическая мобильность молодых ученых России – АММУР”. Во втором случае выделение ДНК, амплификация и секвенирование проводились по схеме, указанной в работе Ефетова и соавт. [35].

В большинстве случаев использовались стандартные праймеры:

LepF1: ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG,
LepR1: TAAACTTCTGGATGTCCAAAAATCA.

В качестве дополнительных, при необходимости, использовались также следующие праймеры:

MLepF1: GCTTTCCACGAATAAATAATA,
MLepR1: CCTGTTCCAGCTCCATTTTC,

LCO1490 (C_LepFolF): GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG,

HCO2198 (C_LepFolR): TAAACTTCAGGGT-GACCAAAAAATCA.

Консенсусные последовательности расшифровывались с использованием редактора последовательностей ChromasPro. Полученные нуклеотидные последовательности переводились в соответствующие аминокислотные. Для анализа данных использовались аналитические инструменты сайта проекта канадского Центра ДНК-

штрихкодирования (www.boldsystems.org), а также программы BioEdit, MEGA 6.0 и DNAsp v5. В качестве меры эволюционной консервативности отдельно взятой позиции в белке использовалась нормализованная информационная энтропия. Изменения аминокислот в каждом наборе данных оценивали путем расчета энтропии для каждого аминокислотного сайта в программе BioEdit. Полностью консервативный аминокислотный сайт имеет значение энтропии 0, которое увеличивается с увеличением вариации аминокислот. Для оценки эффективности разграничения последовательностей на видовом уровне использовалась дендрограмма, построенная с помощью двухпараметрической модели Кимуры (K2P-дендрограмма) (рис. 1) [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами были расшифрованы последовательности гена *COI* длиной 658 пар оснований для 1031 экз. более чем 240 видов Zygaenidae, в том числе для 114 экз. 26 видов, принадлежащих к роду *Jordanita*. На основании данных ДНК были получены соответствующие пептидные последовательности длиной 219 аминокислот. Полученные си-квенсы гена *COI* были депонированы в GenBank. Число результатов для каждого вида и регионы сбора образцов представлены в табл. 1.

Ни в одной из полученных последовательностей вставок и/или делеций (инделов) не было детектировано. При анализе нуклеотидных штрихкодов (длиной более 650 пар нуклеотидов) с использованием Maximum Composite Likelihood model, проведенных в программе MEGA 6 для представителей рода *Jordanita*, обнаружены 194 переменные позиции, из них 158 сайтов оказались парсимонийно-информативными. Оценочное соотношение транзиции/трансверсии (*R*) составило 3.97. Анализируемые последовательности подтвердили АТ-смещение (среднее содержание АТ > 60% во всех последовательностях), характерное для митохондриальной ДНК животных (см. табл. 2). Это согласуется с литературными данными [36], при этом Pentinsaari с соавт. [37] выяснено, что смещение состава последовательностей ДНК-штрихкода в сторону АТ немного выше у Lepidoptera, чем у других таксонов.

Второе положение в триплетах характеризуется наиболее высоким содержанием GC-пар (42.65%), а самое низкое содержание GC-пар (8.59%) – в третьем положении, следовательно можно говорить о снижении мутационного давления на этот участок *COI* [38, 39]. Определение стандартной ошибки показывает выраженность межвидовой изменчивости нуклеотидного состава последовательностей гена *COI*. Нуклеотидный состав второй позиции триплетов характеризуется самой низкой вариабельностью (SE=0.026), третьей

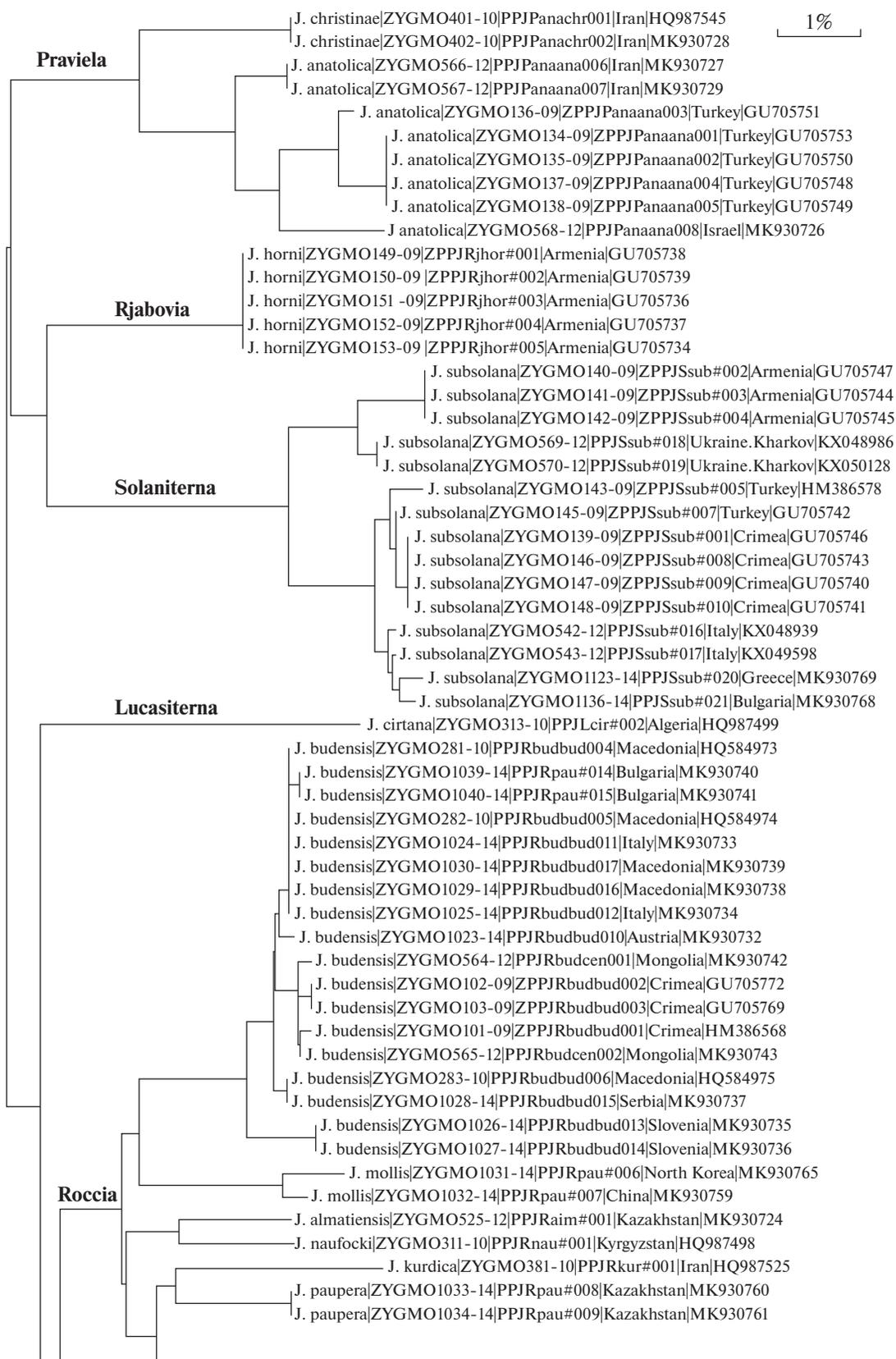


Рис. 1. Дендрограмма, построенная с использованием двухпараметрической модели Кимуры на основе нуклеотидных последовательностей участка гена первой субъединицы митохондриальной цитохромоксидазы видов рода *Jordanita* Verity, 1946. Крупным шрифтом приведены названия подродов.

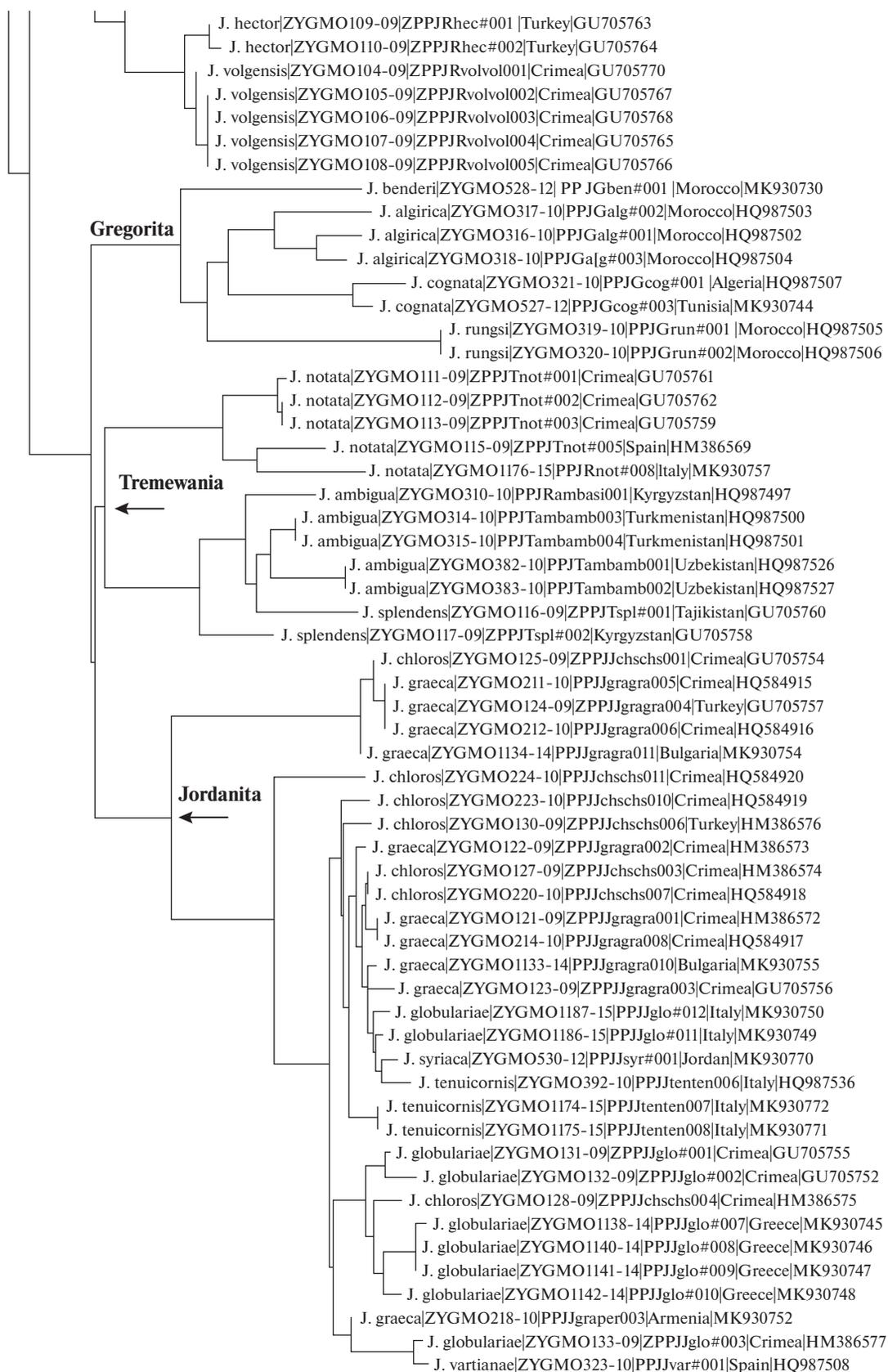


Рис. 1. Окончание

Таблица 1. Список экземпляров, использованных в исследовании

Вид	Число последовательностей	Географические регионы находок
<i>Jordanita (Roccia) budensis</i>	18	Австрия, Италия, Македония, Монголия, Россия (Крым), Сербия, Словения, Франция
<i>Jordanita (Roccia) paupera</i>	2	Казахстан
<i>Jordanita (Roccia) mollis</i>	2	Китай, Северная Корея
<i>Jordanita (Roccia) volgensis</i>	5	Россия (Крым)
<i>Jordanita (Roccia) naufocki</i>	1	Кыргызстан
<i>Jordanita (Roccia) almatiensis</i>	1	Казахстан
<i>Jordanita (Roccia) kurdica</i>	1	Иран
<i>Jordanita (Roccia) hector</i>	2	Турция
<i>Jordanita (Lucasiterna) cirtana</i>	1	Алжир
<i>Jordanita (Tremewania) notata</i>	5	Италия, Испания, Россия (Крым)
<i>Jordanita (Tremewania) splendens</i>	2	Кыргызстан, Таджикистан
<i>Jordanita (Tremewania) ambigua</i>	5	Кыргызстан, Туркменистан, Узбекистан
<i>Jordanita (Gregorita) algerica</i>	3	Марокко
<i>Jordanita (Gregorita) rungsi</i>	2	Марокко
<i>Jordanita (Gregorita) cognata</i>	2	Алжир, Тунис
<i>Jordanita (Gregorita) benderi</i>	1	Марокко
<i>Jordanita (Jordanita) syriaca</i>	1	Иордания
<i>Jordanita (Jordanita) graeca</i>	10	Армения, Болгария, Россия (Крым), Турция
<i>Jordanita (Jordanita) chloros</i>	7	Россия (Крым) и Турция
<i>Jordanita (Jordanita) tenuicornis</i>	3	Италия
<i>Jordanita (Jordanita) globulariae</i>	9	Греция, Италия, Македония, Россия (Крым)
<i>Jordanita (Jordanita) vartianae</i>	1	Испания
<i>Jordanita (Praviela) anatolica</i>	8	Иран и Турция
<i>Jordanita (Praviela) christinae</i>	2	Иран
<i>Jordanita (Solaniterna) subsolana</i>	15	Армения, Болгария, Греция, Италия, Россия (Крым), Турция, Украина
<i>Jordanita (Rjabovia) horni</i>	5	Армения

Таблица 2. Суммарная статистика частоты встречаемости нуклеотидов (%) в последовательностях, полученных для рода *Jordanita*

Азотистые основания	Минимальная	Средняя	Максимальная	SE
G	13.98	14.88	16.11	0.0408
C	15.05	16.39	17.93	0.0664
A	28.42	29.92	31.31	0.0537
T	36.93	38.80	40.31	0.0772
GC	30.09	31.27	32.98	0.0678
GC, 1-я позиция в кодоне	40.18	42.67	45.62	0.1444
GC, 2-я позиция в кодоне	42.01	42.65	43.32	0.0258
GC, 3-я позиция в кодоне	4.55	8.59	15.00	0.2286

позиции — максимальным межвидовым полиморфизмом (SE=0.23). Следовательно, большинство замен в изучаемом участке гена *COI* являются сино-

нимичными. Также в программе BioEdit для 158 последовательностей были найдены четыре консервативных региона (с максимальной средней

энтропией, не превышающей 0.2, и минимальной длиной 15 нуклеотидов): позиции с 182 по 199; с 233 по 262; с 303 по 317; с 320 по 339. С помощью программы DNAsp v5 было детектировано 194 полиморфных (сегрегирующих) сайта с общим количеством мутаций 245, число парсимонийно-информативных сайтов составило 158, число гаплотипов — 74.

После исключения Ефетовым и Тарманном (на основании изучения морфологических признаков) трех видов из подрода *Roccia* Alberti, 1954 (род *Jordanita*), а именно: *Jordanita notata* (Zeller, 1847), *Jordanita splendens* (Staudinger, 1887) и *Jordanita ambigua* (Staudinger, 1887), для этих видов был описан подрод *Tremewania* Efetov & Tarmann, 1999 [40]. К2Р-дендрограмма проиллюстрировала как монофилию подрода *Tremewania*, так и монофилию *Roccia* после исключения вышеназванных трех видов. Эти результаты согласуются как с данными морфологии и биологии, так и с недавно полученной информацией о хемоаттракции [29]. Сложная ситуация была обнаружена в подроде *Jordanita* Verity, 1946. Максимальная внутривидовая дистанция между экземплярами вида *Jordanita (Jordanita) graeca* (Jordan, 1907) составила 5.72%, а вида *Jordanita (Jordanita) chloros* (Hübner, 1813) — 6.08%, в то время как дивергенция между последовательностями *COI* внутри других видов данного подрода оказалась гораздо меньше. Для вида *Jordanita (Jordanita) globulariae* (Hübner, 1793) эта величина составила 1.86%, а *Jordanita (Jordanita) tenuicornis* (Zeller, 1847) — 1.58%. Однако межвидовые дистанции для изучаемого подрода оказались очень низкими — в пределах 0.3–0.61%. Виды *Jordanita (Jordanita) vartianae* (Malicky, 1961) и *Jordanita (Jordanita) syriaca* (Alberti, 1937) были исследованы только по одному экземпляру каждый, поэтому для них было невозможно рассчитать внутривидовые дистанции. Все виды подрода *Jordanita* рода *Jordanita* имеют хорошие морфологические отличия в строении гениталий [41]. Можно сделать вывод о том, что ДНК-штрихкодирование в этой группе нельзя использовать для делимитации видов. Подобные результаты были получены ранее и для некоторых других таксонов Insecta, например семейства Geometridae (Lepidoptera) [42].

Генетические расхождения (степень полиморфизма) *COI* могут нести информацию биогеографического характера. Так, анализ штрихкодов различных популяций *Jordanita (Solanierna) subsolana* (Staudinger, 1862) показал сходство у образцов из Крыма, Турции, Южной Италии и Македонии, в то время как экземпляры из Армении и континентальной Украины образуют изолированную группу (рис. 2). Это, по нашему мнению, может отражать заселение этим видом определенных географических регионов в разное время. С другой стороны, значительные различия в последовательностях гена *COI* могут быть связаны с

длительной изоляцией разобщенных популяций одного и того же вида, например у *Jordanita (Tremewania) splendens* (максимальное внутривидовое расстояние 2.17%) из разных горных цепей Центральной Азии (рис. 1). Данные ДНК-штрихкодирования могут быть использованы для ревизии объема видов. Например, в 2019 г. было показано, что таксон *Ino budensis* var. *mollis* Grum-Grshimailo, 1893 является самостоятельным видом *Jordanita (Roccia) mollis* (Grum-Grshimailo, 1893) [43].

По литературным данным участок *COI*, кодируемый ДНК-штрихкодом, имеет пространственную структуру в виде шести α -спиральных участков, соединенных пятью петлями, состоящими из 60 аминокислот [36, 37]. У *Metazoa* Pentinsaari и соавт. [37] детектировали в участке *COI* 23 высококонсервативные аминокислотные позиции, остальные сайты оказались вариабельными с различной долей энтропии. Наибольшее число консервативных аминокислот (16 из 23) находят в спиральных участках, пронизывающих внутреннюю мембрану митохондрии. Тем не менее одна петля также характеризуется высокой консервативностью, так как контактирует с гемом в активном центре фермента [36, 37]. Согласно работе Pentinsaari и соавт. [37] наиболее важные консервативные позиции у *Metazoa* в данном участке молекулы *COI* — это 22, 45, 110, 111, 113. В исследованном роде *Jordanita* анализ последовательностей *COI* в программе BioEdit показал нулевую энтропию для всех этих позиций.

По данным литературы у Coleoptera в участке *COI*, кодируемом ДНК-штрихкодом, детектировано 39 точек вариабельности, а у Lepidoptera — 14. Вариабельные участки у Lepidoptera совпадают с таковыми у Coleoptera, за исключением одного участка у Lepidoptera (позиция 93), который не определен в качестве вариабельного у Coleoptera (энтропия <0.5) [36, 37]. Для исследованных экземпляров *Jordanita* эта позиция оказалась консервативной. В общем для рода *Jordanita* определена 31 точка вариабельности, что составляет 14.2%. Pentinsaari и соавт. [37] связывают накопление большего количества несинонимичных замен в данном фрагменте белка с двумя факторами: временем дивергенции таксона и уровнем метаболизма, а соответственно интенсивностью работы цепи переноса электронов для обеспечения организма энергией. Представители рода *Jordanita* характеризуются медленным линейным полетом [22], что требует меньших затрат энергии, возможно это проявляется в количестве аминокислотных замен, сопоставимых с таковым у Coleoptera. У активно летающих Lepidoptera (Sphingidae, Saturniidae) и некоторых других Insecta даже уровни метаболизма покоя обычно выше, чем у нелетающих видов [44].



Рис. 2. Географическое распространение *Jordanita (Solaniterna) subsolana* (Staudinger, 1862). Разным цветом обозначены две группы популяций по данным ДНК-штрихкодирования.

Подавляющее большинство точек варибельности аминокислот располагается относительно далеко от центров взаимодействия апофермента с простетическими группами в цитохромоксидазе. Это неудивительно, учитывая решающую роль этого фермента в работе дыхательной цепи. Однако некоторые варибельные сайты в аминокислотной последовательности могут непосредственно влиять на ферментативную активность, так как находятся на расстоянии атомарного взаимодействия от гемовых групп [38]. Было идентифицировано шесть таких варибельных позиций для Metazoa и две для Coleoptera. На расстоянии атомарного взаимодействия от гема локализованы два варибельных участка: аминокислоты 8 и 57 встречаются на расстоянии 3.6 и 4.4 Å от гема соответственно. Для Coleoptera указано, что в одном из двух участков (8 или 57) может появляться гидрофобная аминокислота фенилаланин с объемным радикалом [36, 37]. В нашем исследовании мы выяснили, что для представителей рода *Jordanita* характерна аминокислотная варибельность в позиции 8, в этом положении обнаружен либо изолейцин, либо валин. Обе эти аминокислоты являются гидрофобными и имеют разветвленный, но не циклический ароматический (в отличие от фенилаланина) радикал. Согласно данным Betts и Russell [4] такие замены не приводят к существенным изменениям в структуре белковой молекулы, так как и изолейцин, и валин являются мало реакционноспособными, локализуясь в гидрофобной сердцевине белка, при этом обе эти молекулы, имея метильный радикал при бета-углеродном атоме, характеризуются одинаковой объемностью боковой цепи. Следовательно, такие изменения не

оказывают существенного влияния на функционирование белка.

Также нами показано, что из шести варибельных аминокислотных позиций, располагающихся достаточно близко к гему (расстояние около 5 Å), известных по данным литературы для Metazoa [36, 37], позиция 27 у *Jordanita* является варибельной. Но в литературных источниках показано, что в этой позиции находится глутамин (с энтропией более 1), а у экземпляров исследуемого рода *Jordanita* детектированы треонин, аспарагин, валин, метионин или аланин.

В предыдущем исследовании нами было показано, что позиции 8, 13, 97, 104, 106, 123, 125 являются варибельными для рода *Zygaena* Fabricius, 1775 [33]. При этом позиция 123 ранее была детектирована как варибельная для всего рода, в то время как остальные позиции являются подродоспецифичными. В результате анализа последовательностей рода *Jordanita* эти позиции также были определены как варибельные. В положении 123 варьируют серин/глицин и у *Zygaena*, и у *Jordanita*. Такие замены, по мнению Betts и Russell [4], не имеют серьезного влияния на функционирование данного участка полипептидной цепи, так как эти аминокислоты характеризуются малым размером радикалов.

Интересно, что при исследовании кариотипов представителей семейства Zygaenidae [45, 46] во многих родах обнаружены виды с выраженными отклонениями от модального для Lepidoptera гаплоидного числа (30–31) хромосом (n). У большинства изученных нами видов рода *Jordanita* n равно как раз 31 (за исключением *J. (S.) subsolana*

na, $n = 27$) [41]. В то же время внутривидовая вариабельность последовательностей митохондриальной COI у некоторых хорошо различимых морфологически видов этого рода значительно превышает общепринятые уровни межвидовой дивергенции (2–3%), достигая у отдельных представителей подрода *Jordanita* 6–7%.

Данные о строении и изменчивости COI, вариабельности кодирующих ее генов имеют важное значение не только для понимания механизмов функционирования белков, но и для выяснения путей видообразования, эволюции и филогенетических взаимоотношений биологических видов. Комплексный анализ, учитывающий все наблюдения (морфологические, биологические, экологические и биохимические) и данные штрихкодирования ДНК, может быть полезен для решения некоторых систематических проблем, а также таксономических и биогеографических решений.

Таким образом, в результате изучения митохондриального ДНК-штрихкода у представителей рода *Jordanita* показано, что этот участок гена цитохромоксидазы характеризуется высокой степенью вариабельности. В аминокислотных последовательностях, соответствующих ДНК-штрихкодам, рода *Jordanita* была выявлена 31 точка вариабельности аминокислот, при этом две точки (8 и 27) локализованы на близком расстоянии к активному центру фермента.

Считаем своим долгом выразить благодарность П.Д.Н. Эберу (Prof. P.D.N. Hebert) (Канада), Р. Ружери (Dr R. Rougerie) (Франция), а также О.Г. Горбунову и И.Г. Мещерскому (Россия) за плодотворное сотрудничество и техническую помощь при проведении исследований.

Данная работа была частично поддержана проектом программы развития ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского» «Академическая мобильность молодых ученых России – АММУР» в 2017 г.

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J.R. Biological identifications through DNA barcodes // Proc. Biol. Sci. 2003. V. 270. P. 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
2. Tsukihara T., Yamashita E., Tomizaki T. et al. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å // Science. 1996. V. 272. P. 1136–1144. <https://doi.org/10.1126/science.272.5265.1136>
3. Balsa E., Marco R., Perales-Clemente E. et al. NDUF4A is a subunit of Complex IV of the mammalian electron transport chain // Cell Metab. 2012. V. 16. P. 378–386. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.07.015>
4. Betts M.J., Russell R.B. Amino acid properties and consequences of substitutions // Bioinformatics for Geneticists: A Bioinformatics Primer for the Analysis of Genetic Data, Second Edition. Chichester: Wiley, 2007. P. 311–342. <https://doi.org/10.1002/9780470059180.ch13>
5. Efetov K.A., Kirsanova A.V., Lazareva Z.S. et al. DNA barcoding of Zygaenidae (Lepidoptera): results and perspectives // Nota Lepidopterologica. 2019. V. 42. № 2. P. 137–150. <https://doi.org/10.3897/nl.42.33190>
6. Efetov K.A. *Inouela* gen. n. from Japan and Taiwan (Lepidoptera: Zygaenidae, Chalcosiinae) // Entomologist's Gazette. 1999. V. 50. № 2. P. 91–95.
7. Efetov K.A., Tarmann G.M., Tremewan W.G. *Zygaena nevadensis* Rambur, 1858 (Lepidoptera: Zygaenidae, Zygaeninae) newly recorded from the southern tip of the Peninsula Appenninica (Apennine Peninsula), Italy // Entomologist's Gazette. 2011. V. 62. № 2. P. 123–129.
8. Efetov K.A., Tarmann G.M. A new European species, *Adscita dujardini* sp. nov. (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridae) confirmed by DNA analysis // Entomologist's Gazette. 2014. V. 65. № 3. P. 179–200.
9. Efetov K.A., Hofmann A., Tarmann G.M. Application of two molecular approaches (use of sex attractants and DNA barcoding) allowed to rediscover *Zygaenoprocris eberti* (Alberti, 1968) (Lepidoptera, Zygaenidae, Procridae), hitherto known only from the female holotype // Nota Lepidopterologica. 2014. V. 37. № 2. P. 151–160. <https://doi.org/10.3897/nl.37.7871>
10. Efetov K.A., Hofmann A., Tarmann G.M., Tremewan W.G. Taxonomic comments on the treatment of the Zygaenidae (Lepidoptera) in volume 3 of *Moths of Europe*, Zygaenids, Pyralids 1 and Brachodids (2012) // Nota Lepidopterologica. 2014. V. 37. № 2. P. 123–133. <https://doi.org/10.3897/nl.37.7940>
11. Efetov K.A., Tarmann G.M., Tshova T.B., Subchev M.A. Enantiomers of 2-butyl 7Z-dodecenoate are sex attractants for males of *Adscita mannii* (Lederer, 1853), *A. geryon* (Hübner, 1813), and *Jordanita notata* (Zeller, 1847) (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridae) in Italy // Nota Lepidopterologica. 2015. V. 38. № 2. P. 161–169. <https://doi.org/10.3897/nl.38.6312>
12. Efetov K.A., Kucherenko E.E., Parshkova E.V., Tarmann G.M. 2-butyl 2-dodecenoate, a new sex attractant for *Jordanita (Tremewania) notata* (Zeller, 1847) and some other Procridae species (Lepidoptera: Zygaenidae) // SHILAP Revista de lepidopterologia. 2016. V. 44. № 175. P. 519–527.
13. Efetov K.A. A revision of the genus *Goe* Hampson, [1893] (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridae), with descriptions of two new species // Entomologist's Gazette. 1998. V. 49. № 1. P. 49–62.
14. Efetov K.A. Two new species of the genus *Artona* Walker, 1854 (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridae) // Entomologist's Gazette. 1997. V. 48. № 3. P. 165–177.
15. Efetov K.A. Nine new species of the genus *Chrysartona* Swinhoe, 1892 (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridae) // Entomologist's Gazette. 2006. V. 57. № 1. P. 23–50.

16. *Efetov K.A. Illiberis (Hedina) lousi* sp. nov. (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridae) from China // Entomologist's Gazette. 2010. V. 61. № 4. P. 235–241.
17. *Efetov K.A., Tarmann G.M. Chrysartona (Chrystarmanna) mineti* sp. nov. (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridae) from northern Vietnam // Entomologist's Gazette. 2013. V. 64. № 3. P. 197–206.
18. *Efetov K.A., Tarmann G.M. Illiberis (Alterasvenia) cernyi* sp. nov. (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridae) from northern Thailand // Entomologist's Gazette. 2013. V. 64. № 1. P. 33–39.
19. *Efetov K.A., Tarmann G.M. Illiberis (Alterasvenia) banmauka* sp. nov. (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridae) from China and Myanmar // Entomologist's Gazette. 2014. V. 65. № 1. P. 62–70.
20. *Efetov K.A., Tarmann G.M. Pseudophacusa multidentata* Efetov & Tarmann, a new genus and species of Procridae from Myanmar, China and Laos (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridae) // SHILAP Revista de lepidopterologia. 2016. V. 44. № 173. P. 81–89.
21. *Efetov K.A., Tarmann G.M. Thibetana keili* Efetov & Tarmann, a new species of the genus *Thibetana* Efetov & Tarmann, 1995, from Tibet (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridae, Artonini) // SHILAP Revista de lepidopterologia. 2017. V. 45. № 180. P. 581–587.
22. *Efetov K.A. The Zygaenidae (Lepidoptera) of the Crimea and Other Regions of Eurasia*. Simferopol: CSMU Press, 2005. 420 p.
23. *Efetov K.A., Tarmann G.M. The hypothetical ground plan of the Zygaenidae, with a review of the possible autapomorphies of the Procridae and the description of the Inouelinae subfam. nov.* // J. Lepidopterists' Society. 2017. V. 71. № 1. P. 20–49. <https://doi.org/10.18473/lepi.v71i1.a5>
24. *Efetov K.A. The description of the female of Illiberis (Alterasvenia) yuennanensis* Alberti, 1951 (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridae) // Entomologist's Gazette. 1996. V. 47. № 2. P. 111–113.
25. *Efetov K.A. On the systematic position of Zygaenoprocris* Hampson, 1900 (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridae) and the erection of two new subgenera // Entomologist's Gazette. 2001. V. 52. № 1. P. 41–48.
26. *Efetov K.A., Tarmann G.M., Hayashi E., Parshkova E.V. New data on the chaetotaxy of the first instar larvae of Procridae and Artonini (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridae) // Entomologist's Gazette. 2006. V. 57. № 4. P. 229–233.*
27. *Efetov K.A., Hayashi E. On the chaetotaxy of the first instar larva of Artona martini* Efetov, 1997 (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridae, Artonini) // Entomologist's Gazette. 2008. V. 59. № 2. P. 101–104.
28. *Efetov K.A., Koshio C., Kucherenko E.E. A new synthetic sex attractant for males of Illiberis (Primilliberis) pruni* Dyar, 1905 (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridae) // SHILAP Revista de lepidopterologia. 2018. V. 46. № 182. P. 263–270.
29. *Can Cengiz F., Efetov K.A., Kaya K. et al. Zygaenidae (Lepidoptera) of Thrace Region of Turkey // Nota Lepidopterologica. 2018. V. 41. № 1. P. 23–36. <https://doi.org/10.3897/nl.41.21065>*
30. *Князев С.А., Ефетов К.А., Пономарёв К.Б. Пестрянки (Lepidoptera, Zygaenidae) Омской области // Зоол. журн. 2015. Т. 94. № 11. С. 1297–1302.*
31. *Ефетов К.А., Паршкова Е.В., Баевский М.Ю., Поддубов А.И. Сложный эфир бутанола-2 и додеценной кислоты: синтез и аттрактивные свойства // Укр. биохим. журн. 2014. Т. 86. № 6. С. 175–182.*
32. *Subchev M.A., Efetov K.A., Toshova T.B., Koshio C. Sex pheromones as isolating mechanisms in two closely related Illiberis species – I. (Primilliberis) rotundata* Jordan, 1907, and *I. (P.) pruni* Dyar, 1905 (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridae) // Entomologist's Gazette. 2016. V. 67. № 1. P. 51–57.
33. *Ефетов К.А., Лазарева З.С., Паршкова Е.В., Тарман Г.М. Вариабельность аминокислотных последовательностей первой субъединицы митохондриальной цитохромоксидазы, кодируемых 658bp-участком гена COI, у видов рода Zygaena Fabricius, 1775 // Крымский журн. эксперим. и клин. медицины. 2017. Т. 7. № 4. С. 29–34.*
34. *Ефетов К.А., Курсанова А.В., Лазарева З.С. и др. Изучение нуклеотидных последовательностей гена первой субъединицы митохондриальной цитохромоксидазы и решение некоторых вопросов биосистематики Zygaenidae (Lepidoptera) // Таврический медико-биол. вестник. 2016. Т. 19. № 1. С. 28–33.*
35. *Ефетов К.А., Лазарева З.С., Паршкова Е.В. Изучение ДНК-штрихкодов у видов подрода Jordanita рода Jordanita* Verity, 1946 (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridae) // Уч. записки Крымского федерального ун-та им. В.И. Вернадского. Биология. Химия. 2019. Т. 5(71). № 4. С. 69–78.
36. *Pentinsaari M. Utility of DNA barcodes in identification and delimitation of beetle species, with insights into COI protein structure across the animal kingdom: Acad. diss. Oulu.: Univ. Oulu, 2016. 60 p.*
37. *Pentinsaari M., Salmela H., Mutanen M., Roslin T. Molecular evolution of a widely adopted taxonomic marker (COI) across the animal tree of life // Sci. Reports. 2016. V. 6. <https://doi.org/10.1038/srep35275>*
38. *Бутвиловский В.Э., Бутвиловский А.В., Черноус Е.А. Молекулярная эволюция: материалы к факультативному курсу: курс лекций. Минск: БГМУ, 2012. 96 с.*
39. *Бутвиловский А.В., Барковский Е.В., Бутвиловский В.Э. и др. Основные методы молекулярной эволюции: монография. Минск: Белпринт, 2009. 215 с.*
40. *Efetov K.A., Tarmann G.M. Forester Moths. The Genera Theresimima* Strand, 1917, *Rhagades* Wallengren, 1863, *Jordanita* Verity, 1946, and *Adscita* Retzius, 1783 (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridae). Stenstrup: Apollo Books, 1999. 192 p.
41. *Efetov K.A. Forester and Burnet Moths (Lepidoptera: Zygaenidae). The Genera Theresimima* Strand, 1917, *Rhagades* Wallengren, 1863, *Zygaenoprocris* Hampson, 1900, *Adscita* Retzius, 1783, *Jordanita* Verity, 1946 (Procridae), and *Zygaena* Fabricius, 1775 (Zygaeninae). Simferopol: CSMU Press, 2004. 272 p.

42. Hausmann A., Haszprunar G., Hebert P.D.N. DNA barcoding the geometrid fauna of Bavaria (Lepidoptera): Successes, Surprises, and Questions // PLoS One. 2011. V. 6. № 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017134>
43. Efetov K.A., Tarmann G.M., Parshkova E.V. “*Ino Budensis* var. *Mollis*” Grun-Grshimailo, 1893 (Lepidoptera: Zygaenidae) from Eastern Asia recognized as a valid species on the base of morphological and molecular analysis // Zootaxa. 2019. V. 4619. № 3. P. 518–526. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4619.3.5>
44. Reinhold K. Energetically costly behaviour and the evolution of resting metabolic rate in insects // Funct. Ecol. 1999. № 13. P. 217–224.
45. Efetov K.A., Parshkova E.V., Koshio C. The karyotype of *Illiberis (Primilliberis) rotundata* Jordan, [1907] (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridinae) // Entomologist's Gazette. 2004. V. 55. № 3. P. 167–170.
46. Efetov K.A., Parshkova E.V., Tarasova L.G., Tarmann G.M. The karyotypes of Procridinae (Lepidoptera: Zygaenidae), with the first record of the karyotype of *Pollaniscus commoni* Tarmann, 2004, a representative of the tribe Artonini // Entomologist's Gazette. 2015. V. 66. № 2. P. 121–125.

Molecular Genetic Characters of Species of the Genus *Jordanita* Verity, 1946 (Lepidoptera: Zygaenidae, Procridinae): DNA Barcodes and Corresponding Amino Acid Sequences

K. A. Efetov^{a,*}, Z. S. Lazareva^a, E. V. Parshkova^a, and G. M. Tarmann^b

^aVernadsky Crimean Federal University, Simferopol, 295051 Russia

^bTiroler Landesmuseen, Ferdinandeum, Naturwissenschaftliche Abteilung, Sammlungs- und Forschungszentrum, Hall, 6060 Austria

*e-mail: efetov@ma.cfuv.ru

The paper presents qualitative and quantitative composition of the nucleotide sequences of the 5' region of the first subunit of the mitochondrial cytochrome oxidase (*COI*) gene (decoded in the framework of the International DNA Barcoding Project) and the variability of the corresponding amino acid sequences in the genus *Jordanita* Verity, 1946. The number of variable positions in COI region (219 amino acid residues) is 14.2% that significantly exceeds the data for other Lepidoptera. 31 amino acid variable positions were revealed, and two of them are localized near the active site of the enzyme.

Keywords: DNA barcoding, cytochrome oxidase, *Jordanita*, Zygaenidae, amino acid sequence, variable sites.

МНОЖЕСТВЕННЫЙ ХРОМОСОМНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ, ХРОМОСОМНОЙ РАСЫ “ЭВОРОН” ЭВОРОНСКОЙ ПОЛЕВКИ (Rodentia, Arvicolinae)

© 2021 г. И. В. Картавецва¹, *, И. Н. Шереметьева¹, М. В. Павленко¹

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

*e-mail: Kartavtseva@biosoil.ru

Поступила в редакцию 26.02.2020 г.

После доработки 11.05.2020 г.

Принята к публикации 08.07.2020 г.

На основании анализа собственных и литературных данных полевок берегов о. Эворон ($n = 8$) и р. Амгунь ($n = 8$), в Эворон-Чукчагирской низменности, а также особей лабораторного разведения, приведены новые данные о кариотипической изменчивости ($2n = 38–41$, $NF = 54–59$), хромосомных преобразованиях и их сочетаниях в кариотипе. Нумерация хромосом в кариотипе эворонской полевки с использованием методов дифференциального (GTG–) окрашивания позволила обозначить пары хромосом, вовлеченные в различные хромосомные перестройки, а для пар, образованных в результате слияния хромосом, дать номера парам их образовавшим. Тандемные слияния теломера-теломера (TTel) двуплечих хромосом образуют крупный субметацентрик Mev1/4M; слияние теломера-центромера (TCen) в результате инактивации центромеры одной из пар акроцентриков образуют либо акроцентрик (Mev17/18A), либо метацентрик (Mev17/18M), а робертсоновское слияние этих же пар – образует метацентрик средних размеров (Mev17/18M). Также показана изменчивость положения центромеры в двух парах аутосом (Mev8 и Mev14). Выявленные перестройки позволили описать двенадцать вариантов кариотипа: два с $2n = 41$, шесть с $2n = 40$, три с $2n = 39$ и один с $2n = 38$. Предложено отнести полевок Эворон-Чукчагирской низменности, имеющих слияние двуплечих хромосом Mev1 и Mev4, к хромосомной расе “эворон”, остальных – к расе “арги”. Получение плодового потомства от особей, имеющих в кариотипе слияние TTel и высокий процент этой перестройки у особей из природных выборок, свидетельствует об отсутствии ее вредного влияния на жизнеспособность полевок.

Ключевые слова: видообразование, цитогенетика, хромосомные перестройки, тандемные, робертсоновские слияния, полиморфизм, популяции, грызуны, млекопитающие.

DOI: 10.31857/S0016675821010082

Восточноазиатские серые полевки рода *Alexandromys* (= *Microtus*) (Arvicolini Gray, 1821) характеризуются слабой морфологической дифференциацией [1–4] и высокой скоростью процессов видообразования, сопровождающихся хромосомными перестройками [2, 5, 6]. Кариологические характеристики ($2n$ и NF) видов этого рода являются хорошими дифференцирующими признаками [2, 7–10]. Род включает 12 видов, хромосомные числа которых варьируют от 30 до 52. Для трех видов отмечен стабильный кариотип: *A. kikuchii* Kuroda, 1920 ($2n = 30$, $NFa = 48$) [11], *A. sachalinensis* Vasin, 1955 ($2n = 50$, $NFa = 60$) [12] и *A. gromovi* Vorontsov et al., 1988 ($2n = 44$, $NFa = 58$) [13]; причем первые два вида являются эндемиками островов. Для трех видов отмечены редкие случаи изменчивости числа хромосом посредством перестроек робертсоновского типа: *A. oeso-*

nomus Vasin, 1955 ($2n = 30–32$, $NFa = 58$) [14, 15] *A. montebelli* Milne–Edwards, 1872 ($2n = 30–31$, $NFa = 54$) [16], и *A. mongolicus* Radde, 1861 ($2n = 49–50$, $NFa = 56$) [2]. Для четырех видов описана изменчивость положения центромеры (или инверсии) при стабильном числе хромосом: *A. fortis* Büchner, 1889 ($2n = 52$, $NFa = 62–64$) [17], *A. middendorffii* Poljakov, 1881 ($2n = 50$, $NFa = 54–56$) [2], *A. limnophilus* Büchner, 1889 ($2n = 38$, $NFa = 56–58$) [18], *A. mujanensis* Orlov et Kovalskaya, 1978 ($2n = 38$, $NFa = 46–49$) [19]. И только для двух видов обнаружена изменчивость числа и морфологии хромосом, сопряженная с множественными хромосомными перестройками: *A. evoronensis* Kovalskaya et Sokolov, 1980 ($2n = 38–40$, $NF = 52–58$) [2, 9] и *A. maximowiczii* Schrenk, 1859 ($2n = 36–44$, $NFa = 50–60$) [2, 10]. По молекулярно-генетическим данным показано, что полевки группы “maximo-

wiczii” *A. mujanensis* и *A. evoronensis* близки к *A. maximowiczii*, и в одной из последних работ было предложено рассматривать первые два вида в составе *A. maximowiczii* [20]. Несмотря на то, что мы соавторы этой статьи, считаем, что ранг этих таксонов все еще остается спорным, и они нуждаются в дополнительных исследованиях, особенно гибридных, поэтому в настоящей работе рассматриваем *A. evoronensis* как самостоятельный вид.

Внутрипопуляционный множественный хромосомный полиморфизм последних двух видов исследован слабо [2, 7, 9, 10, 21]. Для *A. evoronensis* при описании вида, основанном на стерильности F1 при ссаживании их с *A. maximowiczii* и кариологических особенностях [9], были выявлены вариации диплоидного числа и плеч хромосом эворонской полевки ($2n = 38-40$, NF = 52–58). В этой работе авторы выявили шесть структурных перестроек: два центрических слияния, однотеломерно-центромерное слияние и три перицентрических инверсии, половые хромосомы описаны как акроцентрические. Вслед за этой работой другими авторами [22] при использовании дифференциального (G-) окрашивания хромосом пяти особей из природной популяции, расположенной недалеко от terra typica, были отмечены иные хромосомные перестройки при той же изменчивости числа хромосом (38–40), половые хромосомы описаны как акроцентрические. Различия числа хромосом объясняли тандемным слиянием двух двуплечих пар хромосом. Позже, на основе изучения кариотипов ранее исследованных полевок [22] и их лабораторного потомства ($2n = 38-40$, NF = 53–56) [2], были выявлены четыре типа перестроек: тандемное слияние двуплечих пар, одно Робертсоновское слияние и изменение положения центромеры в двух парах аутосом. Изменение положения центромеры связывали как с различными типами слияния хромосом, так и перицентрическими инверсиями. Морфология половых хромосом была уточнена: X-двуплечий, а Y-одноплечий элементы. В работе приведены фото шести раскладок хромосом с различными диплоидными числами и сочетаниями хромосомных перестроек (две раскладки с $2n = 40$, две с $2n = 39$ и одна с $2n = 38$). Варианты кариотипа не были описаны, номера двуплечих пар хромосом (D), вовлеченные в тандемное слияние определены как D1 и D6, акроцентрические пары хромосом, участвующие в слиянии хромосом с образованием двуплечей хромосомы (D4) не определены.

Ранее считали, что данный вид обитает только в Эворон-Чукчагирской низменности, расположенной в Хабаровском крае России [23] соответственно и кариотипы исследованы из долины оз. Эворон этой низменности [2, 9, 24, 25]. Недавно нами были обнаружены две изолированные популяции эворонской полевки — одна в Верхне-

буреинской впадине Хабаровского края [25], другая в северо-восточной части Амурской обл. [26], видовая диагностика которых была проведена по данным мтДНК. Полевки этих популяций в кариотипах имели 37 и 36 хромосом соответственно, что не входит в размах изменчивости числа хромосом, описанного для вида ранее (38–40) [2, 9]. На основании этих данных, нами было высказано предположение, что эворонская полевка может иметь две хромосомные расы [27].

Чтобы охарактеризовать кариотипическую изменчивость в географически изолированных популяциях вида с числами хромосом 36 и 37 (что и планируется сделать в следующей работе), необходимо сначала описать кариологические особенности вариантов кариотипа полевок из Эворон-Чукчагирской низменности, выявив пары хромосом, вовлеченные в хромосомные перестройки. Поэтому целью настоящего исследования было исследовать кариотипы полевок в Эворон-Чукчагирской низменности, дать номера парам хромосом кариотипа с максимальным числом одноплечих хромосом, на основе собственных и литературных данных описать варианты кариотипа и хромосомные перестройки, характеризующие эти варианты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом хромосомного исследования послужили 27 полевок: десять особей эворонской полевки, отловленных авторами в трех природных локальных популяциях Эворон-Чукчагирской равнины (рис. 1), и семнадцать — лабораторного разведения. Исследованным полевок присваивали тройной номер: номер хромосомного препарата/номер образца тканей/номер сиквенса контрольного региона в Генбанке NCBI. Последний номер приведен с целью привязки кариологических данных настоящей работы к ранее опубликованным молекулярно-генетическим данным (если таковые имеются) [25, 26, 28].

Точка № 1 — самец 2050/81–06/НМ135862 — отловлен в сентябре 2006 г. в долине проточного оз. Эворон, на осоково-вейниковом закороченном лугу близ развилки дорог на пос. Харпичан и пос. Эворон (51°19' с.ш., 136°35' в.д.). Точка № 2 — три самца: 2355/50–08/НМ135861, 2369/87–08 и 2370/88–08/НМ135859 — отловлены на разнотравном лугу в июле 2008 г., 4 км на север от пос. им. Полины Осипенко, близ слияния рек Нимелен и Амгунь (52°26' с.ш., 136°34' в.д.). Точка № 3 — шесть особей: самец 0060/58–16, самка 0061/94–16, самка 0062/93–16, самка 0063/92–16, самец 0064/91–16 и самка 0066/95–16 — отловлены в июле 2016 г., дамба заросшая травой и ивой, 1 км восточнее пос. им. Полины Осипенко, долина р. Амгунь (52°25.42' с.ш., 136°29.67' в.д.). Семнадцать полевок лабораторного разведения получены от четырех природных животных, отловленных

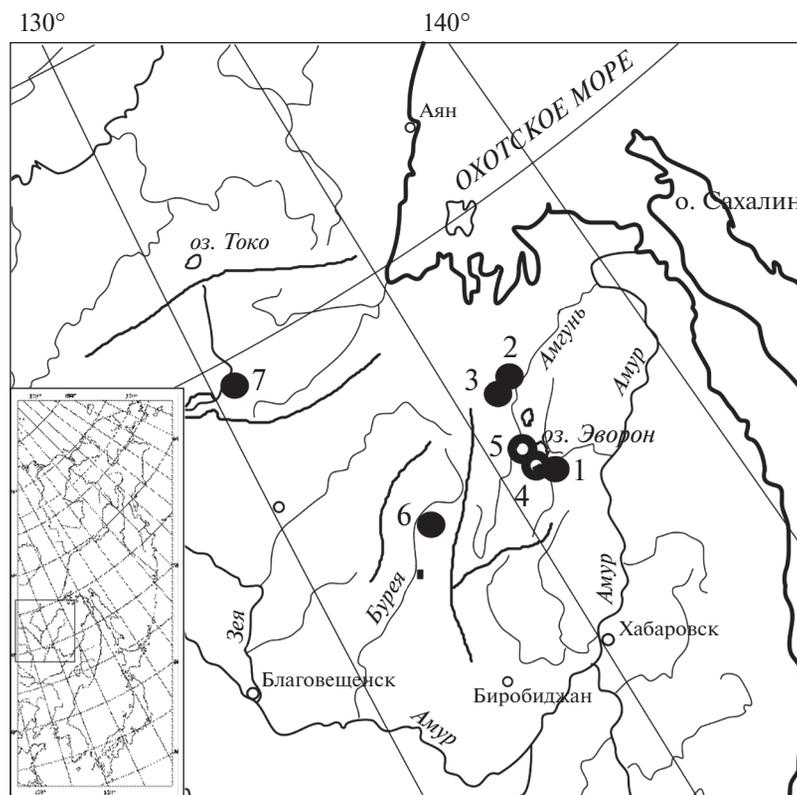


Рис. 1. Точки исследования кариотипа эворонской полевки *Alexandromys evoronensis*. Черные значки – наши данные, белые – литературные. Координаты локалитетов 1–5 ($2n = 38–41$) указаны в настоящей статье, локалитет № 6 ($2n = 37$) [25], локалитет № 7 ($2n = 36$) [26].

в точке № 3: самцов 0060/58–16 и 0064/91–16, самок 0062/93–16 и 0061/94–16. Этим полевкам присваивали двойные номера. В разведении эворонских полевок использованы апробированные методы [2, 29].

Хромосомные препараты, ткани для молекулярного анализа и черепа хранятся в коллекции ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН.

Также с целью выявления вариантов кариотипов эворонской полевки использованы ранее опубликованные данные хромосом из двух точек (рис. 1): точка № 4 (*terra typica*) – берег р. Девятка, единственной реки, вытекающей из оз. Эворон [9]; точка № 5 – долина р. Одон, впадающей в оз. Эворон [2, 22]. Ранее в двух работах [2, 9] максимальное число плеч хромосом было определено как 58. Однако по данным опубликованной авторами раскладки хромосом при первоописании вида (полевка из точки 4) [9] оно равно 59, поэтому мы считаем это число верным и учитываем в нашей работе.

Суспензии хромосом для полевок точек № 1 и 3 приготовлены из клеток костного мозга бедренной кости по стандартной методике [30], для полевок точки № 2 использован метод кратковременной культуры клеток костного мозга [31]. Го-

мологию пар хромосом выявляли при помощи GTG-метода [32], окрашивание на структурный гетерохроматин проводили с использованием метода, предложенного Самнером [33], без предварительной обработки препаратов соляной кислотой. Окрашивание ядрышкового организатора (ЯОР) проведено без предварительной обработки муравьиной кислотой [34].

Исходным кариотипом для присвоения номеров пар хромосом послужил кариотип с максимальным числом $2n$ (42), включающий 26 акроцентрических (A) и 14 двуплечих (M) аутосом (табл. 1). Парам хромосом, образованным в результате слияния хромосом, присваивали дробный номер, состоящий из номеров пар слившихся хромосом и указанием ее морфологии (A или M). Для выявления вариантов кариотипа эворонской полевки, опубликованного ранее из долины оз. Эворон [2, 9, 35], мы применили новую нумерацию пар хромосом. Ранее парам хромосом кариотипа с $2n = 40$ (16 двуплечих и 22 одноплечих аутосом) были даны номера отдельно двуплечим (D) и одноплечим (A) хромосомам [2, 9], затем для ранее опубликованного кариотипа [2, 9] была дана сквозная нумерация пар [35]. Поскольку для двуплечей хромосомы, образованной в результате

Таблица 1. Хромосомные характеристики вариантов кариотипа и схема изменчивых пар аутосом эворонской полевки *Alexandromys evoronensis* Эворон-Чукчагирской низменности

2n	NF	Число аутосом		Номера пар аутосом и их морфология						Число перестроек		Источник
		М	А	1, 4	1/4	17, 18	17/18	8	13	всего	ГС	
42*	58	14	26	xxxx		v vvv		v v	v v	0	0	Нет данных
41a	56	13	26	x x	X	v vvv		v v	v v	1	1	Наши данные
b	57	14	25	x x	X	v vvv		vx	v v	2	2	»
40a	57	15	23	xxxx			vx	v v	v v	1	1	[2] + наши данные
b	56	14	24	xxxx			xx	v v	v v	1	0	[2]
c	59	17	21	xxxx			vx	xx	v v	2	1	[9]
d	56	14	24	x x	X	v v	x	xx	v v	3	1	[2]
e	54	12	26		XX	v vvv		v v	v v	1	0	Наши данные
f	55	13	25		XX	v vvv		vx	v v	2	1	»
39a	55	14	23		XX	v v	x	vx	vx	3	2	[2]
b	56	15	22	x x	X		xx	v v	v v	2	1	[9]
c	55	14	23	x x	X		vx	xx	v v	3	2	[2]
38a	55	15	21		XX		xx	v v	vx	3	1	[2]

Примечание. Морфология аутосом: М – двулучевая (X), А – однолучевая (V). 42* – теоретически ожидаемый вариант кариотипа, ГС – гетерозиготное состояние; пара хромосом 1/4 дана прописными буквами, чтобы выделить ее крупные размеры.

слияния акроцентрических пар хромосом, в последней работе был дан порядковый номер, не указывающий на слияние, а пары, участвовавшие в перестройке, не имели номера, мы приводим иную нумерацию хромосом. А именно: кариотипу с максимальным диплоидным числом хромосом (41), имеющему 26 одноплечих аутосом, даем сквозную нумерацию. Для определения числа хромосом анализировали не менее 20 хромосомных пластинок и не менее трех раскладок для каждой особи. Метафазные пластинки анализировали с помощью микроскопа Axio Imager 1 с цифровой камерой AxioCamHR и программного обеспечения AXIOVISION 4.7 (Германия) центра коллективного пользования ФНЦ Биоразнообразия.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование хромосомных наборов *A. evoronensis* двадцати семи особей (10 природных и 17 лабораторного разведения) полевок Эворон-Чукчагирской низменности выявило новое максимальное диплоидное число (41), ранее оно было равно 40, и число акроцентрических пар аутосом (26). Хромосомные числа исследованных полевок точек № 1, 2 и 3 варьировали от 40 до 41 (рис. 2).

В результате анализа дифференциально-окрашенных хромосом (рис. 3) и изменчивости числа и морфологии хромосом собственных и литературных данных для точек № 4 [9] и 5 [2] было показано, что диплоидные числа вида варьируют от

38 до 41. С учетом различных хромосомных перестроек выявлено 12 вариантов кариотипа (табл. 1). Дифференциальное окрашивание хромосом эворонской полевки позволило дать номера парам хромосом кариотипа и парам, вступающим в хромосомные перестройки, при формировании двенадцати вариантов кариотипа (рис. 3).

Вариант 2n = 41a, NF = 56 (рис. 2,a) имеет 13 двулучевых (М) и 26 однолучевых (А) аутосом. Среди двулучевых аутосом присутствует один крупный субметацентрик. Дифференциальное окрашивание позволило определить метацентрические пары хромосом Mev1 и Mev4, которые в результате тандемного слияния теломера–теломера (TTel) образовали крупный субметацентрик (Mev1/4M) (рис. 4,a), где активирован центромерный район хромосомы Mev4. В этом варианте кариотипа все три хромосомы (Mev1, Mev4 и Mev1/4M) находятся в гетерозиготном состоянии. Такой вариант имели самцы точек № 2 (2369/87–08; 2370/88–08; 2355/50–08) и особи точки № 3 (самец 0060/58–16; самки 0063/92–16 и 0066/95–16); встречен у особей точки № 2 с частотой 1.0 и точки № 3 – с частотой 0.67. Для популяции берега р. Амгунь (точки № 2 и 3) частота равна 0.75. Окрашивание на структурный гетерохроматин выявило прицентромерный гетерохроматин во всех парах хромосом. В X-хромосоме присутствует слабо окрашенный С-блок в прицентромерном районе длинного плеча. Y-хромосома полностью гетерохроматиновая. Ядрышкообразующие районы локализованы в прицентромер-

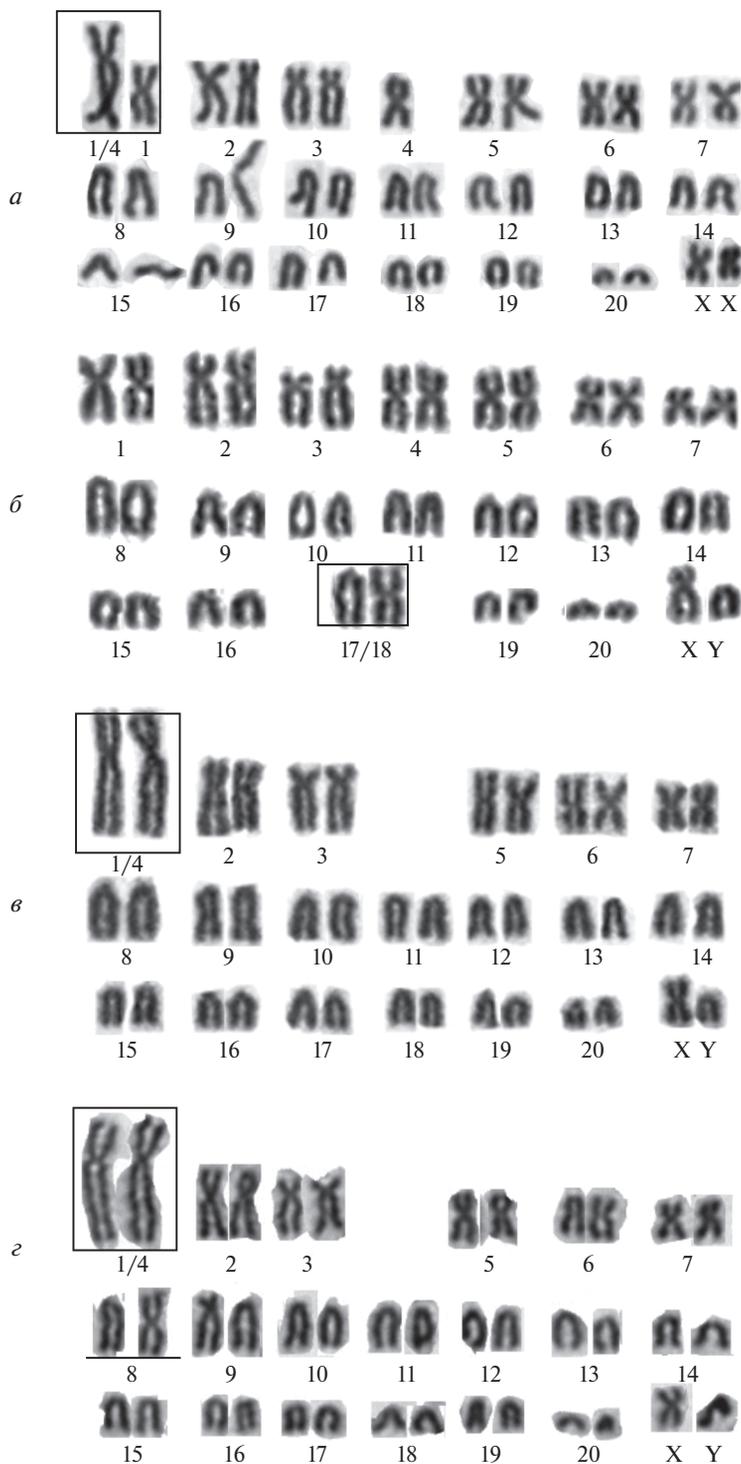


Рис. 2. Варианты кариотипа эворонской полевки *Alexandromys evoronensis*. *a* – $2n = 41a$, $NF = 56$ (точка № 2, самка 0063/92–16) 13 двуплечих (M), 26 одноплечих (A) аутосом и один крупный субметацентрик (Mev1/4), образованный в результате тандемного слияния пар Mev1 и Mev4; *б* – $2n = 40a$, $NF = 57$ (точка 1, самец 2050/81–06/НМ135862), 15 M и 23 A. Одна пара хромосом гетероморфная – Mev17/18A и Mev17/18M; *в* – $2n = 40e$, $NF = 54$ (точка № 3, самец 4183, лабораторное разведение), 12 M и 26 A аутосом, тандемное слияние пар Mev1 и Mev4 в гомозиготном состоянии (Mev1/4M и Mev1/4M); *г* – $2n = 40f$, $NF = 55$ (точка № 3, самец 4527, лабораторное разведение), 13 M, 25 A, тандемное слияние пар Mev1 и Mev4 в гомозиготном состоянии (Mev1/4, Mev1/4) и гетероморфная пара Mev8M и Mev8A.

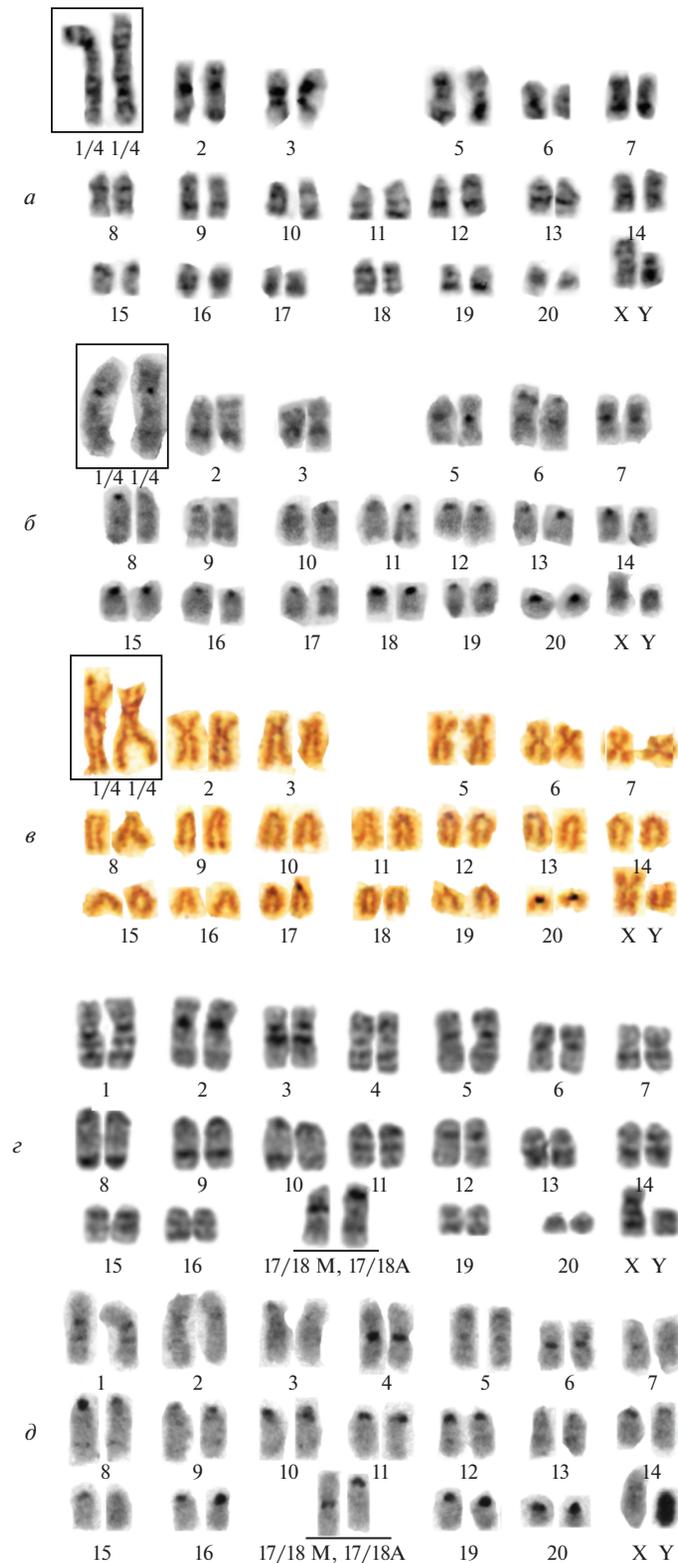


Рис. 3. Дифференциально окрашенные хромосомы эворонской полевки *Alexandromys evoronensis* из двух точек. *a* – точка № 3, кариотип $2n = 40e$, $NF = 54$ (самец № 4183, лабораторное разведение), 12 М и 26 А аутосом: GTG-окрашивание; *б* – С-окрашивание, стрелками указаны теломерные С-блоки; *в* – NOR-окрашивание, ядрышкообразующие районы в прицентромерных районах двух пар аутосом (17 и 20); *г*, *д* – локалитет № 1, кариотип $2n = 40a$, $NF = 57$ (самец 2050/81-06/НМ135862), 15 М и 23 А. Пара 17/18 гетероморфная (подчеркнута): акроцентрическая хромосома образована путем тандемного слияния (центромера–теломера), метацентрическая – путем центромерного слияния (центромера–центромера). GTG-окрашивание (*г*), С-окрашивание (*д*).

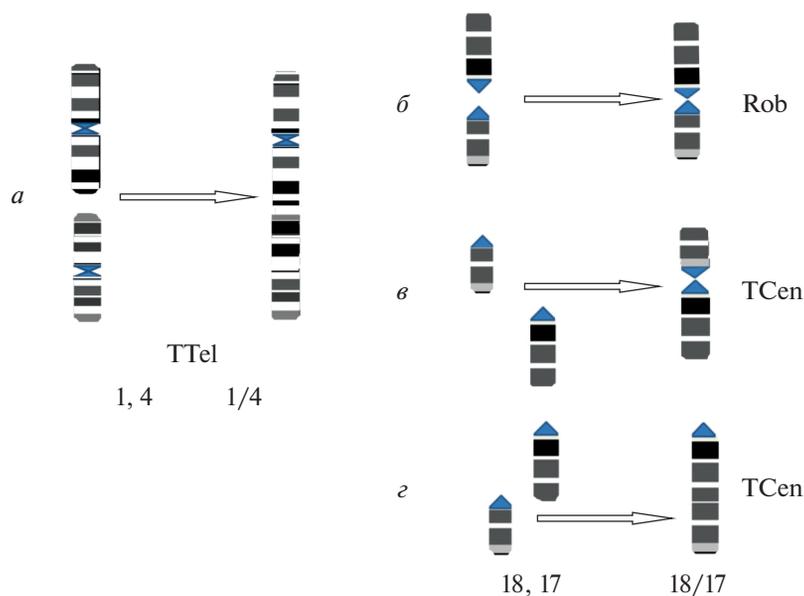


Рис. 4. Схемы хромосомных перестроек эворонской полевки *Alexandromys evoronensis*. а — тандемное слияние теломера-теломера (TTel) образует крупный субметацентрик (Mev1/4M). Слияния акроцентрических хромосом Mev17A и Mev18A; б — робертсоновское слияние с образованием метацентрика Mev17/18M; в — тандемное слияние — центромера-теломера (TCen) с образованием метацентрика Mev17/18M; г — тандемное слияние центромера-теломера (TCen) с образованием акроцентрика Mev17/18A.

ных районах двух пар аутосом — Mev17A и Mev20A (рис. 2, в).

Вариант $2n = 41b$, NF = 56 (табл. 1): 14 двуплечих и 25 одноплечих аутосом. От кариотипа $2n = 41a$ отличается одной парой аутосом (Mev8), находящейся в гетерозиготном состоянии по морфологии гомологов, представленных акроцентриком (А) и метацентриком (М). Этот вариант обнаружен у особей лабораторного разведения. Метацентрический вариант хромосомы появился в результате ссаживания полевков вариантов кариотипов 40f и 41a.

Варианты с $2n = 40$. По данным собственных и литературных данных обнаружено шесть вариантов кариотипа, имеющего 40 хромосом (табл. 1), различающихся сочетаниями хромосомных перестроек таких как тандемное слияние (TTel) метацентрических пар Mev1M и Mev4M с образованием крупного субметацентрика (Mev1/4M); робертсоновское слияние акроцентрических пар Mev17A и Mev18A с образованием метацентрика Mev17/18M (рис. 4, б) и тандемное слияние — центромера-теломера (TCen) акроцентрических пар Mev17A и Mev18A с образованием акроцентрика Mev17/18A, где активирована центромера хромосомы Mev18A (рис. 4, г). В нашем исследовании в кариотипе полевков с $2n = 40$ (точки № 2 и 3) были обнаружены два варианта слияния акроцентрических хромосом (рис. 4). Третий вариант TCen с образованием метацентрика Mev17/18M, описанный в работе М.Н. Мейер с соавт. [2], в точке № 5 нами не обнаружен.

Вариант $2n = 40a$, NF = 57 (рис. 2, б, табл. 1): 15 двуплечих и 23 одноплечих аутосом. Одна пара хромосом гетероморфная — Mev17/18A и Mev17/18M. При дифференциальном окрашивании хромосом (GTG) виден различный рисунок окрашивания гетероморфных хромосом (рис. 3, з). На рис. 4 приведена схема слияния акроцентрических хромосом (рис. 4, б, г). Окрашивание на структурный гетерохроматин показало наличие прицентромерного гетерохроматина во всех парах аутосом, включая гетероморфную пару. Акроцентрические хромосомы Mev17A и Mev18A, участвовавшие в слиянии, имели гетерохроматиновые блоки в центромерных районах. У метацентрической хромосомы Mev17/18M гетерохроматин выявлен в центромерном районе хромосомы, тогда как при тандемном слиянии гетерохроматиновый блок отмечен только в центромерном районе акроцентрической хромосомы Mev17/18A (рис. 3, д). Такой вариант кариотипа обнаружен у особей точек № 1 (2050/81–06/НМ135862) и № 3 лабораторного разведения (4437/297–18). К такому варианту можно отнести ранее обнаруженный кариотип полевки из точки № 5 [2].

Вариант $2n = 40b$, NF = 56 (табл. 1): 14 М и 24 А аутосом. Отличается от варианта $2n = 40a$ тем, что пара Mev17/18M находится в гомозиготном состоянии. Такой вариант имеет одна из полевков точки № 5 [2].

Вариант $2n = 40c$, NF = 59 (табл. 1): 17 М и 21 А аутосом. Отличается от $2n = 40a$ и $2n = 40b$ тем,

что имеет гетероморфную пару: Mev17/18A и Mev17/18M. Пара Mev8M представлена двумя метацентрическими хромосомами. Этот вариант имеет максимальное число плеч хромосом (59) и обнаружен в точке № 4 [9].

Вариант $2n = 40d$, NF = 56 (табл. 1): 14 M и 24 A аутосом. Кариотип имеет гетерозиготное состояние хромосом (Mev1M, Mev4M, Mev1/4M, Mev17A, Mev18A, Mev17/18M), где присутствуют два типа слияния одновременно: TTel (Mev1/4M) и Робертсоновское (Mev17/18M). Такой вариант имела она из полевков точки № 5 [2].

Вариант $2n = 40e$, NF = 54 (рис. 2, в, 3, а, б, в): 12 M и 26 A аутосом. Кариотип имеет TTel-слияние (Mev1/4M) в гомозиготном состоянии. Такой вариант обнаружен нами в точке № 3 (самка 0062/93–16).

Вариант $2n = 40f$, NF = 55 (рис. 2, г): 13 M, 25 A. Кариотип имеет TTel-слияние (Mev1/4M) в гомозиготном состоянии и гетероморфную пару – Mev8M, A. У одного из гомологов пары Mev9 имеется хорошо выраженное короткое плечо, и такую хромосому можно назвать субтелоцентрической. Однако в настоящей работе мы относим эту хромосому к акроцентрической и не учитываем при подсчете числа плеч аутосом. Такой вариант обнаружен нами в точке № 3 (самец 0064/91–16).

Вариант $2n = 39a$, NF = 55 (табл. 1): 14 M и 23 A аутосом. Кариотип имеет гетерозиготное состояние трех хромосом: Mev17/18M, Mev17A и Mev18A. Две пары аутосом по характеру их морфологии находятся в гетероморфном состоянии (Mev8M, Mev8A и Mev13M, Mev13A). Такой вариант обнаружен нами в точке № 5 [2].

Вариант $2n = 39b$, NF = 56 (табл. 1): 15 M и 22 A аутосом. Кариотип имеет TTel-слияние (Mev1/4M) в гетерозиготном состоянии (Mev1M, Mev4M, Mev1/4M) и слияние акроцентрических хромосом Mev17/18M в гомозиготном состоянии. Такой вариант обнаружен в точке № 4 [9].

Вариант $2n = 39c$, NF = 55 (табл. 1): 14 M и 23 A аутосом. Кариотип имеет TTel (Mev1/4M), Робертсоновское (Mev17/18M) и TCen (Mev17/18A) слияния в гетерозиготном состоянии (Mev1M, Mev4M, Mev1/4M, Mev17/18M, Mev17/18A). Такой вариант обнаружен в точке № 5 [2].

Вариант $2n = 38a$, NF = 55 (табл. 1): 15 M и 21 A аутосом. Кариотип характеризуется слияниями TTel (Mev1/4) и Робертсоновским (Mev17/18M), образованные пары находятся в гомозиготном состоянии. Пара Mev13 гетероморфная – Mev13M, A. Такой вариант обнаружен нами в точке № 5 [2].

Окрашивание на структурный гетерохроматин (г/х). Небольшое количество г/х присутствует в прицентромерных районах всех аутосом. Степень его окрашивания от слабого до яркого в различных метафазах варьировало. Также для полевков из точек № 2 и 3 (долина р. Амгунь) отмечены

C-блоки в теломерном районе короткого плеча пары хромосом Mev2. Однако в кариотипе 40a полевки из точки № 1 (рис. 3, д) (долина оз. Эворон) пара аутосом Mev2 таких блоков не имела.

Кариотипы полевков долины р. Амгунь. В точке № 2 у двух особей был кариотип 41a. В точке № 3 диплоидные числа варьировали от 40 до 41. Так, один самец (0060/58–16) и две самки (0063/92–16 и 0066/95–16) имели кариотип 41a, один самец (0064/91–16) – кариотип 40f и одна самка – 40e (0062/93–16). Еще у одной самки, давшей потомство (0061/94–16), кариотип не определен, но в кариотипе потомства ($2n = 40a$) присутствовала Робертсоновская перестройка (Mev17/18M) и тандемное слияние TCen (Mev17/18A). При разведении полевков, нам не удалось сохранить особей с таким вариантом кариотипа. При ссаживании полевков с вариантами кариотипа $2n = 40f$ и $2n = 40e$, получена линия со стабильным числом хромосом (40), но при этом с изменчивой морфологией пары Mev8 (M, A). При ссаживании самки с кариотипом $2n = 40e$ с самцами вариантов кариотипа $2n = 40f$ и $2n = 41a$ получена линия с числами хромосом 40 и 41. Наиболее жизнеспособными оказались особи вариантов кариотипа с тандемным слиянием двуплечих пар аутосом (TTel) и образованием крупного субметацентрика Mev1/4M как в гомозиготном ($2n = 40e$, $2n = 40f$), так и гетерозиготном состоянии ($2n = 41a$ и $2n = 41b$). На основании того, что почти все отловленные нами полевки в точках № 2 и 3, имели слияние TTel, а при лабораторном разведении получено потомство с такой перестройкой, можно заключить, что слияние TTel не является вредным в исследуемой популяции. Что касается второго тандемного слияния (TCen) акроцентрических пар с образованием акроцентрика Mev17/18A, то жизнеспособность полевков с такой перестройкой возможно снижена. Нами в виварных условиях (как было сказано выше) были получены полевки с такой перестройкой, но получить от них потомство не удалось.

Кариотипы полевков долины оз. Эворон. Числа хромосом двадцати семи полевков из природы и семи особей лабораторного разведения из точек № 1, 4 и 5 варьировали от 38 до 40 (табл. 2). Имеющиеся в нашем распоряжении собственные и литературные [2, 9] данные только для восьми особей, включая одну полевку лабораторного разведения, позволили описать восемь вариантов кариотипа: один для $2n = 38$, три – $2n = 39$ и четыре – $2n = 40$. Кариотипы с $2n = 41$ не обнаружены. Изменчивость кариотипа сопряжена с такими хромосомными перестройками, как TTel, TCen, центрическим слиянием и смещением центромеры.

Слияние теломера–теломера. Тандемное слияние (TTel) двуплечих хромосом с образованием

Таблица 2. Варианты кариотипа эворонской полевки *Alexandromys evoronensis* двух долин в Эворон-Чукчагирской низменности

Долины	Локалитет (число особей)	2n			
		38	39	40	41
Оз. Эворон	1 (1)	—	—	a	—
	4 (20*)	+	b	c	—
	5 (5**)	+	a, c	a, b, c	—
	Лабораторные 5 (7**)	?	?	d	—
Р. Амгунь	2 (2)	—	—	—	a
	3 (6)	—	—	e, f	a,
	Лабораторные 3 (17)	—	—	a, e, f	a, b

Примечание. + — вариант обнаружен, ? — нет данных, жирным выделены варианты, появившиеся в результате виварного разведения; “—” — вариант не обнаружен; * — исследованы пределы изменчивости 2n и NF, варианты кариотипа определены по двум опубликованным раскладкам [9]; ** — варианты кариотипа определены по шести опубликованным раскладкам [2].

крупного субметацентрика Mev1/4 присутствует в девяти вариантах кариотипа из двенадцати обнаруженных, причем в пяти из них — в гетерозиготном состоянии. Из девяти кариотипированных полевков природной популяции берега р. Амгунь все особи имели слияние TТel (Mev1/4), причем, шесть особей имели гетерозиготное состояние по этой перестройке с частотой 0.67. При лабораторном разведении полевков преобладали особи с перестройкой TТel в гомозиготном состоянии. В природных популяциях точек № 4 и 5, были обнаружены особи с такой перестройкой в кариотипах вариантов 2n = 40d, 2n = 39a, b, c, 2n = 38 (табл. 2). Если в точке № 4 частота данных хромосомных перестроек неизвестна, то в точке № 5 (из пяти полевков) TТel выявили в кариотипе двух особей в гомозиготном состоянии и у одной — в гетерозиготном. В точке № 1 одна особь не имела такой перестройки. Таким образом, хромосомные числа полевков Эворон-Чукчагирской низменности варьировали от 38 до 41. Частота теломерного слияния (TТel) в кариотипах здесь равна 0.87, в гетерозиготном состоянии — 0.47. Единственный самец, отловленный нами в окрестностях оз. Эворон, не имел такой перестройки.

ОБСУЖДЕНИЕ

Обнаруженные в настоящей работе числа хромосом эворонской полевки Эворон-Чукчагирской равнины варьируют от 38 до 41, числа плеч — от 54 до 59 (табл. 1). Полученные данные позволяют предполагать, что максимальное число хромосом равно 42. Ранее для данного вида были приведены иные характеристики кариотипа: 2n = 38–40, NF = 54–58 и без описания вариантов кариотипа и хромосомных перестроек, характеризующих эти варианты [2]. Впервые в настоящей работе выявлен кариотип, имеющий максимальное из обнаруженных для вида число хромосом (41) и одноплечих

аутосом (26). Изменчивость числа хромосом обусловлена слияниями четырех пар аутосом — Mev1M, Mev4M, Mev17A и Mev18A. Тандемное слияние пар Mev1M и Mev4M (TТel), с образованием Mev1/4M, приводит к уменьшению числа хромосом и плеч аутосом. Слияние (TСen) акроцентрических пар Mev17A и Mev18A приводит к образованию Mev17/18M, Mev17/18A. Эти два варианта слияний обнаружены у полевки из популяции № 1 (рис. 2,б, рис. 3,з, д). Третий вариант тандемного слияния, с образованием двухплечего элемента, обнаружен в популяции № 5 [2], где активирована центромера хромосомы Mev17. Нами такой вариант не обнаружен, но поскольку имеется описание этой перестройки, мы приводим ее схему (рис. 4,з).

Изменчивость морфологии аутосом (и как следствие изменение числа плеч) происходит также и за счет изменения положения центромеры или инверсии в данных парах: Mev8A и Mev14A. Впервые изменчивость морфологии данных пар аутосом была обнаружена для полевков берегов оз. Эворон [2]. Авторами было предложено два сценария перестройки этих пар аутосом — перцентрическая инверсия и тандемное слияние акроцентрических хромосом, аналогичные таковым в паре Mev17/18. Возможно, то, что мы называем смещением центромеры, является инактивацией одной из центромер слившихся акроцентрических пар аутосом. Таким образом, число вариантов кариотипа эворонской полевки, с учетом всех перестроек хромосом, должно быть значительно больше, чем описано нами.

Исследование кариотипов эворонской полевки из локальных популяций долин оз. Эворон и р. Амгунь позволяет говорить, что они имеют сходный характер перестроек хромосом, но различные числа хромосом (табл. 2). Эти популяции имеют два варианта тандемных слияний и одно Робертсоновское.

Несмотря на то, что мы не выявили низкие числа хромосом (38 и 39) в долине р. Амгунь (точках № 2, 3), наличие особей с двумя тандемными и робертсоновским слияниями в этих популяциях позволяет предположить, что при увеличении числа исследованных полевков, мы можем ожидать появления здесь кариотипов с этими числами. Однако по распределению гетерохроматина во второй паре аутосом (Mev2) мы наблюдаем различия между полевками берегов оз. Эворон (точки № 1, 5) и р. Амгунь (точки № 2, 3). Возможно отличия касаются и аутосомы Mev9, в которой появляется короткое плечо. Из-за исследования небольшого объема выборок мы не можем говорить, что обнаруженные различия дифференцируют популяции. О слабой дифференциации полевков берегов р. Амгунь и оз. Эворон свидетельствуют и полученные нами ранее данные контрольного региона мтДНК [26]. Так, было выявлено только десять фиксированных замен между гаплотипами особей (HM135858–HM135861), отловленных в точке № 2, и гаплотипом особи (номер HM135857) точки № 4.

Нами впервые сделано окрашивание ЯОР для эворонской полевки. Для видов рода *Alexandromys* ЯОР исследованы только для *A. fortis* (номера пар хромосом несущих ЯОР-блоки не определяли), у которого ЯОР локализованы в теломерном районе метацентрической пары и центромерном районе двух пар аутосом [36]. Наличие ЯОР-блоков в прицентромерном районе небольшой пары и самой мелкой акроцентрической пары набора эворонской полевки возможно соответствуют таковым для *A. fortis*.

Ранее для кариотипов полевков из долины оз. Эворон (точка № 5) были исследованы С-окрашенные хромосомы [2]. В работе сказано: “Аутосомный гетерохроматин у эворонской полевки очень слабо выражен. В основном – это центромерные блоки, далеко не всегда выявляющиеся у всех пар. На X-хромосоме кроме центромерного блока присутствует еще околоцентромерный блок. Y-хромосома целиком состоит из гетерохроматина” [2, стр. 201]. Полевки берегов р. Амгунь имеют прицентромерный гетерохроматин во всех парах аутосом (рис. 3,б). Следовательно можно было сделать вывод, что полевки долин р. Амгунь и оз. Эворон различаются по локализации гетерохроматина. Однако у исследованной нами полевки с берегов Эворон (рис. 3,д) мы отмечаем наличие прицентромерных блоков во всех парах аутосом, а также различное гетерохроматиновое окрашивание гетероморфных хромосом Mev17/18M и Mev17/18A. Также отчетливо виден околоцентромерный блок в длинном плече третьей пары аутосом. Поэтому считаем, что наши данные скорее дополняют информацию о характере окрашивания на структурный гетерохроматин в хромосомах этого вида, а не служат отличительными особенностями

кариотипов полевки р. Амгунь и оз. Эворон. Следует отметить, что дифференциальное окрашивание хромосом полевков, приготовленных из костного мозга взрослых животных, имеет проблемы, поскольку цитоплазма клеток костного мозга у таких особей имеет много жировых включений, что мешает получению качественных препаратов.

Авторами, описавшими этот вид [9], было высказано предположение, что теоретически диплоидное число у эворонской полевки может варьировать от 36 до 42. Однако на сегодняшний день данные по известным для вида перестройкам в Эворон-Чукчагирской популяции не позволяют допустить наличия здесь кариотипов с $2n = 36–37$. Тем не менее обнаруженные нами ранее особи из Верхнебуреинской впадины Хабаровского края и Верхнезейской равнины Амурской обл. имели в кариотипе 37 и 36 хромосом соответственно [25, 26] свидетельствуют о том, что на сегодняшний день эти числа выходят за пределы обнаруженной изменчивости вида. Возможно для эворонской полевки можно предположить наличие двух хромосомных рас: “эворон” с $2n = 38–42$ и “арги” с $2n = 36, 37$. В настоящее время характер хромосомного полиморфизма расы “арги” не исследован, однако большое число пар, вступающих в перестройки и “легкость”, с которой происходят слияния хромосом у полевков Эворон-Чукчагирской популяции, позволяет предположить обнаружения у этого вида перестроек с участием как аналогичных, так и других пар аутосом.

Исследования характера тандемных перестроек у животных из природных популяций представляют большой интерес, так как показано, что транслокации и тандемные слияния лежали в основе преобразования кариотипов многих групп млекопитающих [37–39]. Наиболее яркими примерами служат тандемные слияния хромосом, сопровождавшие видообразования оленей рода *Muntiacus* [40, 41] и хлопковых крыс рода *Sigmodon* [42, 43].

Для серых полевков рода *Microtus* (в который до недавнего времени входили восточноазиатские полевки в ранге подрода *Alexantromys*) показана быстрая дивергенция кариотипа [44–46]. Большая часть хромосомных перестроек приходилась на робертсоновские слияния, но и тандемные слияния также не были редкими событиями. Однако под тандемными слияниями как правило подразумевались слияния двуплевого элемента с одноплечим (TCen) [44, 45, 47].

Известно, что во внутри- и межпопуляционный полиморфизм млекопитающих, особенно у эволюционно молодых видов, могут быть вовлечены все известные хромосомные перестройки, однако самым “вредным” из них являются тандемные слияния [39, 48]. Нам известны тандемные слияния в гетерозиготном состоянии для нескольких видов млекопитающих. Так у летучих мышей *Uroderma bi-*

lobatum [49] перестройка выявлена в гетерозиготном состоянии у 9% особей, у южно-американского грызуна туко-туко *Stenomys talarum* – 11% [50], и у одной особи из восьми исследованных в Европе мышовок *Sicista subtilis* [51]. Однако исследование мейоза *Stenomys talarum* допускает, что изменчивость хромосом связана не с тандемным, а с робертсоновским слиянием хромосом [52]. Тандемное слияние двуплечих хромосом с образованием крупного двуплечего элемента показано также для трех видов млекопитающих: песцов *Anorex lagopus* [53] и двух видов полевок *Alexandromys maximowiczii* [2, 10, 13], *A. evoronensis* [2], однако частота такой перестройки для этих видов не была определена. Наше исследование выявило гетерозиготное состояние тандемного слияния (TTel) с частотой 0.47 для особей природной популяции *A. evoronensis* в Эворон-Чукчагирской изменчивости.

Принято считать, что теломеры представляют собой нуклеопротеиновые структуры, расположенные на концах линейных эукариотических хромосом и защищающие их от деградации, слияния и активности системы репарации ДНК [54–57]. Обнаружение тандемного слияния хромосом (TTel) в гетерозиготном состоянии в природной популяции эворонской полевки представляет интерес для дальнейшего исследования с целью понимания системы преобразования ДНК в теломерных районах во время хромосомных перестроек.

Благодарим Т.В. Васильеву за помощь в карiotипировании полевок лабораторной популяции.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (12-04-00662а, 15-04-03871).

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Поздняков А.А. Морфотипическая изменчивость жевательной поверхности коренных зубов серых полевок группы “*maximowiczii*” (Rodentia, Arvicolidae, *Microtus*): опыт количественного статистического анализа // Зоол. журн. 1993. Т. 72. № 11. С. 114–125.
2. Мейер М.Н., Голенищев Ф.Н., Раджабли С.И., Саблина О.Л. Серые полевки фауны России и сопредельных территорий. СПб.: Зоол. ин-т РАН, 1996. 320 с.
3. Лисовский А.А., Оболенская Е.В. Структура краниометрического разнообразия серых полевок *Microtus* подрода *Alexandromys* // Тр. Зоол. ин-та РАН. 2011. Т. 315. № 4. С. 461–477.
4. Войта Л.Л., Голенищев Ф.Н., Тиунов М.П. Дальневосточные полевки *Alexandromys* (Rodentia: Cricetidae) из позднеплейстоценовых и голоценовых отложений пещеры Медвежий клык Приморского края России // Тр. Зоол. ин-та РАН. 2019. Т. 323. № 3. С. 313–346.
5. Фрисман Л.В., Коробицына К.В., Картавцева И.В. и др. Серые полевки (*Microtus* Shrank, 1798) Дальнего Востока России: аллозимная и кариологическая дивергенция // Генетика. 2009. Т. 45. № 6. С. 804–812.
6. Lemskaya N.A., Romanenko S.A., Golenishchev F.N. et al. Chromosomal evolution of Arvicolinae (Cricetidae, Rodentia). III. Karyotype relationships of ten *Microtus* species // Chromosome Res. 2010. V. 18. P. 459–471. <https://doi.org/10.1007/s10577-010-9124-0>
7. Ковальская Ю.М. Хромосомный полиморфизм *Microtus maximowiczii* Schrenck, 1858 (Rodentia, Cricetidae) // Бюлл. Моск. о-ва испытателей природы. 1977. Т. 82. № 2. С. 38–48.
8. Орлов В.Н., Булатова Н.Ш. Сравнительная цитогенетика и кариосистематика млекопитающих. М.: Наука, 1983. 406 с.
9. Ковальская Ю.М., Соколов В.Е. Новый вид полевок (Rodentia, Cricetidae, *Microtus*) из нижнего Приамурья // Зоол. журн. 1980. Т. 59. № 9. С. 1409–1416.
10. Kartavtseva I.V., Sheremetyeva I.N., Korobitsina K.V. et al. Chromosomal forms of *Microtus maximowiczii* (Schrenck, 1858) (Rodentia, Cricetidae): Variability in 2n and NF in different geographic regions // Russ. J. Theriology. 2008. V. 7. № 2. P. 89–97.
11. Harada M., Ando A., Lin L.-K., Takada S. Karyotypes of Taiwan vole *Microtus kikuchii* and the Pere David’s vole *Eothenomys melanogaster* from Taiwan // J. Mammalogical Society of Japan. 1991. V. № 16. P. 41–45.
12. Мейер М.Н., Волобуев В.Г. Морфологические особенности и хромосомный набор сахалинской полевки – *Microtus sachalinensis* Vasin, 1955, Rodentia, Cricetidae // Тр. Биолого-почвенного ин-та ДВНЦ АН СССР. 1974. Т. 17. № 120. С. 75–83.
13. Sheremetyeva I.N., Kartavtseva I.V., Voyta L.L. et al. Morphometric analysis of intraspecific variation in *Microtus maximowiczii* (Rodentia, Cricetidae) in relation to chromosomal differentiation with reinstatement of *Microtus gromovi* Vorontsov, Boeskorov, Lyapunova et Revin, 1988, stat. nov. // J. Zool. Syst. and Evol. Res. 2009. V. 47. № 1. P. 42–48. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2008.00511.x>
14. Fredga K., Bergstrom U. Chromosome polymorphism in the root vole (*Microtus oeconomus*) // Hereditas. 1970. V. 66. № 1. P. 145–152. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1970.tb02340.x>
15. Баскевич М.И., Хляп Л.А., Шварц Е.А. Хромосомный полиморфизм в периферической популяции полевки экономки *Microtus oeconomus* (Rodentia, Arvicolinae) из Валдайского национального парка // Докл. РАН. 2014. Т. 454. № 2. С. 227–231.
16. Куоя Т., Обара Ю., Наката А. Chromosomal aberrations in Japanese voles in and around an illegal dumpsite at the Aomori-Iwate prefectural boundary // Zool. Sci. 2008. V. 25. № 3. P. 307–312. <https://doi.org/10.2108/zsj.25.30>

17. Kartavtseva I.V., Kryukov A.P. Karyotype of *Microtus fortis* (Rodentia, Cricetidae) from extreme south of Far East Russia // Chromosome Sci. 1998. V. 2. P. 31–34.
18. Couranta F., Brunet-Lecomte P., Volobouev V. et al. Karyological and dental identification of *Microtus limnophilus* in a large focus of alveolar echinococcosis (Gansu, China) // Biol. et Pathol. Animals. 1999. V. 322. P. 473–480.
[https://doi.org/10.1016/S0764-4469\(99\)80097-3](https://doi.org/10.1016/S0764-4469(99)80097-3)
19. Картавцева И.В., Васильева Т.В., Шереметьева И.Н. и др. Генетическая изменчивость трех изолированных популяций муйской полевки *Alexandromys tujanensis* Orlov et Kovalskaja, 1978 (Rodentia, Arvicolinae) // Генетика. 2019. Т. 55. № 8. С. 920–935.
<https://doi.org/10.1134/S0016675819080071>
20. Lisovsky A.A., Petrova T.V., Yatsentyuk S.P. et al. Multilocus phylogeny and taxonomy of East Asian voles *Alexandromys* (Rodentia, Arvicolinae) // Zool. Scripta. 2018. V. 47. № 1. P. 9–20.
<https://doi.org/10.1111/zsc.12261>
21. Картавцева И.В., Шереметьева И.Н., Романенко С.А., Гладких О.Л. Изменчивость хромосом полевки Максимовича *Microtus maximowiczii* (Rodentia, Cricetidae, *Microtus*) // Цитология. 2013. Т. 55. № 4. С. 261–263.
22. Голенищев Ф.Н., Раджабли С.И. Новый вид серых полевок с берегов озера Эворон // Докл. АН СССР. 1981. Т. 257. № 1. С. 248–250.
23. Шереметьева И.Н., Картавцева И.В., Войта Л.Л., Тиунов М.П. Новые данные по распространению серых полевок рода *Microtus* (Rodentia: Cricetidae) на Дальнем Востоке России // Зоол. журн. 2010. Т. 89. № 10. С. 1273–1276.
24. Картавцева И.В., Шереметьева И.Н., Немкова Г.А., Лазурченко Е.В. Хромосомные исследования полевки Максимовича *Microtus maximowiczii* Schrenk, 1858 в Норском заповеднике Амурской области и эворонской *Microtus evoronensis* Kovalsk. et Socolov, 1980 окрестностей озера Эворон Хабаровского края // Териофауна России и сопредельных территорий. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2007. 188 с.
25. Sheremetyeva I.N., Kartavtseva I.V., Vasiljeva T.V., Frisman L.V. Voles of the genus *Alexandromys* from the Verkhnebureinskaya Depression // Biol. Bull. 2017. V. 44. № 7. P. 813–819.
<https://doi.org/10.1134/S1062359017070159>
26. Шереметьева И.Н., Картавцева И.В., Васильева Т.В. Обитает ли Эворонская полевка (*Alexandromys evoronensis*) на северо-востоке Верхнезейской равнины? // Зоол. журн. 2016. № 2. С. 477–484.
27. Kartavtseva I.V., Sheremetyeva I.N., Pavlenko M.V. et al. A new chromosomal race of the Evoron voles *Alexandromys evoronensis* of two isolated populations in the Russian Far East // 6th International Conference of Rodent Biology and Management and 16th Rodents et Spatium (3–7 September, 2018, Potsdam, Germany): Book of abstracts. 2018. P. 268.
28. Haring E., Sheremetyeva I., Kryukov A. Phylogeny of Palearctic vole species (genus *Microtus*, Rodentia) based on mitochondrial sequences // Mammalian Biol. 2011. V. 76. P. 258–267.
<https://doi.org/10.1016/j.mambio.2010.04.006>
29. Павленко М.В., Шереметьева И.Н., Васильева Т.В. Особенности содержания и размножения в лабораторных условиях серых полевок рода *Alexandromys* Ognev, 1914 из популяции неясного таксономического статуса северо-востока Верхнезейской равнины // Вестн. Иркутской гос. с.-х. акад. 2017. Т. 83. С. 120–125.
30. Ford C.F., Hamerton J.L. A colchicine hypotonic citrate squash preparation for mammalian chromosomes // Stain Technol. 1956. V. 31. P. 247–251.
31. Графодатский А.А., Раджабли С.И. Хромосомы сельскохозяйственных и лабораторных млекопитающих. Атлас. Новосибирск: Наука, 1988. 128 с.
32. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes // Lancet. 1971. V. 11. № 7731. P. 971–972.
33. Sumner A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin // Exp. Cell Res. 1972. V. 83. P. 438–442.
34. Miinke M., Schmiady H. A simple one-step for staining the nucleolus organizer region // Experientia. 1979. V. 35. P. 602–603.
35. Sablina O.V., Radjabli S.I., Graphodatsky A.S. Selected karyotypes // Atlas of Mammalian Karyotypes / O'Brien S.J., Nash W.G., Menninger J.C. 2006. P. 267.
36. Шереметьева И.Н., Картавцева И.Н., Фрисман Л.В. Кариологическая и аллозимная изменчивость дальневосточной полевки (*Microtus fortis*, Buchner, 1889 Cricetidae, Rodentia) Дальнего Востока России // Генетика. 2006. Т. 42. № 6. С. 833–843.
37. Kulemzina A.I., Trifonov V.A., Perelman P.L. et al. Cross-species chromosome painting in Cetartiodactyla: Reconstructing the karyotype evolution in key phylogenetic lineages // Chrom. Res. 2009 V. 17. P. 419–436.
<https://doi.org/10.1007/s10577-009-9032-3>
38. Elder F.F.B., Hsu T.C. Tandem fusions in the evolution of mammalian chromosomes // The Cytogenetics of Mammalian Autosomal Rearrangements / Ed. Sandberg A.A. N.Y.: Alan R. Liss. 1988. P. 481–506.
39. Dobigny G., Britton-Davidian J., Robinson T.J. Chromosomal polymorphism in mammals: An evolutionary perspective // Biol. Rev. 2017. V. 92. P. 1–21.
<https://doi.org/10.1111/brv.12213>
40. Liming S., Yingying Y., Xingsheng D. Comparative cytogenetic studies on the red muntjac, *Chinese muntjac*, and their F1 hybrids // Cytogen. and Cell Genet. 1980. V. 26. P. 22–27.
41. Huang L., Wang J., Nie W., Su W., Yang F. Tandem chromosome fusions in karyotypic evolution of *Muntiacus*: Evidence from *M. feae* and *M. gongshanensis* // Chromosome Res. 2006. V. 14. P. 637–647.
42. Elder F.F.B. Tandem fusion, centric fusion, and chromosomal evolution in the cotton rats, genus *Sigmodon* // Cytogen. Cell Genet. 1980. V. 26. P. 199–210.
43. Swier V.J., Bradley R.D., Rens W. et al. Patterns of chromosomal evolution in *Sigmodon*, evidence from whole chromosome paints // Cytogenet. Genome Res. 2009. V. 125. P. 54–66.
44. Modi W.S. Phylogenetic analyses of chromosomal banding patterns among the Nearctic Arvicolidae (Mammalia, Rodentia) // Syst. Zool. 1987. V. 36. № 2. P. 109–136.

45. *Sitnikova N.A., Romanenko S.A., O'Brien P.C.M. et al.* Chromosomal evolution of Arvicolinae (Cricetidae, Rodentia). I. The genome homology of tundra vole, field vole, mouse and golden hamster revealed by comparative chromosome painting // *Chromosome Res.* 2007. V. 15. P. 447–456.
46. *Lemskaya N.A., Romanenko S.A., Golenishchev F.N. et al.* Chromosomal evolution of Arvicolinae (Cricetidae, Rodentia). III. Karyotype relationships of ten *Microtus* species // *Chromosome Res.* 2010. V. 18. P. 459–471. <https://doi.org/10.1007/s10577-010-9124-0>
47. *Mazurok N.A., Rubtsova N.V., Isaenko A.A. et al.* 2001. Comparative chromosome and mitochondrial DNA analyses and phylogenetic relationships within common voles (*Microtus*, Arvicolidae) // *Chromosome Res.* V. 9. P. 107–120.
48. *King M.* Chromosomal Speciation Revisited (Again). Species Evolution. The Role of Chromosome Change Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1993. 336 p.
49. *Owen J.G., Baker R.K.* The *Uroderma bilobatum* (Chiroptera, Phyllostomidae) cline revisited // *J. Mammalogy.* 2001. V. 82. № 4. P. 1102–1113. [https://doi.org/10.1644/1545-1542\(2001\)082<1102:TU-BCPC>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1644/1545-1542(2001)082<1102:TU-BCPC>2.0.CO;2)
50. *Massarini A., Mizrahi D., Tiranti S. et al.* Extensive chromosomal variation in *Ctenomys talarum* from the Atlantic coast of Buenos Aires province, Argentina (Rodentia, Octodontidae) // *J. Neotropical Mammalogy.* 2002. V. 9. P. 199–207.
51. *Kovalskaya Y., Aniskin V., Bogomolov P. et al.* Karyotype reorganization in the subtilis group of Birch Mice (Rodentia, Dipodidae, Sicista): Unexpected taxonomic diversity within a limited distribution // *Cytogen. and Genome Res.* 2011. V. 132. P. 271–288. <https://doi.org/10.1159/000322823>
52. *Basheva E.A., Torgasheva A.A., Gomez Fernandez M.J. et al.* Chromosome synapsis and recombination in simple and complex chromosomal heterozygotes of tuco-tuco (*Ctenomys talarum*: Rodentia: Ctenomyidae) // *Chromosome Res.* 2014. V. 22. № 3. P. 351–363. <https://doi.org/10.1007/s10577-014-9429-5>
53. *Раджабли С.И., Графодатский А.С.* Эволюция карิโอ типа млекопитающих. Структурные перестройки хромосом и гетерохроматин // Цитогенетика гибридов, мутаций и эволюция кариоти па. Новосибирск: Наука, 1977. С. 231–249.
54. *Garcia-Cao M., O'Sullivan R., Peters A.H. et al.* Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases // *Nat. Genet.* 2004. V. 36. P. 94–99. <https://doi.org/10.1038/ng1278>
55. *Benetti R., Garcia-Cao M., Blasco M.A.* Telomere length regulates the epigenetic status of mammalian telomeres and subtelomeres // *Nat. Genet.* 2007. V. 39. P. 243–250. <https://doi.org/10.1038/ng1952>
56. *Palm W., de Lange T.* How shelterin protect mammalian telomeres // *Annu. Rev. Genet.* 2008. V. 42. P. 301–334. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130350>
57. *Кордюкова М.Ю., Калмыкова А.И.* Природа и функции теломерных транскриптов // Биохимия. 2019. Т. 84. № 2. С. 212–222. <https://doi.org/10.1134/S0320972519020040>

Multiple Chromosomal Polymorphism of Chromosomal Race “Evoron” of the Evoron Vole (Rodentia, Arvicolinae)

I. V. Kartavtseva^{a, *}, I. N. Sheremetyeva^a, and M. V. Pavlenko^a

^a*Federal Center for Terrestrial Biota Diversity of East Asia, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia*

*e-mail: Kartavtseva@biosoil.ru

Based on a study of our own and published data on voles on the coast of Lake Evoron ($n = 8$) and River Amgun ($n = 8$), in the Evoron-Chukchagir lowland, as well as individuals of laboratory breeding, new data on karyotypic variation ($2n = 38–41$, $NF = 54–59$), chromosomal transformations and their combinations in the karyotype are presented. The numbering of chromosomes in the Evoron vole karyotype using differential (GTG–) staining methods made it possible to identify pairs of chromosomes involved in various chromosome rearrangements, and pairs formed by chromosome fusion to give pairs numbers that formed them. The tandem fusion of the telomere-telomere (TTel) of the bi-arm chromosomes form the large submetacentric Mev1/4M; telomere-centromere fusion (TCen) as a result of inactivation of the centromere of one of the acrocentric pairs form either an acrocentric (Mev17/18A) or metacentric (Mev17/18M), and the Robertson fusion of the same pairs forms a metacentric (Mev17/18M). The variability of the centromere position in two pairs of autosomes (Mev8 and Mev14) is also shown. The revealed rearrangements made it possible to describe twelve variants of the karyotype: two with $2n = 41$, six with $2n = 40$, three with $2n = 39$, and one with $2n = 38$. It is proposed that the voles of the Evoron-Chukchagir lowland be attributed to the “Evoron” chromosome race, the rest to the “argy” race. Obtaining prolific offspring from individuals having TTel fusion in the karyotype and a high percentage of this rearrangement in individuals from natural samples indicates the absence of its harmful effect on the viability of voles.

Keywords: speciation, cytogenetics, chromosomal rearrangements, tandem, Robertson fusions, polymorphism, populations, rodents, mammals.

УДК 575.174.015.3

ЧАСТОТА МУТАЦИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАЗВИТИЕМ НАСЛЕДСТВЕННОГО ГЕМОХРОМАТОЗА I ТИПА, БОЛЕЗНИ ВИЛЬСОНА–КОНОВАЛОВА И СЕМЕЙНОЙ СРЕДИЗЕМНОМОРСКОЙ ЛИХОРАДКИ, И ОСОБЕННОСТИ ИХ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ В РУССКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

© 2021 г. Д. Д. Абрамов¹, В. В. Кадочникова², Е. Г. Якимова², М. В. Белоусова¹, А. В. Маерле¹, И. В. Сергеев², И. Б. Козлов², *, А. Е. Донников³, И. А. Кофиади², **, Д. Ю. Трофимов⁴

¹ООО “ДНК-Технология”, Москва, 117587 Россия

²Государственный научный центр Институт иммунологии, Москва, 115522 Россия

³Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова, Москва, 117997 Россия

⁴Институт репродуктивной генетики Научного центра акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова, Москва, 117997 Россия

*e-mail: kozlov.nrcii@gmail.com

**e-mail: kofiadi@mail.ru

Поступила в редакцию 31.01.2020 г.

После доработки 11.06.2020 г.

Принята к публикации 29.06.2020 г.

Данная статья является продолжением цикла работ, посвященных определению частоты носительства мутаций, ассоциированных с развитием распространенных моногенных заболеваний, среди представителей русской популяции. Установлены частоты распространения мутаций в генах *HFE*, *ATP7B* и *MEFV* у доноров первичной кроводачи, идентифицирующих себя как русские и постоянно проживающих на территории Российской Федерации. Для проведения SNP-генотипирования использован метод примыкающих проб. При генотипировании были обнаружены 57 носителей мутации С282Y гена *HFE*, наиболее значимой в развитии гемохроматоза I типа (частота в выборке 911 доноров 6.3%, или 1 : 16), и 18 носителей мутации Н1069Q в гене *ATP7B*, связанной с развитием болезни Вильсона–Коновалова (частота в выборке 1032 доноров 1.7%, или 1 : 57). Также установлена высокая частота носительства (частота в выборке 1212 доноров 7.3%, или 1 : 14) мутации К695R в гене *MEFV*, ассоциированной с развитием семейной средиземноморской лихорадки, характеризующейся легким фенотипом и неполной пенетрантностью.

Ключевые слова: наследственный гемохроматоз I типа, *HFE*, болезнь Вильсона–Коновалова, *ATP7B*, семейная средиземноморская лихорадка, *MEFV*, генотипирование, русская популяция.

DOI: 10.31857/S0016675821010021

Наследственный гемохроматоз — заболевание, характеризующееся врожденным нарушением обмена железа в организме человека, приводящим к его накоплению в тканях. Избыток железа вызывает нарушения функций печени, поджелудочной железы, сердца и других органов, в том числе репродуктивных. Несвоевременно начатое лечение или его отсутствие могут привести к развитию тяжелой полиорганной патологии [1, 2].

Наиболее распространен наследственный гемохроматоз I типа — моногенное заболевание, передающееся по аутосомно-рецессивному типу, связанное с нарушениями функций гена *HFE* (продукт гена участвует в поддержании гомеостаза железа). В настоящий момент известно несколько

замен одиночных нуклеотидов в гене *HFE*, связанных с риском развития гемохроматоза. Среди них наибольшей клинической значимостью обладают С282Y, Н63D и S65C. Замена С282Y является наиболее распространенной (обнаруживается у 87–90% больных) и приводит к замене аминокислоты цистеин на тирозин в 282-м положении. Она приводит к неспособности белка *HFE* взаимодействовать с рецептором трансферрина (TfR1), в результате чего формируется ложный сигнал о низком содержании железа в организме и усиливается его всасывание. Большинство пациентов с типичным фенотипом наследственного гемохроматоза — гомозиготы по редкому варианту 282Y, меньшая часть — носители компаунд-гетерозигот 282Y/63D и гомозигот

63D/63D, связанных, как правило, с нетяжелыми формами заболевания. При гомозиготном генотипе 65C/65C также может наблюдаться легкая форма гемохроматоза. Гетерозиготы по указанным мутациям не имеют клинически выраженных признаков гемохроматоза [3–5].

Около 13% представителей североευропейской популяции являются гетерозиготами и около 0.5% гомозиготами по мутации C282Y гена *HFE*, однако необходимо отметить, что наличие мутаций в гене *HFE* в большинстве случаев не приводит к развитию гемохроматоза, т.е. мутации являются низкопенетрантными [6, 7]. Наличие таких мутаций может являться показанием к проведению регулярных профилактических обследований с целью своевременного обнаружения признаков повышения уровня железа в крови и назначения необходимого лечения, которое обычно заключается в проведении лечебных кровопусканий или назначении комплексообразующих препаратов.

Болезнь Вильсона–Коновалова (гепатолентикулярная дегенерация, гепатоцеребральная дистрофия) — тяжелое прогрессирующее наследственное заболевание, передающееся по аутосомно-рецессивному типу. В основе заболевания лежит нарушение экскреции меди из организма, приводящее к ее накоплению и последующему сочетанному поражению паренхиматозных органов и головного мозга. Болезнь Вильсона–Коновалова (**БВК**) относится к редким заболеваниям, распространенность составляет 1–9 случаев на 100000 населения (в среднем 1 на 25000). Причиной возникновения БВК являются мутации гена *ATP7B*, кодирующего АТФазу 7В. Ведущее звено патогенеза БВК — хроническая интоксикация медью, накапливающейся в печени, селезенке, почках, головном мозге, хрусталике глаза и других органах. Накопление меди в тканях печени приводит последовательно к воспалению, фиброзу и циррозу, накопление меди в тканях головного мозга — к некрозу нейронов [8, 9].

В настоящее время известно более 600 различных мутаций в гене *ATP7B*. В европейских популяциях наиболее распространенной является мутация с.3207C>A, приводящая к замене гистидина на глутамин в положении 1069 (p.His1069Gln) [10, 11]. Доля мутации с.3207C>A в выборке больных русского происхождения по данным лаборатории ДНК-диагностики ФГБУ МГНЦ РАМН составляет 48%. Также частыми являются мутации с.3190G>A (p.Glu1064Lys), с.3402delC и с.2304insC, частота встречаемости которых среди больных составляет 3.9, 2.4 и 4.6% соответственно. Частота носительства составляет около 1% (носителем является каждый 90–100-й человек).

Основные методы лечения БВК — применение комплексообразующих препаратов, соблюдение диеты со сниженным количеством меди в рацио-

не и, при необходимости, проведение трансплантации печени [12].

Семейная средиземноморская лихорадка (периодическая болезнь (**ПБ**), армянская болезнь, периодический перитонит, доброкачественный перитонит, рецидивирующая артралгия и т.д.) — наследственное заболевание, характеризующееся периодическими остро возникающими приступами болей в животе (реже в грудной клетке, суставах), лихорадкой. После приступа, длящегося 2–3 дня, больные выздоравливают с восстановлением полной трудоспособности. Семейная средиземноморская лихорадка — наиболее распространенное заболевание из группы синдромов, называемых аутовоспалительными наследственными периодическими лихорадками (Hereditary Periodic Fever Syndromes). Осложнениями данного заболевания являются амилоидоз, артриты, бесплодие, ишемическая болезнь сердца. Болезнь имеет хроническое течение, продолжаясь десятки лет, оказывая значительное влияние на качество жизни. Приступы наблюдаются до 100–300 и более раз за годы болезни и обычно со временем учащаются. Приступы возникают обычно без каких-либо причин, но могут иметь сезонный характер, отсутствуя зимой или летом. Проявляется заболевание обычно с детского и юношеского возраста и встречается у мужчин и женщин с одинаковой частотой. Выделяют несколько разновидностей заболевания, в том числе абдоминальную, торакальную, суставную [13, 14].

В настоящее время ПБ рассматривается как преимущественно аутосомно-рецессивное заболевание с неполной пенетрантностью, ассоциировано с мутациями в гене *MEFV*. Заболевание наиболее распространено в регионах Восточного Средиземноморья, встречается у турок, армян, евреев, греков и арабов. Частота носительства по литературным данным достигает 1 : 5 [15, 16].

Ген *MEFV* кодирует белок пирин (или маренострин). Функцией пирина является торможение интенсивности воспалительного ответа путем ингибирования активации и хемотаксиса нейтрофилов. Наличие мутаций в гене *MEFV*, вероятно, приводит к ухудшению контроля за воспалительным процессом, к усиленной и неконтрольной миграции лейкоцитов в серозные мембраны, чрезмерной продукции провоспалительных цитокинов, развитию серозного воспаления и приступа ПБ. На сегодняшний день в гене *MEFV* описано свыше 80 мутаций, в основном в экзонах 10, 5, 3 и 2, частота и встречаемость которых характеризуются существенными межпопуляционными различиями. Установлена корреляция тяжести заболевания с разным спектром мутаций гена *MEFV*. Наиболее тяжелое течение болезни наблюдается при мутациях экзона 10: M694V, M680I, V726A. Больные с гомозиготными генотипа-

ми по данным мутациям чаще страдают артритами. Легкий фенотип и неполная пенетрантность описаны у пациентов с мутациями K695R, P369S и E148Q [17–19]. Определение мутаций в гене *MEFV* в ряде стран является стандартной процедурой при постановке диагноза “семейная средиземноморская лихорадка”.

Целью настоящего исследования было установление частоты распространения мутаций в генах *HFE*, *ATP7B* и *MEFV* среди представителей русской популяции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материала для настоящего исследования использовали коллекцию периферической крови 1032 здоровых индивидов (доноров первичной кроводачи, идентифицирующих себя как русские, в соотношении 56% мужчин и 44% женщин, возрастного диапазона 21–44 года) и 400 сотрудниц ФГБУ “НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова” Минздрава России.

Выделение ДНК

Выделение ДНК проводили из 100 мкл периферической крови при помощи набора реагентов “ПРОБА–ГС–ГЕНЕТИКА” компании ООО “ДНК-Технология” (Россия). Методика выделения основана на лизисе биоматериала с последующей сорбцией ДНК на носителе, отмывкой примесей и элюцией ДНК с сорбента. Полученные образцы ДНК сразу использовали для генотипирования либо хранили при –20°C. Концентрация ДНК, определенная на специализированном флуориметре Qubit (Invitrogen, США), составляла в среднем 50–100 мкг/мл.

Генотипирование методом примыкающих проб

Определение замен одиночных нуклеотидов проводили с использованием комплектов реагентов “Гемохроматоз”, “Болезнь Вильсона–Коновалова” и “FAMILIAL MEDITERRANEAN FEVER” производства компании ООО “ДНК-Технология”. Принцип их действия основан на применении метода примыкающих проб (adjacent probes, kissing probes) [20, 21].

В каждый из комплектов реагентов входят амплификационные смеси для определения конкретной мутации. Каждая из смесей содержит праймеры, общие для дикого и мутантного вариантов нуклеотидной последовательности, один общий олигонуклеотид с гасителем флуоресценции и два сиквенс-специфичных олигонуклеотида (пробы), несущих различные флуорофоры. Олигонуклеотидные пробы, соответствующие тому или иному варианту последовательности, мечены

различными флуорофорами, что позволяет определять оба варианта в одной пробирке.

При идентификации замен одиночных нуклеотидов проводили ПЦР, затем понижали температуру реакционной смеси для гибридизации полученной матрицы с олигонуклеотидными пробами. Определение генотипа выполняли после ПЦР и гибридизации путем измерения уровня флуоресценции в ходе температурной денатурации дуплексов олигонуклеотидов и полученных матриц. Данное измерение проходило в режиме реального времени, в результате были получены кривые плавления (рис. 1). Если анализируемый образец содержал только один вариант нуклеотидной последовательности гена, т.е. был гомозиготен по данному полиморфизму, температура плавления для пробы, образующей совершенный дуплекс, была существенно выше, нежели для пробы, образующей несовершенный дуплекс. Если же анализировали гетерозиготный образец, содержащий оба варианта нуклеотидной последовательности, оба варианта проб могли образовать совершенный дуплекс, поэтому температуры их плавления были практически одинаковы.

Применяемый подход выгодно отличается от большинства молекулярно-генетических методов определения однонуклеотидных замен, в том числе использующих технологию TaqMan. Определение генотипа происходит дважды, независимо по двум каналам флуоресценции, что существенно повышает надежность генотипирования (см. рис. 1).

Полимеразную цепную реакцию и определение температуры плавления олигонуклеотидных проб проводили с помощью детектирующего амплификатора DTprime (ООО “ДНК-Технология”). Использовали следующий температурный режим амплификации: 94°C – 10 с, 64°C – 30 с в течение 50 циклов. По завершении реакции амплификации реакционную смесь остужали до 25°C со скоростью 2°C/с. Кривые плавления получали следующим образом: температуру реакционной смеси повышали с 25 до 75°C с шагом в 1°C, измеряя уровень флуоресценции на каждом шаге. В ходе выполнения работы применяли комплекс отечественного оборудования для автоматизирования основных этапов проведения исследований, что позволило проводить генотипирование до 100 образцов по 40 мутациям в день.

В качестве подтверждающего метода проводили выборочное автоматическое секвенирование ДНК по Сэнгеру с применением автоматического секвенатора ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США), использовали реактивы и рекомендации производителя.

Частоту аллелей вычисляли по формуле:

$$f = n/2N \times 100\%,$$

где n – встречаемость аллеля.

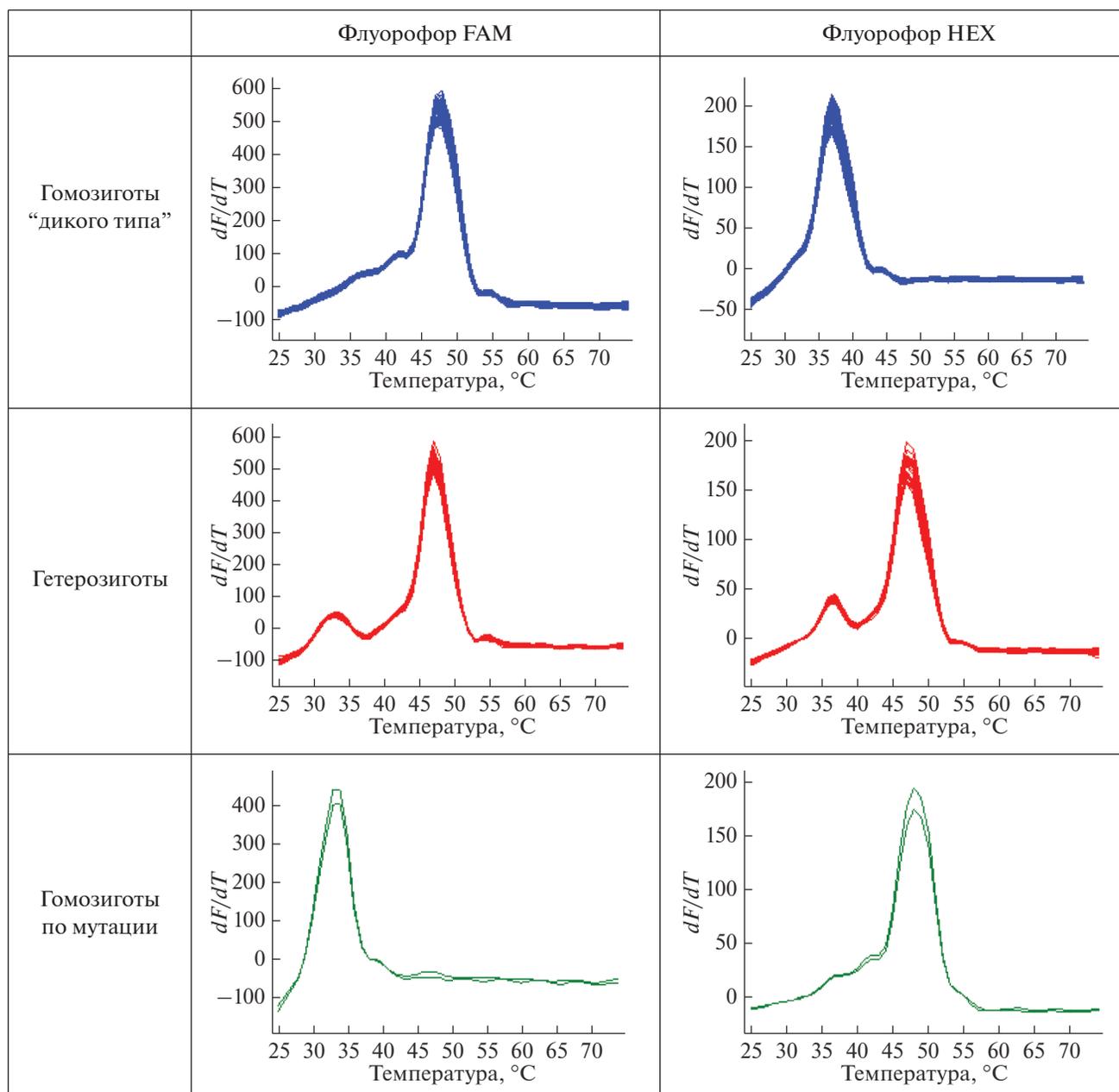


Рис. 1. Кривые плавления для различных вариантов генотипа, полученные при определении мутации H63D в гене *HFE*. Детекция аллелей осуществляется по двум оптическим каналам: FAM и HEX.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В части исследования, посвященной установлению частоты носительства в русской популяции мутаций, связанных с нарушениями обмена металлов (болезнь Вильсона–Коновалова и гемохроматоз), были определены генотипы 1032 здоровых доноров первичной кроводачи, идентифицирующих себя как русские, из них 911 доноров – по мутациям гена *HFE* и 1032 донора – по мутации гена *ATP7B*. Результаты приведены в табл. 1–3.

Были обнаружены 18 носителей мутации H1069Q в гене *ATP7B*, связанной с развитием болезни Вильсона–Коновалова (частота в выборке 1.7%, или 1 : 57), и 57 носителей мутации C282Y гена *HFE*, наиболее значимой в развитии гемохроматоза I типа (частота в выборке 6.3%, или 1 : 16).

В части исследования, посвященной установлению частоты носительства в русской популяции мутаций в гене *MEFV*, связанных с развитием семейной средиземноморской лихорадки, были определены генотипы 812 здоровых индивидов из

Таблица 1. Частота носительства в русской популяции мутаций в гене *HFE*

Генотип	Доноры первичной кроводачи, идентифицирующие себя как русские (N = 911)	
	n	%
<i>HFE</i> : 187 C>G (H63D), rs1799945		
CC	656	72.0
GG	16	1.8
CG	239	26.2
<i>HFE</i> : 193 A>T (S65C), rs1800730		
AA	884	97.0
TT	0	0
AT	27	3.0
<i>HFE</i> : 845 G>A (C282Y), rs1800562		
GG	854	93.7
AA	0	0
AG	57	6.3

числа доноров, включенных в исследование, и 400 сотрудников ФГБУ “НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова” Минздрава России, также идентифицирующих себя как русские (общее число обследованных лиц – 1212). Результаты приведены в табл. 4.

Были обнаружены 88 носителей мутаций в гене *MEFV*, связанных с развитием средиземноморской лихорадки (частота в выборке 7.3%, или 1 : 14), в подавляющем большинстве случаев (82 из 88) была выявлена мутация *MEFV*:2084 A>G (K695R). В одном случае была выявлена гомозигота по мутации *MEFV*:2084 A>G (K695R).

В качестве контрольного исследования проводилось выборочное генотипирование образцов с выявленными гетерозиготами методом автоматического секвенирования ДНК по Сенгеру, во всех случаях результаты секвенирования совпадали с результатами, полученными методом ПЦР в режиме реального времени (данные не приведены).

ОБСУЖДЕНИЕ

В части исследования, посвященной установлению частоты носительства в русской популяции мутаций, связанных с нарушениями обмена металлов, было обнаружено, что полученная частота носительства мутации C282Y гена *HFE*, наиболее значимой в развитии гемохроматоза I типа, согла-

суется с опубликованными данными для русской популяции и практически в 2 раза ниже, чем таковая, определенная для большинства североевропейских популяций (около 13%). В то же время определенная в данном исследовании частота носительства мутации H1069Q в гене *ATP7B* (1 : 57) почти в 2 раза превышает обычно упоминаемую в публикациях частоту носительства мутаций, связанных с болезнью Вильсона–Коновалова (1 : 90...1 : 100).

Опираясь на полученные данные о распространении носительства мутаций, учитывая более

Таблица 2. Частота встречаемости компаунд-гетерозигот по мутациям в гене *HFE*

Компаунд-гетерозигота	Доноры первичной кроводачи, идентифицирующие себя как русские (N = 911)	
	n	%
C282Y/H63D	5	0.5
C282Y/S65C	2	0.2
H63D/S65C	3	0.3

Таблица 3. Частота носительства в русской популяции мутаций в гене *ATP7B*

Генотип	Доноры первичной кроводачи, идентифицирующие себя как русские ($N = 1032$)	
	n	%
<i>ATP7B</i> : 3207 C>A (H1069Q), rs76151636		
CC	1014	98.3
AA	0	0
AC	18	1.7

тяжелое течение и последствия болезни Вильсона–Коновалова, представляется целесообразным включить мутацию H1069Q в гене *ATP7B* в перечень мутаций, определяемых в ходе прегравидарной подготовки, с целью определения носительства заболевания у партнеров и принятия решения о применении вспомогательных репродуктивных технологий. Определение мутаций в гене *HFE*, связанных с развитием наследственного гемохроматоза I типа представляется целесообразным определять в ходе генетического неонатального скрининга, с целью формирования генетического паспорта и своевременного определения предрасположенности к заболеванию.

В части исследования, посвященной установлению частоты носительства в русской популяции мутаций в гене *MEFV*, были обнаружены 88 носителей мутаций в гене *MEFV*, связанных с развитием средиземноморской лихорадки (частота в выборке 7.3%, или 1 : 14). Определение для русской популяции столь высокой частоты носительства мутаций, связанных с развитием семейной средиземноморской лихорадки, стало неожиданным, однако следует учесть, что в подавляющем большинстве случаев (82 из 88) была выявлена мутация *MEFV*:2084 A>G (K695R), описанная как мутация с неполной пенетрантностью, относительно редко выявляемая у больных средиземноморской лихорадкой, в том числе у больных представителей русской популяции. Также следует отметить, что в единственном в нашем исследовании случае выявления гомозиготы по мутации *MEFV*:2084 A>G (K695R) каких-либо жалоб или клинических проявлений, могущих свидетельствовать о развитии средиземноморской лихорадки, у донора крови выявлено не было.

Учитывая крайне высокую частоту носительства мутаций, связанных с развитием семейной средиземноморской лихорадки в ряде популяций, включая ряд популяций СНГ, представляется целесообразным определять данные мутации в

Таблица 4. Частота носительства в русской популяции мутаций в гене *MEFV*

Генотип	Доноры первичной кроводачи, сотрудницы ФГБУ “НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова” ($N = 1212$)	
	n	%
<i>MEFV</i> : 2076_2078del (I692del), rs104895093		
InsIns	1212	100
DelDel	0	0
InsDel	0	0
<i>MEFV</i> : 2080 A>G (M694V), rs61752717		
AA	1212	100
GG	0	0
AG	0	0
<i>MEFV</i> : 2082 G>A (M694I), rs28940578		
GG	1212	100
AA	0	0
AG	0	0
<i>MEFV</i> : 2177 T>C (V726A), rs28940579		
TT	1208	99.7
CC	0	0
CT	4	0.3
<i>MEFV</i> : 2084 A>G (K695R), rs104895094		
AA	1129	93.1
GG	1	0.1
AG	82	6.8
<i>MEFV</i> : 2230 G>T (A744S), rs61732874		
GG	1210	99.8
TT	0	0
GT	2	0.2

ходе прегравидарной подготовки, однако необходимо проведение дополнительных исследований для уточнения спектра определяемых мутаций в зависимости от конкретной популяции.

Таким образом, в результате исследования были установлены частоты распространенных в рус-

ской популяции мутаций в генах *HFE*, *ATP7B* и *MEFV* у здоровых индивидов.

Представляется целесообразным включить мутацию H1069Q в гене *ATP7B* в перечень мутаций, определяемых в ходе прегравидарной подготовки, с целью определения носительства заболевания у партнеров и принятия решения о применении вспомогательных репродуктивных технологий.

Впервые для русской популяции установлена высокая частота носительства мутации K695R в гене *MEFV*, ассоциированной с развитием семейной средиземноморской лихорадки, характеризующейся легким фенотипом и неполной пенетрантностью.

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

Авторы заявляют, что они не имеют конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tavill A.S.* Diagnosis and management of hemochromatosis // *Hepatology*. 2001. V. 33. № 5. P. 1321–1328.
2. *Allen K.J.* Iron-overload-related disease in *HFE* hereditary hemochromatosis // *N. Engl J. Med.* 2008. V. 358. № 3. P. 221–230.
3. *Adams P.C., Reboussin D.M., Barton J.C. et al.* Hemochromatosis and iron-overload screening in a racially diverse population // *N. Engl J. Med.* 2005. V. 352. № 17. P. 1769–1778.
4. *Воевода М.И., Кобзев В.Ф., Ромащенко А.Г. и др.* Распространение аллелей C282Y, H63D и S65C гена *HFE* и предрасположенности к нарушениям метаболизма железа в популяциях России // *Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2001. Т. 4. С. 13–27.
5. *Михайлова С.В., Кобзев В.Ф., Куликов И.В. и др.* Полиморфизм гена *HFE*, ассоциированного с наследственным гемохроматозом, в популяциях России // *Генетика*. 2003. Т. 39. № 7. С. 988–995.
6. *Beutler E.* The *HFE* Cys282Tyr mutation as a necessary but not sufficient cause of clinical hereditary hemochromatosis // *Blood*. 2003. V. 101. № 9. P. 3347–3350.
7. *Potekhina E.S., Lavrov A.V., Samokhodskaya L.M. et al.* Unique genetic profile of hereditary hemochromatosis in russians: high frequency of C282Y mutation in population, but not in patients // *Blood Cells Mol. Dis.* 2005. V. 35. № 2. P. 182–188.
8. *Ferenci P.* Diagnosis and current therapy of Wilson's disease // *Aliment Pharmacol. Ther.* 2004. V. 19. P. 157–165.
9. *Ferenci P.* Regional distribution of mutations of the *ATP7B* gene in patients with Wilson disease: impact on genetic testing // *Hum. Genet.* 2006. V. 120. № 2. P. 151–159.
10. *Lutsenko S., Barnes N.L., Bartee M.Y., Dmitriev O.Y.* Function and regulation of human copper-transporting ATPases // *Physiol. Rev.* 2007. V. 87. P. 1011–1046.
11. *Gromadzka G., Schmidt H.H., Genschel J.* H1069Q mutation in *ATP7B* and biochemical parameters of copper metabolism and clinical manifestation of Wilson's disease // *Mov. Disord.* 2006. V. 21. № 2. P. 245–248.
12. *Medici V., Mirante V.G., Fassati L.R.* Liver transplantation for Wilson's disease: The burden of neurological and psychiatric disorders // *Liver Transpl.* 2005. V. 1. P. 1056–1063.
13. *Bakkaloglu A.* Familial Mediterranean fever // *Pediatr. Nephrol.* 2003. № 18. P. 853–859.
14. *Shohat M., Halpern G.J.* Familial Mediterranean fever – review // *Genetics in Medicine*. 2011. V. 13. № 6. P. 487–498.
15. *Giaglis S., Papadopoulos V., Kambas K. et al.* *MEFV* alterations and population genetics analysis in a large cohort of Greek patients with familial Mediterranean fever // *Clin. Genetics*. 2007. № 71. P. 458–467.
16. *Саркисян Т.Ф.* Молекулярная диагностика семейной средиземноморской лихорадки (периодической болезни) среди армян // *Новый армянский мед. журн.* 2007. Т. 1. № 1. С. 16–23.
17. *Sarkisian T., Ajrapetyan H., Shahsuvaryan G.* Molecular study of FMF patients in Armenia // *Inflammation & Allergy*. 2005. № 4. P. 113–116.
18. *Mkrtchan G.M., Boyajyan A.S., Yavazyan A.A., Beglaryan A.A.* Classical pathway complement activity in familial Mediterranean fever // *Clin. Biochemistry*. 2006. V. 39. № 7. P. 688–691.
19. *Лянгасова О.В., Машикина Е.В., Луценко Е.В. и др.* Исследование спектра мутаций гена *MEFV* в популяции Ростовской области // *Живые и биокосные системы*. 2014. № 8. P. 1–13.
20. *Кофиади И.А., Ребриков Д.В.* Методы детекции однонуклеотидных полиморфизмов: аллель-специфичная ПЦР и гибридизация с олигонуклеотидной пробой // *Генетика* 2006. Т. 42. № 1. С. 22–32.
21. *Сергеев И.В., Хаитов М.Р., Трофимов Д.Ю. и др.* Разработка методов для проведения широкомасштабных исследований полиморфизма генов, регулирующих различные компоненты иммунного ответа // *Физиол. и патол. иммун. системы*. 2009. Т. 13. № 4. С. 21–26.

Frequency of Mutations Associated with the Development of Hereditary Hemochromatosis Type I, Wilson–Konovalov’s Disease and Familial Mediterranean Fever and Peculiarities of Their Distribution in the Russian Population

D. D. Abramov^a, V. V. Kadochnikova^b, E. G. Yakimova^b, M. V. Belousova^a, A. V. Maerle^a,
I. V. Sergeev^b, I. B. Kozlov^{b,*}, A. E. Donnikov^c, I. A. Kofiadi^{b,**}, and D. Yu. Trofimov^d

^aLLC “DNA-Technology”, Moscow, 117587 Russia

^bNational Research Center, Institute of Immunology, Moscow, 115522 Russia

^cNational Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after academician V.I. Kulakov, Moscow, 117997 Russia

^dInstitute of Reproductive Genetics of National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after academician V.I. Kulakov, Moscow, 117997 Russia

*e-mail: kozlov.nrcii@gmail.com

**e-mail: kofiadi@mail.ru

This article is a continuation of the series of works devoted to determining the frequency of mutations associated with the development of common monogenic diseases among the Russian population. The aim of the study was to determine the frequency of mutations in *HFE*, *ATP7B* and *MEFV* genes among blood donors who identify themselves as Russians and permanently residing in the Russian Federation. An adjacent probe method was used to perform SNP-genotyping. During genotyping, 57 carriers of the *HFE* C282Y mutation (frequency in a sample of 911 donors 6.3% or 1 : 16), playing the most significant role in the development of type I hemochromatosis, and 18 carriers of the H1069Q mutation (frequency in a sample of 1032 donors 1.7% or 1 : 57) in the *ATP7B* gene, associated with the development of Wilson–Konovalov disease were detected. A high carrier frequency (frequency in a sample of 1212 donors 7.3% or 1 : 14) of the mutation K695R in the *MEFV* gene, associated with the development of familial Mediterranean fever, characterized by mild phenotype and incomplete penetrance, was also found.

Keywords: hereditary hemochromatosis type 1, *HFE*, Wilson–Konovalov disease, *ATP7B*, familial Mediterranean fever, *MEFV*, genotyping, Russian population.

РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ СЕКВЕНИРОВАНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ *Rangifer tarandus*

© 2021 г. И. В. Артющин^{1,2}, Е. А. Коноров^{1,3,*}, К. А. Курбаков^{1,3}, Ю. А. Столповский¹

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

³Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова
Российской академии наук, Москва, 109316 Россия

*e-mail: casqy@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.01.2020 г.

После доработки 05.08.2020 г.

Принята к публикации 03.09.2020 г.

Разработана система праймеров и оптимизированы условия ПЦР для амплификации митохондриального генома северного оленя *Rangifer tarandus*. Получены последовательности полного митохондриального генома домашнего и дикого оленя из Ненецкого автономного округа. Сравнение двух данных геномов с уже известными двумя митохондрионами домашних оленей из Китая и Японии выявило всего 160 полиморфных сайтов во всех этих выборках. Обнаружены уникальные аллели как для диких, так и домашних оленей Ненецкого автономного округа. Таким образом, разработанная методика позволяет получить новую информацию для филогеографии и изучения генетического разнообразия пород северного оленя, охватывая изменчивость по неизученным для северного оленя митохондриальным маркерам, таким как ND1–ND6 и ATR6, ATR8.

Ключевые слова: *Rangifer tarandus*, митохондриальный геном, полиморфизм.

DOI: 10.31857/S0016675821010033

Генетике северного оленя *Rangifer tarandus* посвящено множество исследований, затрагивающих проблемы консервации географических популяций [1, 2], определения потока генов между дикими и домашними формами [3, 4], генетического разнообразия отдельных пород и популяций [5, 6]. В большинстве работ использовались микросателлитные маркеры, либо отдельные регионы митохондриального генома.

Участки митохондриального генома широко используются в качестве маркеров для филогенетики и баркодинга, а также для изучения внутривидовой изменчивости. Для такого рода исследований мтДНК очень удобна из-за ее высокой копияности, что улучшает успешность амплификации при небольшом количестве ДНК. Последовательность генов в митохондрионе консервативна у животных, что облегчает подбор и использование праймеров для разных групп животных. В то же время в мтДНК есть достаточное количество замен для определения различий как особей внутри вида, так и на уровне семейств. Особенно при использовании маркеров с разной скоростью накопления замен, таких как первая субъединица цитохромоксидазы (COI) и D-петля. Несмотря на обнаруженные недостатки — отклонение от нейтральности, от-

клонения в скоростях эволюции у отдельных таксонов, ядерные копии митохондриальных генов [7], а также на увеличение доли исследований, использующих полногеномное секвенирование — мтДНК не утратила своей роли одного из основных маркеров в популяционной генетике.

Большинство популяционно-генетических исследований северного оленя проводилось на единичном маркере, в основном D-петле контрольного региона, cyt**b**, COI или COII, либо на комбинации из приведенных маркеров [3–9]. Использование полных митохондриальных геномов же позволяет объединить гаплотипы отдельных маркеров в единые гаплогруппы митохондрионов, сократив их количество, и дополнить информацией о полиморфизме неизученных участков мтДНК. Использование полных митохондриальных геномов позволило прояснить происхождение отдельных линий крупного рогатого скота и с большим разрешением уточнить их популяционную историю [10, 11]. В настоящее время известны митохондрионы двух северных оленей — эвенкийского оленя из Аолугуя, Китай [12, GenBank KM506758.1] и оленя из Хоронобе, Япония (Wada et al., неопубликованные данные, GenBank AB245426.1). В данных работах были использованы праймеры для *Arborophila ru-*

Таблица 1. Разработанная система праймеров для амплификации полного митохондриона *R. tarandus* и эффективность амплификации для хорошо сохранившейся и деградировавшей мтДНК

Позиция начала праймера	Последовательность прямого праймера	Позиция начала праймера	Последовательность обратного праймера	% амплификации из свежих проб ($n = 24$)	% амплификации из проб с деградировавшей ДНК ($n = 120$)	Температура, °C
L_1324	gctaagtaccccgaaaccagacgagc	R_5458	gttgcccagttcagcacggattagt	100	83.3	62.7
L_2915	gccattacgacctgccacatcctcaa	R_8934	ggggcaaggcttgagtggtaaatgc	50	22.7	62
L_8328	acaccgctccattaattccatgct	R_13977	agtgtgggggttggttggaattgt	62.5	20.8	64
L_10802	ggccttcacctctgactacccaagc	R_14930	ctgggtgtagtgtctgggtctcct	95.8	87.5	64
L_15394	tcaacacccaagctgaagtctaatt	R_1349	gctcgtctggttcgggtacttagc	100	100	55.9

fipectus и сычуаньской куропатки [13], что может затруднить их использование для популяционно-генетических исследований с использованием высокопроизводительного секвенирования из-за недостаточной специфичности. Поэтому нами была разработана система праймеров для амплификации мтДНК для последующего секвенирования.

Мы разработали систему из пяти пар праймеров (табл. 1) и опробовали ее на 120 образцах выщипов с относительно деградировавшей ДНК (условия хранения: температура 0–10°C, срок хранения 1–2 года), и 24 образца из свежесамороженных образцов. Для фрагментов L_2915-R_8934 и L_8328-R_13977 амплификация произошла только в половине свежих образцов и в четверти образцов с деградировавшей ДНК, скорее всего, из-за большей длины (5649 и 6019 пн соответственно). Объем смеси для ПЦР составил 25 мкл, из них: 2 мкл – 10× Encyclo буфер (Encyclo Plus PCR kit, Евроген, Россия), 0.4 мкл dNTP 50×, 0.4 мкл Hot Taq-полимераза 50×, 2× 0.04 мкл праймеры, 17.12 мкл dd H₂O и 5 мкл экстракта ДНК образца.

Два образца дикого и домашнего оленя из Ненецкого автономного округа были отсеквенированы на платформе Illumina Mi Seq. Полученные чтения были выровнены на геном оленя из Хоронобе с помощью bowtie 2 [14] и собраны, используя известный геном в качестве референса. Последовательности митохондриального генома дикого и домашнего оленя из Ненецкого автономного округа депонированы в базе данных GenBank под идентификаторами MT753444 и MT726040 соответственно. Полученные нами митохондриальные геномы были выровнены с геномами северных оленей из Аолугуя и Хоронобе, а также с геномом *Cervus elaphus* (GenBank KP172593.1) с помощью MAFFT [15]. Также были получены из базы данных GenBank данные по отдельным митохондри-

альным маркерам: COI, cyt**b**, контрольному региону [9, 16–20], и выровнены отдельно для каждого маркера. Подсчет числа полиморфных сайтов и нуклеотидного разнообразия осуществлялся с помощью DnaSP [21].

Филогенетический анализ полных митохондрионов *R. tarandus* с помощью Mr. Bayes выявил родство домашнего оленя из Ненецкого АО и эвенкийского оленя из Аолугуя (рис. 1,а). Геном оленя из Хоронобе находится дальше от остальных митохондрионов, однако обладает общими аллельными вариантами с диким оленем из Ненецкого АО в 11 полиморфных сайтах (рис 1,б). В 78 полиморфных сайтах из 160 эвенкийский и ненецкие олени обладают общими аллельными вариантами.

Прочитанных полных митохондриальных геномов *R. tarandus* на данный момент недостаточно, чтобы выявить большую долю генетической изменчивости, обнаруженную в предыдущих исследованиях с использованием последовательностей цитохрома *b*, контрольного региона и COI (табл. 2). Однако полученные нами данные позволяют судить о том, как распределены полиморфные сайты по митохондриальному геному *R. tarandus* (рис. 1,в и табл. 2). На основании данных по большему числу митохондрионов возможно объединить гаплотипы маркеров, быстро накапливающих замены (D-петля и цитохром *b*) в гаплогруппы, учитывая информацию по более “медленным” маркерам, в том числе не изученным для *R. tarandus* (таким как вторая и третья субъединицы цитохромоксидазы, NADH-дегидрогеназы и АТФазы). Наблюдаемая изменчивость по NADH-дегидрогеназам и АТФазам (рис. 1,г) может служить материалом для отбора к климатическим условиям или к высоким широтам,

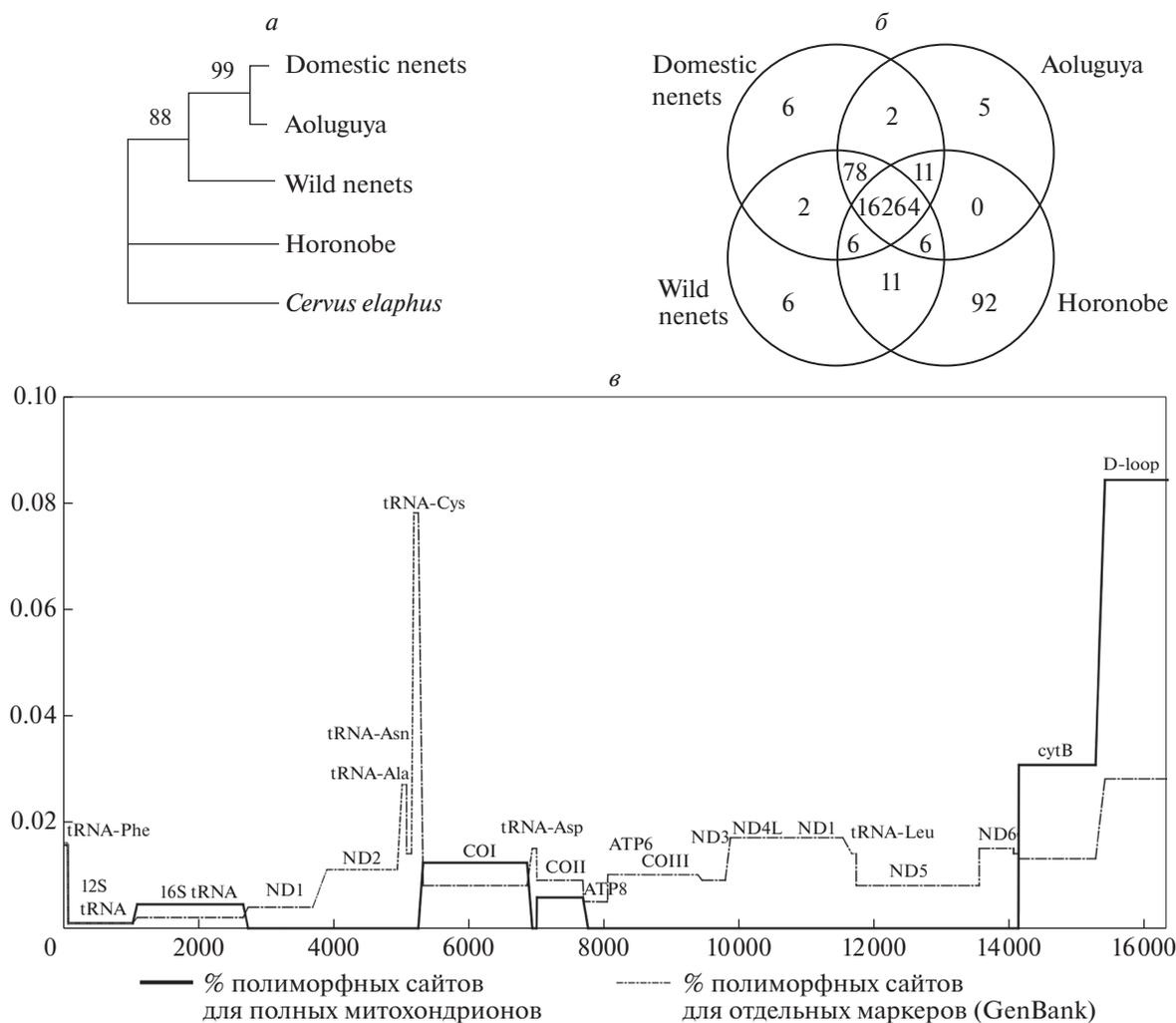


Рис. 1. Анализ полиморфизма мтДНК для полных геномов и данных из GenBank по отдельным маркерам. *а* – филогения четырех особей *R. tarandus* с известными последовательностями митохондриальных геномов; *б* – число уникальных аллелей для каждого из полных митохондрий и число общих аллелей для двух и трех особей; *в* – доля полиморфных сайтов на маркер для полных митохондрий (отмечено серым) и для выборок по отдельным маркерам, взятым из GenBank.

как это раньше наблюдалось на материале других млекопитающих [22, 23].

Разработанная система праймеров позволяет упростить задачу секвенирования митохондриальных геномов *R. tarandus* для изучения их попу-

ляционной истории и демографии, а также адаптационных процессов. В дальнейших исследованиях данная система будет оптимизирована для получения более устойчивой амплификации на фрагменте L_2915–R_8934 и использована для

Таблица 2. Нуклеотидное разнообразие (π) для некоторых митохондриальных маркеров *R. tarandus*

	16S rRNA	ND2	COI	COII	ND5	ND6	cytB	D-петля
Полный митохондрий ($n = 4$)	0.00118	0.00575	0.00475	0.00438	0.00394	0.00758	0.00715	0.0141
Отдельные маркеры (по данным из GenBank) ($n = 5$)	0.00272	–	0.00425 ($n = 183$)	–	–	–	0.05906 ($n = 395$)	0.02795 ($n = 1831$)

Примечание. Для значений π по данным предшествующих работ указаны последовательности в GenBank по состоянию на декабрь 2019 г.

секвенирования накопленного материала по российским диким и одомашненным популяциям северного оленя.

Данная работа была поддержана грантом РФФИ № 17-29-08003.

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Meng X., Aryal A., Tait A. et al. Population trends, distribution and conservation status of semi-domesticated reindeer (*Rangifer tarandus*) in China // J. for Nat. Conservation. 2014. V. 22. № 6. P. 539–546. <https://doi.org/10.1016/j.jnc.2014.08.008>
2. Festa-Bianchet M., Ray J.C., Boutin S. et al. Conservation of caribou (*Rangifer tarandus*) in Canada: An uncertain future // Canadian J. Zool. 2011. V. 89. № 5. P. 419–434. <https://doi.org/10.1139/z11-025>
3. Давыдов А.В., Холодова М.В., Мещерский И.Г. и др. Дифференциация диких и домашних форм северного оленя (*Rangifer tarandus* L.) по результатам анализа мтДНК // С.-х. биология. 2007. № 6. С. 1083–1093.
4. Cronin M.A., MacNeil M.D., Patton J.C. Mitochondrial DNA and microsatellite DNA variation in domestic reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) and relationships with wild caribou (*Rangifer tarandus granti*, *Rangifer tarandus groenlandicus*, and *Rangifer tarandus caribou*) // J. Heredity. 2006. V. 97. № 5. P. 525–530. <https://doi.org/10.1093/jhered/esl012>
5. Холодова М.В., Колпацников Л.А., Кузнецова М.В., Баранова А.И. Генетическое разнообразие диких северных оленей (*Rangifer tarandus*) Таймыра: анализ полиморфизма контрольного региона митохондриальной ДНК // Известия РАН, Серия биологическая. 2011. № 1. С. 52–60. <https://doi.org/10.7868/S0002332916060023>
6. Кол Н.В., Королев А.Л., Захаров И.А. Полиморфизм митохондриальной ДНК в тувинской популяции северного оленя (*Rangifer tarandus* L.) // Генетика. 2006. Т. 42. № 1. С. 110–112.
7. Galtier N., Nabholz B., Glémin S., Hurst G.D.D. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: A reappraisal // Mol. Ecol. 2009. V. 18. № 22. P. 4541–4550. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04380.x>
8. Cronin M.A., MacNeil M.D., Patton J.C. Variation in mitochondrial DNA and microsatellite DNA in caribou (*Rangifer tarandus*) in North America // J. Mammalogy. 2005. V. 86. № 3. P. 495–505. [https://doi.org/10.1644/1545-1542\(2005\)86\[495:VI-MDAM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1644/1545-1542(2005)86[495:VI-MDAM]2.0.CO;2)
9. Kvie K.S., Heggenes J., Røed K.H. Merging and comparing three mitochondrial markers for phylogenetic studies of Eurasian reindeer (*Rangifer tarandus*) // Ecol. and Evol. 2016. V. 6. № 13. P. 4347–4358. <https://doi.org/10.1002/ece3.2199>
10. Achilli A., Bonfiglio S., Olivieri A. et al. The multifaceted origin of taurine cattle reflected by the mitochondrial genome // PLoS One. 2009. V. 4. № 6. P. e5753. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005753>
11. Achilli A., Olivieri A., Pellecchia M. et al. Mitochondrial genomes of extinct aurochs survive in domestic cattle // Curr. Biol. 2008. V. 18. № 4. P. R157–R158. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.01.019>
12. Ju Y., Liu H., Rong M. et al. Complete mitochondrial genome sequence of Aoluguya reindeer (*Rangifer tarandus*) // Mitochondrial DNA Part A. 2016. V. 27. № 3. P. 2261–2262. <https://doi.org/10.3109/19401736.2014.984171>
13. He L., Dai B., Zeng B. et al. The complete mitochondrial genome of the Sichuan Hill Partridge (*Arborophila rufipectus*) and a phylogenetic analysis with related species // Gene. 2009. V. 435. № 1–2. P. 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2009.01.001>
14. Langmead B., Salzberg S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 // Nat. Methods. 2012. V. 9. № 4. P. 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
15. Katoh K., Asimenos G., Toh H. Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT // Bioinf. for DNA Sequence Analysis. Humana Press, 2009. P. 39–64. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-251-9_3
16. Kvie K.S., Heggenes J., Anderson D.G. et al. Colonizing the High Arctic: Mitochondrial DNA reveals common origin of Eurasian archipelagic reindeer (*Rangifer tarandus*) // PLoS One. 2016. V. 11. № 11. P. e0165237. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165237>
17. Cronin M.A., MacNeil M.D., Patton J.C. Mitochondrial DNA and microsatellite DNA variation in domestic reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) and relationships with wild caribou (*Rangifer tarandus granti*, *Rangifer tarandus groenlandicus*, and *Rangifer tarandus caribou*) // J. Heredity. 2006. V. 97. № 5. P. 525–530. <https://doi.org/10.1093/jhered/esl012>
18. Wilkerson C.D., Mahoney S.P., Carr S.M. Post-glacial recolonization of insular Newfoundland across the Strait of Belle Isle gave rise to an endemic subspecies of woodland caribou, *Rangifer tarandus terranova* (Bangs, 1896): Evidence from mtDNA haplotypes // Genome. 2018. V. 61. № 8. P. 575–585. <https://doi.org/10.1139/gen-2017-0199>
19. Yannic G., Pellissier L., Ortego J. et al. Genetic diversity in caribou linked to past and future climate change // Nat. Climate Change. 2014. V. 4. № 2. P. 132–137. <https://doi.org/10.1038/nclimate2074>
20. Eger J.L., Birt T.P., Gunn A., Baker A.J. Genetic diversity and history of Peary caribou (*Rangifer tarandus*) in North America // Proc. From the Caribou Genet. and Relationships Workshop. Edmonton, Canada. 2009. P. 73–101.
21. Librado P., Rozas J. DNA SP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // Bioinformatics. 2009. V. 25. № 11. P. 1451–1452. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg359>

22. Yu L., Wang X., Ting N., Zhang Y. Mitogenomic analysis of Chinese snub-nosed monkeys: Evidence of positive selection in NADH dehydrogenase genes in high-altitude adaptation // *Mitochondrion*. 2011. V. 11. № 3. P. 497–503.
<https://doi.org/10.1186/s12862-017-0896-0>
23. Slimen H.B., Schaschl H., Knauer F., Suchentrunk F. Selection on the mitochondrial ATP synthase 6 and the NADH dehydrogenase 2 genes in hares (*Lepus capensis* L., 1758) from a steep ecological gradient in North Africa // *BMC Evol. Biol.* 2017. V. 17. № 1. P. 46.
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2011.01.004>

Primer System for Reindeer (*Rangifer tarandus*) Mitochondrial Genome Sequencing

I. V. Artyushin^{a, b}, E. A. Konorov^{a, c, *}, K. A. Kurbakov^{a, c}, and Y. A. Stolpovsky^a

^aVavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Science, Moscow, 119991 Russia

^bLomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

^cGorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences, Moscow, 109316 Russia

*e-mail: casqy@yandex.ru

In our study we developed primer system and optimized PCR protocol for amplification of reindeer (*Rangifer tarandus*) mitochondrial genome. We sequenced and assembled two mitochondrial genomes of wild and domestic reindeer from Nenets Autonomous Okrug. These two genomes were compared with known sequenced mitochondriomes of domestic reindeers from Aoluguya (China) and Horonobe (Japan). Among found 160 polymorphic sites some of them has private alleles for domestic and wild reindeer from Nenets Autonomous Okrug. Developed system helps to provide new information for phylogeographic and genetic variation studies of reindeer and to add data from unexamined for reindeer mitochondrial marker such as ND1–ND6 и ATP6, ATP8.

Keywords: *Rangifer tarandus*, mitochondrial genome, polymorphism.

ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ *in vitro* СКРИНИНГА КАНДИДАТОВ В АНТИМИКОБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА УСТОЙЧИВОСТЬ, ОПОСРЕДОВАННУЮ MMP5-MMP15-ТРАНСПОРТЕРАМИ

© 2021 г. К. В. Шур¹, С. Г. Фролова^{1,2}, Н. И. Акимова¹, В. Н. Даниленко¹, Д. А. Маслов^{1, *}

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119333 Россия

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
Московская обл., Долгопрудный, 141701 Россия

*e-mail: maslov_da@vigg.ru

Поступила в редакцию 05.02.2020 г.

После доработки 11.03.2020 г.

Принята к публикации 19.03.2020 г.

Возникновение лекарственной устойчивости к противотуберкулезным препаратам является глобальным вызовом и требует разработки новых лекарств, активных в отношении устойчивых штаммов *Mycobacterium tuberculosis*. Одной из задач, возникающей при разработке, является определение механизмов возникновения или осуществления такой устойчивости к кандидату в лекарство. Система эффлюкса MmpS5-MmpL5 способна обеспечивать лекарственную устойчивость микобактерий к широкому спектру антибиотиков, в том числе к бекваквину, клофазимину, тиациетазонам, азолам и имидазо[1,2-*b*][1,2,4,5]тетразинам. Нами сконструирован рекомбинантный штамм *M. smegmatis* $\Delta mmp5$, делеционный по генам *mmpS5-mmpL5* оперона и являющийся гиперчувствительным к имидазо[1,2-*b*][1,2,4,5]тетразинам. Сравнение чувствительности пары штаммов *M. smegmatis* mc2 155 и *M. smegmatis* $\Delta mmp5$ к кандидатам в антимикобактериальные соединения может быть использовано в качестве тест-системы для установления возможного участия системы эффлюкса MmpS5-MmpL5 в формировании устойчивости на ранних стадиях скрининга.

Ключевые слова: *Mycobacterium smegmatis*, тест-система, лекарственная устойчивость, противотуберкулезные препараты.

DOI: 10.31857/S001667582101015X

Туберкулез является одним из наиболее опасных социально-значимых заболеваний человека. В связи с постоянным ростом числа штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, устойчивых к существующим противотуберкулезным препаратам (ПТП), актуальным подходом в борьбе с туберкулезом является создание принципиально новых, высокоактивных в отношении возбудителя ПТП, способных преодолеть лекарственную устойчивость [1]. По последним данным в различных фазах клинических испытаний находится около 23 новых препаратов и схем терапии туберкулезной инфекции. Однако к последнему разработанному и внедренному в клиническую практику ПТП – бекваквину (ТМС 207) [2] – уже известны случаи возникновения лекарственной устойчивости [3, 4]. Таким образом, разработка новых кандидатных противотуберкулезных препаратов требует более внимательного подхода и должна включать в себя исследование механизмов возникновения устойчивости у бактерий как вызванной мутациями (приобретенная устойчивость), так и вследствие имеющихся у бактерии

систем защиты (природная лекарственная устойчивость) [5].

Один из механизмов, обеспечивающих лекарственную устойчивость микобактерий к широкому спектру антибиотиков, обусловлен клеточными транспортерами, осуществляющими обратный транспорт (эффлюкс) антибиотиков из клетки. Белки эффлюкса подразделяются на пять семейств в зависимости от их структуры, используемой энергии и субстрат-специфичности: суперсемейство АТФ-связывающих кассет (АТФ-binding cassette superfamily, ABC), суперсемейство основных помощников (major facilitator superfamily, MSF), семейство малых белков множественной лекарственной устойчивости (small multidrug resistance family, SMR), семейство экструзии лекарств и токсичных соединений (multidrug and toxic compound extrusion family, MATE) и семейство белков устойчивости-клубнеобразования-деления (resistance-nodulation-division family, RND). Системы эффлюкса могут обуславливать высокий уровень устойчивости микобактерий к рифампицину,

офлоксацину, этамбутолу, стрептомицину и другим антимикробным агентам [6].

Клеточные помпы микобактерий класса RND консервативны и отличаются от других транспортеров этого же класса у других бактерий. Им было присвоено отдельное название – Mmp (mycobacterial membrane proteins) [7]. Одним из представителей Mmp-транспортеров микобактерий является система MmpS5-MmpL5 [8]. Данная система кодируется генами *mmpS5-mmpL5* оперона, который присутствует в геноме микобактерий, как медленно- (*M. tuberculosis*, *M. marinum*, *M. bovis*, *M. ulcerans*, *M. africanum*), так и быстрорастущих (*M. aurum*, *M. smegmatis*, *M. intracellulare*, *M. abscessus*, *M. avium*). У медленно растущих представителей рода экспрессию оперона регулирует транскрипционный фактор семейства MarR [9], в то время как у быстрорастущих – транскрипционный регулятор TetR [10]. Мутации в гене-репрессоре приводят к сверхэкспрессии *mmpS5-mmpL5* оперона, вызывая резистентность микобактерий к различным препаратам: азолам [11], клофазимину и бедаквилину у *M. tuberculosis* [3], производным тиацетазона у *M. abscessus* [10] и имидазо[1,2-*b*][1,2,4,5]тетразином у *M. smegmatis* [12].

Таким образом, исследование возможного участия системы MmpS5-MmpL5 в формировании лекарственной устойчивости микобактерий к разрабатываемым препаратам на ранних этапах скрининга позволит повысить качество создаваемых препаратов, активных как в отношении *M. tuberculosis*, так и других представителей микобактерий, обладающих опероном *mmpS5-mmpL5*.

В данной работе мы описываем создание диагностической пары: *M. smegmatis mc2 155* и *M. smegmatis* с делетированным опероном *mmpS5-mmpL5* (*M. smegmatis Δmmp5*), а также работоспособность системы с использованием перспективных противотуберкулезных препаратов класса имидазо[1,2-*b*][1,2,4,5]тетразинов [13]. Выбор данного организма для создания тест-системы обусловлен тем, что *M. smegmatis mc2 155* является быстрорастущей непатогенной бактерией, несущей в составе своего генома (NC_008596.1) данный оперон (гены *MSMEG_1381-MSMEG_1382*).

M. smegmatis Δmmp5 получен методом гомологичной рекомбинации с использованием суицидной системы p2NIL/pGOAL19 [14]. Фрагмент генов *MSMEG_1381-MSMEG_1382*, содержащий плечи для гомологичной рекомбинации длиной 1253 и 2665 пн, был амплифицирован с использованием праймеров pN-1381-2-del-f1 5'-TTTTAAGCTTC-GAAGAGAAGCGGACGTGTA-3' и pN-1381-2-d-r4 5'-TTTTGGATCCCTCGGTCTCCGCATACCTGTTG-3', при этом в него была внесена делеция в 2828 пн методом сайт-направленного мутагенеза по Р.М. Нельсону [15] с использованием праймеров pN-1381-2-del-r1 5'-ATGCGCGAGAACGACCTTCGGGTT-

GAAGTC-3' и pN-1381-2-del-f2 5'-CGAAGGTC-GTTCTCGCGCATGAAAGAGGAA-3'. Амплифицированный фрагмент был клонирован в плазмиду p2NIL по сайтам рестрикции *HindIII* и *BamHI*, после чего в полученную конструкцию по сайту рестрикции *PacI* была лигирована кассета из плазмиды pGOAL19. Итоговой конструкцией электропорировали клетки *M. smegmatis mc2 155*, после чего проводили отбор единичных кроссверов на триптон-соевом агаре (M290, Himedia, Индия), содержащем канамицин (50 мкг/мл), гигромицин (50 мкг/мл) и X-Gal (50 мкг/мл), отбирая синие колонии. Синие колонии выращивали ночь в жидкой среде Middlebrook 7H9 с добавлением ADC (Himedia, Индия), Tween-80 и глицерина, затем высевали серийные десятикратные разведения на триптон-соевый агар, содержащий X-Gal (50 мкг/мл) и 2%-ную сахарозу. Отбирали белые колонии двойных кроссверов и тестировали их на чувствительность к канамицину. Для отбора мутантов, несущих желаемую делецию, проводили ПЦР-скрининг с фланкирующими делецию праймерами s-13812-f 5'-ACAAAGGT-GCTCGGTTCGAAT-3' и s-13812-r 5'-GGACGAC-CAGTGTGTCGAA-3'. Делецию подтверждали севенированием по Сэнгеру.

Затем определили уровень лекарственной чувствительности сконструированного делеционного мутанта *M. smegmatis Δmmp5* в сравнении со штаммом дикого типа *M. smegmatis mc2 155*. Анализ лекарственной чувствительности был проведен с использованием метода определения минимальных ингибирующих концентраций (МИК). Для определения МИК культуры клеток исследуемых штаммов *M. smegmatis* культивировали в среде Middlebrook 7H9 ADC, содержащей полисорбат-80 и глицерин (Himedia, Индия) в течение суток при 37°C и периодическом помешивании (250 об./мин). Далее культуры уравнивали до OD₆₀₀ = 0.05 средой 7H9 и вносили в ячейки 96-луночного планшета, содержащие серийные двукратные разведения исследуемых соединений. Для проведения тестирования лекарственной чувствительности были использованы имидазо[1,2-*b*][1,2,4,5]тетразины – **3a**, **3h**, **3n** и **3c**, описанные нами ранее [13], основной механизм устойчивости к которым обеспечен системой MmpS5-MmpL5 [12]. Оценку роста клеточных культур проводили визуально после двух суток инкубации при 37°C и периодического помешивания (290 об./мин), рис. 1.

Анализ результатов тестирования МИК у *M. smegmatis Δmmp5* показал повышение лекарственной чувствительности к веществам класса имидазо[1,2-*b*][1,2,4,5]тетразины: в два раза к соединению **3a**, более, чем в четыре раза – к **3c**, в четыре раза – к **3h** и в два раза – к **3n** (табл. 1).

Результаты определения МИК соединений класса имидазо[1,2-*b*][1,2,4,5]тетразинов подтвер-

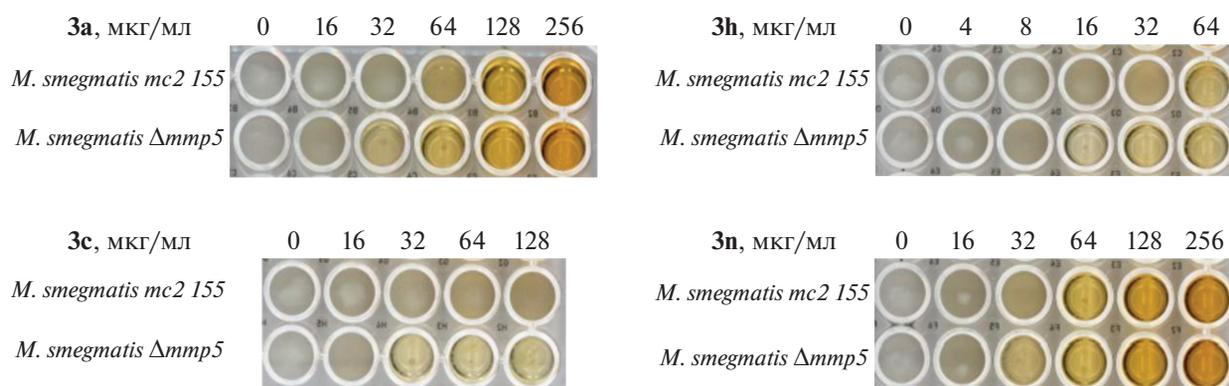


Рис. 1. Рост культур клеток *M. smegmatis mc2 155* и *M. smegmatis Δmmp5* в присутствии серийных двукратных разведений соединений **3a**, **3c**, **3h**, **3n**. Концентрации соединений указаны в мкг/мл, в каждой лунке 200 мкл: 196 мкл клеточной суспензии и 4 мкл соединений, растворенных в 2%-ном диметилсульфоксиде (ДМСО). Положительный контроль (0) содержит 2%-ный ДМСО.

дили возможность использования пары штаммов *M. smegmatis mc2 155* и *M. smegmatis Δmmp5* в качестве тест-системы для установления участия системы MmpS5-MmpL5 в формировании лекарственной устойчивости к разрабатываемым ПТП. Созданная и протестирована тест-система *in vitro*-скрининга перспективных антимикобактериальных агентов позволит проводить ранний скрининг разрабатываемых хит-соединений на предмет участия оперона *mmpS5-mmpL5* в реализации лекарственной устойчивости к ним. Ввиду того, что система эффлюкса MmpS5-MmpL5 может обеспечивать устойчивость микобактерий к соединениям совершенно различных химических классов, что осложняет *in silico* предсказание подверженности разрабатываемых соединений MmpS5-MmpL5-опосредованному эффлюксу, использование созданной *in vitro* тест-системы, можно рекомендовать при исследовании всех новых классов ПТП. Также штамм *M. smegmatis Δmmp5* может стать основой для выявления механизмов действия (получение спонтанных лекарственно-устойчивых мутантов) перспективных ПТП, устойчивость к которым обеспечивается данными транспортерами.

Авторы выражают благодарность В.Н. Чарушину и Г.Л. Русинову за предоставленные соединения класса имидазо[1,2-*b*][1,2,4,5]тетразинов.

Таблица 1. МИК соединений **3a**, **3c**, **3h** и **3n** у *M. smegmatis mc2 155* и *M. smegmatis Δmmp5*

Соединение	МИК, мкг/мл	
	<i>M. smegmatis mc2 155</i>	<i>M. smegmatis Δmmp5</i>
3a	128	64
3c	>128	32
3h	64	16
3n	64	32

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект РНФ № 17-75-20060 “Поиск биомиметической потенциальной противотуберкулезных препаратов класса азоло [1,2,4,5]тетразинов”).

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

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2019. Geneva: WHO, 2019. 297 p.
- Deoghare S. Bedaquiline: A new drug approved for treatment of multidrug-resistant tuberculosis // Indian J. Pharmacol. 2013. V. 45. № 5. P. 536–537. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.117765>
- Andries K., Villellas C., Coeck N. et al. Acquired resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to bedaquiline // PLoS One. 2014. V. 9. № 7. P. e102135. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102135>
- Pym A.S., Diacon A.H., Tang S.-J. et al. Bedaquiline in the treatment of multidrug- and extensively drug-resistant tuberculosis // Eur. Respir. J. 2016. V. 47. № 2. P. 564–574. <https://doi.org/10.1183/13993003.00724-2015>
- Nguyen L. Antibiotic resistance mechanisms in *M. tuberculosis*: An update // Arch. Toxicol. 2016. V. 90. № 7. P. 1585–1604. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1727-6>
- Gygli S.M., Borrell S., Trauner A. et al. Antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Mechanistic and evolutionary perspectives // FEMS Microbiol. Rev. 2017. V. 41. № 3. P. 354–357. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux011>

7. Li X.Z., Zhang L., Nikaido H. Efflux pump-mediated intrinsic drug resistance in *Mycobacterium smegmatis* // Antimicrob. Agents Chemother. 2004. V. 48. № 7. P. 2415–2423.
<https://doi.org/10.1128/AAC.48.7.2415-2423.2004>
8. Briffotiaux J., Huang W., Wang X. et al. MmpS5/MmpL5 as an efflux pump in *Mycobacterium* species // Tuberculosis. 2017. V. 107. P. 13–19.
<https://doi.org/10.1016/j.tube.2017.08.001>
9. Radhakrishnan A., Kumar N., Wright C.C. et al. Crystal structure of the transcriptional regulator Rv0678 of *Mycobacterium tuberculosis* // J. Biol. Chem. 2014. V. 289. № 23. P. 16526–16540.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.538959>
10. Halloum I., Viljoen A., Khanna V. et al. Resistance to thiacetazone derivatives active against *Mycobacterium abscessus* involves mutations in the MmpL5 transcriptional repressor MAB-4384 // Antimicrob. Agents Chemother. 2017. V. 61. № 4. P. e02509–16.
<https://doi.org/10.1128/AAC.02509-16>
11. Milano A., Pasca M.R., Proveddi R. et al. Azole resistance in *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by the MmpS5-MmpL5 efflux system // Tuberculosis (Edinb). 2009. V. 89. № 1. P. 84–90.
<https://doi.org/10.1016/j.tube.2008.08.003>
12. Maslov D.A., Shur K.V., Vatlin A.A. et al. MmpS5-MmpL5 transporters provide *Mycobacterium smegmatis* resistance to imidazo[1,2-*b*][1,2,4,5]tetrazines // Pathogens 2020. V. 9. № 3. P. 166.
<https://doi.org/10.3390/pathogens9030166>
13. Maslov D.A., Korotina A.V., Shur K.V. et al. Synthesis and antimycobacterial activity of imidazo[1,2-*b*][1,2,4,5]tetrazines // Eur. J. Med. Chem. 2019. V. 178. P. 39–47.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.05.081>
14. Parish T., Stoker N.G. Use of a flexible cassette method to generate a double unmarked *Mycobacterium tuberculosis* tlyA plcABC mutant by gene replacement // Microbiology (Reading, Engl.). 2000. V. 146. № 8. P. 1969–1975.
<https://doi.org/10.1099/00221287-146-8-1969>
15. Nelson R.M., Long G.L. A general method of site-specific mutagenesis using a modification of the *Thermus aquaticus* polymerase chain reaction // Anal. Biochem. 1989. V. 180. № 1. P. 147–151.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90103-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90103-6)

A Test-System for *in vitro* Screening Antimycobacterial Drug Candidates for MmpS5-MmpL5 Mediated Drug Resistance

K. V. Shur^a, S. G. Frolova^{a, b}, N. I. Akimova^a, V. N. Danilenko^a, and D. A. Maslov^{a, *}

^aVavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences, Moscow, 119333 Russia

^bMoscow Institute of Physics and Technology (State University), Moscow oblast, Dolgoprudny, 141701 Russia

*e-mail: maslov_da@vigg.ru

Emergence of drug-resistance to anti-tuberculosis agents is a global challenge that requires development of novel drugs, active against resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. One of the tasks of drug development is to determine the mechanism of resistance of the pathogen to the drug candidate. The mycobacterial MmpS5-MmpL5 efflux system can provide resistance to a wide range of antibiotics, including bedaquiline, clofazimine, thiacetazones, azoles and imidazo[1,2-*b*][1,2,4,5]tetrazines. We were able to construct a recombinant *M. smegmatis* $\Delta mmp5$ strain, which carries a deletion within the *mmpS5-mmpL5* operon, and is hypersensitive to imidazo[1,2-*b*][1,2,4,5]tetrazines. Comparing the sensitivity of *M. smegmatis* mc2 155 and *M. smegmatis* $\Delta mmp5$ to candidate antimycobacterials can be used as a test-system for determining the possible role of the MmpS5-MmpL5 efflux system in developing drug resistance at early screening stages.

Keywords: *Mycobacterium smegmatis*, test-system, drug resistance, anti-tuberculous drug.

РУССКИЕ ПОВОЛЖЬЯ. ИНТЕНСИВНОСТЬ МЕТИСАЦИИ В КОНЦЕ XX ВЕКА

© 2021 г. Г. И. Ельчинова^{1, *}, Р. А. Зинченко^{1, 2, **}

¹Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова, Москва, 115522 Россия

²Национальный научно-исследовательский институт общественного здоровья
им. Н.А. Семашко, Москва, 105064 Россия

*e-mail: elchinova@med-gen.ru

**e-mail: renazinchenco@mail.ru

Поступила в редакцию 17.02.2020 г.

После доработки 22.04.2020 г.

Принята к публикации 12.06.2020 г.

Исследование выполнено на архивных данных лаборатории генетической эпидемиологии ФГБНУ “МГНЦ”. Из 65747 брачных записей по Удмуртии, Чувашии, Марий Эл, Башкирии, Татарстану, относящихся к концу XX в., отобраны 15804 пар, в которых хотя бы один из супругов русский. Из 1.2 млн населения обследованных районов русские составляют почти 270 тыс. человек. Интенсивность метисации русского населения составила 52.5%. Этническая брачная ассортативность – 2.3. Приводятся данные по всем пяти республикам.

Ключевые слова: этническая брачная ассортативность, интенсивность метисации, русские Поволжья.

DOI: 10.31857/S0016675821010057

С 80-х годов прошлого столетия сотрудниками лаборатории генетической эпидемиологии проводятся комплексные медико-популяционно-генетические обследования населения России. Работы идут в соответствии со стандартным протоколом, разработанным в лаборатории под руководством академика Е.К. Гинтера. Протокол предусматривает сбор генетико-демографической информации, впоследствии используемой при анализе груза и спектра наследственной патологии [1]. В Поволжье обследовано население Татарстана, Башкортостана, Удмуртии, Чувашии и Марий Эл. Основное внимание уделялось обследованию автохтонного населения, поэтому выбирались районы с преобладанием титульной нации. Тем не менее, даже в этих районах проживает значительное число русских. Русские составляют почти 270 тыс. (22.2%) из 1.2 млн населения этих районов. Анализ метисации русского населения Поволжья посвящена данная работа.

В работе использованы архивные данные лаборатории генетической эпидемиологии по брачным записям: шесть р-нов Башкортостана (Бурзянский, Абзелиловский, Баймакский, Салаватский, Архангельский, Балтачевский), 13 р-нов Татарстана (Арский, Нурлатский, Пестречинский, Мензелинский, Буинский, Кукморский, Атнинский, Балтасинский, Дрожжановский, Черемшанский, Альке-

евский, Муслюмовский, Актанышский), шесть р-нов Удмуртии (Дебесский, Глазовский, Игринский, Можгинский, Малопургинский, Шарканский), шесть р-нов Чувашии (Алатырский, Мариинско-Посадский, Цивильский, Канашский, Чебоксарский, Моргаушский), три р-на Марий Эл (Советский, Медведевский, Моркинский). Из 65747 брачных записей отобраны те, в которых хотя бы один из супругов русский. Их оказалось 15804 (табл. 1). Все брачные записи относятся к концу XX в. Из них внутриэтнические русские браки составили 47.5%. Интенсивность метисации русских Поволжья составляет 52.5%. На основании этого мы приходим к выводу, что русское население Поволжья высокометисировано. Основными брачными партнерами русских ожидаемо являются народы Поволжья, эти браки составляют 94.9%. Браки со славянскими народами составляют 3.1%, причем 2.9% – это браки с украинцами и белорусами, а браки с западными славянами (поляки, чехи, болгары) – чуть менее 0.2%. Немногочисленны браки с народами Кавказа (0.7%) и Средней Азии (0.3%). Браки с немцами, длительно проживающими в Поволжье, составили 0.3%. По 0.1% составили браки с народами Прибалтики, Ближнего Востока и северными финно-угорскими народами (коми-пермяки, ка-

Таблица 1. Национальный состав браков русских

Тип барака	Удмуртия	Татарстан	Башкирия	Чувашия	Марий Эл	СУММА
Русско-русский	1857	2470	467	2031	681	7506
Русско-аварский					1	1
Русско-азербайджанский	10	3				13
Русско-арабский	1			1	6	8
Русско-армянский	10	8	3	3	4	28
Русско-башкирский	7	5	255	1		268
Русско-белорусский	19	7	4	6	3	39
Русско-болгарский	2					2
Русско-бурятский	1					1
Русско-гагаузский	1					1
Русско-греческий		1	1	1		3
Русско-грузинский	5				1	6
Русско-еврейский					1	1
Русско-казахский			1	2		3
Русско-карельский		1				1
Русско-киргизский		1				1
Русско-коми	3	2		1	1	7
Русско-корейский	3		1		1	5
Русско-кумыкский	1					1
Русско-курдский		1				1
Русско-латышский	1		7			8
Русско-лезгинский	1					1
Русско-литовский	1					1
Русско-марийский	13	30	8	6	661	718
Русско-молдавский	10	1	1	2	5	19
Русско-мордовский	2	85	1	340	2	430
Русско-немецкий	12	3	3	4	4	26
Русско-ногайский	1					1
Русско-осетинский	1	2				3
Русско-пермяцкий	1					1
Русско-польский	6	1	1		2	10
Русско-сирийский				1		1
Русско-таджикский	3	2		2		7
Русско-татарский	209	1386	86	30	89	1800
Русско-турецкий		1				1
Русско-туркменский		3			1	4
Русско-удмуртский	2782	81	2	1	6	2872
Русско-узбекский		7	1	2	1	11
Русско-украинский	80	46	6	36	35	203
Русско-финский	1					1
Русско-цыганский	2					2
Русско-чеченский	1			1		2
Русско-чешский				1	1	2
Русско-чувашский	8	857	13	889	17	1784
СУММА	5055	5004	861	3361	1523	15804

Таблица 2. Наблюдаемое и ожидаемое число внутриэтнических русских браков и этническая ассортативность *H*

Республика	Наблюдаемое	Ожидаемое	<i>H</i>	Метисация, %
Удмуртия	1857	1424	1.30	63.3
Чувашия	2031	736	2.76	39.6
Башкирия	467	67	6.97	45.8
Татарстан	2470	474	5.21	50.6
Марий Эл	681	623	1.09	55.3

релы, финны). Единичны браки с корейцами, бурятами, цыганами, греками.

Ожидаемое число внутриэтнических русских браков составило 3240 при наблюдаемом 7506. Этническая брачная ассортативность рассчитана по методу Н.П. Бочкова [2] как отношение наблюдаемого к ожидаемому, для русских Поволжья она составила 2.3. При избытке внутриэтнических браков наблюдается недостаток межэтнических: 8298 наблюдаемых при ожидаемом 22711. Таким образом, в нашей выборке браков, в которых хотя бы один из супругов русский, ожидаемое число – 25951 брачная запись при наблюдаемом 15804. Предполагаем, что такое несоответствие связано с активной миграцией русского населения в крупные города, не охваченные настоящим исследованием. В пользу этого свидетельствуют результаты картографического анализа эндогамности населения Татарстана [3], выявляющие наличие минимумов в районе Казани и Набережных Челнов, не входящих в проведенное исследование.

В табл. 2 представлены эти же данные по каждой из республик. Этническая ассортативность положительна, наиболее низкая в Марий Эл (русских в выборке 31.7%), самая высокая в Башкирии (русских в выборке 9.8%). Подобное явление неоднократно наблюдалось нами и ранее: национальные меньшинства имеют более высокую этническую брачную ассортативность. Наиболее высокая метисация в Удмуртии (36.8% русских в выборке), ниже всего она в Чувашии (26.8% русских в выборке). Таким образом, русские высокометисированы в каждой из республик несмотря на положительную брачную этническую ассортативность.

Таким образом, успешная ассимиляция русских в республиках Поволжья отражена высоким уровнем метисации несмотря на положительную этническую брачную ассортативность. Дальнейшие молекулярно-генетические исследования позволят оценить влияние метисации на дрейф генов в русском населении Поволжья.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 20-015-00061 и государственного задания Министерства науки и высшего образования.

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

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Амелина С.С., Шокарев Р.А., Кривенцова Н.В. и др. Генетико-эпидемиологическое изучение Ростовской области // Мед. генетика. 2005. Т. 4. № 8. С. 371–377.
2. Бочков Н.П., Николаева И.В., Тихоной М.В. и др. Брачная ассортативность в населении современного города // Генетика. 1984. Т. 20. № 7. С. 1224–1229.
3. Ельчинова Г.И., Игумнов П.С., Зинченко Р.А., Гинтер Е.К. Медико-генетическое изучение населения Татарстана. Сообщение 3. Популяционно-генетическая характеристика // Мед. генетика. 2012. № 9. С. 41–48.

Russian Volga Region. Intensity of Metisation at the End of the 20th Century**G. I. El'chinova^{a, *} and R. A. Zinchenko^{a, b, **}**^a*Research Centre for Medical Genetics, Moscow, 115522 Russia*^b*Semashko National Research Institute of Public Health, Moscow, 105064 Russia***e-mail: elchinova@med-gen.ru****e-mail: renazinchenko@mail.ru*

The study was performed using archival data from the laboratory of genetic epidemiology of the RCMG. Of the 65747 marriage records for Udmurtia, Chuvashia, Mari El, Bashkiria, and Tatarstan, dating back to the end of the 20th century, 15804 were selected, in which at least one of the spouses is Russian. Russians make up almost 270 thousand people out of the 1.2 million population of the surveyed areas. The intensity of metisation of the Russian population was 52.5%. Ethnic marital assortativeness 2.3. Data is provided for all 5 republics.

Keywords: ethnic wedding assortatively, the intensity of cross-breeding, the Russian Volga region.

**РЕЗУЛЬТАТЫ ДЛИТЕЛЬНОГО МОНИТОРИНГА
И ЭКСПЕРИМЕНТА ПО ОБОГАЩЕНИЮ ГЕНОФОНДА ПОПУЛЯЦИЙ
КУСТАРНИКОВОЙ УЛИТКИ *Bradybaena fruticum* (Müll.)
НА УРБАНИЗИРОВАННЫХ ТЕРРИТОРИЯХ**

© 2021 г. В. М. Макеева^{1, *}, И. Д. Алазтели¹, А. В. Смуров¹,
Д. В. Политов², Ю. С. Белоконов², М. М. Белоконов²

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: vmmakeeva@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.02.2020 г.

После доработки 18.06.2020 г.

Принята к публикации 08.07.2020 г.

Результаты длительного мониторинга динамики фенетических признаков в десяти популяциях кустарниковой улитки из Подмосковья и парков г. Москвы зафиксировали постоянство частоты аллеля полосатости раковин в крупных природных популяциях и изменение частот в мелких городских изолятах. Одновременно в череде поколений выявлена стойкая тенденция увеличения частоты желтых раковин, что объясняется происходящим осветлением местообитаний и служит подтверждением адаптивности признака цвета раковин. Представлены результаты длительного эксперимента по поддержанию жизнеспособности четырех городских популяций кустарниковой улитки *Bradybaena fruticum* (Müll.), начатого с обогащения их генофонда в 2003 г. и проведения контроля в 2005 г., выявившего изменение частоты аллеля полосатости раковины. Повторный контроль состояния генофонда оздоровленных популяций (2017–2019 гг.) выявил сохранение частоты этого признака с 2005 г. на протяжении двух поколений моллюсков, в том числе в двух популяциях при $p < 0.01$, одной $p < 0.05$. Таким образом, контроль результатов эксперимента по обогащению популяций подтверждает, что способ поддержания жизнеспособности популяций на урбанизированных территориях (защищенный патентом на изобретение) эффективен для восстановления генетического разнообразия и жизнеспособности популяций животных.

Ключевые слова: популяция, аллель, фенетические признаки, мониторинг, урбанизированный ландшафт.

DOI: 10.31857/S0016675821010094

Сохранение биоразнообразия является одним из необходимых условий устойчивого развития человечества [1]. Сохранение биоразнообразия связано не только с сохранением местообитаний и поддержанием численности вида, но в значительной степени – с поддержанием генетического разнообразия популяций.

Устойчивость популяций животных и растений обеспечивается благодаря гомеостазу, т.е. постоянству соотношения частот аллелей генов. Использование частот аллелей генов позволяет оценить генотипическую структуру популяций. В условиях урбанизированных ландшафтов фрагментация как правило ведет к изоляции мелких популяций, сокращению их генетического разнообразия (вследствие активизации дрейфа генов и инбридинга) и вымиранию [2, 3]. Поэтому для обеспечения жизнеспособности популяций на

урбанизированных территориях необходим контроль состояния генофонда и поддержание его разнообразия [4].

Это является главной методологической основой геноурбанонологии – нового научного направления, разработанного авторами [4–6]. В рамках геноурбанонологии получен патент на изобретение № 2620079 “Способ поддержания жизнеспособности популяций животных или растений на урбанизированных территориях” [7], который позволяет остановить процессы устойчивого необратимого изменения генофондов, вызванные антропогенной изоляцией. Апробация способа была проведена на примере четырех популяций кустарниковой улитки, обитающих на особо охраняемых территориях города Москвы, в 2003–2005 гг. [6].

Необходимо отметить, что ранее сокращение генетического разнообразия было выявлено в по-

пуляциях четырех модельных видов животных и растений в условиях урбанизированного ландшафта города Москвы и Подмосковья, что несомненно свидетельствует об уменьшении адаптивного потенциала и жизнеспособности популяций [8–10].

Задача настоящего исследования состоит в анализе динамики генофонда популяций кустарниковой улитки по результатам длительного эколого-генетического мониторинга фенетических признаков, а также — в проведении контрольного обследования состояния генофонда экспериментально обогатенных в 2003 г. четырех городских популяций этого модельного объекта.

Кустарниковая улитка широко распространена в европейской части России, Западной Сибири — в пойменных лесах и на склонах сырых оврагов, в том числе и в антропогенных местообитаниях. Этот вид включен в список видов, предложенных для внесения в Красную Книгу города Москвы [11].

Кустарниковая улитка является удобным объектом для мониторинга динамики структуры популяций, т.к. обладает ярко выраженным генетически детерминированным полиморфным признаком — наличием или отсутствием полосы на раковине, с доминированием аллеля бесполосости [12]. Раковины также полиморфны по цвету. Выделяются красные, коричневые и желтые морфы. Цвет раковины не является четким дискретным признаком и детерминирован полигенно. Продолжительность жизни особей составляет 5–6 лет.

Эколого-генетический мониторинг популяций кустарниковой улитки начал в 1975 г. [13] и продолжается по настоящее время. Описания местообитаний исследованных за этот период 20-ти популяций улиток в Москве и Подмосковье, а также методика сбора материала, результаты оценки состояния генофонда с использованием биохимических маркеров и фенетических признаков подробно изложены ранее [8, 14–17].

В настоящем сообщении приведены результаты мониторинга десяти популяций, из которых шесть обитают на особо охраняемых территориях (ООПТ) г. Москвы, четыре — в дальнем и ближнем Подмосковье. Мониторинг двух популяций проводится с 1975 г., одной — с 1989 г., одной — с 1998 г., остальных — с 2003 г. Последнее контрольное обследование состояния генофонда популяций проведено в 2017–2019 гг., объем материала составляет 1310 экземпляров. Для изучения динамики частот фенетических признаков во времени использованы также данные исследований популяций улиток, проведенных ранее [13–17] в количестве более 12000 раковин.

Пункты сбора улиток в Москве: Национальный парк Лосиный остров; особо охраняемые территории (ООПТ) г. Москвы: природно-исторические парки: Измайлово, Кузьминки–Люб-

лино; парк Битцевский лес; природный заказник Воробьевы горы, усадьба Узкое, Главный Ботанический сад. Улиток собирали в трех пунктах на западе Московской обл., в Звенигородском р-не: природный заказник “Звенигородская биостанция МГУ и карьер Сима”, дер. Городок на берегу Можайского водохранилища, дер. Мешково (Киевское шоссе).

Анализ состояния генофонда десяти популяций кустарниковой улитки в пространстве и во времени проводился с использованием двух фенетических признаков: наличия или отсутствия полосы на раковине и наличия ярко желтой окраски раковины.

Для сравнения выборок из исследованных популяций использовалась частота аллеля полосатости, которая рассчитывалась по доле полосатых особей, проявляющих рецессивный ген [18]. При этом доминантная гомозигота и гетерозигота имеют одинаковое фенотипическое выражение — отсутствие полосы на раковине. В расчетах частот аллелей исходили из предположения, что соотношение генотипов в популяциях соответствует равновесию Харди–Вайнберга, поскольку данные, полученные нами ранее, указывают на равновесное распределение генотипов аллозимных локусов у данного вида [8].

Для проведения сравнительного графического анализа популяций в пространстве и во времени рассчитывались доверительные границы для доли, среднее квадратическое отклонение (σ_p), средняя ошибка для доли (S_p) [18].

Выборки сравнивались с помощью критерия Фишера с предварительным преобразованием долей в радианы (метод ϕ) [19].

Анализ частот раковинных фенотипов выявил стойкое сохранение частоты аллеля полосатости — генетически детерминированного признака наличия или отсутствия полосы на раковине в популяциях, разделенных антропогенными барьерами (рис. 1, табл. 1). Постоянство частот сохраняется не только в ограниченный период времени (3–5 лет), но и на протяжении 3–7 поколений (одно поколение шесть лет). В целом длительный мониторинг выявил колебания частот признаков вокруг средней величины, что подтверждает адаптивный характер полиморфизма (выявленный ранее), дающий возможность популяции выжить в колеблющихся условиях среды [16, 17] (табл. 1). Необходимо отметить, что постоянство генетической структуры выявлено главным образом для крупных природных популяций (Звенигород, Городок, Мешково). В то же время в мелких изолированных городских популяциях, испытывающих максимальное антропогенное воздействие, отмечены достоверные изменения частот аллелей (Воробьевы горы, Кузьминки, Лосиный остров) (рис. 1). Полученные данные о постоянстве частот полосатых морф в природных популяциях

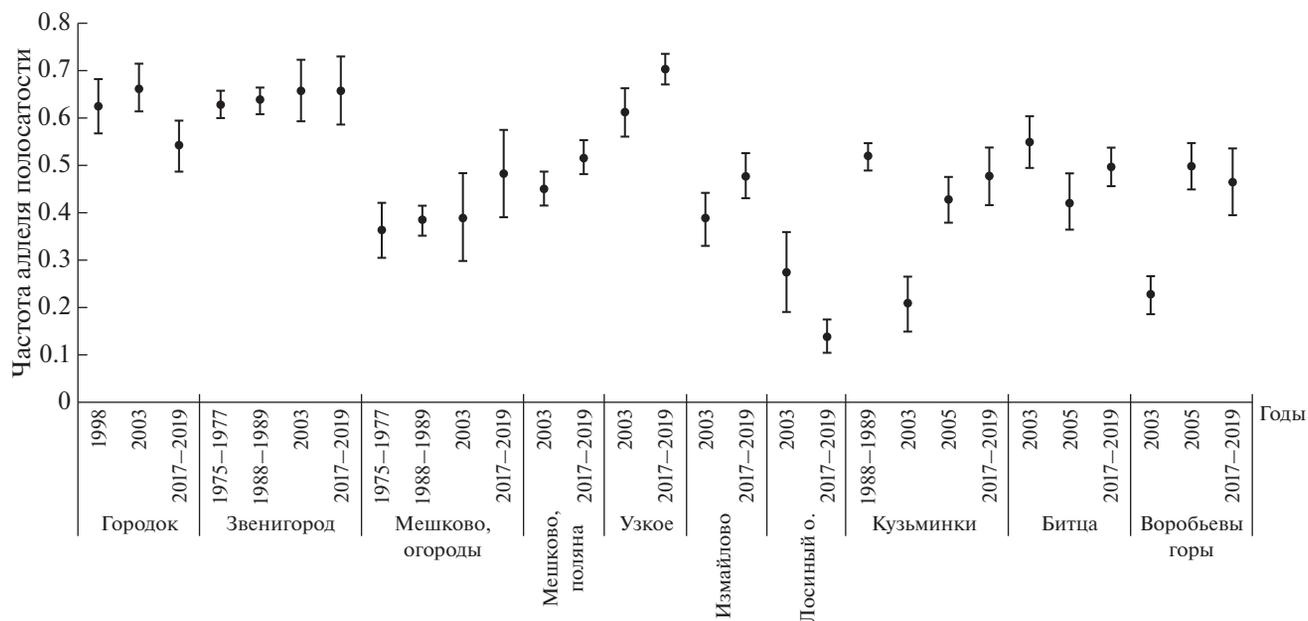


Рис. 1. Частоты аллеля полосатости раковин в десяти популяциях кустарниковой улитки в парках г. Москвы и в Подмоскovie по результатам длительного мониторинга.

кустарниковой улитки согласуются с ранними работами авторов [17] и с современными работами других исследователей, выявившими стойкое сохранение частот полосатых морф на протяжении шестнадцати лет в популяции наземного моллюска *Helix albescens*, Rossmassler в Крыму [20] и достоверные изменения частот фенетических признаков в популяциях наземных моллюсков *Bradybaena fruticum* [21] и *Cepaea vindobonensis*, Ferussac [22], обитающих на урбанизированных территориях.

В целом результаты анализа популяций моллюсков (с использованием аллеля полосатости), разграниченных естественными и созданными человеком барьерами, позволяют сделать заключение о решающей роли антропогенной инсуляризации в формировании пространственно-популяционной структуры вида. Сильное влияние антропогенной инсуляризации за период наблюдения (43 года) сказалось также в резком сокращении площади обитания и численности особей в изолятах (в 25–50 раз), в сокращении генетического разнообразия популяций. За период длительного мониторинга исчезло семь популяций моллюсков (33.3% от общего числа популяций) и 19 участков, различающихся фитоценологически (54.3% от общего числа участков) вследствие разрушения их местообитаний.

Сравнительный анализ популяций в пространстве и во времени с использованием признака частоты ярко-желтых раковин выявил стойкую тенденцию увеличения частоты желтых раковин (табл. 1), (различия достоверны в восьми

из десяти популяций). Это может быть объяснено происходящим осветлением местообитаний, отмеченным нами ранее [15, 17], и служит подтверждением адаптивности признака цвета раковин. Необходимо отметить, что случаи отклонения от выявленной тенденции, например в популяции “Узкое” (табл. 1), связаны с сильным антропогенным воздействием, выражающемся в постоянном сенокосении в местах обитания улиток, приводящему к сокращению площади обитания и численности популяции.

Также было подтверждено выявленное нами ранее [15, 17] преобладание желтых бесполосых раковин в открытых фитоценозах по сравнению с затененными, что обеспечивает большую защиту моллюсков при апостатическом (хищниками) отборе. Кроме того, тот или иной цвет раковины обеспечивает разную степень регуляции нагрева тела, следовательно, разную скорость потери воды. Эксперименты, проведенные нами ранее, подтвердили большую выживаемость бесполосых моллюсков с желтым цветом фона раковин при нагревании, по сравнению с другими морфами [23].

В 2003 г. в четырех популяциях из парков Москвы (Кузьминки, Битцевский лес, Воробьевы горы, Ботанический сад), испытывающих максимальный антропогенный пресс (генофонд и эффективная численность были оценены как критические) [8], было проведено экспериментальное оздоровление генофонда [5, 6]. Решение об оздоровлении популяций было принято на основании результатов оценки состояния генофонда 20 популяций кустарниковой улитки из парков

Таблица 1. Частоты аллеля полосатости, полосатых и желтых раковин в десяти популяциях кустарниковой улитки парков Москвы и в Подмосковье по результатам длительного мониторинга

Пункт сбора	Год	Численность			Частота полосатых раковин	Частота аллеля полосатости	Частота желтых раковин	σ_p	S_p
		всего	полосатых	желтых					
Городок	1998	134	52	32	0.3881	0.6229	0.2388	0.485	0.030
	2003	171	75	47	0.4386	0.6623	0.2749	0.473	0.026
Звенигород	2017–2019	168	49	55	0.2917	0.5401	0.3274	0.498	0.027
	1975–1977	4250	1672	349	0.3934	0.6272	0.0821	0.484	0.005
Мешково, огороды	1989	567	229	42	0.4789	0.6920	0.0741	0.462	0.015
	2003	102	44	16	0.4314	0.6568	0.1569	0.475	0.033
Мешково, поляна у Киевского шоссе	2017–2019	86	37	28	0.4302	0.6559	0.3256	0.475	0.036
	1975–1977	3185	417	343	0.1309	0.3618	0.1077	0.481	0.029
Узкое	1988	451	66	100	0.1118	0.3344	0.2217	0.486	0.016
	2003	53	8	–	0.1509	0.3885	0.0000	0.487	0.047
Измайловский парк	2017–2019	56	13	6	0.2321	0.4818	0.1071	0.500	0.047
	2003	367	74	22	0.2016	0.4490	0.0599	0.497	0.018
Лосинный остров	2017–2019	188	50	27	0.2660	0.5157	0.1436	0.500	0.026
	2003	436	163	96	0.3739	0.6114	0.2202	0.487	0.017
Кузьминки	2017–2019	128	63	3	0.4922	0.7016	0.0234	0.458	0.029
	2003	195	29	12	0.1487	0.3856	0.0615	0.487	0.025
Битцевский лес	2017–2019	66	15	21	0.2273	0.4767	0.3182	0.499	0.043
	2003	320	24	18	0.0750	0.2739	0.0563	0.446	0.018
Воробьевы горы	2017–2019	104	2	39	0.0192	0.1387	0.3750	0.346	0.024
	2003	561	150	27	0.3825	0.5171	0.0481	0.500	0.015
Воробьевы горы	2017–2019	94	4	5	0.0426	0.2063	0.0532	0.405	0.030
	2003	204	37	34	0.1814	0.4259	0.1667	0.494	0.024
Воробьевы горы	2017–2019	128	29	24	0.2266	0.4760	0.1875	0.499	0.031
	2003	160	48	9	0.3000	0.5477	0.0563	0.498	0.028
Воробьевы горы	2017–2019	129	23	16	0.1783	0.4222	0.1240	0.494	0.031
	2003	289	71	39	0.2457	0.4957	0.1349	0.500	0.021
Воробьевы горы	2017–2019	216	11	30	0.0509	0.2257	0.1389	0.418	0.020
	2003	202	50	32	0.2475	0.4975	0.1584	0.500	0.025
Воробьевы горы	2017–2019	97	21	16	0.2165	0.4653	0.1649	0.499	0.036

Примечание. σ_p – среднее квадратическое отклонение; S_p – средняя ошибка для доли по признаку частоты аллеля полосатости раковин.

Таблица 2. Степень различия популяций по частотам аллеля полосатости, по результатам длительного эксперимента по оздоровлению генофонда

Пункт сбора	Год	Численность		Частота		<i>d.f.</i>	<i>F</i> -критерий	Вероятность различия по сравнению с 2005 г.
		всего	полосатых	полосатых	аллеля			
Кузьминки	2003	94	4	0.0426	0.2063	296	14.7698	0.999
	2005	170	37	0.2176	0.4665	—	—	—
	2017–2019	128	29	0.2266	0.4760	330	0.7983	Различия нет
Битцевский лес	2003	160	48	0.3000	0.5477	287	4.5255	0.95
	2005	129	23	0.1783	0.4222	—	—	—
	2017–2019	289	71	0.2457	0.4957	416	1.9390	Различия нет
Воробьевы горы	2003	216	11	0.0509	0.2257	416	34.6080	0.999
	2005	202	50	0.2475	0.4975	—	—	—
	2017–2019	97	21	0.2165	0.4653	297	0.2727	Различия нет

Примечание. 2003 г. — частота аллеля полосатости до оздоровления; 2005 г. — после оздоровления; 2017–2019 — через два поколения после оздоровления.

Москвы и Подмосковья (13 полиморфных изоферментных локусов, 2730 экземпляров) [8]. Для оздоровления генофонда использована разработанная технология сохранения жизнеспособности популяций животных на урбанизированных территориях, защищенная впоследствии патентом [7]. В городские популяции было внесено определенное расчетное число улиток из эталонных популяций Московской обл. (Звенигород, Городок, Мешково). В 2005 г. проведено первое контрольное определение состояния генофонда, которое выявило изменение частот аллеля полосатости у потомства во всех популяциях. Повторный контроль состояния генофонда оздоровленных популяций проведен по прошествии 12 лет — двух поколений (2017–2019 гг.). При этом одна из четырех обогащенных популяций (Ботанический сад) исчезла вследствие полного разрушения местообитания. Контроль выявил сохранение частот полосатых раковин и аллеля полосатости в обогащенных популяциях с 2005 г. (табл. 2). При этом в двух популяциях наблюдались достоверные отличия (по сравнению с 2003 г.) при $p < 0.001$, в одной — при $p < 0.05$. Необходимо отметить, что тенденция увеличения частоты ярко желтых раковин сохранилась и в обогащенных популяциях.

Таким образом, результаты эксперимента по обогащению генофонда популяций кустарниковой улитки подтвердили эффективность использования разработанного способа для восстановления их генетического разнообразия и жизнеспособности.

В заключение необходимо отметить, что фенетический признак наличия или отсутствия полосы на раковине с успехом был использован (для прак-

тических целей) для быстрой оценки состояния генофонда после проведенного оздоровления популяций на особо охраняемых территориях (ООПТ) г. Москвы [3, 5, 6]. Подобные фенетические признаки могут быть использованы и для других видов флоры или фауны при организации мероприятий по их сохранению на городских ООПТ. Однако несомненно, что более точную оценку дает использование кодоминантных генетических маркеров [8–10].

Длительный эксперимент по поддержанию жизнеспособности популяций был начат в рамках НИОКР Департамента природопользования и охраны окружающей среды г. Москвы в соответствии с целевой программой по восстановлению биоразнообразия Москвы по проекту “Восстановление генетического разнообразия исчезающих видов беспозвоночных животных на ООПТ города Москвы (на примере кустарниковой улитки), 2002–2003 гг.”.

Настоящее исследование (продолжение длительного эксперимента) проведено в рамках темы государственного задания, регистрационный № АААА-А16-116042010089-2 “Экология”. “Биосферные функции природных экосистем и рациональное природопользование”. Частично — в рамках темы государственного задания № 0112-2019-0001, а также по Программе обучения в аспирантуре, совместно реализуемой Московским государственным университетом им. М.В. Ломоносова и университетом МГУ—ППИ в Шеньчжэне, Китай.

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Конвенция устойчивого развития мира // Программа действий: повестка дня на 21 век и другие документы конференции в Рио-де-Жанейро. Женева: Центр “За наше общее будущее”, 1993. 70 с.
2. Wright S. Coefficient of inbreeding and relationship // Amer. Natur. 1922. V. 56. P. 330–339.
3. Макеева В.М. Эколого-генетические основы охраны животных антропогенных экосистем (на примере Москвы и Подмосковья) // Автореф. дис. докт. биол. наук. М.: МГУ им. Ломоносова, 2008. 47 с.
4. Макеева В.М., Белоконь М.М., Смуров А.В. Геноурбанонология как основа устойчивого сохранения биоразнообразия и экосистем в условиях глобальной урбанизации // Усп. соврем. биол. 2013. Т. 133. № 1. С. 19–34.
<https://doi.org/10.1134/S207908641304004>
5. Makeeva V.M., Smurov A.V., Politov D.V. et al. Technology for restoring and maintaining sustainability of populations: Practical and theoretical results of genourbanology // The Open Conf. Proc. J. 2015. V. 6. P. 1–9. DOI 102174/221028920150601001
6. Макеева В.М., Смуров А.В. Эколого-генетическая диагностика состояния и методы восстановления популяций животных городских особо охраняемых природных территорий (на примере модельных видов в городе Москве) // Науч. вестн. Белгородского ун-та. Серия “Естеств. науки”. 2011. Вып. 14. № 3(98). С. 104–110.
7. Макеева В.М., Смуров А.В. Патент № 2620079. Способ поддержания жизнеспособности популяций животных или растений на урбанизированных территориях. 2017.
8. Макеева В.М., Белоконь М.М., Малюченко О.П. Оценка состояния генофонда природных популяций беспозвоночных животных в условиях фрагментированного ландшафта Москвы и Подмосковья (на примере кустарниковой улитки, *Bradybaena fruticum* (Müll.)) // Генетика. 2005. Т. 41. № 11. С. 1495–1510.
9. Макеева В.М., Белоконь М.М., Малюченко О.П., Леонтьева О.А. Оценка состояния генофонда природных популяций позвоночных животных в условиях фрагментированного ландшафта Москвы и Подмосковья (на примере бурых лягушек) // Генетика. 2006. Т. 42. № 5. С. 628–642.
10. Макеева В.М., Смуров А.В., Политов Д.В. и др. Сравнительная оценка состояния генофонда и жизнеспособности лесопосадок из парков города Москвы и естественных популяций из Подмосковья на примере ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.) // Генетика. 2018. Т. 54. № 9. С. 1015–1025.
<https://doi.org/10.1134/S0016675818090096>
11. Красная книга города Москвы. М.: АБФ, 2001. 610 с.
12. Хохуткин И.М. О наследовании признака “опоясанности” в естественных популяциях наземного брюхоногого моллюска *Bradybaena fruticum* (Müll.) // Генетика. 1979. Т. 15. № 5. С. 868–871.
13. Макеева В.М. Популяционная структура кустарниковой улитки *Bradybaena fruticum* (Müll.) в условиях антропогенного ландшафта Подмосковья // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: МГУ им. Ломоносова, 1980. 24 с.
14. Макеева В.М. Эколого-генетический анализ структуры колоний кустарниковой улитки *Bradybaena fruticum* (Müll.) в условиях антропогенного ландшафта Подмосковья // Журн. общей биол. 1988. Т. 49. № 3. С. 333–342.
15. Макеева В.М. Роль естественного отбора в формировании генетического своеобразия популяций моллюсков (на примере кустарниковой улитки *Bradybaena fruticum* (Müll.)) // Журн. общей биологии. 1989. Т. 30. № 1. С. 101–107.
16. Макеева В.М., Пахорукова Л.В., Уголкина Н.Г. Анализ динамики полиморфных признаков в популяциях кустарниковой улитки, *Bradybaena fruticum* (Müll.), в целях экологического мониторинга // Журн. общей биол. 1995. Т. 56. № 5. С. 570–587.
17. Макеева В.М., Пахорукова Л.В. Роль естественного отбора в поддержании устойчивости генотипического состава природных популяций кустарниковой улитки *Bradybaena fruticum* (Müll.), Mollusca, Gastropoda по результатам экологического мониторинга // Журн. общей биологии. 2000. Т. 61. № 6. С. 638–661.
18. Рокицкий П.Я. Введение в статистическую генетику. Минск: Высш. школа, 1974. 447 с.
19. Зайцев Г.Н. Методика биометрических расчетов. М.: Наука, 1979. 255 с.
20. Крамаренко С.С., Крамаренко А.С. Пространственно-временная изменчивость фенетической структуры метапопуляции наземного моллюска *Helix albescens* Rossmassler, 1839 (Gastropoda: Pulmonata: Helicidae) // Науч. ведомости Белгородского ун-та. Серия “Естеств. науки”. 2009. № 11(66). С. 55–61.
21. Снегин Э.А. Временная динамика генетической структуры и эффективная численность популяций *Bradybaena fruticum* Müll. (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata) в условиях Юга Среднерусской возвышенности // Экология. 2015. № 3. С. 198–205.
<https://doi.org/10/7868/S0367059715020110>
22. Крамаренко С.С., Хохуткин И.М., Гребенников М.Е. Особенности фенетической структуры наземного моллюска *Sepae vindobonensis* (Pulmonata: Helicidae) в урбанизированных и природных популяциях // Экология. 2007. № 1. С. 42–48.
23. Макеева В.М., Матекин П.В. Физиологический эффект полиморфных признаков кустарниковой улитки *Bradybaena fruticum* (Müll.) // Журн. общей биол. 1994. Т. 55. № 3. С. 347–355.

The Results of a Long-Term Monitoring and Experiment to Enrich the Gene Pool of Populations of the Bush Snail *Bradybaena fruticum* (Müll.) in Urbanized Territories

V. M. Makeeva^{a, *}, I. D. Alazneli^a, A. V. Smurov^a,
D. V. Politov^b, Y. S. Belokon^b, and M. M. Belokon^b

^aMoscow State University, Moscow, 119991 Russia

^bVavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: vmmakeeva@yandex.ru

The results of a long-term monitoring of the dynamics of phenetic features in ten populations of the bush snail *Bradybaena fruticum* (Müll.) in Moscow region and Moscow parks have revealed that the frequency of the allele of striped shells remained unchanged in large natural populations while there was a shift in the frequencies of this allele in small urbanized isolates. Simultaneously, in a series of generations a tendency for the frequency of yellow shells to increase has been revealed, that can be accounted for by the ongoing lightening of the habitats (decreasing the shade density) and confirms the adaptability of the feature of shell color. The long-term experiment to maintain the viability of four urban populations of the bush snail *Bradybaena fruticum* (Müll.), started with enriching their gene pool in 2003 and finished with monitoring in 2005, has revealed a shift in the frequencies of the allele of striped shells. Further control of the condition of the gene pool of the rehabilitated populations (2017–2019) has revealed the constancy of the frequency of this feature since 2005 within two generations of snails, including two populations where $p > 0.01$, and one where $p > 0.05$. Thus, the monitoring of the results of the experiment to enrich the gene pool of populations confirms that the patented method for maintaining population viability proves effective for restoration of the genetic diversity and viability of animal populations.

Keywords: population, allele, phenetic features, monitoring, urbanized landscape.