

СОДЕРЖАНИЕ

Том 57, номер 2, 2021

Обзорные и теоретические статьи

- Разнообразие и фенотипический эффект аллельных вариантов генов короткостебельности *Rht* у пшениц
И. С. Сухих, В. Ю. Вавилова, А. Г. Блинов, Н. П. Гончаров 127
- Геномогенез микроба чумы *Yersinia pestis* как процесс мозаичной эволюции
В. В. Сунцов 140
-

Генетика микроорганизмов

- Фосфатаза Pph3 вовлечена в регуляцию безошибочной ветви пострепликативной репарации в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*
Д. В. Федоров, Т. А. Евстюхина, В. Т. Пешехонов, В. Г. Королев 155
- Особенности quorum sensing системы SprIR *Serratia proteamaculans* 94 и ее участие в регуляции клеточных процессов
Ю. В. Зайцева, В. А. Липасова, О. А. Кокшарова, В. А. Плюта, И. В. Демидюк, Л. С. Чернин, И. А. Хмель 165
-

Генетика растений

- Анализ сцепления генов, контролирующих качественные признаки растений ячменя на хромосоме 6
В. П. Нецветаев 179
- Эколого-фитоценологическая дифференциация, генетическая изменчивость и структура природных популяций реликтового вида аквафлоры *Isoetes lacustris* L. в Беларуси
А. Б. Власова, А. Н. Юхимук, М. А. Джус, М. С. Тухфатуллина, Б. П. Власов 185
- Анализ полиморфизма генома D синтетической пшеницы, полученной на основе *Ae. tauschii* L.
И. В. Потоцкая, В. П. Шаманин, С. С. Шепелев, М. Бхатта, А. И. Моргунов 196
-

Генетика животных

- Генетическая структура популяции голштиinizированного черно-пестрого скота по микросателлитным локусам
О. С. Шаталина, И. В. Ткаченко, А. А. Ярышкин 205
-

Генетика человека

- Анализ транскриптов генов протаминов 1 и 2 типов и фрагментация ДНК в сперматозоидах у пациентов клиник ВРТ
М. А. Ищук, О. В. Малышева, Е. М. Комарова, И. Д. Мекина, Е. А. Лесик, А. М. Гзгзян, И. Ю. Коган, В. С. Баранов 214
- Влияние полиморфизма INDEL лейкоцитарного антигена человека G (*HLA-G*) и сезона рождения на риск развития шизофрении и ее клинические особенности
Г. И. Коровайцева, М. В. Габаева, И. В. Олейчик, В. Е. Голимбет 223
-

Математические модели и методы

Математическое моделирование отбора по ограниченному полом признаку:
к вопросу о существовании полиморфизма по размеру помета
в естественных популяциях песцов

О. Л. Жданова, Е. Я. Фрисман

229

Краткие сообщения

Новая делеция мтДНК мыши линии BALB/c

В. Н. Антипова

241

Contents

Vol. 57, No. 2, 2021

Reviews and Theoretical Articles

Diversity and Phenotypical Effect of the Allele Variants of Dwarfing *Rht* Genes in Wheat

I. S. Sukhikh, V. J. Vavilova, A. G. Blinov, and N. P. Goncharov

127

Genomogenesis of the Plague Microbe *Yersinia pestis* as Related to the Process of Mosaic Evolution

V. V. Suntsov

140

Genetics of Microorganisms

Pph3 Phosphatase Is Involved in the Regulation of the Error-Free Branch of Postreplicative DNA Repair in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*

D. V. Fedorov, T. A. Evstyukhina, V. T. Peshekhonov, and V. G. Korolev

155

Features of the SprlR Quorum Sensing System of *Serratia proteamaculans* 94 and Its Participation in the Regulation of Cellular Processes

Yu. V. Zaitseva, V. A. Lipasova, O. A. Koksharova, V. A. Plyuta, I. V. Demidyuk, L. S. Chernin, and I. A. Khmel

165

Plant Genetics

Linkage Analysis of Genes Controlling the Qualitative Characteristics of Barley Plants in Chromosoma 6

V. P. Netsvetaev

179

Ecological and Phytocenotic Differentiation, Genetic Variability and Structure of Natural Populations of the Relict Species of Aquatic Flora *Isoetes lacustris* L. in Belarus

N. B. Vlasava, A. N. Yukhimuk, M. A. Dzhus, M. S. Tukhfatullina, and B. P. Vlasov

185

Analysis of the Genome D Polymorphism of Synthetic Wheat Obtained on the Basis of *Ae. tauschii* L.

I. V. Pototskaya, V. P. Shamanin, S. S. Shepelev, M. Bhatta, and A. I. Morgounov

196

Animal Genetics

Genetic Structure of the Population of Holstein Black-and-White Cattle by Microsatellite Loci

O. S. Shatalina, I. V. Tkachenko, and A. A. Yaryshkin

205

Human Genetics

Protamine 1 and 2 mRNAs Abundance in Human Spermatozoa and Its Relation to Semen Quality and Sperm DNA Fragmentation among Fertility Clinic Patients

M. A. Ishchuk, O. V. Malysheva, E. M. Komarova, I. D. Mekina, E. A. Lesik, A. M. Gzgyan, I. Yu. Kogan, and V. S. Baranov

214

The Effect of INDEL Polymorphism of the Human Leukocyte Antigen G (*HLA-G*) and the Season of Birth on the Risk of Schizophrenia and Its Clinical Features

G. I. Korovaitseva, M. V. Gabaeva, I. V. Oleichik, and V. E. Golimbet

223

Mathematical Models and Methods

Mathematical Modeling of Selection by Sex-Limited Trait: To the Question of Maintaining a Polymorphism by Litter Size in Natural Populations of Arctic Foxes

O. L. Zhdanova and E. Ya. Frisman

229

Short Communications

A New Deletion of Mitochondrial DNA of a BALB/c mouse

V. N. Antipova

241

РАЗНООБРАЗИЕ И ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ КОРОТКОСТЕБЕЛЬНОСТИ *Rht* У ПШЕНИЦ

© 2021 г. И. С. Сухих¹, *, В. Ю. Вавилова¹, А. Г. Блинов¹, Н. П. Гончаров¹

¹Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: igor3419@gmail.com

Поступила в редакцию 27.03.2020 г.

После доработки 18.05.2020 г.

Принята к публикации 17.06.2020 г.

Обзор посвящен описанию аллельных вариантов генов *Rht* и их влияния на признаки, связанные с ростом, развитием и урожайностью растений пшеницы. Рассмотрено влияние генов *Rht* на рост и развитие растений пшеницы через посредство DELLA-белков. Предлагается новая классификация растений пшеницы по высоте (длине стебля), основанная на наличии/отсутствии в их генотипах конкретных аллелей генов *Rht*, определяемых молекулярно-генетическими методами.

Ключевые слова: зеленая революция, короткостебельность, генетический контроль, гены *Rht*, DELLA-белки.

DOI: 10.31857/S0016675821020107

В 1950–1960 гг. в мировом аграрном секторе произошла “зеленая революция”, обусловившая значительное увеличение валового сбора зерна мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в развивающихся странах (Мексика, Колумбия, Индия, Пакистан и ряд других стран Южной и Юго-Восточной Азии). Для увеличения урожайности селекционерами были успешно использованы растения пшеницы, нечувствительные к длине дня (фотопериоду), устойчивые к полеганию и обладающие высокой продуктивностью, обусловленной отзывчивостью интенсивных сортов пшеницы на высокие дозы минеральных удобрений [1–6]. Считается, что широкое использование в сельскохозяйственном производстве короткостебельных растений мягкой пшеницы являлось ключевым моментом успеха всех программ селекции пшениц в ходе “зеленой революции” и обуславливало повсеместное увеличение урожайности [7], связанное в первую очередь с устойчивостью растений новых сортов к полеганию (tolerance to lodging) при использовании высоких доз минеральных удобрений [8]. В свою очередь, в таком повышении устойчивости пшеницы к полеганию за счет короткостебельности главенствующую роль сыграли гены *Rht* (от англ. reduced height), контролирующие выраженность признака “высота растения” [9]. Мутантные аллели этих генов обуславливают существенное уменьшение высоты растения за счет укорочения длины их стебля. Это позволяет растению удерживать более тяжелый колос и не

полегать, несмотря на то что механическая устойчивость стебля короткостебельных сортов пшеницы не выше, чем у обычных (~100–120 см) и даже высокорослых (~120–140 см) сортов [10]. При полегании растений резко снижается эффективность механизированной уборки; более того, качество зерна падает из-за повышенной влажности, так как колос полеглих растений оказывается покрыт другими растениями или лежит на влажной почве. При интенсивных технологиях возделывания существенное увеличение урожайности дают растения только с полукарликовыми короткостебельным фенотипами [11]. Такие растения характеризуются уменьшением длины стебля соответственно на 24–30 и 40–50% от нормы (стандарта), в то время как значительно менее урожайные карликовые – на 50–60% (рис. 1). Для описания фенотипов растений пшеницы по признаку “высота растения (длина стебля)” мы сочли целесообразным подвести под “гибридную” классификацию, основанную на работах S. Vorojevic [12] и М.М. Якубцинера с соавт. [13] и сложившуюся к настоящему времени в русскоязычной традиции перевода английских терминов, касающихся фенотипов [14], молекулярно-генетическую основу (см. рис. 1). При этом предпочтению отдано первому автору (S. Vorojevic [12]). Мы приняли перевод “stunted” как “малорослые”, “dwarf” – как “карлики”, “semidwarf” – как “полукарлики”, “short straw” – короткостебельные, “middle straw” – как среднерослые, “tall

straw” – как длинностебельные (высокорослые). В англоязычной литературе отсутствует термин “extreme tall straw”, так как такие сорта встречаются только в стародавнем сортименте России и Польши [13] и не представлены в западных публикациях. Несмотря на несовершенство и противоречивость классификаций сортообразцов пшеницы S. Vогоевич [12] и М.М. Якубцинера с сотр. [13] по высоте растений, к настоящему времени ничего лучше не предложено. В классификацию нами внесено еще одно новшество: нами дополнительно разделены полукарлики и короткостебельные растения на два класса – соответственно полукарлики 1 и полукарлики 2, а также короткостебельные 1 и короткостебельные 2, в соответствии с наличием у них генов *Rht* или их аллелей. Мы учли ранее высказанную критику этих классификаций [9, 15]. Неоднократно отмечалась зависимость выраженности признака “высота растений” от условий внешней среды [9, 15, 16] и, как следствие, условность деления сортообразцов пшеницы на классы [9, 15]. В случае использования не маркерных сортов (стандартов), а информации о конкретных аллелях мутантных генов *Rht* (см. рис. 1), т.е. стабильных при любых внешних условиях ДНК-маркеров, такая классификация становится на надежную основу и перестает быть подверженной модифицирующему действию окружающей среды.

ПРОИСХОЖДЕНИЕ МУТАНТНЫХ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНОВ *Rht*

Неудивительно, что после первых успешных экспериментов по возделыванию короткостебельных сортов пшениц исследователи со всего мира занялись поиском генов, приводящих к уменьшению высоты растений за счет уменьшения длины их стебля, и изучением механизмов действия таких генов. Всего на сегодняшний день описано 19 генов *Rht*, в том числе семь мутантных аллелей гена *Rht-1*, а также ряд аллелей гена *Rht8* (табл. 1), всестороннее изучение которых позволило в значительной степени расширить генофонд короткостебельных пшениц для использования в селекционных программах как мягкой [17], так и твердой пшениц [15]. Первыми из генов, влияющих на выраженность признака “длина стебля” у пшеницы, были описаны гены *Rht-1* (табл. 1), изначально обозначенные как *Sd1* и *Sd2* [18]. Символика *Sd1* и *Sd2* была признана неудачной и R.A. McIntosh заменил ее на более удачную с его точки зрения, *Rht* [19]. Показано, что мутантные аллели данных генов, обуславливающие разную выраженность признаков “карликовость” и “короткостебельность” у пшеницы, широко использовались [17] и до сих пор используются в селекционных программах по всему миру. Мутантные аллели генов-гомологов *Rht-1* выявлены

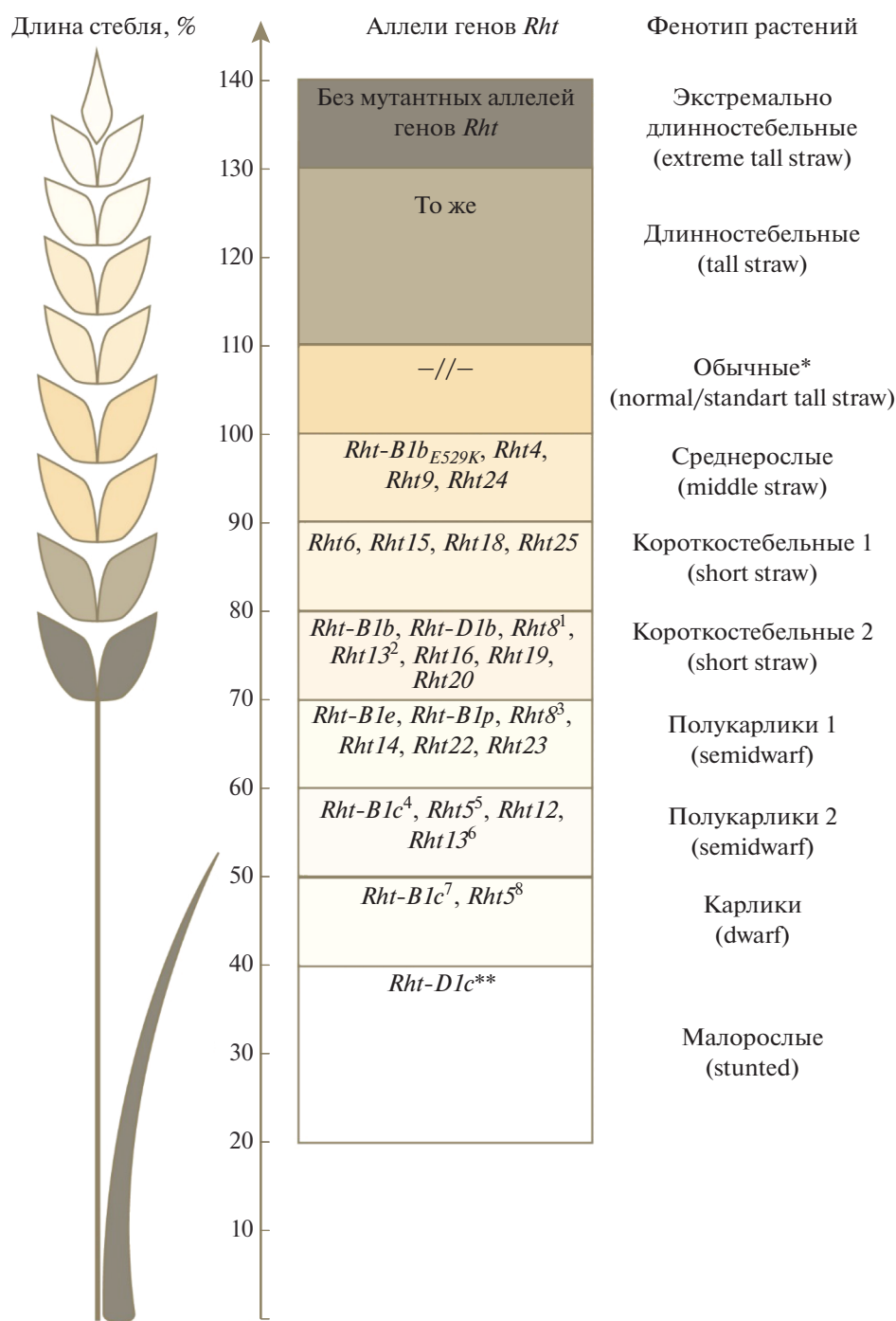
только в геномах В и D полиплоидных пшениц. Эти аллели, приводящие к укорочению длины стебля, были идентифицированы более чем у 70% “карликовых” (в отечественной литературе “короткостебельных”) сортов пшеницы в мире [20]. При этом аллельные варианты *Rht-B1b* и *Rht-D1b* были выявлены у изученных сортов в 90% случаев [21]. Оба мутантных аллеля происходят от полукарликового японского сорта мягкой пшеницы Norin 10. В Международном центре по улучшению пшеницы и кукурузы (СИММИТ, Мексика) при селекции на короткостебельность был использован его низкорослый гибрид с высокорослым сортом Brevor (линия Norin 10-Brevor 14, =синоним Sel. 14 (CI 13253)) [22].

*Интерпретация молекулярными биологами понятий “доминантности”/“рецессивности” генов *Rht**

“Доминантность” и “рецессивность” – очень важные характеристики генов. Они важны как при изучении характера наследования признаков, так и в селекционных работах для планирования схем скрещивания и выбора стратегии отбора. В мировой литературе и в “Каталоге символов генов пшеницы” [19] сложилась необъяснимая традиция обозначать рецессивные гены *rht1* и *rht2* символами доминантных генов *Rht1* и *Rht2*. В последних изданиях “Каталога...”, выпускаемых при активном участии молекулярных биологов, данные гены приводятся как аллели генов-ортологов (гомологов) *Rht-1* [23]. Доминантные аллели получили, наконец, адекватные символы *Rht-B1a* и *Rht-D1a*, но при этом аллели *Rht-B1b* и *Rht-D1b*, несмотря на то что они обозначены как доминантные (с заглавной буквы), описаны авторами “Каталога...” как рецессивные. Однако и в этом случае мутантный полудоминантный ген *Rht3* получил символ *Rht-B1c*, т.е. рецессивного аллеля. Информация о типе наследования признака “короткостебельность” (доминантности/рецессивности генов) дана в табл. 1. В “Каталоге...” также сложилась неопределенная ситуация и с доминантностью–рецессивностью аллелей гена *Rht8*. Если в молекулярной биологии понятие “аллели” – это варианты неких последовательностей генов, то для генетики и селекции необходима конкретная информация об аллельных вариантах генов и, что не менее важно, о межаллельном взаимодействии. Информация о доминантности/рецессивности других генов, например *Ppd* [24] или ген *Q* [25], в “Каталоге...” также представлена неудовлетворительно.

*Источники мутантных генов *Rht**

Естественные (природные) мутации, обуславливающие укорочение длины стебля у пшеницы, за исключением аллелей *Rht-B1b*, *Rht-D1b*, *Rht4* и



* – в понятии “зеленой революции”

** – в сочетании с другими аллелями генов *Rht*

Рис. 1. Схема влияния мутантных аллелей *Rht*-генов на выраженность признака “длина стебля” пшениц по сравнению с обычной длиной (усредненные данные). Нормальная длина (standard) принята за 100%. Цифрами над генами обозначены источники литературы, в которых для представленных на рисунке мутантных аллелей генов *Rht* указана различная длина стебля. ^{1, 2, 5, 6, 8} – [78, 94, 96]; ³ – [97]; ⁴ – [52]; ⁷ – [77].

Rht8, описаны крайне редко. Например, доминантный ген *Rht24* был обнаружен среди рекомбинантов в инбредных линиях, полученных от скрещивания линий Jingdong 8 и Aikang 58 [26]. В

популяции рекомбинантных инбредных линий, полученных от скрещивания двух короткостебельных форм UC1110 (генотип *Rht-D1b*) и PI 610750 (генотип *Rht-B1b*), недавно был выявлен

Таблица 1. Список генов *Rht* и их доноров

Ген/аллель	Тип наследования	Локализация в хромосоме	Донор	Источник литературы
<i>rht-B1/Rht-B1b (Rht1)</i>	Рецессивный	4BS	Norin 10	[40, 54, 92]
<i>Rht-B1/Rht-B1c (Rht3)</i>	Полудоминантный	4BS	Tom Thumb	[54, 76]
<i>rht-B1/Rht-B1e (Rht11)</i>	Рецессивный	4BS	Karlik 1	[54, 79]
<i>rht-B1/Rht-B1p (Rht17)</i>	»	4BS	Chris M1	[33, 54]
<i>rht-B1/Rht-B1b_{E529K}</i>	»	4BS	Kronos	[27]
<i>rht-D1/Rht-D1b (Rht2)</i>	»	4DS	Norin 10	[54, 92]
<i>Rht-D1/Rht-D1c (Rht10)</i>	Доминантный	4DS	Ai-Bian	[54, 93]
<i>Rht4</i>	»	2BL	Burt M937	[54, 94]
<i>Rht5</i>	»	3BS	Marfed M1	[54, 94]
<i>Rht6</i>	»	Нет данных	Magnif 41	[54, 78]
<i>Rht7</i>	»	2AS	BerséeMult	[54, 79]
<i>Rht8/Rht8a (WMS261-165)*</i>	?	2DS	Mara, Sava	[54, 94]
<i>Rht8/Rht8b (WMS261-174)</i>	?	2DS	Odom	[88]
<i>Rht8/Rht8c (WMS261-192)</i>	Доминантный	2DS	Краснодарский карлик	[87]
<i>Rht9*</i>	»	7BL	Mara	[54, 95]
<i>Rht12</i>	»	5AL	Karcagi 522M7K	[54, 94]
<i>Rht13</i>	»	7BS	Magnifi 41M1	[54, 64, 96]
<i>Rht14</i>	»	Нет данных	Castelporziano	[54, 78]
<i>Rht15</i>	»	»	Durox	[54, 77]
<i>Rht16</i>	»	»	Edmore M1	[54, 78]
<i>Rht18</i>	»	6A	Icaro	[54, 90]
<i>Rht19</i>	»	Нет данных	Vic M1	[54, 78]
<i>Rht20</i>	»	»	Burt M860	[54, 78]
<i>Rht22</i>	»	7AS	Aiganfanmai	[89]
<i>Rht23</i>	»	5DL	Sumai 3	[91]
<i>Rht24</i>	»	6AL	Aikang 58 × Jingdong 8	[26]
<i>Rht25</i>	»	6AS	UC1110 × PI610750	[28]

* Ранее обозначенные Э.Б. Алиевым [47] теми же символами гены *Rht8* и *Rht9* и локализованные автором в хромосомах 2B и 2D сортов Sharbati Sonoga и Скороспелка 35 не идентифицированы. Возможно, снижение высоты у этих сортов – результат плейотропного эффекта доминантных генов *Ppd2* и *Ppd1*, контролирующих в них нечувствительность к длине дня [9]. Также до сих пор не идентифицированы гены у мутантов сорта Мироновская 808, полученных Л.А. Писаревой [48], названных Карлик, Полукарлик и Л-39.

доминантный ген *Rht25* [27]. Мутантный аллель *Rht25b*, вызывающий короткостебельность (*semi-dwarf*), по-видимому, происходит от родителя-синтетика, у которого либо сорт твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.) Срос 1, либо образец дикого вида *Aegilops tauschii* Coss. (syn. *Ae. squarrosa* L.) был источником нового аллеля гена, детерминирующего короткостебельный фенотип [28]. Стоит отметить, что образцы донора генома D полиплоидных пшениц *Aegilops tauschii* могут оказаться перспективными источниками новых генов *Rht* [29].

В 1970-е гг. посредством использования методов мутагенеза удалось получить значительное число новых эффективных аллелей генов *Rht*. А именно гены *Rht12*, *Rht14* и *Rht18* были выделены

из потомств гибридов Ningchun 45, Karcagi 12 и селекционных линий Castelporziano (PI347731) и Icaro (PI503555), происходящих из радиационных мутантов сортов Karcagi, Capelli и Anhinga, полученных в результате обработки их зерен гамма-лучами, медленными или быстрыми нейтронами соответственно [30–32]. Химический мутагенез, а именно использование этилметансульфоната (EMS) и метилнитромочевины (MNM), был применен для обработки зерен сортов Marfed, Chris и Edmore. В результате были выделены мутантные короткостебельные формы Marfed M, Mutant Chris (MN6616M) и Edmore M1 (PI499362), у которых были обнаружены новые гены и аллели генов *Rht*, а именно *Rht5*, *Rht16*, *Rht-B1e* и *Rht-B1p*, обуславливающие

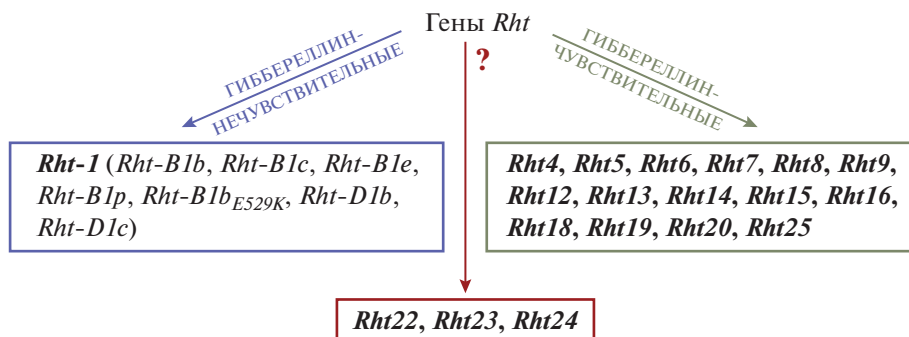


Рис. 2. Распределение генов *Rht* на чувствительные, нечувствительные к гиббереллину, а также с неопределенным характером реакции (?).

уменьшение длины стебля [30, 33, 34]. В еще одном эксперименте мутантные растения пшеницы с различной степенью выраженности признака “длина стебля” (всего 366 мутантов) были получены как химическим (в результате обработки EMS), так и радиационным (гамма-облучение) мутагенезом при обработке зерен китайского сорта мягкой пшеницы Jing 411. В поколении M_6 этого мутанта были выделены перспективные низкорослые (короткостебельные) линии [35], но их генетический анализ для идентификации мутантных генов и их аллелей авторы не проводили.

В настоящее время различные мутантные гены *Rht* активно изучаются с целью увеличения урожайности сортов мягкой пшеницы [36–46]. Ряд таких генов до сих пор не идентифицирован [47, 48].

ВАРИАНТЫ ГЕНОВ *Rht*

Все гены *Rht* можно условно разделить на две группы: чувствительные к гиббереллиновой кислоте (ГК₃) и нечувствительные к ней. ГК₃ является гормоном растений, влияющим на многочисленные процессы их вегетативного и генеративного развития, в том числе на прорастание зерновок и удлинение стебля [49].

Гены *Rht*, нечувствительные к гиббереллину

Все мутантные аллели гена *Rht-1* являются нечувствительными к экзогенному гиббереллину, тогда как почти все остальные мутантные аллели других генов *Rht*, описанные к данному моменту времени, являются чувствительными к нему (рис. 1, 2). Кроме того, разные аллели гена *Rht-1* приводят к неодинаковому уменьшению длины стебля. Так, наиболее широко используемые в селекции аллели гена *Rht-1* (*Rht-B1b* и *Rht-D1b*) обуславливают короткостебельный фенотип по нашей классификации (рис. 1). Тогда как аллель *Rht-B1c* обуславливает более выраженное снижение длины стебля растения, давая карликовый фенотип (рис. 1).

Объединение в одном растении аллелей *Rht-B1b* и *Rht-D1b* является нежелательным, поскольку приводит к образованию излишне выраженного низкорослого фенотипа и вследствие этого обуславливает низкую зерновую продуктивность таких растений [3]. Наличие же у растений пшеницы только одного из двух аллелей *Rht-B1b* или *Rht-D1b* в значительной степени увеличивало их продуктивность [50]. По этой же причине аллели, приводящие к карликовому фенотипу, такие как *Rht-B1c* и *Rht-D1c*, не используются в селекции культуры [51, 52]. Более того, в условиях засухи для низкорослых (короткостебельных) растений пшеницы с аллельными вариантами *Rht-B1b* или *Rht-D1b* было установлено достоверное снижение как числа зерен в колосе, так и массы 1000 зерен и, следовательно, общее снижение урожая по сравнению с высокорослыми сортами с аллелями *Rht-B1a* и *Rht-D1a* [53]. В ряде исследований было показано, что аллели *Rht-B1b* или *Rht-D1b* вызывают не только укорочение длины стебля, но и уменьшение длины coleoptily и корней, что в конечном счете приводит к снижению эффективности использования воды из почвы и устойчивости к засухе [53–57].

Молекулярные механизмы гиббереллин-зависимого роста растения пшеницы

Влияние мутантных генов *Rht-1* на высоту растения (длину стебля) пшеницы опосредуется тем, что они кодируют DELLA-белки, которые являются основными регуляторами сигнального пути ГК₃ и супрессорами роста растений. Данные белки входят в состав семейства транскрипционных регуляторов GRAS и содержат в своей последовательности два отдельных домена: N-концевой регуляторный домен, который служит для распознавания и связывания ГК₃, и C-концевой функциональный домен GRAS [58].

Различные участки домена GRAS DELLA-белков могут связываться с ДНК-связывающими до-

менами некоторых транскрипционных факторов, блокируя их функцию. Более того, DELLA-белки влияют на рост и развитие растений путем связывания с другими белками, не являющимися транскрипционными факторами, контролируя и изменяя их функции в клетке. Однако DELLA-белки не всегда действуют в качестве супрессоров роста: было показано, что они оказывают позитивное действие на высоту растения при неблагоприятных условиях, например таких как холод [59], засоленность почвы [60, 61] и деэтиолирование [62–64]. Таким образом, DELLA-белки способствуют адаптации растений к неблагоприятным условиям окружающей среды, осуществляя баланс между ростом и ответом на стресс в неблагоприятных условиях.

Наличие большого количества DELLA-белков в клетках растения уменьшает длину стебля за счет замедления роста растений путем связывания с транскрипционными факторами и другими компонентами сигнального пути ГК₃ [58, 65–67]. Процесс дегградации DELLA-белков с помощью ГК₃, в результате которого уменьшается их влияние на увеличение длины стебля, подробно описан для резуховидки Таля (*Arabidops isthaliana* (L.) Heynh.) [68, 69]. Однако было высказано предположение, что аналогичный механизм присутствует и у других видов цветковых растений [69]. У *Arabidopsis thaliana* ГК₃ узнается и связывается рецепторным белком GID1, в результате чего его N-концевой район изменяет конфигурацию и закрепляет ГК₃ в молекуле белка GID1 [70]. Таким образом, образуется комплекс GA–GID1, который впоследствии связывается с DELLA-белком с помощью мотива TVHYNP, образуя комплекс GA–GID1–DELLA [70]. В свою очередь GA–GID1–DELLA увеличивает способность DELLA распознаваться белками F-box (SLY1 в случае с *Arabidopsis*), которые отвечают за образование SCF (SKP1, CULLIN, F-box) E3 убиквитин-лигазного комплекса, его убиквитинацию и далее дегградацию DELLA в протеасоме 26S [71] (рис. 3). Таким образом, ГК₃ способствует уменьшению количества DELLA-белков в клетке и соответственно уменьшению их негативного влияния на рост растения [68, 72].

Было показано, что мутантные аллели гена *Rht-1* снижают чувствительность растения к ГК₃, так как эти мутации уменьшают способность DELLA-белков связываться с комплексом GA–GID1 [28, 51, 73]. Таким образом, обработка растения экзогенной ГК₃ не вызывает у них увеличения длины стебля [22]. Наличие у растений данных аллелей гена *Rht-1* можно выявить по отсутствию их ответа на обработку экзогенной ГК₃ [53]. Однако данный способ не позволяет выявить различия между аллельными вариантами *Rht-B1b* и *Rht-D1b*, так как они оба дают схожий фенотип при обработке

экзогенной ГК₃. В этом случае для определения конкретного аллельного варианта гена *Rht-1* используются методы молекулярной биологии [74].

Аллели Rht-B1b и Rht-D1b. Мутации *Rht-B1b* и *Rht-D1b* приводят к образованию преждевременных стоп-кодонов [51, 73] (рис. 4). Оба данных мутантных варианта аллелей обуславливают сопоставимый эффект уменьшения длины стебля: примерно на 24% по сравнению с его нормальной длиной (табл. 1, рис. 1), что хорошо объясняется схожим механизмом действия мутации. Так как аллели *Rht-B1b* и *Rht-D1b* образуют активные продукты, то в обоих случаях мутантный фенотип может образовываться двумя путями. Первый вариант: мутантный фенотип опосредован коротким N-концевым пептидом, который образуется в результате альтернативного стоп-кодона. DELLA-домен данного укороченного N-концевого пептида гипотетически может связываться с GID1 и таким образом подавлять сигнал ГК₃ [73]. При втором варианте возможна реинициация трансляции после стоп-кодона, что приводит к образованию укороченного с N-конца продукта (C-концевой пептид). Данный продукт не может связываться с рецептором GID1, таким образом препятствуя дегградации DELLA-белков и подавляя ГК-зависимый рост и развитие. Реинициация трансляции возможна в случае, если рибосома продолжит сканирование цепи после стоп-кодона и обнаружит метионин [51]. У аллелей *Rht-B1b* и *Rht-D1b* после мутантных стоп-кодонов следуют несколько метионинов, что согласуется с гипотезой реинициации трансляции. Второй вариант подтверждается фактом, что аналогичный аллель гена короткостебельности кукурузы *D8-Mpl* также кодирует продукт, укороченный с N-конца [73]. В целом вторая гипотеза имеет большее число подтверждений, чем первая [51, 73, 75]. Таким образом, вероятнее всего аллели *Rht-B1b* и *Rht-D1b* гена *Rht-1* пшеницы, как и аллель гена *D8-Mpl* кукурузы, кодируют белок, у которого отсутствует C-концевая последовательность.

Аллель Rht-B1c. У аллеля *Rht-B1c*, обуславливающего сильное уменьшение длины стебля (рис. 1), обнаружено нарушение на N-концевом кодирующем участке [51]. Предполагается, что белковый продукт данного мутантного аллеля, не связывается с ГК₃. Мутацией является участок размером 2026 пн, встроенный в GA–GID1 связывающий домен, а не замена нуклеотида, приводящая к образованию нового стоп-кодона. Большая часть данной инсерции удаляется в результате сплайсинга, что приводит к образованию дополнительной 30-аминокислотной последовательности (рис. 4) [51, 76]. Растения с аллелем *Rht-B1b* или *Rht-D1b* имеют более длинный стебель, чем растения с аллелем *Rht-B1c*, так как имеющаяся у него инсерция в DELLA-домен нарушает его

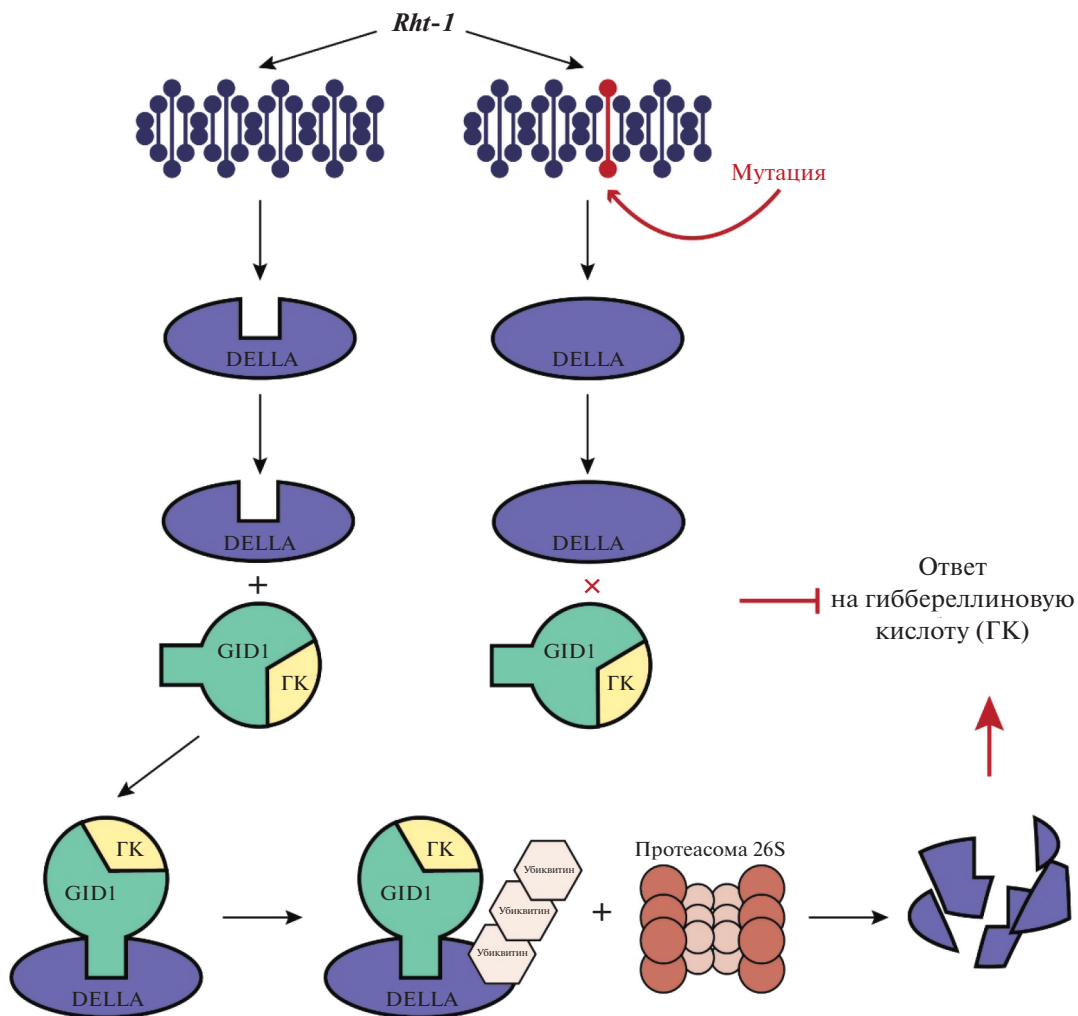


Рис. 3. Схема деградации DELLA-белков. Мутантные аллели гена *Rht-1* кодируют дефектный белок DELLA, что приводит к нарушению его связывания с комплексом GA–GID1 [68, 69].

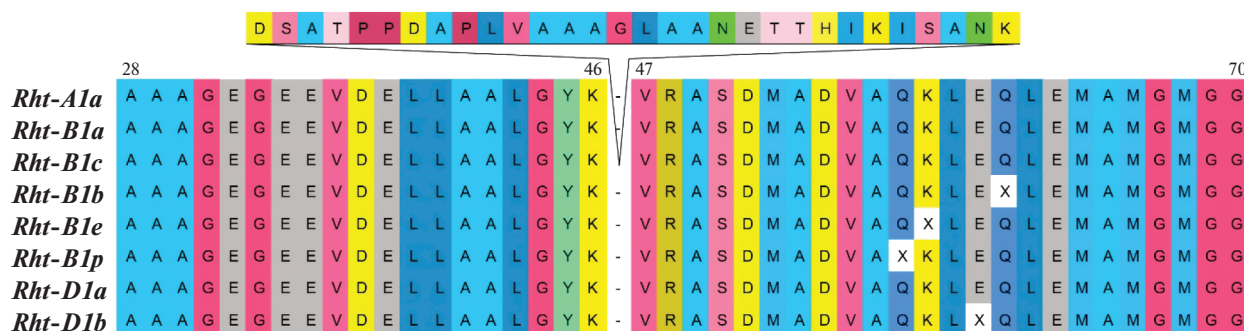


Рис. 4. Выравнивание аминокислотных последовательностей различных аллельных вариантов генов *Rht-B1* и *Rht-D1*. “-” – вставка размером в 30 аминокислот в аллельном варианте *Rht-B1c*. “X” – преждевременный стоп-кодон. Числами над выравниванием показаны позиции аминокислот согласно последовательности аллельного варианта *Rht-Ala* JF930277.

связь с GA–GID1 комплексом [52], что является основой сигнального пути ГК₃. Наличие аллеля *Rht-B1c* вызывает уменьшение длины стебля, сопоставимое с таковым у мутантного растения, имеющего два мутантных аллеля *Rht-B1b* и *Rht-D1b* одновременно (~60%), а растения с двумя аллелями одновременно *Rht-B1c* и *Rht-D1b* формируют самый короткий стебель – более 70% уменьшения его длины по сравнению с нормальным фенотипом.

Аллели *Rht-B1e* и *Rht-B1p*. Изначально в работе С.Ф. Konzak [77] были описаны два гена *Rht11* и *Rht17*. В работах М.Н. Ellis с соавт. [74, 78] данные гены были определены как ГК-нечувствительные, что показало их сходство с геном *Rht-1*. Однако в работах М. Баженова и М.Г. Дивашука была установлена идентичность аллелей *Rht-B1e*, *Rht-B1p* гена *Rht-1* и генов *Rht11*, *Rht17* соответственно [33, 79]. Таким образом, было показано, что *Rht11* и *Rht17* являются не самостоятельными генами, а аллелями гена *Rht-1*. Мутации *Rht-B1p* и *Rht-B1e* гена *Rht-1* вызваны заменами в нуклеотидных позициях, находящимися по соседству с нуклеотидной позицией мутации *Rht-B1b* (рис. 4). Эти мутации приводят к образованию стоп-кодонов. Данный факт позволяет предположить, что изменение длины стебля при наличии мутаций *Rht-B1p* и *Rht-B1e* происходит схожим образом с мутацией *Rht-B1b*. В то же время растения как с аллелем *Rht-B1e*, так и с аллелем *Rht-B1p* имеют несколько меньшую длину стебля, чем растения с аллелем *Rht-B1b* (табл. 1) [51, 79]. Такое отличие в экспрессии аллелей может быть объяснено разным уровнем эффективности реинициации трансляции, в результате чего образуются разные концентрации белков, снижающих длину стебля [33, 79].

Стоит отметить, что *Rht11* и *Rht17* – не единственные случаи неверного определения новых генов. Ранее описанный ген *Rht21*, согласно А. Börner и А.А. Worland [80], также является аллелем гена *Rht-1*.

Чувствительные к гиббереллину гены *Rht*

В настоящее время у пшеницы, кроме гена *Rht-1*, описаны еще 18 генов *Rht* (табл. 1). Наиболее хорошо изученными из них являются гены *Rht4* и *Rht8*, которые уменьшают высоту растений в среднем на 12 и 16 см соответственно (рис. 1). При этом длина coleoptилей и число зерен в колосе у них остаются неизменными [56, 81, 82]. Кроме того, для растений с мутантными аллелями гена *Rht8* характерно наличие более крупных зерен и достоверное увеличение массы 1000 зерен [83, 84]. Растения пшеницы с геном *Rht4* дают более высокий урожай зерна только в сочетании с аллелем *Rht-B1b*. При этом преимущества данного аллеля отмечены в различных условиях – как при достаточном, так и при недостаточном уровне увлажнения [85]. Среди российских и украин-

ских короткостебельных сортов наибольшее распространение получили аллели гена *Rht8*. На настоящий момент описано 14 аллелей гена *Rht8* [86]. Данный ген тесно связан с локусом WMS261, что позволяет проводить его молекулярный анализ и различать аллели *Rht8* по длине последовательностей. Наиболее часто встречаются аллели длиной 165, 174 и 192 пн, обозначаемые *Rht8a* (WMS261-165), *Rht8b* (WMS261-174) и *Rht8c* (WMS261-192) соответственно (табл. 1) [81, 86, 87]. Однако среди этих трех аллелей только аллель *Rht8c* уменьшает длину стебля (в среднем на 14%). Тогда как аллель *Rht8b* не вызывает изменения длины стебля, а аллель *Rht8a*, наоборот, увеличивает его длину на 5% [86, 87]. Аллели гена *Rht8* часто используются вместе с аллелями гена *Rht-1*, так как ген *Rht8* сам по себе не вызывает уменьшения длины стебля, достаточного для формирования устойчивости растений пшеницы к полеганию [81, 88].

Стоит отметить, что некоторые *Rht*-гены негативно влияют на урожайность [84]. Однако их негативное влияние можно нейтрализовать, используя аллели других генов, отвечающих за признаки, на которые отрицательно действовали *Rht*-гены. Например, ген *Rht12* приводит к более позднему формированию колоса и цветению растений пшеницы, в то время как колос растений пшеницы с аллелем *Ppd-D1a*, снижающим чувствительность к длине дня, начинает закладываться быстрее. Таким образом, растения пшеницы с геном *Rht12* будут развиваться без негативных эффектов, если в их геноме будет присутствовать доминантный аллель *Ppd-D1a* [30].

Доминантный ген *Rht13* вызывает значительное уменьшение длины стебля растений (до 30 см), но при этом длина coleoptили существенно не меняется. В условиях недостатка влаги у таких растений существенно (до 18%) снижается число зерен в колосе, хотя масса 1000 зерен остается неизменной [83]. Несмотря на то что для большинства чувствительных к гиббереллину генов *Rht* известна хромосомная локализация (табл. 1), в настоящий момент времени молекулярные механизмы действия данных генов все еще изучены слабо [26, 28, 32, 39, 54, 74, 78, 89–91]. Их дальнейшее изучение может помочь в создании новых эффективных доноров короткостебельности (табл. 1).

ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНОВ *Rht* ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ УРОЖАЙНОСТИ

Многочисленные экспериментальные данные показывают, что значительное увеличение урожайности с использованием минеральных удобрений достигается при высоте растения пшеницы от 70 до 100 см [55], в то время как длина стебля растений без нарушений в генах *Rht* составляет около 100–140 см [11]. Показано, что для гаранти-

рованного увеличения урожайности сортов мягкой пшеницы целесообразно использовать растения со следующими аллелями: *Rht-B1b*, *Rht-D1b*, *Rht-B1e*, *Rht-B1p* и *Rht8*, а для твердой – *Rht-B1b*, *Rht-B1e* и *Rht-B1p* [51, 73]. В то же время наличие в растениях пшеницы комбинации этих аллелей, а также аллелей *Rht-B1c* и *Rht-D1c*, приводит к существенному уменьшению длины стебля и значительному снижению урожайности. Гены *Rht13*, *Rht16*, *Rht19*, *Rht20*, *Rht22* и *Rht23* являются потенциальными кандидатами для эффективного использования в селекции сортов нового поколения с целью повышения урожайности пшениц, так как они приводят к примерно такому же уменьшению длины стебля, что и аллели *Rht-B1b*, *Rht-D1b*, *Rht-B1e*, *Rht-B1p* и *Rht8* (рис. 1). Станут ли данные гены *Rht* основой для новой “зеленой революции” – вопрос открытый [44]. Однако использовать эти гены стоит с осторожностью, так как некоторые из них могут приводить к нежелательным эффектам (таким как более позднее цветение растений пшеницы и более медленный рост и развитие их стебля), приводящим в конечном итоге к снижению урожайности [30, 84]. Кроме того, использование растений пшеницы с мутантными аллелями всех генов *Rht* ограничено условиями внешней среды [53] и используемых систем возделывания. Например, засуха в значительной степени влияет на развитие растений пшеницы и может негативно влиять на действие генов *Rht* на длину стебля и в конечном итоге на урожай [57].

Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 16-16-10021).

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. *Allan R.E.* Agronomic comparisons between *Rht1* and *Rht2* semidwarf genes in winter wheat // *Crop Sci.* 1989. V. 29. № 5. P. 1103–1108. <https://doi.org/10.2135/cropsci1989.0011183X002900050001x>
2. *Brooking I.R., Jamieson P.D., Porter J.R.* The influence of daylength on final leaf number in spring wheat // *F. Crop. Res.* 1995. V. 41. P. 155–165. [https://doi.org/10.1016/0378-4290\(95\)00014-H](https://doi.org/10.1016/0378-4290(95)00014-H)
3. *Gent M.P.N., Kiyomoto R.K.* Physiological and agronomic consequences of *Rht* genes in wheat // *J. Crop Prod.* 1997. V. 1. № 1. P. 27–46. https://doi.org/10.1300/J144v01n01_02
4. *Hedden P.* The genes of the green revolution // *TRENDS Genet.* 2003. V. 19. № 1. P. 5–9. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(02\)00009-4](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(02)00009-4)
5. *Jamieson P.D., Brooking I.R., Porter J.R.* How temperature and daylength determine flowering time in spring wheat – a discussion // *Proc. Agronomy Society.* 1995. V. 25. P. 23–27.
6. *Kamran A., Iqbal M., Spaner D.* Flowering time in wheat (*Triticum aestivum* L.): A key factor for global adaptability // *Euphytica.* 2014. V. 197. № 1. P. 1–26. <https://doi.org/10.1007/s10681-014-1075-7>
7. *Borlaug N.E.* Wheat breeding and its impact on world food supply // *Third Int. Wheat Genet. Symp. Canberra,* 1968. P. 1–36.
8. *Verma A., Worland A.J., Sayers E.W. et al.* Identification and characterization of quantitative trait loci related to lodging resistance and associated traits in bread wheat // *Plant Breed.* 2005. V. 124. P. 234–241. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2005.01070.x>
9. *Мережко А.Ф., Писарева Л.А., Прилюк Л.В.* Генетический контроль высоты растения у пшеницы // *Генетика.* 1986. Т. 22. № 5. С. 725–732.
10. *Paollilo D.J., Niklas K.J.* Effects of *Rht*-dosage on the breaking strength of wheat seedling leaves // *Am. J. Botany.* 1996. V. 83. № 5. P. 567–572. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1996.tb12740.x>
11. *Flintham J.E., Borner A., Worland A.J., Gale M.D.* Optimizing wheat grain yield: Effects of *Rht* (gibberellin-sensitive) dwarfing genes // *J. Agric. Sci.* 1997. V. 128. № 1. P. 11–25. <https://doi.org/10.1017/S0021859696003942>
12. *Borojević S.* Characteristics of some new dwarf and semidwarf wheat lines // *Euphytica.* 1968. V. 17. № 1. P. 143.
13. *Якубцинер М.М., Филатенко А.А., Корнейчук В.А.* Классификатор рода *Triticum* L. Л., 1973. 25 с.
14. *Лоскутова Н.П.* Гены короткостебельности пшеницы // *Аграрная Россия.* 2002. Т. 1. С. 25–30. <https://doi.org/10.30906/1999-5636-2002-1-25-30>
15. *Альдеров А.А.* Генетика короткостебельности тетраплоидных пшениц. СПб.: ВИР, 2001. 165 с.
16. *Звейнек И.А.* Выбор тестеров для генетической оценки сортов яровой мягкой пшеницы по высоте растений // *Бюл. ВНИИР им. Н.И. Вавилова.* 1984. С. 9–10.
17. *Gill K.S.* Research On Dwarf Wheats. New Delhi: Indi. Council Agricultural Res. (ICAR), 1979. 184 p.
18. *Allan R.E.* Differentiating between two Norin 10/Brevor 14 semidwarf genes in a common genetic background // *Seiken Ziho.* 1970. № 22. P. 83–90.
19. *McIntosh R.A.* Catalogue of gene symbols for wheat // *Proc. 4th Intern. Wheat Genet. Symp. Missouri,* 1973. P. 893–937.
20. *Thomas S.G.* Novel *Rht-1* dwarfing genes: Tools for wheat breeding and dissecting the function of DELLA proteins // *J. Exp. Bot.* 2017. V. 68. № 3. P. 354–358. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw509>
21. *Sourdille P., Cadalen T., Charmet G. et al.* Molecular markers linked to genes affecting plant height in wheat using a doubled-haploid population // *Theor. Appl.*

- Genet. 1998. V. 96. P. 933–940.
<https://doi.org/10.1007/s001220050823>
22. Gale M.D., Marshall G.A. The chromosomal location of *ga11* and *rht1*, genes for gibberellin insensitivity and semidwarfism, in a derivative of Norin 10 wheat // Heredity. 1976. V. 37. № 2. P. 283–289.
<https://doi.org/10.1038/hdy.1976.88>
 23. McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J. et al. Catalogue of gene symbols for wheat [Электронный ресурс]. URL: <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/symbolClassList.jsp>
 24. Киселёва А.А., Салина Е.А. Генетические механизмы формирования времени колошения мягкой пшеницы // Генетика. 2018. V. 54. № 4. P. 381–396.
<https://doi.org/10.7868/S001667581804001X>
 25. Sormacheva I., Golovnina K., Vavilova V. et al. Q gene variability in wheat species with different spike morphology // Genet. Resour. Crop Evol. 2015. V. 62. № 6. P. 837–852.
<https://doi.org/10.1007/s10722-014-0195-1>
 26. Tian X., Wen W., Xie L. et al. Molecular mapping of reduced plant height gene *Rht24* in bread wheat // Front. Plant Sci. 2017. V. 8. P. 1–9.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01379>
 27. Mo Y., Vanzetti L.S., Hale I. et al. Identification and characterization of *Rht25*, a locus on chromosome arm 6AS affecting wheat plant height, heading time, and spike development // Theor. Appl. Genet. 2018. V. 131. № 10. P. 2021–2035.
<https://doi.org/10.1007/s00122-018-3130-6>
 28. Mo Y., Pearce S., Dubcovsky J. Phenotypic and transcriptomic characterization of a wheat tall mutant carrying an induced mutation in the C-terminal PFYRE motif of *RHT-B1b* // BMC Plant Biol. 2018. V. 18. № 253.
<https://doi.org/10.1186/s12870-018-1465-4>
 29. Krupin P.Yu., Chernook A.G., Bazhenov M.S. et al. Allele mining of TaGRF-2D gene 5'-UTR in *Triticum aestivum* and *Aegilops tauschii* // PLoSOne. 2020. V. 15. № 4: e0231704.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231704>
 30. Chen L., Du Y., Lu Q. et al. The photoperiod-insensitive allele *Ppd-D1a* promotes earlier flowering in *Rht12* dwarf plants of bread wheat // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. № 1312. P. 1–13.
<https://dx.doi.org/10.3389/fpls.2018.01312>
 31. Grant N.P., Mohan A., Sandhu D. Inheritance and genetic mapping of the reduced height (*Rht18*) gene in wheat // Plants. 2018. V. 7. № 58. P. 1–9.
<https://dx.doi.org/10.3390/plants7030058>
 32. Vikhe P., Venkatesan S., Chavan A. et al. Mapping of dwarfing gene *Rht14* in durum wheat and its effect on seedling vigor, internode length and plant height // Crop J. 2018. V. 7. № 2. P. 87–197.
<https://doi.org/10.1016/j.cj.2018.11.004>
 33. Bazhenov M., Divashuk M.G., Amagai Y. et al. Isolation of the dwarfing *Rht-B1p* (*Rht17*) gene from wheat and the development of an allele-specific PCR marker // Mol. Breed. 2015. V. 35. № 213.
<https://doi.org/10.1007/s11032-015-0407-1>
 34. Daoura B.G., Chen L., Hu Y. Agronomic traits affected by dwarfing gene *Rht-5* in common wheat (*Triticum aestivum* L.) // Aust. J. Crop Sci. 2013. V. 7. № 9. P. 1270–1276.
 35. Xiong H., Guo H., Xie Y. et al. Enhancement of dwarf wheat germplasm with high-yield potential derived from induced mutagenesis // Plant Genet. Resour. Charact. Util. 2019. V. 16. № 1. P. 74–81.
<https://doi.org/10.1017/S1479262116000459>
 36. Cho E.J., Kang C., Jung J. et al. Allelic variation of *Rht-1*, *Vrn-1* and *Ppd-1* in Korean wheats and its effect on agronomic traits // Plant Breed. Biotech. 2015. V. 3. № 2. P. 129–138.
https://doi.org/10.14829/jcsproc.240.0_76
 37. Duan J., Wu J., Liu Y. et al. New cis-regulatory elements in the *Rht-D1b* locus region of wheat // Funct. Integr. Genomics. 2012. V. 12. P. 489–500.
<https://doi.org/10.1007/s10142-012-0283-2>
 38. Ford B.A., Foo E., Sharwood R. et al. *Rht18* semidwarfism in wheat is due to increased GA 2-oxidaseA9 expression and reduced GA content // Plant Physiol. 2018. V. 177. P. 168–180.
<https://doi.org/10.1104/pp.18.00023>
 39. French B., Zaicou-kunesch C., Rebetzke G. et al. Alternative dwarfing genes improve wheat emergence from deep sowing // GRDC Research Updates. 2012. P. 40–43.
 40. Jobson E.M., Johnston R.E., Oiestad A.J. et al. The impact of the wheat *Rht-B1b* semi-dwarfing allele on photosynthesis and seed development under field conditions // Front. PlantSci. 2019. V. 10. № 51.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00051>
 41. Кичигина А.К., Чеботарь Г.А., Чеботарь С.В. Биоинформатический анализ нуклеотидных последовательностей аллелей генов короткостебельности пшеницы *Rht-B1* и *Rht-D1*. Одесский национальный ун-т им. И.И. Мечникова, 2016. Т. 21. № 2. С. 79–87.
[https://doi.org/10.18524/2077-1746.2016.2\(39\).82752](https://doi.org/10.18524/2077-1746.2016.2(39).82752)
 42. Li A., Yang W., Lou X. et al. Novel natural allelic variations at the *Rht-1* loci in wheat // J. Integr. Plant Biol. 2013. V. 55. № 11. P. 1026–1037.
<https://doi.org/10.1111/jipb.12103>
 43. Motsnyi I.I., Chebotar G.O., Chebotar S. Effects of the *Ppd-D1a/Ppd-D1b* alleles on agronomical traits of winter wheat in south Ukraine steppe region // EWAC Proc. 17th Intern. EWAC Conf. Bucharest, Romania, 2019.
 44. Würschum T., Langer S.M., Longin C.F.H. et al. A modern green revolution gene for reduced height in wheat // Plant J. 2017. V. 92. P. 892–903.
<https://doi.org/10.1111/tj.13726>
 45. Würschum T., Liu G., Boeven P.H.G. et al. Exploiting the *Rht* portfolio for hybrid wheat breeding // Theor. Appl. Genet. 2018. V. 131. P. 1433–1442.
<https://doi.org/10.1007/s00122-018-3088-4>
 46. Zhang X., Yang S., Zhou Y. et al. Distribution of the *Rht-B1b*, *Rht-D1b* and *Rht8* reduced height genes in autumn-sown Chinese wheats detected by molecular markers // Euphytica. 2006. V. 152. P. 109–116.
<https://doi.org/10.1007/s10681-006-9184-6>
 47. Алиев Э.Б. Цитогенетическое изучение фотопериодической реакции у мягкой пшеницы: Дис. Новосибирск, 1982. 226 с.

48. Тимоха С.И., Писарева Л.А. Аллельные взаимодействия у индуцированных короткостебельных мутантов озимой пшеницы Мироновская 808 // Бюл. ВИР. 1982. № 122. С. 23.
49. Sponsel V.M. Signal achievements in gibberellin research: The second half-century // Annual Plant Reviews. 2016. V. 49: The Gibberellins / Eds Hedden P., Thomas S. G. John Wiley and Sons. Ltd, 2016. P. 1–36. <https://doi.org/10.1002/9781119210436.ch1>
50. Sakamoto T., Matsuoka M. Generating high-yielding varieties by genetic manipulation of plant architecture // Curr. Opin. Biotechnol. 2004. V. 15. № 2. P. 144–147. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.02.003>
51. Pearce S., Saville R., Vaughan S.P. et al. Molecular characterization of *Rht-1* dwarfing genes in hexaploid wheat // Plant Physiol. 2011. V. 157. P. 1820–1831. <https://doi.org/10.1104/pp.111.183657>
52. Wen W., Deng Q., Jia H. et al. Sequence variations of the partially dominant DELLA gene *Rht-B1c* in wheat and their functional impacts // J. Exp. Bot. 2013. V. 64. № 11. P. 3299–3312. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert183>
53. Richards R.A. The effect of dwarfing genes in spring wheat in dry environments. I. Agronomic characteristics // Aust. J. Agric. Res. 1992. V. 43. № 3. P. 517–527. <https://doi.org/10.1071/AR9920517>
54. Yan J., Zhang S. Effects of dwarfing genes on water use efficiency of bread wheat // Front. Agr. Sci. Eng. 2017. V. 4. № 2. P. 126–134. <https://doi.org/10.15302/J-FASE-2017134>
55. Nazim Ud Dowla M.A.N., Edwards I., O'Hara G. et al. Developing wheat for improved yield and adaptation under a changing climate: Optimization of a few key genes // Engineering. 2018. V. 4. № 4. P. 514–522. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.06.005>
56. Гончарова А.И., Моцний И.И., Чеботар С.В. Вплив алелів генів короткостебловості на довжину колеоптиля пшениці м'якої в умовах осмотичного стресса // Вісник Одеського націон. ун-ту. 2016. Т. 21. № 1. С. 89–99. [https://doi.org/10.18524/2077-1746.2016.1\(38\).68107](https://doi.org/10.18524/2077-1746.2016.1(38).68107)
57. Jatayev S., Sukhikh I., Vavilova V. et al. Green revolution 'stumbles' in a dry environment: Dwarf wheat plants with *Rht* genes fail to produce higher grain yield than taller genotypes under early and severe drought // Plant, Cell & Environment. 2020. P. 1–10.
58. Thomas S.G., Blázquez M.A., Alabadí D. DELLA proteins: Master regulators of gibberellin-responsive growth and development // Annual Plant Reviews. V. 49: The Gibberellins / Eds Hedden P., Thomas S.G. John Wiley and Sons. Ltd, 2016. P. 189–228. <https://doi.org/10.1002/9781119210436.ch7>
59. Achard P., Gong F., Cheminant S. et al. The cold-inducible *CBF1* factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism // Plant Cell. 2008. V. 20. № 8. P. 2117–2129. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.058941>
60. Achard P., Cheng H., Grauwe L. De et al. Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals // Science. 2006. V. 311. № 5757. P. 91–94. <https://doi.org/10.1126/science.1118642>
61. Achard P., Renou J.P., Berthomé R. et al. Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species // Curr. Biol. 2008. V. 18. № 9. P. 656–660. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.04.034>
62. Cheminant S., Wild M., Bouvier F. et al. DELLAs regulate chlorophyll and carotenoid biosynthesis to prevent photooxidative damage during seedling deetiolation in *Arabidopsis* // Plant Cell. 2011. V. 23. № 5. P. 1849–1860. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.085233>
63. deLucas M., Davière J.M., Rodríguez-Falcón M. et al. A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation // Nature. 2008. V. 451. № 7177. P. 480–484. <https://doi.org/10.1038/nature06520>
64. Feng S., Martinez C., Gusmaroli G. et al. Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins // Nature. 2008. V. 451. № 7177. P. 475–479. <https://doi.org/10.1038/nature06448>
65. Annunziata M.G. The long and the short of it: GA 2-oxidase A9 regulates plant height in wheat // Plant Physiol. 2018. V. 177. P. 3–4. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00235>
66. Bilova T.E., Ryabova D., Anisimova I.N. Molecular basis of the dwarfism character in cultivated plants. I. Growth distortions due to mutations of gibberellin metabolism and signaling // Agric. Biol. 2016. V. 51. № 1. P. 3–16. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2016.1.3eng>
67. Чеботарь Г.О., Чеботарь С.В. Сигнальные пути гиббереллина в растениях // Цитология и генетика. 2011. Т. 45. № 4. С. 259–268. <https://doi.org/10.3103/S0095452711040037>
68. Sun T. Gibberellin-GID1-DELLA: A pivotal regulatory module for plant growth and development I // Plant Physiol. 2010. V. 154. P. 567–570. <https://doi.org/10.1104/pp.110.161554>
69. Vera-Sirera F., Gomez M.D., Perez-Amador M.A. DELLA proteins, a group of GRAS transcription regulators that mediate gibberellin signaling // Elsevier Inc. 2016. P. 313–328. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800854-6.00020-8>
70. Murase K., Hirano Y., Sun T.P. et al. Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1 // Nature. 2008. V. 456. № 7221. P. 459–463. <https://doi.org/10.1038/nature07519>
71. Lechner E., Achard P., Vansiri A. et al. F-box proteins everywhere // Curr. Opin. Plant Biol. 2006. V. 9. № 6. P. 631–638. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.09.003>
72. Yamaguchi S. Gibberellin metabolism and its regulation // Annual Rev. Plant Biol. 2008. V. 59. P. 225–251. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092804>
73. Peng J., Richards D.E., Hartley N.M. et al. "Green revolution" genes encode mutant gibberellin response

- modulators // *Nature*. 1999. V. 400. P. 256–261.
<https://doi.org/10.1038/22307>
74. Ellis M.H., Spielmeier A.W., Gale K.R. et al. “Perfect” markers for the *Rht-B1b* and *Rht-D1b* dwarfing genes in wheat // *Theor. Appl. Genet.* 2002. V. 105. P. 1038–1042.
<https://doi.org/10.1007/s00122-002-1048-4>
 75. Li A. Isolation of a gibberellin-insensitive dwarfing gene, *Rht-B1e*, and development of an allele-specific PCR marker // *Mol. Breed.* 2012. V. 30. P. 1443–1451.
<https://doi.org/10.1007/s11032-012-9730-y>
 76. Wu J., Kong X., Wan J. et al. Dominant and pleiotropic effects of a GAI gene in wheat results from a lack of interaction between DELLA and GID1 // *Plant Physiol.* 2011. V. 157. № 4. P. 2120–2130.
<https://doi.org/10.1104/pp.111.185272>
 77. Konzak C.F. Mutations and mutation breeding // *Wheat and Wheat Improvement* / Ed. Heyne E.C. Madison: Am. Soc. Agronomy, 1987. P. 428–443.
 78. Ellis M.H., Rebetzke J.G., Chandler P.M. et al. The effect of different height reducing genes on the early growth of wheat // *Funct. Plant Biol.* 2004. V. 31. P. 583–589.
<https://doi.org/10.1071/FP03207>
 79. Дивашук М.Г., Васильев А.В., Беспалова Л.А., Карлов Г.И. Идентичность генов короткостебельности *Rht-11* и *Rht-Ble* // *Генетика*. 2012. Т. 48. № 7. С. 897–900.
<https://doi.org/10.1134/S1022795412050055>
 80. Börner A., Worland A.J. Does the Chinese dwarf wheat variety “XN0004” carry *Rht21*? // *Cereal Res. Communications*. 2002. V. 30. № 1. P. 25–29.
<https://doi.org/10.1007/BF03543385>
 81. Asplund L., Leino M.W., Hagenblad J. Allelic variation at the *Rht8* locus in a 19th century wheat collection // *The Sci. World J.* 2012.
<https://doi.org/10.1100/2012/385610>
 82. Grover G., Sharma A., Gill H.S. et al. *Rht8* gene as an alternate dwarfing gene in elite Indian spring wheat cultivars // *PLoS One*. 2018. V. 13. № 6.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199330>
 83. Wang Y., Du Y., Yang Z. et al. Comparing the effects of GA-responsive dwarfing genes *Rht13* and *Rht8* on plant height and some agronomic traits in common wheat // *F. Crop. Res.* 2015. V. 179. P. 35–43.
<https://doi.org/10.1016/j.fcr.2015.04.010>
 84. Casebow R., Hadley C., Uppal R. et al. Reduced height (*Rht*) alleles affect wheat grain quality // *PLoS One*. 2016. V. 11. № 5.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156056>
 85. Liu Y., Zhang J., Hu Y.-G. et al. Dwarfing genes *Rht4* and *Rht-B1b* affect plant height and key agronomic traits in common wheat under two water regimes // *F. Crop. Res.* 2017. V. 204. P. 242–248.
<https://doi.org/10.1016/j.fcr.2017.01.020>
 86. Чеботарь С.В., Корзун В.Н., Сиволан Ю.М. Распространение локуса WMS261, маркирующего ген короткостебельности *Rht8*, у сортов мягкой пшеницы Южной Украины // *Генетика*. 2001. Т. 37. № 8. С. 1075–1080.
<https://doi.org/10.1023/A:1016773515628>
 87. Чеботарь Г.А., Моцный И.И., Чеботарь С.В. и др. Прямые эффекты генов короткостебельности на генетическом фоне известных сортов пшеницы юга Украины // *Цитология и генетика*. 2012. Т. 46. № 6. С. 44–52.
<https://doi.org/10.3103/S0095452712060023>
 88. Файт В.И., Чеботарь С.В., Мокану Н.В. и др. Эффекты аллелей гена *Rht8* по агрономическим признакам у озимой мягкой пшеницы в условиях степи юга Украины // *Цитология и генетика* 2007. Т. 41. № 2. С. 30–36.
<https://doi.org/10.3103/S0095452707020053>
 89. Peng Z.S., Li X., Yang Z.J. et al. A new reduced height gene found in the tetraploid semi-dwarf wheat landrace Aiganfanmai // *Genet. Mol. Res.* 2011. V. 10. № 4. P. 2349–2357.
<https://doi.org/10.4238/2011.October.5.5>
 90. Yang Z.Y., Liu C.Y., Du Y.Y. et al. Dwarfing gene *Rht18* from tetraploid wheat responds to exogenous GA 3 in hexaploid wheat // *Cereal Res. Communications*. 2007. V. 45. P. 1–12.
<https://doi.org/10.1556/0806.44.2016.050>
 91. Zhao K., Xiao J., Liu Y. et al. *Rht23* (5Dq') likely encodes a Q homeologue with pleiotropic effects on plant height and spike compactness // *Theor. Appl. Genet.* 2018. V. 131. P. 1825–1834.
<https://doi.org/10.1007/s00122-018-3115-5>
 92. Manske G.G.B., Ortiz-Monasterio J.I., van Ginkel R.M. et al. Phosphorus use efficiency in tall, semi-dwarf and dwarf near-isogenic lines of spring wheat // *Euphytica*. 2002. V. 125. P. 113–119.
<https://doi.org/10.1023/A:1015760600750>
 93. Куркиев К.У. Интрогрессия гена короткостебельности *Rht10* от пшеницы сорта Ai-Bian 1 в генотип тритикале // *Генетика*. 2007. Т. 43. № 9. С. 1269–1272.
<https://doi.org/10.1134/S102279540709013X>
 94. Rebetzke G.J., Ellis M.H., Bonnett D.G. et al. Height reduction and agronomic performance for selected gibberellin-responsive dwarfing genes in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // *F. Crop. Res.* 2012. V. 126. P. 87–96.
<https://doi.org/10.1016/j.fcr.2011.09.022>
 95. Ellis M.H., Rebetzke G.J., Azanza F. et al. Molecular mapping of gibberellin-responsive dwarfing genes in bread wheat // *Theor. Appl. Genet.* 2005. V. 111. P. 423–430.
<https://doi.org/10.1007/s00122-005-2008-6>
 96. Rebetzke G.J., Ellis M.H., Bonnett D.G. et al. The *Rht13* dwarfing gene reduces peduncle length and plant height to increase grain number and yield of wheat // *F. Crop. Res.* 2011. V. 124. № 3. P. 323–331.
<https://doi.org/10.1016/j.fcr.2011.06.022>
 97. Botwright T.L., Rebetzke G.J., Condon A.G. et al. Influence of the gibberellin-sensitive *Rht8* dwarfing gene on leaf epidermal cell dimensions and early vigour in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Ann. Bot.* 2005. V. 95. № 4. P. 631–639.
<https://doi.org/10.1093%2Faob%2Fmci069>

Diversity and Phenotypical Effect of the Allele Variants of Dwarfing *Rht* Genes in Wheat**I. S. Sukhikh^{a, *}, V. J. Vavilova^a, A. G. Blinov^a, and N. P. Goncharov^a**^a*The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia***email: igor3419@gmail.com*

The review is dedicated to the description of the allelic variants of *Rht* genes and their influence on traits associated with the growth, development, and yield of wheat plants. We consider the effect of *Rht* genes on the growth and development of wheat plants through DELLA proteins. We propose a new classification of wheat plants by height (stem length), based on the presence in their genotypes of specific alleles of *Rht* genes determined by molecular-genetic methods.

Keywords: green revolution, dwarf wheat, genetic control, genes *Rht*, DELLA-proteins.

ГЕНОМОГЕНЕЗ МИКРОБА ЧУМЫ *Yersinia pestis* КАК ПРОЦЕСС МОЗАИЧНОЙ ЭВОЛЮЦИИ

© 2021 г. В. В. Сунцов*

Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: vvsuntsov@rambler.ru

Поступила в редакцию 11.04.2020 г.

После доработки 06.07.2020 г.

Принята к публикации 25.08.2020 г.

Руководящим методологическим принципом современного молекулярно-генетического (МГ) подхода в проблеме видообразования микроба чумы *Yersinia pestis* является сальтационистская парадигма горизонтального переноса генов. К главным видообразующим событиям относят встраивание в геном предкового психрофильного сапрозоонозного псевдотуберкулезного микроба *Y. pseudotuberculosis* O:1b двух специфических для чумного микроба плазмид вирулентности pFra и pPst, а также инактивации/делеции генов, утративших функции. Альтернативный экологический подход раскрывает “дарвинский” механизм формирования генома чумного микроба в температурно-континентальной (5–37°C) среде – паразитарной системе монгольский сурок–сурочья блоха (*Marmota sibirica*–*Oropsylla silantiewi*), проявляющей промежуточные свойства между средами обитания предкового и производного видов. В соответствии с экологическим сценарием происхождения чумы интерпретирована эволюционная судьба 18 хорошо изученных генов и генных структур чумного микроба. Показано, что постепенное преобразование генома псевдотуберкулезного микроба в геном возбудителя чумы проходило по мозаичному принципу и соответствовало трем формам адаптации: инадаптации, преадаптации и неадаптации. Перспектива развития теории происхождения чумы видится в синтезе МГ и экологического подходов.

Ключевые слова: геном, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia pestis*, переходные формы, видообразование, мозаичная эволюция, *Marmota sibirica*.

DOI: 10.31857/S0016675821020119

Происхождение новых видов и внутривидовых форм патогенных микроорганизмов остается одной из наиболее актуальных проблем эволюционной инфектологии. Это касается и возбудителя чумы – микроба *Yersinia pestis*. В настоящее время определились два основных пока еще альтернативных подхода к ее решению: молекулярно-генетический (МГ) и экологический. Абсолютно доминирует МГ-подход, он прокламирует быстрое и недавнее, не ранее 20–30 тыс. лет назад, сальтационное преобразование клона возбудителя псевдотуберкулеза *Y. pseudotuberculosis* O:1b в популяцию возбудителя чумы *Y. pestis* путем немногих дискретных МГ-актов: горизонтального встраивания (переноса) генов (ГПГ), их инактиваций, делеций и в меньшей мере рекомбинаций. Ключевыми видообразующими актами считают возникновение генетических изменений макромасштаба – встраивание в геном предкового псевдотуберкулезного микроба 1-го серотипа из пока невыясненного внешнего источника двух специфических для чумного микроба полифункциональных плазмид pFra и pPst, следствием ко-

торого стал скачкообразный переход в принципиально иную среду обитания, т.е. в новую экологическую нишу и адаптивную зону.

В последние два десятилетия различными МГ-методами в лабораториях разных стран создано более десятка филогенетических схем чумного микроба [1–10]. Несмотря на некоторые различия, они принципиально сходны в том, что к ныне существующим наиболее древним формам чумного микроба, т.е. к ближайшим потомкам псевдотуберкулезного микроба, относят геноварианты 0.PE7 и 0.PE10 (Тибет), 0.PE2 (Кавказ), 0PE3 (Ангола) и/или 0.PE4m (Китай), входящие в биовар Pestoides (0.PE). “Археологические” геноварианты чумного микроба также размещают в корне филогенетического дерева [9, 10]. Единодушие МГ-исследователей в отношении сальтационного принципа видообразования микроба чумы и большое сходство всех предложенных МГ-филогений создают иллюзию их истинности и неоспоримости.

Биовар Pestoides имеет избирательную вирулентность для теплокровных хозяев. Он циркули-

рует в популяциях полевок (*Microtinae*) и пищух (*Ochotona: Lagomorpha*) и по некоторым молекулярным признакам наиболее близок к предковому псевдотуберкулезному микробу. Остальные биовары: *Antiqua* (ANT), *Mediaevalis* (MED), *Orientalis* (ORI), *Intermedium* (IN) и входящие в них многочисленные детально охарактеризованные геноварианты рассматриваются как производные от 0.РЕ (как исключение, имеются немногочисленные работы МГ-профиля, указывающие на наибольшую древность биовара *Antiqua* [11, 12]). Но, несмотря на доведенную до совершенства МГ-диагностику возбудителя чумы и “понуклеотидное” (SNP-генотипирование) описание структуры генома популяций из большинства мировых природных очагов, МГ-подход не может предложить достоверный сценарий природных событий в недалеком прошлом, которые привели к преобразованию псевдотуберкулезного микроба в микроб чумы в популяциях какого-либо вида полевок (или пищух?). Научные публикации МГ-профиля, трактующие эволюционные коллизии микроба чумы, ограничиваются, как правило, демонстрацией филогенетических схем, которые не находят достоверной экологической и популяционно-генетической интерпретации. Несмотря на совершенство МГ-методов диагностики возбудителя чумы и детальное описание молекулярной структуры большого числа штаммов, выявленных в разных природных очагах мира, заключения о степени родства внутривидовых форм (геновариантов) между собой и с возбудителем псевдотуберкулеза, надежность использованных “молекулярных часов” и методы построения МГ-филогений вызывают вынужденные сомнения, так как МГ-филогении далеки от экологической валидности, не интерпретируются в свете природных событий. На вопросы: где, когда, при каких обстоятельствах и каким образом клон(ы) псевдотуберкулезного микроба преобразовался(лись) в популяцию(и) микроба чумы – МГ-подход ответа не дает. Псевдотуберкулез – это “болезнь холодильников”, но психрофильные свойства псевдотуберкулезного микроба в молекулярных и генетических исследованиях часто не учитывают, используют “теплолюбивых” экспериментальных животных (лабораторных мышей, крыс, морских свинок, тропическую блоху *Xenopsylla cheopis*), что может приводить к ошибочным эволюционным заключениям. МГ-методы утверждают наибольшую древность одного из полевковых природных очагов чумы, декларируют его прямое происхождение от псевдотуберкулезного очага, но логику и последовательность формирования в недалеком прошлом ареала всех якобы наиболее древних, “полевковых” очагов, широко разбросанных в Азии (геноварианты 0.РЕ1, 0.РЕ2, 0.РЕ4–0.РЕ10) и выявленных в Анголе (0.РЕ3), не раскрывают (заметим, в Анголе нет полевок и пищух и микроба

псевдотуберкулеза 1-го серотипа!). Сомнительной видится мейнстримная МГ-идея горизонтального встраивания в геном будущего чумного микроба откуда-то извне! полифункциональных специфических! для него плазмид вирулентности *pFra* и *pPst*. Нет объяснения взрывному нарастанию (“big bang”) генетического разнообразия возбудителя чумы биовара *Antiqua* (так называемый, узел N07 [9]) в популяциях азиатских сурков в недалеком историческом прошлом перед началом 2-й пандемии. Декларируется вымирание якобы существовавших в недалеком прошлом, 6–1 тыс. лет назад, “археологических” “малопатогенных” МГ-линий *Y. pestis* [9, 10, 13, 14], но возможные его причины умалчиваются.

Действительно, составление МГ-филогенетических схем представляет собой необходимую, но не достаточную составную часть метаанализа, направленного на решение проблемы происхождения чумы. Дальнейшим преемственным этапом исследований видится создание достоверного консолидированного сценария преобразования клона псевдотуберкулезного микроба в популяцию возбудителя чумы с привлечением данных других релевантных естественных наук: экологии, общей генетики, эпизоотологии, эпидемиологии, физиологии, биогеографии, микробиологии, палеонтологии, палеоклиматологии, биоинформатики, эволюционного учения и других. Создание такого непротиворечивого всеобъемлющего сценария, верифицированного практикой, можно будет считать решением проблемы. Пока имеются только отдельные и не вполне удачные попытки экологической интерпретации генетических данных [1, 5, 7, 9, 15].

Второй основной подход к проблеме происхождения чумы – экологический – не консолидируется с МГ-подходом, экологический сценарий радикально отличается от МГ-сценариев [16–18]. В отличие от МГ-подхода экологический подход описывает видообразование микроба чумы как постепенный “дарвинский” процесс, соответствующий положениям синтетической теории эволюции (СТЭ). Микроб чумы является уникальным в составе обширного семейства *Enterobacteriaceae* и рода *Yersinia*, объединяющих возбудителей кишечных инфекций. Это означает, что формирование вида *Y. pestis* проходило в каких-то уникальных условиях. Эти уникальные условия раскрывает экологический подход, согласно которому видообразование *Y. pestis* прошло постепенно под действием естественного отбора в среде, имеющей промежуточные свойства между средами обитания анцестрального и производного видов. Такой уникальной средой оказалась паразитарная система монгольский сурок-гарбаган–сурочья блоха (*Marmota sibirica*–*Oropsylla silantiewi*) [16–19]. Пусковым физико-климатическим фактором, вызвавшим видообразовательный процесс, стало

максимальное сартанское похолодание Северной Азии и Дальнего Востока на рубеже плейстоцена и голоцена, 22–15 тыс. лет назад. Непосредственным индуктором видообразования послужило глубокое промерзание грунта в Центральной Азии и, как следствие, изменение поведения личинок сурочьей блохи в зимний период – переход в силу положительного термотаксиса из промерзающей гнездовой выстилки на тела спящих сурков (температура грунта на глубине гнезда, 1,8–2,5 м, в феврале–марте может опускаться до -8°C). Перемещение личинок на спящих сурков приводит к факультативной гематофагии: из шерсти спящих сурков личинки блох со стохастической закономерностью проникают в полость рта, где на слизистой создают скарификации и питаются выступающей лимфой и кровью. Следствием факультативной гематофагии стало массовое травматическое (неадаптивное) заражение популяций гибернарующих сурков-тарбаганов псевдотуберкулезом. Источником массового травматического заражения залегающих в спячку сурков служили их собственные экскременты, облигатно попадающие в ротовую полость в процессе изготовления “пробки” зимовочной норы [16, 17]. Травматический неадаптивный путь массового заражения псевдотуберкулезом популяций первичного хозяина микроба чумы – монгольского сурка-тарбагана – это центральный экологический принцип для понимания механизма происхождения чумы.

Важнейший частный фактор видообразования микроба чумы – гетеротермное (гетероиммунное) состояние гибернарующих хозяев-сурков [20, 21]. “Холодная” кровь спящих сурков теряет иммунные свойства и уподобляется неживой органике внешней среды. Поэтому гетероиммунная гостальная среда оказалась вполне благоприятной для персистенции псевдотуберкулезного микроба в новых уникальных гостальных условиях, смягчила условия перехода анцестральной микробной популяции (клона) из “холодной” неживой внешней органики (экскрементов сурка) через “холодную” живую органику (неиммунную и слабо иммунную кровь спящих сурков) в принципиально новую среду обитания – лимфо-миелоидный комплекс теплокровных хозяев-грызунов и позволила будущему микробу чумы вступить на путь постепенного адаптациогенеза.

Экологический подход раскрывает биогеоэценологические предпосылки и экологические аспекты преобразования клона псевдотуберкулезного микроба в популяцию возбудителя чумы как достаточно быстрого, “квантового” популяционно-генетического эволюционного процесса [22]. Имея богатое биологическое содержание, экологический подход не остается индифферентным к новым МГ-данным, инкорпорирует многие МГ-факты, согласующиеся с положениями СТЭ. Это позволило реконструировать условия и воссо-

здать популяционно-генетические события преобразования клона *Y. pseudotuberculosis* в популяцию *Y. pestis* на основе эколого-молекулярно-генетического синтеза [19, 21].

Как нам представляется, квантовый характер видообразования чумного микроба был вызван тремя пока еще малоизученными явлениями: 1) встраиванием мобильных элементов (IS и других) в генетический аппарат будущего чумного микроба с эффектом макромутаций, 2) кислородным взрывом макрофагов (КВМ) в организме просыпающихся гетеротермных сурков, температура тела (T_T) которых периодически меняется в диапазоне $5-37^{\circ}\text{C}$, при этом КВМ создает стрессовые условия для патогенных бактерий в широком температурном диапазоне и 3) стресс-индуцированным мутагенезом, вызванным КВМ [19, 21]. Эти явления радикально увеличивали скорость мутирования и генетическую вариабельность микробных клеток в высокоизменчивой стрессовой среде и неизбежно вели к их массовой элиминации, но в то же время в значительной мере повышали вероятность возникновения редких адаптивных мутаций, что увеличивало скорость адаптации (эволюции) и освоения новой экологической ниши. Такая эволюционная стратегия является крайне рискованной для эволюционирующих популяций (группировок), но остается единственно возможной в быстро меняющейся стрессовой среде. В такой среде могут выжить и дать потомство только единичные особи-основатели, “обнадеживающие монстры”, ставшие счастливыми обладателями редчайших адаптивных мутаций (действительно, микроб чумы выглядит реальным “монстром” в сравнении с псевдотуберкулезным предком).

МГ и экологический подходы к проблеме происхождения возбудителя чумы, хотя и представляются в настоящее время несовместимыми, преследуют единую цель – раскрытие механизма происхождения чумы. Поэтому факты, накопленные каждым из этих подходов, должны быть совместимыми, когерентными. Должен существовать единый сценарий, который может быть создан только совместными усилиями многих наук. Предлагаемая работа нацелена инициировать создание такого консолидированного сценария. Нами предпринята попытка на основе оценки функций некоторых наиболее изученных генов псевдотуберкулезного и чумного микробов и экологического сценария видообразования микроба чумы проследить механизм постепенного геномогенеза чумного микроба в уникальной переходной среде – паразитарной системе монгольский сурок-тарбаган–блоха *O. silantiewi* и утвердить “дарвинский” принцип видообразования *Y. pestis* как популяционно-генетического процесса мозаичной эволюции в противовес широко принятой МГ-парадигме сальтационного видообразования путем ГПГ.

МОЗАИЧНОЕ ВИДООБРАЗОВАНИЕ *Y. pestis*

Известно, что эволюция, в том числе видообразование, проходит по мозаичному принципу [23, 24]. Мозаичная эволюция – это процесс относительно независимых эволюционных изменений различных признаков организмов в ходе онтогенеза, в результате которых возникают новые организмы, у которых примитивные признаки предковой формы сочетаются с прогрессивными признаками производной формы. Мозаичная эволюция свойственна всем живым организмам, включая микроорганизмы. Процесс видообразования и геномогенеза микроба чумы также соответствовал принципу мозаичной эволюции.

Все морфофизиологические, биохимические и молекулярно-генетические преобразования предкового псевдотуберкулезного микроба в возбудителя чумы прошли по трем главным направлениям: 1) формирование факторов высокой вирулентности – адаптация к популяциям хозяина, создание устойчивой интенсивной бактериемии, обеспечивающей трансмиссивную передачу блохами; 2) формирование факторов трансмиссии – адаптация к популяциям блох-переносчиков, осуществляющим надежную трансмиссивную передачу; 3) формирование факторов коммуникации – устойчивых взаимоотношений клеток в производной популяции чумного микроба, стабилизирующих существование нового вида [25–27]. По всем трем направлениям адаптация проходила по мозаичному принципу и одновременно включала три формы: инадаптацию, преадаптацию и неоадаптацию.

Инадаптация характеризуется элиминацией или инактивацией признаков и функций, теряющих адаптивную ценность в новой среде обитания. Инадаптивные тенденции у чумного микроба связывают с более стабильной и богатой питательными продуктами гостально-векторной средой, в сравнении со средой обитания сапрозоонозного псевдотуберкулезного предка – неживой органикой внешней среды [28]. В геноме псевдотуберкулезного микроба имеется 13% интактных генов, которые сохранились в геноме чумного микроба, но инактивированы точечными мутациями [29]. Инактивация коснулась генов общего метаболизма, вирулентности и трансмиссии [30, 31].

Преадаптация – свойство признаков и функций организма, имеющих приспособительную ценность для еще неосуществленных форм взаимодействия с новой средой. Способность к приспособлению у организмов заложена “изначально” и не связана непосредственно с их взаимодействием со средой обитания. Преадаптивные признаки и функции организма (или отдельного органа) характеризуются не как результат случайных мутаций, а предшествующей приспособительной эволюцией. В геномах псевдотуберкулезного и чумного микробов обнаружено больше общих генов и генных

комплексов, отвечающих за реализацию общеметаболических клеточных функций, чем характерных для каждого из видов [32]. Помимо этого обоим микробам свойственны общие хромосомные гены вирулентности, трансмиссии и коммуникации, а также плазида Са-зависимости pYV/pCad – детерминанта вирулентности трех патогенных *Yersinia*. Преадаптивные признаки и функции, свойственные чумному микробу, как функционально важные перешли от псевдотуберкулезного микроба в малоизмененном виде.

Неоадаптация характеризуется формированием новых специфических только для микроба чумы признаков и функций и, соответственно, генов и генетических структур, которые кодируют признаки и функции, возникшие в процессе отбора в новой среде обитания и обеспечившие переход в новую экологическую нишу и адаптивную зону. Новыми фенотипическими признаками чумного микроба стали способность образовывать бубон и трансмиссивная передача через укусы блох. Неоадаптацию у чумного микроба характеризует возникновение факторов вирулентности, трансмиссии и коммуникации, кодированных на двух вновь синтезированных специфических плазидах. Факторы вирулентности и трансмиссии, кодированные на специфических плазидах, являются аддитивными к размещенным на хромосоме [33]. Кроме того, микроб *Y. pestis* приобрел уникальные хромосомные регионы, образующие шесть генетических кластеров, содержащих как минимум 32 гена, не связанных с вирулентностью, но оптимизирующих общеметаболические функции чумной микробной клетки [29].

Так как признаки и функции кодируются определенными генами и генетическими комплексами, последние также можно характеризовать как инадаптивные, преадаптивные и неоадаптивные. В статье рассмотрены некоторые наиболее изученные гены чумного микроба, актуальность функций которых вполне достоверно интерпретируется экологическим сценарием (табл. 1).

ГЕНЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ

Гены вирулентности кодируют признаки и функции, позволяющие напрямую или опосредованно избежать или преодолеть факторы клеточно-го и гуморального иммунитета хозяина [34–36].

Инадаптивные гены. Любой инфекционный процесс начинается преодолением эпителия хозяина возбудителя инфекции двумя способами: или специализированным за счет взаимодействия адгезинов и инвазинов микроба с интегринами определенных эпителиальных клеток, или неадаптивным травматическим путем, т.е. прямым внедрением возбудителя в глубокие ткани и клетки хозяина. Типичная псевдотуберкулезная

Таблица 1. Некоторые хорошо изученные инадаптивные, преадаптивные и неоадаптивные гены и генетические комплексы, участвовавшие в формировании факторов вирулентности, трансмиссии и коммуникации *Yersinia pestis*

	Инадаптивные гены	Преадаптивные гены	Неоадаптивные гены
Факторы вирулентности	<i>inv</i> , <i>yadA</i> , O-антиген	T3SS/ <i>yops</i> , <i>ail</i> , <i>psa</i>	<i>cafI</i> , <i>pla</i> , YpfΦ
Факторы трансмиссии	<i>ureD</i> , <i>rcaA</i> , PDE2, PDE3	<i>hms</i>	<i>ymt</i>
Факторы коммуникации		T6SS	<i>pst</i> , <i>pim</i>

инфекция начинается специализированным путем через М-клетки и “пееровы бляшки” тонкого кишечника теплокровных хозяев. Типичная чумная инфекция тоже начинается специализированным, но иным путем — через укусы зараженных блох. “Входные ворота” инфекции при чуме у грызунов не связаны с М-клетками. Инфицирование крови, печени и селезенки предшествует проникновению микроба в “пееровы бляшки” и М-клетки, т.е. распространение чумного микроба в М-клетки проходит обратным путем в сравнении с псевдотуберкулезной инфекцией [37]. Преобразование одних специализированных ворот инфекции в другие специализированные ворота прошло постепенно через “неспециализированные ворота”, какими стал травматический путь проникновения микроба напрямую в кровь хозяина, как это происходит при посттравматических инфекциях, вызывающих сепсис, таких как газовая гангрена, столбняк, синегнойная, стафилококковая, стрептококковая и другие инфекции.

По понятиям эволюционного учения переход популяций живых организмов от специализации в одной среде обитания к обитанию в другой среде проходит в условиях переходной среды через полиморфные переходные нестабильные формы [38–40]. Для понимания процесса видообразования микроба чумы представляется важным обозначить такую переходную среду и понять причину инактивации у переходной формы *pseudotuberculosis/pestis* генов инвазии (*inv*), адгезии (*yad*) и генного кластера, кодирующего O-антиген. Эти гены являются интактными у предкового псевдотуберкулезного микроба, но инаktivированы точечными мутациями и вставками у чумного.

Стартовый контакт и внедрение патогенов в эпителиальные клетки организма хозяина обеспечивают специфические адгезины и инвазины. Синтез адгезина/инвазина (Inv) — основного фермента, обеспечивающего взаимодействие псевдотуберкулезной клетки с М-клетками эпителия тонкого кишечника млекопитающего-хозяина, кодируется геном *inv*. Inv взаимодействует с интегрин-рецепторами, локализованными только на М-клетках, т.е. М-клетки являются единственной брешью в эпителиальной защите хозяина от псевдотуберкулезного патогена. Эти рецепторы отсутствуют у прочих выстилающих кишечный

тракт энтероцитов, а энтероциты надежно защищают организм хозяина от внедрения многих патогенных микробов, в том числе псевдотуберкулезного [34, 41–44]. В геноме микроба чумы *inv* имеется, но в качестве псевдогена. Инаktivация *inv* вызвана не обитанием в более стабильной и богатой питательной среде грызун-блоха, а сменой входных ворот инфекции, минуя брешь эпителиальной защиты, т.е. вызвана отсутствием стартового контакта псевдотуберкулезного микроба с эпителиальными М-клетками.

Хотя у микроба чумы *inv* инаktivирован, каких-либо новых генов с аналогичной функцией, но направленной на другие энтероциты, не выявлено. Следовательно, стартовый путь адаптации чумного микроба к организму хозяина не включал специализированного способа преодоления интестинального барьера. Возникает вопрос: если не через М-клетки и другие энтероциты, то каким образом будущий микроб чумы получил устойчивый доступ в лимфомиелоидный комплекс хозяина? Ответ дает экологический сценарий — первичное заражение хозяина псевдотуберкулезом на стартовом этапе видообразования возбудителя чумы прошло неспециализированным способом — травматическим. Прямое проникновение псевдотуберкулезного микроба в кровь спящего монгольского сурка-тарбагана стало возможным при установлении прямого устойчивого контакта экскрементов с кровью благодаря сартанскому похолоданию и, как следствие, поведенческому сдвигу в популяциях сурочьей блохи — возникновению факультативной гематофагии личинок [16, 17].

Другой инаktivированный ген *yadA*, функционально тесно связанный с *inv*, кодирует на плазмиде pCad синтез адгезина YadA [44–46]. Важным свойством YadA является способность связываться с экстрацеллюлярным матриксом и интегринами М-клеток, что, как и в случае с Inv, важно на стартовом этапе псевдотуберкулезной инфекции. Со сменой “входных ворот” инфекции при чуме, минуя М-клетки, *yadA* утерял свою функциональную значимость, подобно *inv*, и был инаktivирован мутацией в процессе естественного отбора.

Для расшифровки процесса видообразования микроба чумы интерес представляют O-антигены псевдотуберкулезного O:1b и чумного микробов.

Молекулярные структуры генных кластеров, кодирующих O-антигены, имеют сходство на уровне 98.9%, что указывает на происхождение *Y. pestis* именно от *Y. pseudotuberculosis* O:1b [47]. Открытие прямого предка чумного микроба стало краеугольным камнем в теории происхождения чумы. Генный кластер, кодирующий O-антиген, является интактным у псевдотуберкулезного микроба, поддерживает свойство вирулентности [48], но у чумного микроба он инактивирован мутацией. Полагают, что утрата функции O-антигена у чумного микроба привела к полноценному функционированию важнейшего новообразованного фактора вирулентности – протеина Pla (активатора плазминогена), ответственного за бубонное проявление инфекции. Новообразованный локус *pla* оказался антагонистом генов, кодирующих O-антиген, и, в силу краеугольной важности функции *pla*-гена, его синтез был поддержан естественным отбором, а функция O-антигена, наоборот, была утрачена [32, 47, 49].

Преадаптивные гены псевдотуберкулезного микроба, сохранившие свою актуальность в новой среде обитания, перешли к микробу чумы в малоизмененном виде. К ним относят гены, отвечающие за стрессоустойчивость к факторам клеточного и гуморального иммунитета теплокровных хозяев [9, 35, 50].

Центральной преадаптивной генетической структурой чумного микроба следует считать систему секреции III типа (ТЗСС) (“молекулярный шприц”) – базовый фактор вирулентности патогенных *Yersinia*, локализованный на плазмиде вирулентности pYV/pCad. С помощью ТЗСС протеины внешней мембраны микроба (Yops) транспортируются непосредственно в эукариотическую клетку хозяина и ингибируют фагоцитоз [33]. Прочие факторы вирулентности *Y. pestis* следует рассматривать как аддитивные к ТЗСС, создающие синергетический эффект.

В геноме чумного микроба от псевдотуберкулезного предка в почти неизменном виде перешел ген *ail* (attachment invasion locus), кодирующий на хромосоме поверхностный протеин Ail, регулирующий проявление резистентности к гуморальным факторам иммунитета [51–55]. Почему этот инвазин, в отличие от Inv и YadA, полностью сохранил свою функциональную значимость в чумной клетке? Функция Ail, обеспечивающая противостояние предкового псевдотуберкулезного микроба гуморальными факторами иммунитета хозяина, оказалась чрезвычайно важной и для дочернего вида – микроба чумы, так как, согласно экологическому сценарию, стартовым условием видообразования *Y. pestis* было прямое попадание псевдотуберкулезного микроба в лимфо-миелоидную систему спящих сурков-тарбаганов и возникновение последующей посттравматической

септицемии. Таким образом, Ail стал авангардным фактором защиты микроба псевдотуберкулеза, противостоящим факторам гуморального иммунитета спящего сурка при травматическом проникновении в кровь, а впоследствии сохранил функцию защитного фактора промежуточной (pseudotuberculosis/pestis) и производной (*Y. pestis*) форм.

Особенностью белка Ail чумного микроба является проявление активности не только в организме теплокровных хозяев, имеющих T_r около 37°C , но и при более низкой ($\leq 28^\circ\text{C}$) температуре, что обычно связывают с устойчивостью микроба чумы к бактерицидным факторам в пищеварительном тракте блохи [51]. В соответствии же с экологическим сценарием Ail не имеет отношения к персистенции микроба в блохах. Активность Ail в холодной ($\leq 28^\circ\text{C}$) крови хозяина можно рассматривать как преадаптивное свойство, стабилизировавшееся в гетеротермной среде ($5\text{--}37^\circ\text{C}$) в процессе адаптиогенеза в популяциях монгольского сурка-тарбагана во время зимней спячки.

Еще одним очевидным преадаптивным хромосомным геном является *psaA*, кодирующий антиген рН6 (PsaA). Функция этого антигена состоит в ингибировании фагоцитоза и поддержании способности чумного микроба реплицироваться в макрофагах в условиях “незавершенного фагоцитоза” [50, 52]. Эта способность свойственна также псевдотуберкулезному микробу, и, несомненно, этот признак был унаследован возбудителем чумы от псевдотуберкулезного предка [56]. Репликация в макрофагах позволяет обоим микробам избежать элиминации факторами гуморального иммунитета, а также использовать макрофаги в качестве транспортного средства из мест внедрения (M-клеток и сайтов инокуляции) в лимфатические узлы.

Неоадаптивные гены вирулентности кодируют признаки и функции, отвечающие за классическую бубонную форму инфекции и наступление сепсиса организма хозяина, без которого невозможна трансмиссивная передача через укусы блох. Новообразованные гены вирулентности размещены на специфических только для чумного микроба большой pFra и малой pPst плаزمидях. Эти плазмиды вирулентности в действительности являются полифункциональными. Большая плаزمид несет гены вирулентности (*cafI*) и трансмиссии (*ymt*). Малая плазмид несет ген вирулентности (*pla*) и два гена коммуникации (*pst* и *pim*). Все эти гены кодируют разные специфические только для микроба чумы признаки, поэтому широко принятая среди МГ-исследователей идея об их горизонтальном встраивании из какого-то пока неизвестного внешнего источника далека от экологического понимания и не вписывается в общепринятые положения СТЭ. Согласно экологическому сценарию

рию обе плазмиды были синтезированы интрацеллюлярно в процессе геномного *Y. pestis*. Причем первой появилась pFra [19].

Ген *cafI* кодирует на pFra синтез антигена F1, отвечающего за подавление фагоцитоза макрофагами [57]. Этот фактор вирулентности достаточно хорошо изучен, он является аддитивным к базовому преадаптивному фактору вирулентности T3SS. Но остается не вполне понятным совмещение на одной pFra-плазмиде генов вирулентности *cafI* и трансмиссии *ymt*. Первый экспрессируется при температуре 37°C (T_T теплокровного хозяина), а второй – при ≤27°C, т.е. плаزمида обладает сложным и совершенным аппаратом терморегуляции функций. Считают, что 27°C – это температура местообитания блохи на теле хозяина, и микроб, будучи вне хозяина, адаптирован именно к этой температуре. Однако блохи являются лишь кратковременными эктопаразитами и основное время жизненного цикла проводят в гнезде хозяина, температура которого значительно ниже, чем 27°C. К примеру, в зимовочных гнездах монгольского сурка температура подстилки никогда не превышает 7°C, в течение года колеблется в диапазоне от –8 до +7°C [16–20]. Согласно экологическому сценарию происхождения микроба чумы можно предположить, что синтез плазмиды pFra вместе с *ymt*-геном стартовал на ранних этапах геномного *Y. pestis*, но синтез гена *cafI* на этой плазмиде был смещен к концу геномного. В любом случае экологический сценарий не поддерживает идею горизонтального встраивания большой полифункциональной плазмиды pFra в геном чумного микроба из какого-либо внешнего источника.

Ген *pla*, локализованный на малой плазмиде pPst/pPla, кодирует синтез активатора плазминогена – фермента Pla. Этот фермент обеспечивает диссеминацию чумного микроба из сайта инокуляции в регионарные лимфатические узлы с образованием бубона и дальнейшее распространение по всему организму зараженного хозяина с наступлением сепсиса [52, 58, 59]. Согласно экологическому сценарию эндоцеллюлярный синтез этого фактора начался на более поздних стадиях геномного микроба чумы в популяциях гибернирующих гетеротермных сурков, имеющих T_T выше 20–25°C, когда макрофаги способны активироваться фагоцитозом и может наступать кислородный взрыв [19, 21, 22]. Pla отсутствует у кавказского подвида *Y. pestis caucasica*. По МГ-признакам это позволяет считать кавказский подвид наиболее древним, проявляющим переходные свойства между псевдотуберкулезным и чумным микробами [58]. Наоборот, по экологической логике кавказский подвид образует наиболее молодые природные очаги, наиболее удаленные от места видообразования *Y. pestis* в Центральной Азии. Надо пола-

гать, что признак Pla⁺ был утерян в “бутылочном горлышке” при естественной длительной, тысячелетиями, ползучей территориальной экспансии микроба чумы из района видообразования [20, 60].

В хромосоме чумного микроба обнаружена ДНК профага YpfΦ, которая отсутствует у псевдотуберкулезного микроба. Предполагают ее аквизицию путем ГПГ [13, 61]. С наличием профага связывают увеличение вирулентности чумного микроба. Причем в геномах более древних биоваров Antiqua и Mediaevalis профаг существует как экстрахромосомный нестабильный регион, а в геноме более молодого биовара Orientalis – как интегрированный и стабильный [62]. Поэтому полагают, что стабилизация фага в геноме чумного микроба проходила длительное время, вплоть до начала 3-й пандемии. Пока остаются неясными происхождение профага в геноме чумного микроба и его взаимоотношение с популяциями *Y. pestis*. YpfΦ специфичен для *Y. pestis*, следовательно, надо полагать, формировался коэволюционно с *Y. pestis*. Если предполагают ГПГ, то возникает вопрос: где, откуда и каким образом произошло встраивание его в хромосому? Известно, что после дивергенции от клона *Y. pseudotuberculosis* популяция *Y. pestis* строго изолирована в (стерильной) крови хозяина и имела ограниченные возможности заимствования внеклеточной (foreign) ДНК [63].

ГЕНЫ ТРАНСМИССИИ

Псевдотуберкулезный микроб, предок чумного, в типичных условиях не передается блохами. Попадая в редких случаях с кровью в пищеварительную систему блох, он продуцирует токсины, вызывающие острую диарею, приводящую к гибели [64]. Поэтому для более эффективной передачи новому хозяину микроб чумы выработал адаптации к персистенции в популяциях блох. Адаптация проходила по двум направлениям: 1) снижения токсичности для блох и увеличения устойчивости к ферментам пищеварительной системы и 2) формирования биопленки, создающей механический блок преджелудка как механизм пролонгированной передачи возбудителя в популяции хозяина. Формирование биопленки в преджелудке блохи является температурно-зависимым процессом и происходит в диапазоне температур от 5 до 26°C, причем при пониженной температуре этот процесс проходит более интенсивно. Известно, что при 6–10°C – температуре мест обитания блох сурков и сусликов рода *Oropsylla* – биопленка в виде “пробки” преджелудка блох возникает во много раз чаще, чем при температуре 18–25°C [65–67].

Микроб чумы передается двумя трансмиссионными механизмами: неспециализированным раннефазным (механическим) и специализированным позднефазным (“блоковым”), между ко-

торыми существует континуальный переход [67]. Неспециализированный малоэффективный механический способ передачи реализуется в короткие сроки после укуса блох и характерен для многих трансмиссивных болезней. Микроб псевдотуберкулеза этим способом передается редко, только в “холодных” условиях обитания блох [68]. При механической передаче коадаптивных отношений микроба и блохи не наблюдается.

Специализированный “блоковый” способ передачи является инновацией чумного микроба, он осуществляется благодаря адаптации к персистенции в передних отделах пищеварительной системы блох. Адаптация проходила, как упомянуто выше, двумя способами: противостоянием токсическому воздействию ферментов пищеварительной системы блохи со снижением собственной токсичности (*Ymt*-фактор) и выработкой способности формировать биопленку и создавать блок в преджелудке блохи (*Hms*-фактор). Специализированный путь передачи является аддитивным к примитивному механическому и значительно увеличивает эффективность трансмиссивной передачи [67].

Причина формирования “блоковой” передачи имела дуалистическую природу. С одной стороны, агрегации до 10^5 клеток чумного микроба в сайтах инокуляции блокированными блохами, в отличие от одиночных “планктонных” клеток при механической передаче, дают более высокий эффект заражения. С другой стороны, в виде биопленки и агрегаций, локализованных в передних отделах пищеварительного тракта блохи, микроб может длительное время персистировать и осуществлять пролонгированную передачу в течение всей жизни зараженной блохи (в некоторых случаях более 400 суток) [65, 68]. В процессе видообразования чумного микроба это было важно для переживания промежуточной формой *pseudotuberculosis/pestis* сезона летней активности первичного хозяина – монгольского сурка. Сурки в теплый сезон года активны и имеют постоянную T_r около 37°C . В это время система иммунитета работает полноценно и патогены тотально элиминируются. Отсюда можно заключить, что на этапе преобразования клона *Y. pseudotuberculosis* в популяцию *Y. pestis* переходная форма *pseudotuberculosis/pestis* в холодное время года персистировала в популяциях гибернирующих гетеротермных сурков ($T_r < 37^\circ\text{C}$), а теплый сезон переживала в популяциях блохи *O. silantiewi*, обитающих в холодных условиях сурочьих нор [20, 69].

Инадаптивные гены. Уреаза *UreD*, кодируемая хромосомным геном *ureD*, необходима для персистенции кишечных *Yersinia* в кислой среде желудочно-кишечного тракта животных-хозяев, но является крайне токсичной для блох [26, 70, 71]. Таким образом, ген *ureD* является антитрансмиссионным. Он инактивирован у чумного микроба

и существует в виде псевдогена, так как утерю свою функцию в связи с трансмиссией через укусы блох, минуя кишечный тракт [13, 15, 26]. То есть инактивация гена *ureD* и потеря уреазной активности у чумного микроба были связаны со сменой пути заражения инфекцией и адаптацией к обитанию в организме блох, гибель которых снижает эффективность трансмиссивной передачи. У некоторых штаммов чумного микроба отмечают реверсию признака Ure^- в Ure^+ , что связывают с наличием в жизненном цикле микроба почвенной фазы [26]. Экологический сценарий не поддерживает эту идею.

Другой инактивированный хромосомный ген *rscA* кодирует регуляторный протеин *RcsA*, известный как ингибитор синтеза биопленки (антитрансмиссионный фактор) [26, 72]. Этот ген имеют как псевдотуберкулезный, так и чумный микробы. У псевдотуберкулезного микроба, попадающего из внешней органической среды в организм грызуна-хозяина, а затем блохи-переносчика, ген *rscA* экспрессируется, и биопленка в организме переносчика-блохи не образуется. У чумного микроба *rscA* инактивирован, стал псевдогеном. Выключение антитрансмиссионного фактора привело к формированию биопленки и, как следствие, блока преджелудка блохи [72–75]. Инактивация антитрансмиссионного гена *rscA*, надо полагать, была связана с синтезом у чумного микроба антагонистического к нему гена трансмиссивности *ymt* на вновь синтезированной большой плазмиде *pFga*. Функция *ymt*, как рассмотрим ниже, оказалась высоко актуальной в новых гостально-векторных условиях. Как следствие, сопряженные антагонистические процессы – инактивация *rscA* и синтез *ymt* – были поддержаны естественным отбором [26].

Адаптация чумного микроба к трансмиссивной блоковой передаче проявилась также в инактивации регуляторных генов, кодирующих функции фосфодиэстераз (*PDE*) – ферментов, участвующих в синтезе биопленки в качестве негативных регуляторов. Гены, кодирующие функции *PDE2* и *PDE3* у микроба чумы, в отличие от псевдотуберкулезного микроба, инактивированы и поэтому не блокируют индукцию биопленки в пищеварительном тракте блох [15, 75].

Преадаптивные гены. Наиболее важными и хорошо изученными преадаптивными генетическими структурами чумного микроба, кодирующими факторы трансмиссии, являются *hms*-опероны – совокупность хромосомных локусов, кодирующих протеины *Hms*, ответственные за синтез экстрацеллюлярного матрикса, формирующего биопленку у предкового псевдотуберкулезного и у дочернего чумного микробов при температурах $\leq 26^\circ\text{C}$ [50, 76–78]. У псевдотуберкулезного микроба эти опероны составляют молекулярно-генетическую основу

адаптации к колониальному обитанию во внешней неживой органике, богатой конкурирующими прокариотными видами. Биопленка-матрикс является физико-химическим средством борьбы за существование в мультимикробном сообществе и хранилищем экзоцеллюлярного биохимического и генетического материала, необходимого для поддержания метаболических и эволюционных процессов в популяциях биопленко-формирующих бактерий [79]. У микроба чумы экстрацеллюлярный матрикс выполняет несколько иную функцию. Он участвует в формировании блока преджелудка блохи-переносчика и, таким образом, специфической трансмиссивной передачи. В процессе видообразования *Y. pestis* блок преджелудка блохи обеспечивал пролонгированное переживание промежуточной формой *pseudotuberculosis/pestis* летнего периода в популяциях блох (но не в популяциях сурков), так как летом активные сурки обладают полноценным иммунитетом и переходные формы микроба в их организме тотально элиминировались [22].

Неоадаптивные гены. Помимо Hms, базового фактора трансмиссии, микроб чумы синтезирует аддитивный специфический фактор трансмиссии — мышинный токсин (Ymt). Этот фермент защищает бактерии от бактериолитических и цитотоксических воздействий в передних отделах пищеварительной системы блохи и тем самым радикально повышает способность блох к трансмиссивной передаче [50, 64]. Синтез Ymt кодируется геном *ymt*, размещенным на большой плазмиде pFga. Следуя логике экологического сценария происхождения чумы, адаптация будущего микроба чумы к передаче взрослыми блохами стартовала сразу после массового проявления факультативной личиночной гематофагии у сурочьих блох и устойчивого посттравматического псевдотуберкулезного сепсиса гибернирующих гетеротермных ($T_r \geq 5^\circ\text{C}$) сурков [19]. С началом синтеза Ymt следует увязывать формирование плазмиды pFga. В свою очередь, начало синтеза pFga стало стартовым моментом в формировании эпизоотической системы чумы монгольский сурок–блоха *O. silantiewi*–микроб *Y. pestis*.

ГЕНЫ КОММУНИКАЦИИ

Микроорганизмы, как все прочие живые организмы, проявляют социальные взаимоотношения. Взаимосвязи и кооперация проявляются в таких жизненных функциях как расселение, питание, создание биопленки, репродукция, химическая защита, сигнализация [79]. Гены коммуникации кодируют функции и признаки, консолидирующие микробные популяции. Остановимся на судьбе одного преадаптивного генного блока и двух неоадаптивных генов коммуникации чумного микроба.

Преадаптивные гены. Как у предкового псевдотуберкулезного, так и чумного микробов имеется генный кластер секреторной системы 6-го типа (T6SS), отвечающий за разнообразные функции, среди которых выделяют регуляцию внутри- и межвидовых бактериальных отношений [80–83]. Молекулярные структуры некоторых генетических кластеров T6SS у *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis* имеют высокое сходство. Кластер A T6SS является температурно-зависимым, гены кластера экспрессируются при температуре не выше 26°C , что предполагает регуляцию внутривидовых отношений в популяциях обоих видов *Yersinia* вне теплокровного хозяина, и эта регуляция в холодной внегостальной мертвой органической среде обитания (в экскрементах) предкового псевдотуберкулезного и в холодной векторной среде производного чумного микробов (в передних отделах пищеварительной системы блох) осуществляется сходным образом.

Неоадаптивные гены. Многие микробные виды синтезируют видоспецифические бактериоцины — химические агенты, ответственные за регуляцию меж- и внутривидовых взаимодействий микробных клеток и поддерживающие функцию борьбы за существование в многовидовом микробном сообществе [25, 84]. Микроб чумы синтезирует специфический бактериоцин — пестицин (Pst), кодируемый на малой плазмиде геном *pst*. Пестицин проявляет активность против предкового вида *Y. pseudotuberculosis* 0:1b и чувствительных к пестицину штаммов собственного вида. Как регулятор меж- и внутривидовых отношений, пестицин имел непосредственное отношение к процессу преобразования клона *Y. pseudotuberculosis* 0:1b в популяцию *Y. pestis* [22]. С ним связано взаимодействие микробных клеток в переходной гетерогенной популяции *pseudotuberculosis/pestis*. Клетки (клоны, колонии, группировки), синтезирующие пестицин, стали подавлять предковые формы, не синтезирующие или синтезирующие этот фермент в меньшей мере. В конечном счете пестицин стал внутривидовым биохимическим изолирующим фактором, создавшим hiatus между предковым микробом псевдотуберкулеза 1-го серотипа и дочерним микробом чумы, прочно и навсегда разделившим эти два вида. Таким образом, синтез *pst* при температуре $\geq 26^\circ\text{C}$ является важнейшей характеристикой постепенного геномного генеза *Y. pestis*, в противовес МГ-идее о горизонтальном встраивании в геном псевдотуберкулезного микроба *pst*-гена в составе плазмиды pPst как сальтационного видообразующего акта.

С *pst* функционально тесно связан ген иммунности к пестицину *pim*, размещенный на той же плазмиде. Pim инактивирует пестицин и предохраняет клетку от лизиса собственным пестицином [85]. Тандем Pst–Pim обеспечивает популяционную стабильность и видовую самостоятельность *Y. pestis*.

Размещение на малой плазмиде pPst двух взаимосвязанных видоспецифических генов коммуникации *pst* и *pim* неоспоримо свидетельствует о ее интрацеллюлярном синтезе на завершающих этапах формирования популяционной структуры чумного микроба и исходной эпизоотической системы чумы монгольский сурок–блоха *O. silantiewi*–микроб *Y. pestis* в целом.

Ранее неоднократно высказывалось мнение, которое подчас обсуждается в современной литературе, что жизненный цикл микроба чумы включает сапрофитическую фазу развития, т.е. что чума, как и псевдотуберкулез, является сапрозоонозом [86–88]. Пестицин, при этом, якобы исполняет роль агента борьбы за существование в многовидовом почвенном микробном сообществе [88]. Экологический сценарий происхождения микроба чумы не поддерживает такого мнения.

ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

Итак, как было сказано выше, в МГ-подходе к проблеме видообразования возбудителя чумы основным теоретическим ориентиром научного поиска является парадигма ГПГ – горизонтального переноса основных факторов вирулентности с последующей адаптацией путем “тонкой настройки” генетических изменений для успешной инкорпорации этих факторов в микробный геном. Отсюда с неизбежностью принимается МГ-идея сальтационной эволюции как следствия небольшого числа ключевых спонтанных генетических актов: аквизиций, делеций, инактиваций, “взрывов” внутривидового разнообразия. На МГ-филогенетических схемах чумного микроба обозначают моменты ключевых инноваций: внедрения в различные филогенетические ветви плазмид вирулентности pFga и pPst [3, 9, 26], инактивации/делеции генов вирулентности и трансмиссии *cafI*, *pla*, *ymt*, *ureD*, *rcaA*, *pde2*, *pde3* [26, 27, 75], обозначают узлы и “взрывы” разнообразия (“big bang”, N07, N11, N14) [5, 9]. Но моменты этих так называемых “ключевых” инноваций декларируют только на основании МГ-данных и не подкрепляют экологическим нарративом. Сложилась ситуация, когда структуры геномов предкового псевдотуберкулезного и производного чумного микробов хорошо изучены, но эволюционное гар-пространство между ними остается белым пятном. Даже доскональное знание структур геномов *Y. pseudotuberculosis* O:1b и *Y. pestis* оказалось фактологически недостаточным и методологически несостоятельным для раскрытия МГ-механизма преобразования клона первого вида в популяцию второго. Это гар-пространство способен заполнить эколого-генетический подход, в котором эволюционная судьба генов интерпретируется на основе выявленных уникальных экологических и биогеоценотических обстоятельств видообразовательного

процесса. Экологический подход является вполне информативным и доверительным в связи с недавним в эволюционном масштабе времени возникновением чумного микроба. Природная обстановка конца плейстоцена и голоцена Центральной Азии, в которой протекал видообразовательный процесс, в большой мере сохранилась до настоящего времени и может быть успешно реконструирована актуалистическими методами.

Важно подчеркнуть два коренных обстоятельства процесса видообразования микроба чумы из оказавшегося(ихся) в уникальных условиях, экологически изолированного(ых) клона(ов) псевдотуберкулезного микроба: 1) неадаптивный травматический путь радикальной смены входных ворот псевдотуберкулезной инфекции в организм теплокровного хозяина и 2) наличие промежуточной (переходной) микробной среды, в которой совершались популяционно-генетические события формирования вида *Y. pestis*. Как отмечено выше, прямое травматическое проникновение псевдотуберкулезного микроба в лимфу и кровь спящего сурка не требовало специализированного механизма адгезии и инвазии М-клеток. Как следствие, ферменты *Yad* и *Inv* утратили свои функции, а кодирующие их гены *yad* и *inv* инактивировались. Наоборот, для “заякоривания” и персистенции клона псевдотуберкулезного микроба, напрямую проникшего в лимфу и кровь спящего сурка, был востребован фактор вирулентности, противодействующий факторам гуморального иммунитета хозяина. Этим фактором вирулентности стал адгезин-инвазин *Ail*, унаследованный от псевдотуберкулезного микроба с малыми изменениями.

Второе важное обстоятельство видообразования микроба чумы – наличие промежуточной (переходной) среды между средами обитания предкового и производного видов. Стартовое закрепление клона псевдотуберкулезного микроба в “холодной” крови спящего сурка означало внедрение клона псевдотуберкулезного микроба в континуальную среду, в которой постепенно и последовательно на популяционном уровне совершались все молекулярные и генетические преобразования переходной формы по принципу мозаичной эволюции (рис. 1). Выявление этой среды создало условия для реконструкции быстрого “квантового” и в то же время постепенного, не сальтационного видообразования микроба *Y. pestis* [22, 60].

Обнаружение и описание переходной среды, с одной стороны, открывает широкие перспективы в решении проблемы происхождения чумы, позволяет выстроить логику постепенного преобразования генома умеренно патогенного псевдотуберкулезного микроба 1-го серотипа в геном высокопатогенного чумного микроба биовара *Antiqua* по мозаичному принципу и в соответствии с положениями СТЭ. Но с другой стороны, возникает

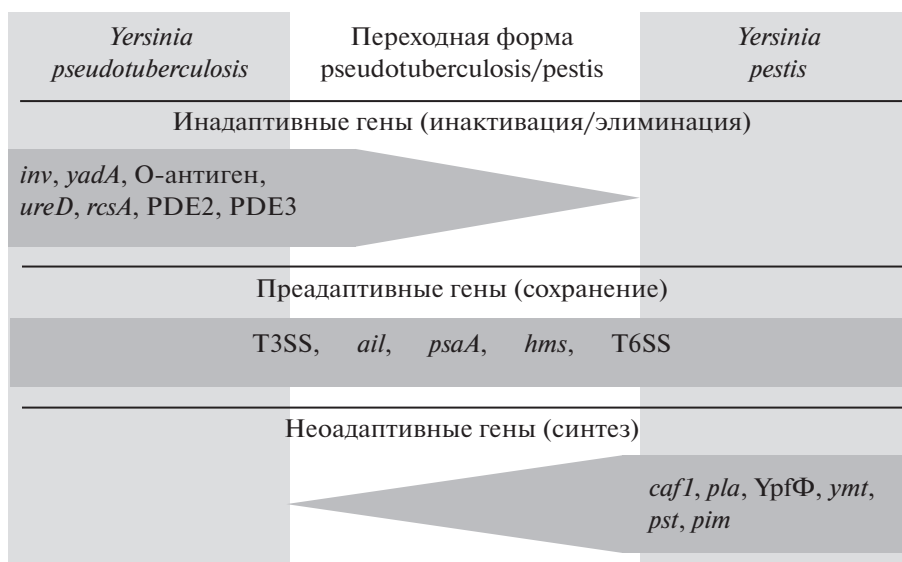


Рис. 1. Три составляющих геномогенеза микроба чумы *Yersinia pestis*, характеризующие мозаичное видообразование: инактивация/элиминация нефункциональных генов, сохранение активных генов и синтез новых генов. Генетическим новациям, приведшим к возникновению нового вида *Yersinia pestis*, была подвержена ныне вымершая переходная форма микроба *pseudotuberculosis/pestis*, существовавшая в промежуточной (переходной) среде.

необходимость радикальной коррекции МГ-филогений в соответствии с “экологической” филогенией [60]. А это не простое дело, так как в проблеме происхождения чумы МГ-исследователи сохраняют единодушие в ориентации на парадигму ГПГ в отношении специфических только для чумного микроба плазмид *rFga* и *rPst*. И в таком случае потребуется достаточно длительное время пока назреют фундаментальные, критические противоречия внутри МГ-подхода, которые вынудят обратиться за поддержкой к экологии. Будущий консенсус экологов, генетиков и молекулярных биологов (*eco-evo perspective*) в вопросах происхождения чумы будет означать рождение всесторонне обоснованной теории происхождения чумы и внесет бесценный вклад в выяснение генетических и молекулярных закономерностей формо- и видообразования не только возбудителя чумы, но и многих других патогенных микроорганизмов.

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.

Автор заявляет, что у него нет каких-либо конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Achtman M., Zurth K., Morelli G. et al. Yersinia pestis, the cause of plague, is a recently emerged clone of Yersinia pseudotuberculosis // PNAS. 1999. V. 96. № 24. P. 14043–14048. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.14043>*
2. *Achtman M., Morelli G., Zhu P. et al. Microevolution and history of the plague bacillus, Yersinia pestis // PNAS. 2004. V. 101. № 51. P. 17837–17842. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408026101>*
3. *Zhou D., Han Y., Song Y. et al. Comparative and evolutionary genomics of Yersinia pestis // Microb. Infection. 2004. V. 6. № 13. P. 1226–1234. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.08.002>*
4. *Morelli G., Song Y., Mazzoni C.J. et al. Yersinia pestis genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity // Nat. Genet. 2010. V. 42. № 12. P. 1140–1143. <https://doi.org/10.1038/ng.705>*
5. *Cui Y., Yu C., Yan Y. et al. Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, Yersinia pestis // PNAS. 2013. V. 110. № 2. P. 577–582. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205750110>*
6. *Valtueña A.A., Mittnik A., Key F.M. et al. The Stone Age Plague: 1000 years of Persistence in Eurasia. <https://doi.org/10.1101/094243>*
7. *Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Motin V.L. et al. Phylogeny and classification of Yersinia pestis through the lens of strains from the plague foci of commonwealth of independent states // Front. Microbiol. 2018. V. 9. Art. 1106. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01106>*
8. *Балахонов С.В., Ярыгина М.Б., Гладких А.С. и др. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов Yersinia pestis, выделенных на монгольской территории трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы // Проблемы особо опасных инфекций. 2019. № 3. С. 34–42. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2019-3-34-42>*
9. *Demeure C.E., Dussurget O., Foil G.M. et al. Yersinia pestis and plague: An updated on evolution, virulence determinants, immune subversion, vaccination, and diagnos-*

- tics // Genes and Immunity. 2019. V. 20. P. 357–370.
<https://doi.org/10.1038/s41435-019-0065-0>
10. Rascovan N., Sjogren K.-G., Kristiansen K. et al. Emergence and spread of basal lineages of *Yersinia pestis* during the neolithic decline // Cell. 2019. № 176. P. 295–305.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.005>
 11. Wang X., Zhou D., Qin L. et al. Genomic comparison of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* by combination of suppression subtractive hybridization and DNA microarray // Arch. Microbiol. 2006. V. 186. P. 151–159.
<https://doi.org/10.1007/s00203-006-0129-1>
 12. Анисимов Н.В., Кисличкина А.А., Платонов М.Е. и др. О происхождении гипервирулентности возбудителя чумы // Мед. паразитол. и паразитарн. болезни. 2016. № 1. С. 26–32.
 13. Cui Y., Song Y. Chapter 6. Genome and evolution of *Yersinia pestis* // *Yersinia pestis: Retrospective and Perspective Adv. Exper. Med. Biol.* / Eds Yang R., Anisimov A. Beijing: Springer Sci., 2016. P. 171–192.
 14. Spyrou M.A., Tukhbatova R.I., Wang C.C. et al. Analysis of 3800-year-old *Yersinia pestis* genomes suggests Bronze Age origin for bubonic plague // Nat. Commun. 2018. № 9. P. 1–10.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-04550-9>
 15. Hinnebusch B.J., Chouikha I., Sun Y.-C. Ecological opportunity, evolution, and the emergence of flea-borne plague // Inf. Immun. 2016. V. 84. № 7. P. 1932–1940.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00188-16>
 16. Сунцов В.В., Сунцова Н.И. Экологические аспекты эволюции микроба чумы *Yersinia pestis* и генезис природных очагов // Изв. РАН. Сер. биол. 2000. № 6. С. 645–657.
 17. Сунцов В.В., Сунцова Н.И. Чума. Происхождение и эволюция эпизоотической системы (экологические, географические и социальные аспекты). М.: КМК, 2006. 247 с.
 18. Сунцов В.В. Исключительная роль специфической блохи сурков *Oropsylla silantiewi* (Ceratophyllidae: Siphonaptera) в видообразовании возбудителя чумы – микроба *Yersinia pestis* // Паразитология. 2018. Т. 52. № 1. С. 3–18.
 19. Сунцов В.В. Перспективы синтеза молекулярно-генетического и экологического подходов к проблеме видообразования микроба чумы *Yersinia pestis* // Успехи соврем. биологии. 2020. Т. 140. № 1. С. 43–57.
<https://doi.org/10.31857/S0042132420010068>
 20. Сунцов В.В. Монгольский сурок-тарбаган (*Marmota sibirica*) как исходный хозяин микроба чумы *Yersinia pestis* // Байкальский зоол. журн. 2017. № 2(21). С. 129–137.
 21. Сунцов В.В. Происхождение чумы. Перспективы эколого-молекулярно-генетического синтеза // Вестник РАН. 2019. Т. 89. № 3. С. 260–269.
<https://doi.org/10.31857/S0869-5873893260-269>
 22. Сунцов В.В. Квантовое видообразование микроба чумы *Yersinia pestis* в гетероиммунной среде – популяциях гиберирующих монгольских сурков-тарбаганов (*Marmota sibirica*) // Сиб. экол. журн. 2018. № 4. С. 379–394.
<https://doi.org/10.15372/SEJ20180401>
 23. Тахтаджян А.Л. Об эволюционной гетерохронии признаков // Докл. АН АрмССР. 1946. Т. 5. № 3. С. 79–86.
 24. Beer G.R. de. *Archaeopteryx lithographica*. A Study Based upon the British Museum Specimen. London, 1954. 68 p.
 25. Riley M.A., Wertz J.E. Bacteriocins: evolution, ecology, and application // Annu. Rev. Microbiol. 2002. V. 56. P. 117–137.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.161024>
 26. McNally A., Thomson N.R., Reuter S., Wren B.W. “Add, stir and reduce”: *Yersinia* spp. as model bacteria for pathogen evolution // Nat. Rev. Microbiol. 2016. V. 14. № 3. P. 177–190.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.29>
 27. Hinnebusch B.J., Jarrett C.O., Bland D.M. “Fleaing” the plague: Adaptations of *Yersinia pestis* to its insect vector that lead to transmission // Annu. Rev. Microbiol. 2017. № 71. P. 215–232.
<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093521>
 28. Gu J., Neary J.L., Sanchez M. et al. Genome evolution and functional divergence in *Yersinia* // J. Exper. Zool. 2007. V. 308 B. № 1. P. 37–49.
<https://doi.org/10.1002/jez.b.21120>
 29. Chain P.S., Carniel E., Larimer F.W. et al. Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis* // PNAS. 2004. V. 101. № 38. P. 13826–13831.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0404012101>
 30. Tong Z., Zhou D., Song Y. et al. Pseudogene accumulation might promote the adaptive microevolution of *Yersinia pestis* // J. Med. Microbiol. 2005. № 54. P. 259–268.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.45752-0>
 31. Chouikha I., Sturdevant D.E., Jarrett C. et al. Differential gene expression patterns of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* during infection and biofilm formation in the flea digestive tract // mSystems. 2019. V. 4. № 1. E00217-18.
<https://doi.org/10.1128/mSystems.00217-18>
 32. Willcocks S.J., Stabler R.A., Atkins H.S. et al. High-throughput analysis of *Yersinia pseudotuberculosis* gene essentiality in optimised in vitro conditions, and implications for the speciation of *Yersinia pestis* // BMC Microbiol. 2018. V. 18. № 1. Art. 46.
<https://doi.org/10.1186/s12866-018-1189-5>
 33. Atkinson S., Williams P. *Yersinia* virulence factors – a sophisticated arsenal for combating host defences [version 1; referees: approved] // F1000Research. 2016. 5(F1000-Faculty Rev.): 1370.
<https://doi.org/10.12688/f1000research.8466.1>
 34. Ценева Г.Я., Солодовникова Н.Ю., Воскресенская Е.А. Молекулярные аспекты вирулентности иерсиний // Клин. микробиол. антимикроб. химиотерапия. 2002. Т. 4. № 3. С. 248–266.
 35. Fukuto H.S., Svetlanov A., Palmer L.E. et al. Global gene expression profiling of *Yersinia pestis* replicating inside macrophages reveals the role of a putative stress-

- induced operon in regulation type III secretion and intracellular cell division // *Inf. Immun.* 2010. V. 78. № 9. P. 3700–3715.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00062-10>
36. *Krukonis E.S., Thomsson J.J.* Complement evasion mechanisms of the systemic pathogens *Yersinia* and *Salmonellae* // *FEBS Lett.* 2020.
<https://doi.org/10.1002/1873-3468.13771>
 37. *Butler T., Fu Y.-S., Furman L. et al.* Experimental *Yersinia pestis* infection in rodents after intragastric inoculation and ingestion of bacteria // *Inf. Immun.* 1982. V. 36. № 3. P. 1160–1167.
 38. *Симпсон Дж.* Темпы и формы эволюции / Пер. с англ. М.: Иностран. лит-ра, 1948. 358 с.
 39. *Дубинин Н.П.* Эволюция популяций и радиация. М.: Атомиздат, 1966. 743 с.
 40. *Майр Э.* Популяции, виды и эволюция / Пер. с англ. М.: Мир, 1974. 460 с.
 41. *Clark M.A., Hirst B.H., Jepson M.A.* M-cell surface beta 1 integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells // *Inf. Immun.* 1998. V. 66. P. 1237–1243.
 42. *Шурыгина И.А., Малов И.В., Шурыгин М.Г.* Современные представления о факторах патогенности *Yersinia pseudotuberculosis* // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. 2005. № 6. С. 208–214.
 43. *Быков А.С., Караулов А.В., Цомартова Д.А. и др.* М-клетки — один из важных компонентов в инициации иммунного ответа в кишечнике // *Инфекция и иммунитет.* 2018. Т. 8. № 3. С. 263–272.
<https://doi.org/10.15789/2220-7619-2018-3-263-272>
 44. *Chauhan N., Wrobel A., Skurnik M., Leo J.C.* *Yersinia* adhesins: An arsenal for infection // *Proteomics Clin. Appl.* 2016. V. 10. P. 949–963.
<https://doi.org/10.1002/prca.201600012>
 45. *Tahir Y., Skurnik M.* YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesion // *Int. J. Med. Microbiol.* 2001. V. 291. № 3. P. 209–218.
<https://doi.org/10.1078/1438-4221-00119>
 46. *Muhlenkamp M., Oberhettinger P., Leo J.C. et al.* *Yersinia* adhesion A (YadA) — beauty and beast // *Int. J. Med. Microbiol.* 2015. V. 305. № 2. P. 252–258.
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.12.008>
 47. *Skurnik M., Peippo A., Ervela E.* Characterization of the O-antigen gene cluster of *Yersinia pseudotuberculosis* and the cryptic O-antigen gene cluster of *Yersinia pestis* shows that the plague bacillus is most closely related to and has evolved from *Y. pseudotuberculosis* serotype O:1b // *Mol. Microbiol.* 2000. V. 37. № 2. P. 316–330.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01993.x>
 48. *Kenyon J.J., Cunneen M.M., Reeves P.R.* Genetics and evolution of *Yersinia pseudotuberculosis* O-specific polysaccharides: a novel pattern of O-antigen diversity // *FEMS Microbiol. Rev.* 2017. № 41. P. 200–217.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fux002>
 49. *Kukkonen M., Suomalainen M., Kyllonen P. et al.* Lack of O-antigen is essential for plasminogen activation by *Yersinia pestis* and *Salmonella enterica* // *Mol. Microbiol.* 2004. V. 51. № 1. P. 215–225.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03817.x>
 50. *Zhou D., Han Y., Yang R.* Molecular and physiological insights into plague transmission, virulence and etiology // *Microbes and Infection.* 2006. № 8. P. 273–284.
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.06.006>
 51. *Ерошенко Г.А., Одиноков Г.Н., Куклева Л.М. и др.* Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности генов *yadA*, *inv* и *ail* и их экспрессия в штаммах *Yersinia pestis* основного и неосновных подвидов и *Yersinia pseudotuberculosis* // *Генетика.* 2010. Т. 46. № 6. С. 734–742.
 52. *Felek S., Tsang T.M., Krukonis E.S.* Three *Yersinia pestis* adhesins facilitate yop delivery to eukaryotic cells and contribute to plague virulence // *Inf. Immun.* 2010. V. 78. № 10. P. 4134–4150.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00167-10>
 53. *Ke Y., Chen Z., Yang R.* *Yersinia pestis*: mechanisms of entry into and resistance to the host cell // *Front. Cell. Inf. Microbiol.* 2013. V. 3. Art. 106.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00106>
 54. *Kolodziejek A.M., Hovde C.J., Minnich S.A.* *Yersinia pestis* Ail: multiple roles of a single protein // *Front. Cell. Inf. Microbiol.* 2012. V. 2. Art. 103.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00103>
 55. *Thomson J.J., Plecha S.C., Krukonis E.S.* Ail provides multiple mechanisms of serum resistance to *Yersinia pestis* // *Mol. Microbiol.* 2019. V. 111. № 1. P. 82–95.
<https://doi.org/10.1111/mmi.14140>
 56. *Pujol C., Bliska J.B.* The ability to replicate in macrophages is conserved between *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* // *Inf. Immun.* 2003. V. 71. № 10. P. 5892–5899.
<https://doi.org/10.1128/IAI.71.10.5892-5899.2003>
 57. *Perry R.D., Fetherston J.D.* *Yersinia pestis* — etiologic agent of plague // *Clin. Microbiol. Rev.* 1997. V. 10. № 1. P. 35–66.
 58. *Евсеева В.В., Платонов М.Е., Копылов П.Х. и др.* Активатор плазмидогена чумного микроба // *Инфекция и иммунитет.* 2015. Т. 5. № 1. С. 27–36.
<https://doi.org/10.15789/2220-7619-2015-1-27-36>
 59. *Куклева Л.М., Бойко А.В.* Активатор плазмидогена — многофункциональный белок возбудителя чумы // *Проблемы особо опасных инф.* 2016. № 3. С. 13–20.
<https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-3-13-20>
 60. *Сунцов В.В.* Гостальный аспект территориальной экспансии микроба чумы *Yersinia pestis* из популяций монгольского сурка-гарбагана (*Marmota sibirica*) // *Зоол. журн.* 2020. Т. 99. № 11. С. 1307–1320.
<https://doi.org/10.31857/S0044513420090160>
 61. *Derbise A., Chenal-Francois V., Pouillot F. et al.* A horizontally acquired filamentous phage contributes to the pathogenicity of the plague bacillus // *Mol. Microbiol.* 2007. V. 63. № 4. P. 1145–1157.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05570.x>
 62. *Zhao X., Skurnik M.* Chapter 13. Bacteriophages of *Yersinia pestis* // *Yersinia pestis*: Retrospective and Perspective. Adv. Exper. Med. Biol. / Eds Yang R., Anisimov A. Springer, 2016. P. 361–375.
 63. *Koskela K.A., Mattinen L., Kalin-Manttari L. et al.* Generation of a CRISPR database for *Yersinia pseudo-*

- tuberculosis* complex and role of CRISPR-based immunity in conjugation // Environ. Microbiol. 2015. V. 17. № 11. P. 4306–4321.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.12816>
64. Chouikha I., Hinnebusch B.J. *Yersinia*–flea interactins and the evolution of the arthropod-borne transmission route of plague // Curr. Opin. Microbiol. 2012. V. 15. P. 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.02.003>
65. Бибикова В.А., Классовский Л.Н. Передача чумы блохами. М.: Медицина, 1974. 186 с.
66. Williams S.K., Schotthoeffer A.M., Monteneri J.A. et al. Effects of low-temperature flea maintenance on the transmission of *Yersinia pestis* by *Oropsylla montana* // Vector-Borne and Zoonotic Dis. 2013. V. 13. № 10. P. 1–11.
<https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1017>
67. Hinnebusch B.J., Bland D.M., Bosio C.F., Jarrett C.O. Comparative ability of *Oropsylla montana* and *Xenopsylla cheopis* fleas to transmit *Yersinia pestis* by two different mechanisms // PLoS Negl. Trop. Dis. 2017. V. 11. № 1. e0005276.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005276>
68. Ващенко В.С. Блохи (Siphonaptera) – переносчики возбудителей болезней человека и животных. ЗИИ АН СССР. Л.: Наука, 1988. 161 с.
69. Сунцов В.В. Исключительная роль специфической блохи сурков *Oropsylla silantiewi* (Ceratophyllidae, Siphonaptera) в видообразовании возбудителя чумы – микроба *Yersinia pestis* // Паразитология. 2018. Т. 2. № 1. С. 3–18.
70. Sebbane F., Devalckenaere A., Foulon J. et al. Silencing and reactivation of urease in *Yersinia pestis* is determined by one g residue at a specific position in the ureD gene // Inf. Immun. 2001. V. 69. № 1. P. 170–176.
<https://doi.org/10.1128/IAI.69.1.170-176.2001>
71. Chouikha I., Hinnebusch B.J. Silencing urease: A key evolutionary step that facilitate the adaptation of *Yersinia pestis* the flea-borne transmission route // PNAS. 2014. № 111. P. 18709–18714.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1413209111>
72. Sun Y.C., Hinnebusch B.J., Darby C. Experimental evidence for negative selection in the evolution of a *Yersinia pestis* pseudogene // PNAS. 2008. V. 105. № 23. P. 8097–8101.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0803525105>
73. Zhou D., Yang R. Formation and regulation of *Yersinia* biofilms // Protein and Cell. 2011. V. 2. № 3. P. 173–179.
<https://doi.org/10.1007/s13238-011-1024-3>
74. Bliven K.A., Maurelli A.T. Antivirulence genes: Insights into pathogen evolution through gene loss // Inf. Immun. 2012. V. 80. № 12. P. 4061–4070.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00740-12>
75. Sun Y.-C., Jarrett C.O., Bosio C.F., Hinnebusch B.J. Retracing the evolutionary path that led to flea-borne transmission of *Yersinia pestis* // Cell Host Microbe. 2014. V. 15. P. 578–586.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.04.003>
76. Куклева Л.М., Ерошенко Г.А., Видяева Н.И., Кутырев В.В. Бактериальная биопленка и особенности ее образования у возбудителя чумы и других патогенных иерсиний // Пробл. особо опасных инфекций. 2011. № 110. С. 5–11.
77. Hinnebusch B.J. The evolution of flea-borne transmission in *Yersinia pestis* // Curr. Issues Mol. Biol. 2005. V. 7. № 2. P. 197–212.
78. Hinnebusch B.J., Erickson D.L. *Yersinia pestis* biofilm in the flea vector and its role in the transmission of plague // Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2008. № 322. P. 229–248.
79. West S.A., Diggle S.P., Buckling A. et al. The social lives of microbes // Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 2007. V. 38. P. 53–77.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095740>
80. Jani A.J., Cotter P.A. Type VI secretion: not just for pathogenesis anymore // Cell Host Microbe. 2010. № 8. P. 2–6.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.06.012>
81. Schwarz S., Hood R.D., Mougous J.D. What is type VI secretion doing in all those bugs? // Trends Microbiol. 2010. № 18. P. 531–537.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.09.001>
82. Podladchikova O., Antonenka U., Heesemann J., Rakin A. *Yersinia pestis* autoagglutination factor is a component of the type six secretion system // Int. J. Med. Microbiol. 2011. № 301. P. 562–569.
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.03.004>
83. Yang X., Pan J., Wang Y., Shen X. Type VI secretion systems present new insights on pathogenic *Yersinia* // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2018. № 8. Art. 260.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00260>
84. Patzer S.I., Albrecht R., Braun V., Zeth K. Structural and mechanistic studies of pesticin, a bacterial homolog of phage lysozymes // J. Biol. Chemistry. 2012. V. 287. № 28. P. 23381–23396.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.362913>
85. Howard S.L., Strong P.C.R., Wren B.W. The three bears and virulence-associated plasmids in the genus *Yersinia* // Microbial. Megaplasmids. Microbiology Monographs / Ed. Schwartz E. Berlin; Heidelberg: Springer, 2009. V. 11. P. 171–186.
86. Литвин В.Ю. Сапронозные аспекты энзоотии чумы // Успехи соврем. биологии. 2003. Т. 123. № 6. С. 543–551.
87. Кутырев В.В., Ерошенко Г.А., Попов Н.В. и др. Молекулярные механизмы взаимодействия возбудителя чумы с беспозвоночными животными // Мол. генетика, микробиология, вирусология. 2009. № 4. С. 6–13.
88. Easterday W.R., Kausrud K.L., Star B. et al. An additional step in the transmission of *Yersinia pestis*? // ISME J. 2012. V. 6. P. 231–236.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2011.105>

Genomogenesis of the Plague Microbe *Yersinia pestis* as Related to the Process of Mosaic Evolution

V. V. Suntsov*

Severtsov Institute of Ecology and Evolution of Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

**e-mail: vvsuntsov@rambler.ru*

The basic methodological principle of the modern molecular genetic approach to the problem of speciation of the plague microbe *Yersinia pestis* is the saltationist paradigm of horizontal gene transfer. It assumes the insertion into the genome of the ancestral pseudotuberculosis microbe *Y. pseudotuberculosis* O:1b of two plague-specific plasmids, virulence pFra and pPst, as well as inactivation/deletion of genes that have lost their functions. An alternative ecological approach suggests the “Darwinian” mechanism for the formation of the plague microbe genome in the temperature-continuum (5–37°C) environment of the Mongolian marmot–marmot flea (*Marmota sibirica*–*Oropsylla silantiewi*) system, which exhibits intermediate properties between the habitats of the ancestral and derived species. The ecological scenario of the origin of the plague explains the evolutionary fate of 18 well-studied plague microbe genes and gene structures. It was shown that the gradual transformation of the genome of the pseudotuberculosis microbe into the genome of the plague pathogen occurred according to the principle of mosaic evolution and corresponded to three forms of adaptation: in-adaptation, pre-adaptation and neo-adaptation. The prospect of developing the theory of the origin of the plague is seen in the synthesis of molecular genetic and ecological approaches.

Keywords: genome, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia pestis*, transitional forms, speciation, mosaic evolution, *Marmota sibirica*.

ФОСФАТАЗА Pph3 ВОВЛЕЧЕНА В РЕГУЛЯЦИЮ БЕЗОШИБОЧНОЙ ВЕТВИ ПОСТРЕПЛИКАТИВНОЙ РЕПАРАЦИИ В ДРОЖЖАХ *Saccharomyces cerevisiae*

© 2021 г. Д. В. Федоров¹, Т. А. Евстюхина¹, В. Т. Пешехонов¹, В. Г. Королев^{1, *}

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

*e-mail: korolev_vg@pnpi.nrcki.ru

Поступила в редакцию 18.02.2020 г.

После доработки 03.04.2020 г.

Принята к публикации 08.07.2020 г.

Фосфатазный комплекс РРН3 состоит из трех субъединиц: каталитической Ррh3 и вспомогательных Ррh2 и Рsy4. Ррh3 также образует двойной комплекс с субъединицей Рsy2, который связывается с киназой Rad53 и дефосфорилирует ее без привлечения третьей субъединицы. Тройной комплекс дефосфорилирует γ H2A. Ранее мы показали, что ген *HSM6* соответствует гену *PSY4* на генетической карте *Saccharomyces cerevisiae*. Мутация *hsm6-1* повышает скорость спонтанного и частоту УФ-индуцированного мутагенеза. В настоящей работе мы показали, что мутации в гене *PPH3* увеличивают скорость спонтанного репаративного мутагенеза в 7 раз, при этом мутации *pph3Δ* и *hsm6-1* эпистатируют. При высоких дозах частота УФ-индуцированных мутаций у мутантов *pph3Δ*, *psy4Δ* и *hsm6-1* одинакова и превышает уровень мутагенеза в штамме дикого типа приблизительно двукратно. Все мутанты показывают более высокую (примерно 10-кратную) частоту γ -индуцированных мутаций по сравнению со штаммом дикого типа. Объединение мутаций в генах, кодирующих субъединицы РРН3, и мутаций в *MMS2* и *XRS2*, контролирующими безошибочный путь пострепликативной репарации, приводит к блокированию РРН3-специфического УФ-индуцированного мутагенеза. Таким образом, мы идентифицировали комплекс РРН3 в качестве нового фактора, вовлеченного в регуляцию безошибочной ветви пострепликативной репарации. Двойной мутант по генам *PTC2* и *PTC3*, кодирующим две другие фосфатазы, дефосфорилирующие Rad53, не отличается от штамма дикого типа в отношении УФ-индуцированного мутагенеза и выживаемости. Это означает, что гиперфосфорилирование только Ррh3-специфических сайтов белка Rad53 и гистона H2A увеличивает уровень УФ-мутагенеза.

Ключевые слова: фосфатаза Ррh3, репарация ДНК, дрожжи, толерантность, безошибочная ветвь репарации, мутагенез.

DOI: 10.31857/S0016675821010069

Стабильность геномной ДНК поддерживается в течение всего жизненного цикла клетки. Однако различные нарушения ее первичной структуры, индуцированные как в процессе нормального клеточного метаболизма, так и в ответ на факторы окружающей среды, возникают непрерывно. Повреждения структуры ДНК могут приводить к смерти клетки (летальные повреждения) или к генерации мутаций. Мутации являются первичной причиной наследственных болезней и рака, а также вносят вклад в процесс старения [1].

Хотя клетки содержат множество очень сложных систем для точного восстановления ДНК до ее первоначальной последовательности и структуры, иногда требуются механизмы, способные временно обеспечивать переносимость повреждения ДНК без посредничества репарации. Эти механизмы

толерантности способствуют выживанию после повреждения ДНК, а в некоторых ситуациях также активно способствуют возникновению мутаций. Толерантность к повреждению ДНК (tolerance to DNA damage – TDD) исторически называли пострепликативной репарацией (ПРР) из-за наблюдения, что обработка почкующихся дрожжевых клеток УФ-излучением вызывала одностранные (ОН) бреши в реплицирующейся ДНК [1]. УФ-индуцированные димеры пиримидинов, вызывающие ОН бреши в ДНК, часто сохранялись после “репарации”, что указывает на то, что ПРР просто обходит повреждение без его удаления [2]. Два различных пути TDD, ошибочный и безошибочный, действуют во всех эукариотических организмах [3]. Ошибочный путь TDD опосредуется синтезом через повреждения (TLS), в то время

как в безошибочном TDD одна вновь синтезированная нить служит матрицей для репликации другой заблокированной нити [4, 5]. Выбор между этими путями TDD имеет серьезные последствия для стабильности генома.

Клетки, дефектные в безошибочном пути TDD, характеризуются более выраженной зависимостью от TLS, демонстрируя более высокие уровни спонтанного мутагенеза и повышенную чувствительность к повреждению после инактивации компонентов ошибочной TDD [6]. Примечательно, что мутации в безошибочном пути придают большую чувствительность к ДНК-повреждающим агентам, чем мутации в пути TLS [7].

Эукариотические клетки имеют специализированный ответ на повреждение ДНК, называемый “чекпойнтом”, который задерживает развитие клеточного цикла и способствует репарации поврежденной ДНК. Активация чекпойнта осуществляется каскадом фосфорилирования белков и иницируется в клетках дрожжей двумя протеинкиназами, Mec1 и Tel1 [8]. Эти киназы фосфорилируют белки медиаторы чекпойнта, Rad53 и Rad9, а также гистон H2A [9, 10]. В настоящее время достигнут значительный прогресс в понимании иницирования и хода процесса чекпойнта. Однако о механизмах его прекращения известно мало. Поскольку Ser/Thr киназы (STK) играют центральную роль в инициации чекпойнта, вполне вероятно, что Ser/Thr фосфатазы (STP) должны быть вовлечены в его завершение. Процесс прекращения действия чекпойнта важен для повторной инициации репликации ДНК и выживания клеток. Этот процесс требует дефосфорилирования Rad53 и γ H2A. Было показано, что некоторые фосфатазы специфически продуцируют различные формы модификаций Rad53, которые необходимы для адекватного ответа на определенные повреждения ДНК [11].

В клетках дрожжей фосфатаза Pph3 участвует в дефосфорилировании ключевой чекпойнтной киназы Rad53 [12]. Pph3 образует комплекс с субъединицей Psy2, который связывается с киназой Rad53 и дефосфорилирует ее без участия третьей субъединицы. Другой комплекс, состоящий из трех субъединиц Pph3–Psy2–Psy4, дефосфорилирует γ H2A [13].

Ранее было обнаружено, что STP Pph3, Ptc2 и Ptc3 *S. cerevisiae* важны для дефосфорилирования Rad53 и, следовательно, для его дезактивации во время восстановления от воздействия MMS [14, 15]. FHA1-домен Rad53 взаимодействует со специфическим треонином Ptc2 [16]. Сверхэкспрессия Ptc2 индуцирует чувствительность к УФ и оксимочевине (HU) и летальна для мутантов *rad53*, *mec1* и *dun1* с низкой активностью рибонуклеотид-редуктазы. С другой стороны, делеция *PTC2* специфически подавляет гиперчувствительность *mec1* к

HU [17]. Предполагается, что Ptc2 и Ptc3 дефосфорилируют Rad53 конститутивно, и инактивация этого белка происходит после завершения репарации, что сопровождается снижением активности Mec1 [18].

Ранее нами был выделен мутантный штамм *S. cerevisiae hsm6-1*, характеризующийся повышенной скоростью спонтанного мутагенеза [19]. Эпистатический анализ показал, что мутация *hsm6-1* представляет собой аллель гена *PSY4*. Секвенирование мутантного аллеля *hsm6-1* выявило мутацию сдвига рамки считывания, которая вызвала замену Lys218Glu и генерацию стоп-кодона в следующей позиции. Точечная мутация *hsm6-1* имеет более выраженный фенотип по сравнению с делеционной мутацией *psy4Δ*. На основании полученных данных было сделано заключение, что ген *PSY4* играет ключевую роль в регуляции выхода клеток из чекпойнта, вызванного повреждением ДНК [20]. Полученные в настоящей работе результаты подтверждают это заключение.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы дрожжей и питательные среды

Штаммы дрожжей *S. cerevisiae*, использованные в настоящем исследовании, перечислены в табл. 1. Для роста культуры и регистрации выживания использовали полную среду [21]. Спиртосодержащую среду использовали в исследованиях УФ-индуцированного мутагенеза [22]. Спонтанные мутации устойчивости к канаванину (CanS → CanR) регистрировали с использованием минимальной среды со стандартными добавками и 50 мг/мл канаванина.

Мутагены

Источником ультрафиолетового света была лампа БУВ-30Е с мощностью дозы 1.4 Дж/м² с. Аппарат “Исследователь” с мощностью дозы 180 Гр/мин служил источником γ -лучей. Обработку дрожжей УФ-лучами и γ -лучами проводили как описано ранее [22].

Методы определения частоты мутаций

Чувствительность к летальному воздействию ультрафиолетового излучения и γ -лучей определяли, используя кривые выживаемости. Чувствительность к мутагенному действию ультрафиолетового и γ -лучей была зарегистрирована индукцией прямых мутаций в пяти локусах, контролирующих синтез аденина, *ADE4–ADE8* [23]. Спонтанный мутагенез определяли с использованием стандартного метода медиан (флуктуационный тест), который регистрирует в основном ошибки репликации [24]. В других экспериментах скорость

Таблица 1. Штаммы дрожжей, используемые в работе

Штамм	Генотип	Происхождение
11D-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1</i>	[26]
6B-SVK-312	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 hsm6-1</i>	[20]
KFY-1073	<i>MATα ura3Δ leu2-his3-1 met15Δ pph3Δ::KanMX</i>	Настоящая работа
60-TAE-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 psy4::NAT</i>	[20]
62-TAE-3032	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 pph3::KanMX</i>	Настоящая работа
63-TAE-3033	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 hsm6-1 pph3::KanMX</i>	»
23-DVF-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 ptc2::NAT ptc3::KanMX</i>	»
24-DVF-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 mms2::KanMX</i>	»
25-DVF-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 pph3::KanMX mms2::KanMX</i>	Настоящая работа
26-DVF-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 xrs2::URA3</i>	[27]
27-DVF-3031	<i>MATα ade2Δ-248 ura3-160, 188 leu2-3, 112 trp1 hsm6-1 xrs2::URA3</i>	Настоящая работа

спонтанных мутаций устойчивости к канаванину оценивали по методу упорядоченного посева Хромова-Борисова [25]. Этот метод позволяет измерять скорость репаративного мутагенеза. В этих экспериментах тестируемые дрожжевые культуры выращивали на чашках с полной средой в течение суток. Затем готовили 5 мл суспензии (10⁶ клеток/мл). Специальный репликатор на 150 штырей был погружен в эту суспензию и перенесен на чашку Петри со средой, содержащей канаванин. Репликатор переносил 150 равных капель дрожжевой суспензии (около 2 мкл каждая) на равных расстояниях друг от друга, каждая капля содержала приблизительно 2000 клеток. Концентрация канаванина для оценки скорости мутаций устойчивости к антибиотику была определена в специальных предварительных экспериментах для всех штаммов и составила 50 мг/л. Мутанты имеют более быстрый рост, который проявляется в виде “бородавок” на пятнах с ограниченным ростом исследуемой культуры. После 14–15 дней инкубации подсчитывали бородавки мутантов, устойчивых к канаванину, и общее количество клеток. Последнее было сделано после смыва клеток с ряда реплик капель, лишенных бородавок. Частоты мутаций на одно деление клеток определяли путем деления числа бородавок на общее количество клеток на чашке. Результаты представлены как средние значения 3–5 независимых экспериментов с 95%-ным доверительными интервалами.

Конструирование штаммов

Для разрушения открытой рамки считывания гена *PPH3* (*YDR075W*) клетки штамма дрожжей дикого типа (11D-3031) (табл. 1) трансформировали фрагментом ДНК, содержащим маркер *KanMX*, с фланкирующими 22-нуклеотидными последовательностями, гомологичными флангам гена *PPH3*. Фрагмент генерировали путем ПЦР-ам-

плификации с праймерами Pph3-1 и Pph3-2 и ДНК, выделенной из штамма KFY-1073 в качестве матрицы. Последовательности ДНК всех использованных в настоящей работе праймеров приведены в табл. 2. Трансформанты с делецией гена *PPH3* отбирали по их устойчивости к G418 с использованием полной среды, содержащей G418 в концентрации 200 мкг/мл. Разрушение гена *PPH3* было подтверждено с помощью ПЦР.

Для получения одиночного *mms2Δ* и двойного *hsm6-1 mms2Δ* мутантов клетки штамма дикого типа 11D-3031 (табл. 1) и мутанта *hsm6-1* 6B-SVK-312 (табл. 1) трансформировали фрагментом ДНК, содержащим кассету *KanMX4* с фланкирующими 70-нуклеотидными последовательностями, гомологичными флангам гена *MMS2*. Фрагмент получали посредством ПЦР-амплификации плазмиды pFLA6A-KanMX4 с праймерами *MMS2_L* и *MMS2_R*. Трансформанты также отбирали по их устойчивости к G418 описанным выше способом. Полное замещение гена *MMS2* в полученных штаммах было подтверждено с помощью ПЦР.

Для получения двойного мутанта *ptc2Δ ptc3Δ* клетки штамма дикого типа трансформировали фрагментом ДНК, содержащим кассету *natMX6* с фланкирующими 70-нуклеотидными последовательностями, гомологичными флангам гена *PTC2*. Фрагмент получали путем ПЦР-амплификации плазмиды PFLA6A-natMX6 с праймерами *PTC2_L* и *PTC2_R*. Трансформантов отбирали по их устойчивости к нурсеотрицину на полной среде, содержащей clonNAT в концентрации 30 мг/л. Далее клетки полученного штамма трансформировали фрагментом ДНК, содержащим кассету *kanMX4* с фланкирующими 70-нуклеотидными последовательностями, гомологичными флангам гена *PTC3*. Фрагмент получали с помощью ПЦР-амплификации плазмиды PFLA6A-kanMX4 с праймерами *PTC3_L* и *PTC3_R*. Трансформантов отбирали по их устойчивости к геницину на

Таблица 2. Праймеры, использованные в работе

Название	Последовательность
Pph3-1	5'-GTCAATATGTGGTGTTCGACG-3'
Pph3-2	5'-СТААТCCTGTGATGCCGCTACT-3'
MMS2_L	5'-TCGATGTCGTGGTGAААТТCТТАТТCТGTATATGCAACGТАGААGААAGCAGCGТТТАСАСАА АААТGTCGCTTCGTACGCTGCAGGTСG-3'
MMS2_R	5'-TTGGAATGCTGCAAАТACTGTTTAGGААААAGTAGATAACTAAАAGTTTCTCCTTCCTTCGG TTGACGCGCATAGGCCACTAGTGGATC-3'
PTC2_L	5'-CCTCCCCACGGAATAAACTACAACAAGTTCTGTТАТCAAGGACAATTAGTGT ATATTAGTTGTTGTAACGCTTCGTACGCTGCAGGTСG-3'
PTC2_R	5'-GGTAGTGGTGTATGCTCTTGGTTCTGGTGGTGTCTTGCCTTCTCTTTCTTTCTGT TCGTTCGGTTCCGCATAGGCCACTAGTGGATC-3'

полной среде, содержащей G418 в концентрации 300 мг/л. Разрушение генов *PTC2* и *PTC3* в полученном штамме было подтверждено при помощи ПЦР.

Двойной мутант *hsm6-1 xrs2Δ* был получен путем трансформации клеток штамма *hsm6-1* 6B-SVK-312 (табл. 1) фрагментом ДНК, полученным в результате рестрикции плазмиды pE139 по сайтам *Bam*HI и *Hind*III. Трансформантов отбирали на селективной среде без урцила.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние мутации *pph3Δ* на спонтанный мутагенез

Известно, что клетки *pph3Δ* показывают гиперчувствительность к репликативному стрессу, индуцированному ДНК-алкилирующим агентом MMS. Более того, при воздействии MMS клетки мутанта *pph3Δ* показывают гиперактивацию белка Rad53, задержку входа в S-фазу клеточного цикла и проявляют ухудшение процессинга объединенных хромосомных структур [28]. Эти результаты показывают, что наблюдаемые дефекты являются следствием ухудшения регуляции активации белка Rad53.

Для лучшего понимания функции субъединиц комплекса РРН3 мы проанализировали генетические свойства клеток, мутантных по гену *PPH3*. Флуктуационный тест медиан [24] и метод упорядоченного посева [25] были использованы для определения скорости спонтанных мутаций устойчивости к канаванину у мутанта *pph3Δ*. Ранее мы показали, что скорость спонтанных мутаций, измеренная флуктуационным тестом, в одноклеточном *psy4Δ* не отличалась от скорости в клетках дикого типа: $(3.8 \pm 1.1) \times 10^{-7}$ и $(3.2 \pm 0.6) \times 10^{-7}$ соответственно. В то же время мутация *hsm6-1* увеличивает скорость спонтанного мутагенеза более чем в 5 раз [20]. Измеренная нами скорость репликативных мутаций в мутанте *pph3Δ* не отличалась от скорости в клетках дикого типа — $(3.8 \pm$

$\pm 1.14) \times 10^{-7}$. С другой стороны, метод упорядоченного посева показывает значительные различия между мутантами и штаммом дикого типа: wt — $(3.2 \pm 0.62) \times 10^{-7}$, *psy4Δ* — $(10.2 \pm 2.64) \times 10^{-7}$, *hsm6-1* — $(34.4 \pm 4.2) \times 10^{-7}$ [20], *pph3Δ* — $(52.7 \pm \pm 6.04) \times 10^{-7}$, *hsm6-1 pph3Δ* — $(58.5 \pm 7.04) \times 10^{-7}$. Эти результаты показывают, что мутации *psy4Δ* и *pph3Δ* не изменяют скорости репликативного мутагенеза, но они значительно увеличивают скорость репаративного мутагенеза. К тому же инактивация гена *PSY4* увеличивает скорость репаративного мутагенеза в значительно меньшей степени, чем инактивация гена *PPH3*, что подтверждает разное влияние этих мутаций на репарационные процессы.

Эффект мутаций *pph3Δ* и *hsm6 pph3Δ* на УФ-индуцированный мутагенез и выживаемость

Мутации ряда генов, контролирующих репарацию предмутационных повреждений ДНК, показывают спонтанный мутаторный фенотип и в то же время такие мутанты могут быть чувствительными к летальному и мутагенному действию различных мутагенов. Ранее мы показали, что мутация *psy4Δ* не влияет на УФ-чувствительность клеток дрожжей и слабо повышает уровень УФ-индуцированного мутагенеза [20]. В связи с этим мы измерили выживаемость и частоту мутаций *ade4-ade8* в изучаемых штаммах при УФ-облучении. Одиноклеточный мутант *psy4Δ* не отличается по УФ-чувствительности от штамма дикого типа. В то же время мутант *hsm6-1* показал заметно большую УФ-чувствительность по сравнению со штаммом дикого типа [20]. Мутанты *hsm6-1*, *pph3Δ* и двойной *pph3Δ hsm6-1* показали примерно одинаковую УФ-чувствительность (рис. 1, а).

Так как генетические эффекты мутации *pph3* не были изучены в деталях, мы определили влияние делеции гена *PPH3* на УФ-индуцированный мутагенез. Частота прямых мутаций в генах *ADE4-ADE8* при УФ-облучении была оценена в клетках дикого типа и мутантах *hsm6-1*, *pph3Δ* и

pph3Δ hsm6-1 (рис. 1,б). Представленные кривые индуцированного мутагенеза показывают, что при низких дозах облучения частота мутаций в клетках дикого типа, мутантах *pph3Δ* и *pph3Δ hsm6-1* была одинакова и значительно ниже (~в 3 раза) по сравнению с одиночным мутантом *hsm6-1*. При высоких дозах частота мутаций во всех трех мутантных штаммах была одинакова и превышала уровень мутагенеза в клетках дикого типа примерно вдвое. Таким образом, мутация *hsm6-1* проявляет значительно более выраженный эффект по сравнению с делецией всего гена, в то же время мутация *pph3Δ* полностью эпистатирует к мутации *hsm6-1*.

Выживаемость и мутагенез у мутантов hsm6-1, psy4, pph3Δ и pph3Δ hsm6-1 при γ-облучении

Для индукции двунитевых разрывов (ДНР) ДНК мы использовали γ-лучи. Данные по сравнению выживаемости штамма дикого типа и мутантов *hsm6-1*, *psy4*, *pph3Δ* и *pph3Δ hsm6-1*, полученные в количественном тесте, представлены на рис. 2,а. Из этого рисунка видно, что существенных различий в γ-чувствительности штамма дикого типа и мутантов не наблюдается. Более того, почкующиеся клетки всех штаммов, инактивация которых характеризуется пологим участком кривой инактивации, показали одинаковую чувствительность. Возможно, небольшие различия в первоначальном наклоне кривых выживаемости объясняются различным соотношением доли почкующихся клеток в облучаемых культурах.

Частота прямых мутаций в генах *ADE4–ADE8* была оценена после γ-облучения в штамме дикого типа и мутантах *hsm6-1*, *psy4Δ*, *pph3Δ* и *pph3Δ hsm6-1* (рис. 2,б). Все мутанты проявили более высокую частоту γ-индуцированного мутагенеза по сравнению со штаммом дикого типа. Следует отметить, что различие в частоте мутаций между штаммом дикого типа и мутантами было значительно больше, чем при УФ-облучении.

Эффект УФ-облучения на выживаемость и мутагенез у двойного мутанта ptc2Δ ptc3Δ

Ptc2 и Ptc3 были первыми протеинфосфатазами, для которых показано влияние на дезактивацию чекпойнта, индуцированного повреждением ДНК [14]. Клетки, потерявшие все три фосфатазы Pph3, Ptc2 и Ptc3, проявляют синергическую чувствительность к ДНК-повреждающим агентам камптотетину, NU и MMS, но не к УФ-лучам [29]. Для изучения вовлеченности фосфатаз Ptc2 и Ptc3 в УФ-индуцированный мутагенез мы создали мутантные клетки, потерявшие гены *PTC2* и *PTC3*. Вначале мы тестировали выживаемость мутанта *ptc2 ptc3* после УФ-облучения. Как видно из рис. 3, клетки двойного мутанта не показали

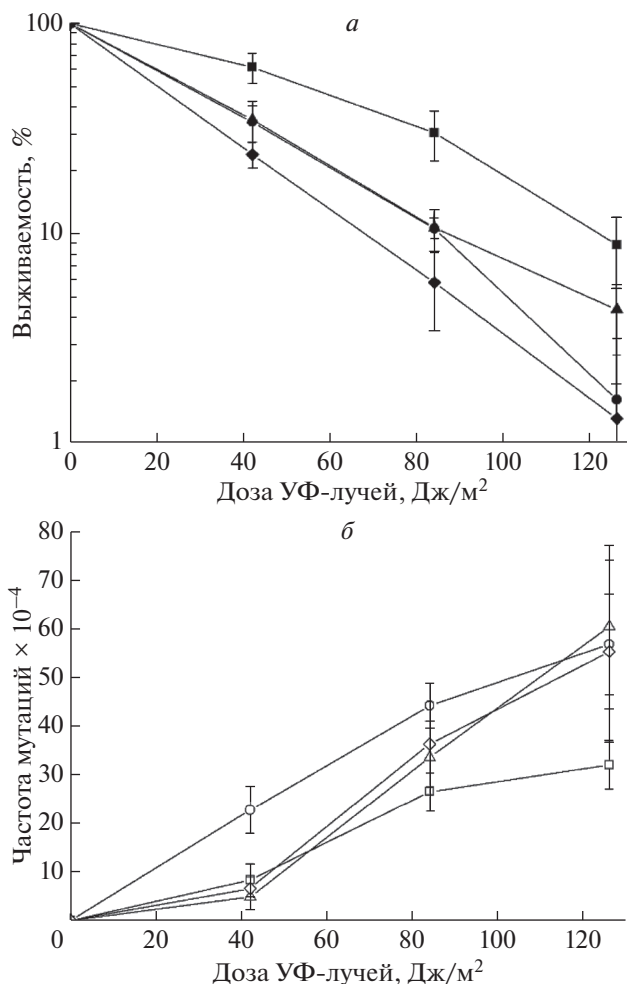


Рис. 1. Выживаемость (а) и частота мутаций по пяти локусам *ADE4–ADE8* (б) при действии разных доз УФ на клетки дрожжей: штамм дикого типа (■, □), мутант *pph3::KanMX* (●, ○), мутант *hsm6-1* (▲, △), двойной мутант *hsm6-1 pph3::KanMX* (◆, ◇).

повышенной чувствительности по сравнению с клетками дикого типа. УФ-индуцированный мутагенез в этих штаммах также оказался одинаковым (рис. 3). Таким образом, гиперфосфорилирование Ptc2/3-зависимых сайтов белка Rad53 не влияет на УФ-индуцированный мутагенез и выживаемость клеток дрожжей.

Белковый комплекс PPH3 вовлечен в регуляцию безошибочной ветви ПРР

Ранее мы сообщали, что мутация *hsm6-1* увеличивает частоту УФ-индуцированного мутагенеза и снижает уровень УФ-индуцированного митотического кроссинговера в области между центромером и геном *ADE2*. Мутант *hsm6* показывает увеличенную скорость спонтанного и УФ-индуцированного мутагенеза, при этом увеличение сильно зависит от гена *REV3*, кодирующего спе-

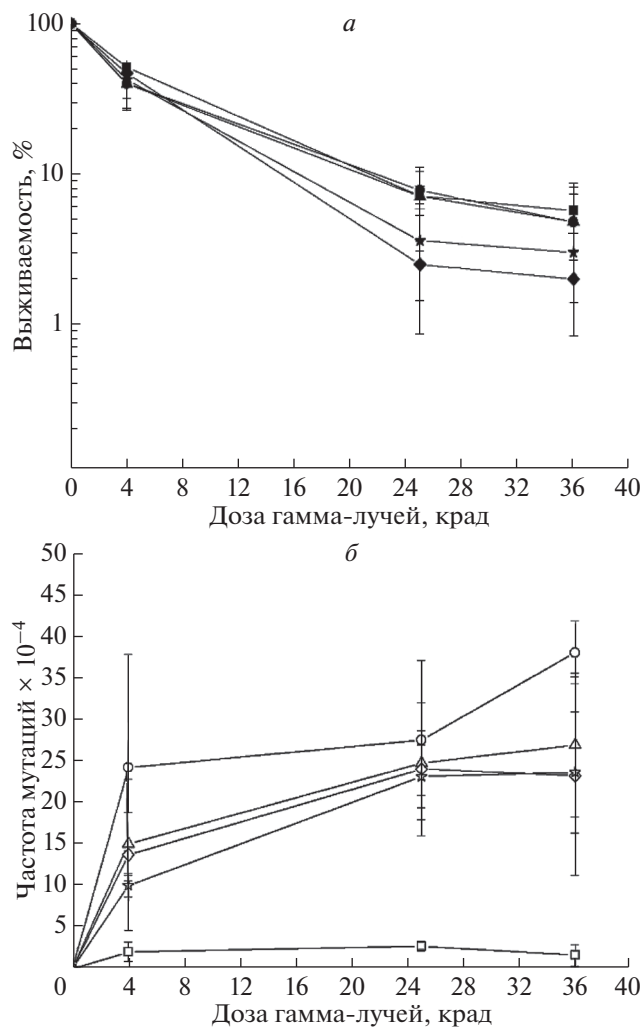


Рис. 2. Выживаемость (а) и частота мутаций по пяти локусам *ADE4–ADE8* (б) при действии разных доз гамма-лучей на клетки дрожжей: штамм дикого типа (■, □), мутант *hsm6-1* (●, ○), мутант *psy4::NAT* (★, ☆), мутант *pph3::KanMX* (◆, ◇), двойной мутант *hsm6-1 pph3::KanMX* (▲, △).

цифическую ДНК-полимеразу [20, 30]. Эти результаты показывают, что *HSM6* может участвовать в одной из ветвей ПРР.

Белок Rad5 вовлечен в безошибочную ветвь ПРР [31]. Белок Mms2, обладающий в комплексе с Ubc13p убиквитинтрансферазной активностью, является субъединицей тройного комплекса Rad5–Mms2–Ubc13, который осуществляет полиубиквитинирование PCNA и таким образом стимулирует рекомбинационно-подобный процесс. Отсюда следует, что ген *MMS2* контролирует первую стадию безошибочной ветви ПРР.

Для проверки предположения, что ген *PPH3* может быть вовлечен в контроль безошибочной ветви ПРР, мы разрушили ген *MMS2* в мутанте *pph3* и штамме дикого типа. Как видно из рис. 4,

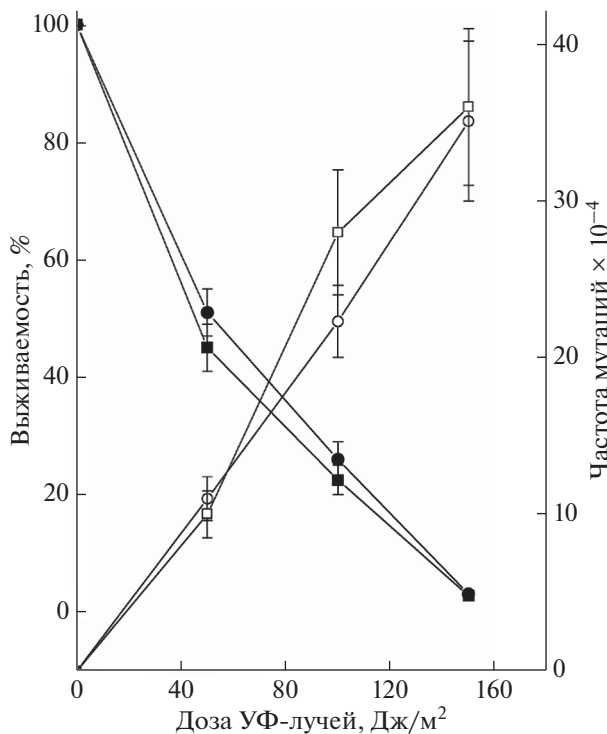


Рис. 3. Выживаемость (темные символы) и частота мутаций по пяти локусам *ADE4–ADE8* (светлые символы): штамм дикого типа (■, □), двойной мутант *ptc2Δ ptc3Δ* (●, ○).

УФ-индуцированный мутагенез в мутанте *mms2* значительно ниже, чем в одиночном мутанте *pph3*, и близок к уровню штамма дикого типа. Двойной мутант *mms2 pph3* показывает уровень УФ-индуцированного мутагенеза такой же, как у одиночного *mms2*. Следовательно, мутации *mms2* и *pph3* находятся на одном пути репарации и *mms2* эпистатирует к *pph3*.

Показано, что ОН бреши ДНК за остановленными репликационными вилками обусловлены Mre11-зависимой деградацией реплицированной ДНК. Это событие определяет вторую стадию безошибочной ветви ПРР. Образование ОН бреши со свободным 3'-концом стимулирует инвазию вновь синтезированной ДНК в дуплексную ДНК сестринской хроматиды, таким образом инициируя смену матриц. Мы исследовали потенциальные эпистатические отношения между мутациями генов *XRS2* и *PPH3*. *Xrs2* является субъединицей комплекса MRE11. Штамм дикого типа был слабо чувствителен к УФ-облучению и не оказывал заметного влияния на УФ-индуцированный мутагенез (рис. 5). Двойной мутант *xrs2 pph3* был также чувствителен к УФ-индукционному летальному действию и мутагенезу, как и одиночный мутант *xrs2* (рис. 5). Таким образом, эти результаты согласуются с ролью *PPH3* в безошибочном пути обхода повреждений.

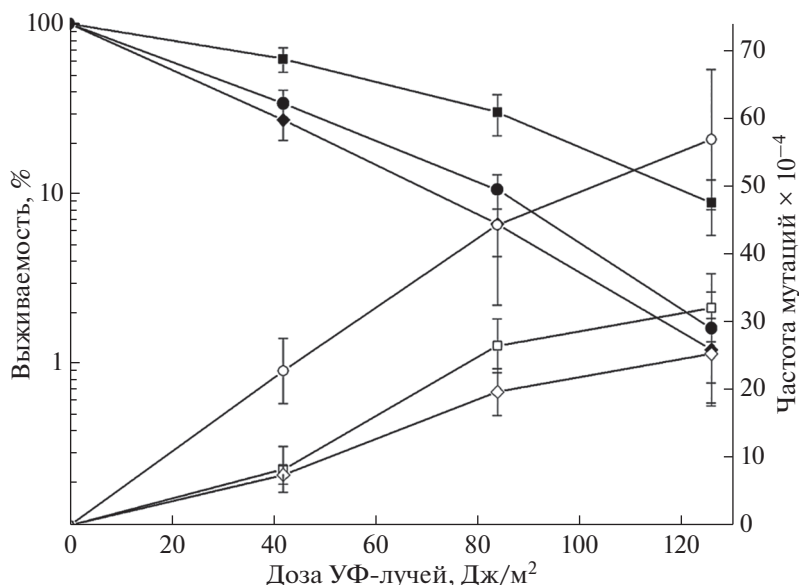


Рис. 4. Выживаемость (темные символы) и частота мутаций по пяти локусам *ADE4–ADE8* (светлые символы): штамм дикого типа (■, □), мутант *pph3* (●, ○), мутант *mms2* (▲, △), двойной мутант *pph3 mms2* (◆, ◇).

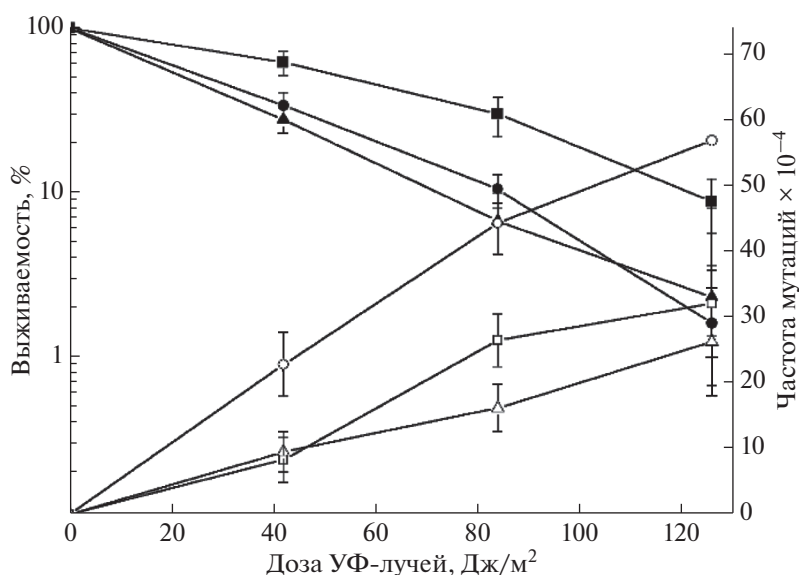


Рис. 5. Выживаемость (темные символы) и частота мутаций по пяти локусам *ADE4–ADE8* (светлые символы): штамм дикого типа (■, □), мутант *pph3* (●, ○), двойной мутант *pph3 xrs2* (▲, △).

ОБСУЖДЕНИЕ

При благоприятных условиях роста основной причиной спонтанного мутагенеза являются ошибки репликации. Именно поэтому флукуационный тест учитывает спонтанные мутации, возникшие в основном в результате ошибок репликации. Мутации, возникающие как ошибки репликации, так и ошибки репарации, регистрируются методом упорядоченного посева, когда клетки выращиваются в течение длительных периодов на селективной

среде, и многие спонтанные повреждения накапливаются в ДНК в течение одного поколения [26]. Если клетки имеют дефект в репарационных системах, это может значительно увеличить уровень спонтанного мутагенеза.

Частота спонтанных мутаций устойчивости к канаванину, измеренная с помощью флукуационного теста для мутанта *pph3Δ*, не отличалась от штамма дикого типа. Однако в тесте Хромова-Борисова мутация *pph3* проявляет очень высокий

уровень спонтанного мутагенеза, который аналогичен двойному мутанту *pph3Δ hsm6-1*. На основании этих данных мы можем предположить, что мутации *pph3Δ*, *psy4Δ* и *hsm6-1* стимулируют подверженный ошибкам процесс репарации ДНК.

При воздействии MMS клетки *pph3Δ* проявляют гиперактивацию Rad53 и задержку внутри-S-фазного чекпойнта [12, 28]. Однако Rph3-Psy2 не является единственной фосфатазой, необходимой для дефосфорилирования Rad53. Фосфатазы Pp2C, Ptc2 и, в меньшей степени, Ptc3 необходимы для дефосфорилирования Rad53 после ДНР ДНК [13]. Учитывая, что Rph3-Psy2, по-видимому, регулирует некоторые чекпойнтные функции Rad53, но не все, можно предположить, что Rph3 и Ptc2/Ptc3 не являются избыточными, поскольку они распознают разные формы фосфорилирования Rad53, и что эти разные формы фосфорилирования независимо регулируют различные аспекты чекпойнт ответа [13]. Чтобы лучше понять функциональное взаимодействие между фосфатазами Rph3-Psy2 и Ptc2/Ptc3, мы проанализировали индуцированный ультрафиолетом мутагенез в клетках, лишенных Ptc2/Ptc3. Как показано на рис. 3, двойной мутант *ptc2 ptc3* не проявляет какой-либо чувствительности к ультрафиолетовому излучению и не увеличивает уровня индуцированного ультрафиолетом мутагенеза. Взятые вместе эти результаты согласуются с моделью, в которой основной причиной более высокого уровня мутаций, индуцированных ультрафиолетом в мутанте *pph3*, является замедление дефосфорилирования РРНЗ-специфических сайтов Rad53 и γ H2A.

Фосфатаза Rph3-Psy2-Psy4 образует стабильный комплекс с γ H2A, т.е. реакция дефосфорилирования гистона является медленным процессом [32]. γ H2A теряется из хроматина независимо от РРНЗ, что указывает на то, что фосфатаза нацеливается на γ H2A после его вытеснения из ДНК. Дефосфорилирование γ H2A с помощью РРНЗ необходимо для эффективного выхода из чекпойнта, индуцированного повреждениями ДНК [13]. Ранее мы предполагали, что чувствительность мутанта *hsm6-1* к ультрафиолетовому излучению и его высокая спонтанная и зависящая от ультрафиолетового излучения изменчивость обусловлены задержанным выходом клетки из чекпойнта [20]. После облучения УФ-лучами в процессе репликации на поврежденной ДНК образуются односторонние ДНР. У мутантов *psy4Δ* и *pph3Δ* значительное увеличение уровня мутагенеза наблюдалось только при высоких дозах УФ-облучения (рис. 1,б), поскольку в этом случае вероятность появления ДНР ДНК и индукции чекпойнта заметно возрастает. Количество выделяющегося γ H2A будет высоким, что повлияет на уровень индуцированного мутагенеза.

Репарация одностороннего ДНР отличается от репарации двустороннего ДНР. Когда индуцируется двусторонний ДНР, гистон H2A фосфорилируется на большем расстоянии с обеих сторон ДНР, что приводит к индукции множества γ H2A [33]. Мы предполагаем, что увеличение количества γ H2A может привести к более высокому уровню индуцированного мутагенеза. Чтобы проверить это предположение, мы использовали γ -лучи, которые индуцируют ДНР ДНК с двумя концами с высокой частотой. Действительно, частота мутаций, индуцированных γ -лучами, у всех исследованных мутантов была чрезвычайно высокой по сравнению со штаммом дикого типа (рис. 2,б). Белок Rph3 является каталитической субъединицей фосфатазного комплекса Rph3-Psy2-Psy4, биохимическая функция которого – дефосфорилирование гистонов γ H2A [13]. Мутации *hsm6-1* и *psy4Δ* инактивируют тройной комплекс фосфатазы. С другой стороны, мутация *pph3Δ* инактивирует обе функции фосфатазного комплекса РРНЗ, при этом мы фиксируем при высоких дозах одинаково высокие уровни УФ- и γ -индуцированного мутагенеза у всех трех мутантов (рис. 1,б и 2,б). Следовательно, замедление дефосфорилирования γ H2A является основной причиной увеличения скорости индуцированного мутагенеза у мутантов *pph3Δ*, *hsm6-1* и *psy4Δ*. Этот вывод подтверждается, во-первых, данными по УФ-индуцированному мутагенезу в клетках, потерявших фосфатазу Ptc2/Ptc3, которая не имеет отношения к дефосфорилированию γ H2A, но дефосфорилирует белок Rad53. Во-вторых, полным совпадением кривых УФ-мутагенеза у мутантов *pph3Δ* и *psy4Δ* (рис. 1,б).

В дрожжах открыта еще одна фосфатаза Glc7, которая способна дефосфорилировать гистон γ H2A [34]. Наличие в клетке одновременно двух фосфатаз, способных дефосфорилировать гистон γ H2A, должно приводить к конкуренции за субстрат. Когда в клетке присутствуют оба фермента, количество свободного γ H2A будет быстро уменьшаться и освобождать комплекс Rph3-Psy2-Psy4 от связывания с гистоном. Это, в свою очередь, сместит равновесие между комплексами Rph3-Psy2-Psy4 и Rph3-Psy2 в сторону последнего. В отсутствие Glc7 (мутант *glc7*) дефосфорилирование гистона γ H2A значительно замедлится, что приведет к его повторному включению в хроматин. Однако отсутствие Glc7 лишь замедляет процесс выхода из чекпойнта, но не блокирует его, из-за активности второго фермента Rph3-Psy2-Psy4. Делеция гена *PSY4* также замедлит дефосфорилирование гистона γ H2A. Таким образом, при низких дозах УФ-лучей отсутствие одного из белков Psy4 или Glc7 не будет заметно сказываться на скорости дефосфорилирования γ H2A. Однако при высокой концентрации этого гистона в ядре (высокие дозы УФ-лучей или при γ -облуче-

нии) отсутствие одного из партнеров окажет заметное влияние на эффективность дефосфорилирования γ H2A. Мутация *hsm6-1* относится к типу сдвиг рамки считывания. В результате образуется укороченный белок, который сохранил консервативную последовательность на N-конце. Можно предполагать, что такой укороченный белок способен формировать тройной комплекс РРНЗ, но не способен выполнять в полном объеме свою ферментативную функцию. Это приведет к замедлению дефосфорилирования гистона γ H2A, значительному увеличению времени существования нефункционального тройного комплекса, связанного с γ H2A, и, как следствие, снижению эффективности дефосфорилирования Rad53. Эти свойства аллеля *hsm6-1* будут отличать его от делеционного мутанта.

В совокупности мы интерпретируем эти результаты как указание на то, что высокий спонтанный мутагенез у мутантов *hsm6-1* и *pph3Δ* и высокая чувствительность к мутагенному действию ультрафиолетовых и γ -лучей обусловлены задержкой выхода клетки из чекпойнта.

Ранее мы предполагали, что ген *HSM6* участвует в контроле ПРР [19, 20]. Проведенный нами генетический анализ подтверждает это предположение. Прежде всего мы показываем, что мутации *mms2* и *xrs2* способны полностью подавлять более высокий УФ-индуцированный мутагенез мутанта *pph3* (рис. 4, 5). Этот фенотип самым строгим образом определяет гены, контролируемые субъединицы белкового комплекса РРНЗ, в качестве участников в регуляции безошибочной ветви ПРР.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-34-005540 мол_а и в рамках государственного задания по теме “Мультикомпонентные биологические системы: структурно-динамическая и функциональная организация” (регистрационный номер АААА-А19-119091890069-7).

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. Prakash L. Characterization of postreplication repair in *Saccharomyces cerevisiae* and effects of *rad6*, *rad18*, *rev3* and *rad52* mutations // *Mol. Gen. Genet.* 1981. V. 184. P. 471–478.
2. Ganesan A.K. Persistence of pyrimidine dimers during post-replication repair in ultraviolet light-irradiated *Escherichia coli* K12 // *J. Mol. Biol.* 1974. V. 87. P. 103–119.
3. Sale J.E. Competition, collaboration and coordination-determining how cells bypass DNA damage // *J. Cell Sci.* 2012. V. 125. P. 1633–1643.
4. Branzei D., Vanoli F., Foiani M. SUMOylation regulates Rad18-mediated template switch // *Nature.* 2008. V. 456. P. 915–920.
5. Giannattasio M., Zwicky K., Follonier C. et al. Visualization of recombination-mediated damage bypass by temple switching // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2014. V. 21. P. 884–892.
6. Cejka P., Vondrejcs V., Storchova Z. Dissection of the functions of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD6 post-replicative repair group in mutagenesis and UV sensitivity // *Genetics.* 2001. V. 159. P. 953–963.
7. Brusky J., Zhu Y., Xiao W. *UBC13*, a DNA-damage-inducible gene, is a member of the error-free postreplication repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae* // *Curr. Genet.* 2000. V. 37. P. 168–174.
8. Paciotti V., Clerici M., Lucchini G., Longhese M.P. The checkpoint protein Ddc2, functionally related to *S. pombe* Rad26, interacts with Mec1 and is regulated by Mec1-dependent phosphorylation in budding yeast // *Genes Dev.* 2000. V. 14. P. 2046–2059.
9. Redon C., Pilch D.R., Rogakou E.P. et al. Yeast histone 2A serine 129 is essential for efficient repair of checkpoint-blind DNA damage // *EMBO Rep.* 2003. V. 4. P. 678–684.
10. Sanchez Y., Desany B.A., Jones W.J. et al. Regulation of *RAD53* by the ATM-like kinases Mec1 and Tel1 in yeast cell cycle checkpoint pathways // *Science.* 1996. V. 271. P. 357–360.
11. Travesa A., Duch A., Quintana D.G. Distinct phosphatases mediate the deactivation of the DNA damage checkpoint kinase Rad53 // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 17123–17130.
12. O'Neill B.M., Szyjka S.J., Lis E.T. et al. Pph3–Psy2 is a phosphatase complex required for Rad53 dephosphorylation and replication fork restart during recovery from DNA damage // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. P. 9290–9295.
13. Keogh M.C., Kim J.A., Downey M. et al. A phosphatase complex that dephosphorylates γ H2AX regulates DNA damage checkpoint recovery // *Nature.* 2006. V. 439. P. 497–501.
14. Leroy C., Lee S.E., Vaze M.B. et al. PP2C phosphatases Ptc2 and Ptc3 are required for DNA checkpoint inactivation after a double-strand break // *Mol. Cell.* 2003. V. 11. P. 827–835.
15. Szyjka S.J., Aparicio J.G., Viggiani C.J. et al. Rad53 regulates replication fork restart after DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genes Dev.* 2008. V. 22. P. 1906–1920.
16. Guillemain G., Ma E., Mauger S. et al. Mechanisms of checkpoint kinase Rad53 inactivation after a double-strand break in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Cell Biol.* 2007. V. 27. P. 3378–3389.
17. Marsolier M.C., Roussel P., Leroy C., Mann C. Involvement of the PP2C-like phosphatase Ptc2 in the DNA checkpoint pathways of *Saccharomyces cerevisiae* // *Genetics.* 2000. V. 154. P. 1523–1532.
18. Heideker J., Lis E.T., Romesberg F.E. Phosphatase, DNA damage checkpoints and checkpoint deactivation // *Cell Cycle.* 2007. V. 6. P. 3058–3064.
19. Иванов Е.Л., Федорова И.В., Ковальцова С.В. Изоляция и характеристика новых мутантов *Saccharo-*

- myces cerevisiae* с увеличенной спонтанной мутабельностью // Генетика. 1992. Т. 28(5). С. 47–55.
20. Федоров Д.В., Ковальцова С.В., Евстюхина Т.А. и др. Ген *HSM6* идентичен гену *PSY4* у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Генетика. 2013. Т. 49. № 3. С. 328–336.
 21. Захаров И.А., Кожин С.А., Кожина Т.Н., Федорова И.В. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромисетов. Л.: Наука, 1984. 112 с.
 22. Ковальцова С.В., Королев В.Г. Штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* для тестирования мутагенов среды, основанный на взаимодействии мутаций *rad2* и *him1* // Генетика. 1996. Т. 32. № 3. С. 366–372.
 23. Roman H. A system selective for mutations affecting the synthesis of adenine in yeast // Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg. Ser. Physiol. 1956. V. 26. P. 299–314.
 24. Lea D.E., Coulson C.A. The distribution of the number of mutants in bacterial populations // J. Genet. 1949. V. 49. P. 264–285.
 25. Khromov-Borison N.N., Saffi J., Henriques J.A.P. Perfect order plating: principal and applications // ТТО. 2002. V. 1. P. TO2638.
 26. Fedorova I.V., Kovaltzova S.V., Gracheva L.M. et al. Requirement of *HSM3* gene for spontaneous mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae* // Mutat. Res. 2004. V. 554. P. 65–75.
 27. Черненко А.Ю., Грачева Л.М., Евстюхина Т.А. и др. Взаимодействие гена *HSM3* с генами эпистатической группы *RAD6* дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Генетика. 2012. Т. 48. № 2. С. 160–167.
 28. Jablonowski C.M., Cussiol J.R., Oberly S. et al. Termination of replication stress signaling via concerted action of the Slx4 scaffold and the PP4 phosphatase // Genetics. 2015. V. 115. <https://doi.org/10.1534/genetics.181479>
 29. Kim J.-A., Hicks W.M., Li J. et al. Orotein phosphatases Pph3, Ptc2, and Ptc3 play redundant roles in DNA double-strand break repair by homologous recombination // Mol. Cell. Biol. 2011. V. 31. P. 507–516.
 30. Ковальцова С.В., Грачева Л.М., Евстюхина Т.А. и др. Гены-мутаторы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Взаимодействие мутаций *him* и *hsm* с мутациями, блокирующими три основных пути репарации индуцированных повреждений ДНК // Генетика. 1996. Т. 32. № 8. С. 1061–1067.
 31. Johnson R.E., Henderson S.T., Petes T.D. et al. *Saccharomyces cerevisiae* *RAD5*-encoded DNA repair protein contains DNA helicase and zinc-binding sequence motifs and affects on stability of simple repetitive sequences in the genome // Mol. Cell. Biol. 1992. V. 12. P. 3807–3818.
 32. Vazquez-Martin C., Rouse J., Cohen P.T.W. Characterization of the role of a trimeric protein phosphatase complex in recovery from cisplatin-induced versus noncrosslinking DNA damage // FEBS J. 2008. V. 275. P. 4211–4221.
 33. Shroff R., Arbel-Eden A., Pilch D. et al. Distribution and dynamics of chromatin modification induced by a defined DNA double-strand break // Curr. Biol. 2004. V. 14. P. 1703–1711.
 34. Bazzi M., Mantiero D., Trovesi C. et al. Dephosphorylation of γ H2A by Glc7/protein phosphatase 1 promotes recovery from inhibition of DNA replication // Mol. Cell. Biol. 2010. V. 30. P. 131–145.

Pph3 Phosphatase Is Involved in the Regulation of the Error-Free Branch of Postreplicative DNA Repair in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*

D. V. Fedorov^a, T. A. Evstyukhina^a, V. T. Peshekhonov^a, and V. G. Korolev^{a, *}

^aPetersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre “Kurchatov Institute,” Gatchina, 188300 Russia

*e-mail: korolev_vg@npni.nrcki.ru

It has been shown that Pph3 phosphatase is involved in the dephosphorylation of the crucial checkpoint kinase Rad53 in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Pph3 protein forms a complex with a Psy2 subunit, which binds to Rad53 kinase and dephosphorylates it without the involvement of a third subunit. Triple complex consisting of Pph3, Psy2 and Psy4 subunits dephosphorylates γ H2A. Earlier, we have shown that the *HSM6* gene represents an allele of *PSY4* gene. The *hsm6-1* mutation increased the frequency of DNA repair spontaneous and UV-induced mutagenesis. In this study we showed that the deletion of *PPH3* gene increases the rate of spontaneous mutagenesis by a factor of seven in *S. cerevisiae*. At high UV light doses the frequencies of mutations in *pph3 Δ* , *psy4 Δ* and *hsm6-1* mutant strains are equal and exceed the level of mutagenesis in the wild type strain approximately twofold. In case of reparative spontaneous mutagenesis, *pph3 Δ* and *hsm6-1* mutations show epistatic effect. All mutants exhibited higher (approximately 10-fold) frequency of γ -induced mutations in comparison with the wild type strain. The combination of mutations in the genes encoding the subunits of PPH3 and mutations in the *MMS2* and *XRS2* genes that control the error-free path of post-replicative repair leads to the blocking of PPH3-specific UV-induced mutagenesis. Our results indicate that *ptc2 Δ ptc3 Δ* double mutant don't influence UV-induced mutagenesis and survival. These data indicate that hyperphosphorylation only of Pph3 specific sites of the Rad53 increases the UV-induced mutagenesis. Thus, we identified the PPH3 complex as a new factor involved in the regulation of the error-free branch of postreplicative repair.

Keywords: Pph3 phosphatase, DNA repair, yeast, tolerance, error-free branch of repair, mutagenesis.

ОСОБЕННОСТИ quorum sensing СИСТЕМЫ SprIR
Serratia proteamaculans 94 И ЕЕ УЧАСТИЕ В РЕГУЛЯЦИИ
КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССОВ

© 2021 г. Ю. В. Зайцева^{1,2}, В. А. Липасова¹, О. А. Кокшарова^{1,3}, В. А. Плюта¹,
И. В. Демидюк¹, Л. С. Чернин⁴, И. А. Хмель¹ *

¹Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра
“Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

²Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова, Ярославль, 150003 Россия

³Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский
государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119899 Россия

⁴Отдел патологии растений и микробиологии, Иерусалимский университет, Реховот, 76100 Израиль

*e-mail: khmel@img.ras.ru

Поступила в редакцию 20.03.2020 г.

После доработки 19.05.2020 г.

Принята к публикации 09.06.2020 г.

Исследована регуляторная quorum sensing система SprIR психротрофного штамма *Serratia proteamaculans* 94. Сконструирован мутант с инактивированным геном *sprR*, кодирующим регуляторный рецепторный белок SprR. Показано, что инактивация этого гена влияла на состав жирных кислот, синтезируемых *S. proteamaculans* 94, и не влияла на синтез N-ацил-гомосеринлактонов (АГЛ), активности внеклеточных протеаз, хитиназ, гемолизина, на свимминг-миграцию клеток и подавление роста мицелия фитопатогенных грибов летучими соединениями, выделяемыми этим штаммом. Инактивация гена *sprI* (но не гена *sprR*) снижала образование биопленок, которое увеличивалось при внесении в культуру экзогенного АГЛ. Проведенный сравнительный протеомный анализ клеток исходного штамма и мутантов с инактивированными генами *sprI* и *sprR* показал, что экспрессия 30 белков *S. proteamaculans* 94 находится под влиянием quorum sensing системы SprIR.

Ключевые слова: quorum sensing, *Serratia proteamaculans*, биопленки, ферменты, жирные кислоты, протеомный анализ.

DOI: 10.31857/S0016675821020144

В последнее время растущее внимание исследователей привлекают quorum sensing (QS) системы регуляции экспрессии генов, участвующие в коммуникации бактерий и обеспечивающие скоординированный ответ популяций бактерий на внешние факторы. QS – это особый тип регуляции, функционирующий обычно при высоких плотностях бактериальных популяций. QS системы включают низкомолекулярные сигнальные молекулы различной химической природы, диффундирующие из клеток в культуральную среду, и рецепторные регуляторные белки, с которыми взаимодействуют сигнальные молекулы. QS системы функционируют как глобальные факторы регуляции, они играют важную роль в контроле большого количества клеточных процессов, относящихся к различным сторонам метаболизма бактерий: они участвуют во взаимодействии многих бактерий с высшими организмами, в регуляции вирулентности бактерий, регуляции экспрессии ге-

нов, связанных с синтезом различных экзоферментов, токсинов, антибиотиков и др. [1–7].

Больше всего исследованы QS системы LuxI/LuxR-типа грамотрицательных бактерий, использующие в качестве сигнальных молекул N-ацил-гомосеринлактоны (АГЛ). QS системы этого типа можно разделить на две группы в зависимости от функций и организации экспрессии QS генов.

Первая группа включает классическую QS систему *Vibrio fischeri*; у этой морской бактерии впервые был открыт феномен QS. В QS-регуляции *V. fischeri* участвуют два основных регуляторных компонента: белок LuxI – синтаза АГЛ (катализирует синтез АГЛ) и LuxR-белок – он образует димер, присоединяет АГЛ, в результате чего изменяется его конфигурация; затем этот комплекс, связываясь с промотором *lux*-оперона, активирует его транскрипцию, что приводит к синтезу люциферазы и эмиссии света. При увеличении популяции

V. fischeri АГЛ накапливаются до порогового уровня, который достаточен для активации LuxR, связывания его с промоторной областью *lux*-оперона и индукции этого оперона. Сходные QS системы были обнаружены в клетках различных видов псевдомонад, *Agrobacterium tumefaciens*, *Burkholderia* и др. [1, 3–7].

Вторая группа включает QS системы бактерий семейства Enterobacteriaceae (*Pantoea*, *Erwinia*, *Serratia* и др.). Регуляторные R-белки в QS системах этой группы функционируют главным образом как негативные регуляторы; они могут репрессировать транскрипцию своих собственных генов в отсутствие АГЛ.

Количество АГЛ увеличивается с увеличением плотности популяции бактерий по мере роста культуры. При достижении достаточно высокой концентрации АГЛ взаимодействует с белком LuxR-типа (например, с белком EsaR *P. stewartii*), при этом происходят изменения его конформации, препятствующие связыванию с ДНК, что приводит к депрессии [8–12].

Объектом нашего исследования была бактерия *Serratia proteamaculans* 94 [13]. QS системы бактерий этого вида изучены мало [11]. В предыдущей работе [14] мы показали, что штамм *S. proteamaculans* 94 синтезирует два главных типа сигнальных молекул АГЛ (N-3-оксо-гексаноил-L-гомосеринлактон и N-3-гидрокси-гексаноил-L-гомосеринлактон) и несколько минорных АГЛ. Гены *sprI* и *sprR* этой QS системы, кодирующие соответственно синтазу АГЛ и рецепторный регуляторный белок SprR, были клонированы и секвенированы. Было показано, что гены *sprI* и *sprR* транскрибировались конвергентно с частичным перекрыванием их рамок считывания. Изучение полученного нами мутанта с инактивированным QS геном *sprI* позволило определить роль этого гена в регуляции ряда клеточных процессов. Инактивация гена *sprI* приводила к отсутствию синтеза АГЛ, уменьшению внеклеточной протеолитической активности, отсутствию хитиноподобной активности, свимминг-миграции клеток (swimming motility), отсутствию или сильному снижению подавления роста мицелия фитопатогенных грибов летучими соединениями, выделяемыми штаммом 94, изменению состава клеточных жирных кислот, синтезируемых этим штаммом [14].

В штамме *S. proteamaculans* 94 нами была обнаружена также сигнальная молекула типа AI-2 и исследована функциональная роль гена *luxS*, ответственного за синтез AI-2. Инактивация этого гена приводила к действию, сходному с действием инактивации гена *sprI* на синтез экзоферментов, свимминг-миграцию клеток, и вызывала снижение или отсутствие ингибирования фитопатогенных грибов летучими веществами, выделяемыми *S. proteamaculans* 94 [15].

В настоящей работе был получен мутант с инактивированным геном *sprR* QS системы штамма *S. proteamaculans* 94, кодирующим рецепторный регуляторный белок SprR. Ранее мутации гена, кодирующего R-белок *S. proteamaculans*, не были получены, и информация о роли этого гена в контроле метаболизма *S. proteamaculans* отсутствует. В работе изучено влияние инактивации гена *sprR* на регуляцию клеточных процессов *S. proteamaculans* 94; исследовано действие инактивации генов *sprI* и *sprR* на образование биопленок этого штамма, проведен сравнительный протеомный анализ экспрессии белков исходного и мутантных штаммов. Полученные данные расширяют наше представление о диапазоне клеточных процессов, в регуляции которых участвуют гены QS системы *S. proteamaculans*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Штаммы бактерий и условия культивирования

Штаммы бактерий, плазмиды и праймеры ПЦР, использованные в работе, приведены в табл. 1, 2. Бактерии выращивали на средах Luria Broth (LB), LA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) и M9 [16] с необходимыми добавками при температуре 28–30°C. Антибиотики отечественного производства использовали в концентрациях (мкг/мл): ампициллин, 100–200; канамицин, 100; гентамицин 40. Тетрациклин (Sigma) добавляли в среду в концентрации 20 мкг/мл.

2. Определение продукции АГЛ

Для определения продукции АГЛ использовали два биосенсора. Сенсор *Chromobacterium violaceum* CV026 высевали штрихами на поверхность среды LA, пересекали их штрихами тестируемых культур, инкубировали 24–48 ч при 30°C. В случае, когда штамм продуцировал АГЛ, наблюдали окрашивание индикаторного штамма CV026 в фиолетовый цвет. Интенсивность окраски оценивали визуально [17]. Второй биосенсор *Agrobacterium tumefaciens* NT1/pZLR4 выращивали на среде LB с добавлением ампициллина (100 мкг/мл) и гентамицина в течение ночи при 30°C. Чашку с агаризованной средой M9 с добавленным X-Gal (конечная концентрация 80 мкг/мл) заливали 3 мл M9 с 0.5% агара с добавлением 0.5 мл ночной культуры *A. tumefaciens* NT1/pZLR4. Тестируемые на продукцию АГЛ штаммы высевали уколами на поверхность агаризованной среды после ее застывания или вносили жидкую ночную культуру в лунки в агаризованной среде и инкубировали при 30°C 24–48 ч. О синтезе АГЛ штаммами судили по появлению голубых зон гидролиза X-Gal [18].

Таблица 1. Штаммы бактерий и плазмиды, использованные в работе

Штаммы и плазмиды	Характеристика	Источник или ссылка
Штаммы		
<i>Serratia proteamaculans</i> 94	Выделен из испорченного в холодильнике мяса	[13]
<i>S. proteamaculans</i> 94 rif-г	Спонтанный мутант rif-г	[14]
<i>Escherichia coli</i> S17-1 (λ -pir)	<i>thi pro hsdR hsdM recA rpsL</i> RP4-2 (Tc ^r ::Mu) (Km ^r ::Tn7) (λ -pir)	Коллекция ИМГ РАН
<i>E. coli</i> TG-1	K-12 <i>supE thi-1</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) Δ (<i>mcrB-hsdSM</i>)5, (<i>r_K⁻m_K⁻</i>) F' [<i>tra D36 proAB⁺ lac^f lac Z</i> DM15]	Stratagene
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	Биосенсор для определения АГЛ на основе продукции виолацеина, Km-г	[17]
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NT1/pZLR4	pZLR4 <i>traG::lacZ</i> . Биосенсор для определения АГЛ на основе индукции синтеза β -галактозидазы, Gm ^r Cb ^r	[18]
<i>S. proteamaculans</i> 94 rif-г <i>sprI::Gm</i>	Мутант <i>sprI::Gm</i> штамма 94 rif-г	[14]
Плазмиды		
p34S-Gm	Источник Gm ^r -кассеты	[21]
pEX18Tc	Вектор для замены генов, Tet ^r oriT <i>sacB</i>	[20]
pAL-TA	Вектор для клонирования продуктов ПЦР, Ap ^r ori pUC P _{lac}	Eurogen

Таблица 2. Праймеры, использованные в работе

Праймер	Последовательность (5' → 3')
SprR-F	5'-GAGCCTGTATGTTTCCATC
SprR-R	5'-CAACTTCCGCCATCACCTG
GM-F	5'-GGCTCAAGTATGGGCATCATT
GM-R	5'-GGCGGTACTTGGGTCGATA
M13-F	5'-GTAAAACGACGGCCAGT
M13-R	5'-CAGGAAACAGCTATGAC

3. Манипуляции с ДНК

Выделение суммарной и плазмидной ДНК, рестриктицию, агарозный гель-электрофорез, лигирование, трансформацию *E. coli* проводили согласно методикам, описанным в [19]. Реакцию ПЦР проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей однократный буфер для Taq ДНК-полимеразы (НПО “СибЭнзим”), по 250 мкМ dGTP, dATP, dCTP и dTTP (НПО “СибЭнзим”), 10 пМ каждого праймера (ЗАО “Синтол”), 0.5 U Taq ДНК-полимеразы (ИМГ РАН). В качестве матрицы для ПЦР использовали плазмидные ДНК или прокипяченные клетки, взятые из свежесозревших колоний. Реакцию ПЦР-амплификации проводили на четырехканальном про-

граммируемом термостате TP4-ПЦР-01-“Терцик” (ЗАО “НПФ ДНК-Технология”).

4. Получение мутанта *S. proteamaculans* 94 с инактивированным геном *sprR*

Мутант с нокаутом гена *sprR* был получен методом замены генов с использованием *sacB*-стратегии [20]. Ранее для клонирования генов *sprI* и *sprR* и их секвенирования нами был клонирован фрагмент ДНК размером 1660 пн, содержащий оба гена, и была определена нуклеотидная последовательность этих генов (JX901285) [14]. Для получения клонированного гена *sprR* была проведена ПЦР-амплификация с праймерами для этого

гена – *SprR-F* и *SprR-R* (табл. 2). ПЦР проводили при 94°C 2 мин, затем 30 циклов при 94°C 20 с, 58°C 20 с, 72°C 40 с, и последняя стадия была при 72°C 4 мин. Продукты ПЦР были выделены из геля (использовали Wizard SV Gel kit и PCR Clean-Up System, Promega) и лигированы с *pAL-TA* векторной ДНК. Лигазная смесь была трансформирована в *E. coli* TG1. Клетки высевали на среду LA с добавлением 200 мкг/мл ампициллина, наличие *sprR* гена в отобранных клонах определяли методом ПЦР, используя универсальные праймеры M13. Сконструированная плазмида была названа *pAL-TA-sprR*.

Для конструирования *sprR::Gm* мутанта *Bam*HI-фрагмент ДНК размером 865 пн плазмиды *p34S-Gm* [21], несущий ген резистентности к гентамицину, был клонирован в *Bgl*II-сайт внутри гена *sprR* в *pAL-TA-sprR* плазмиде. Фрагмент ДНК 1700 пн из полученной плазмиды *pAL-TA-sprR::Gm* был клонирован в *Eco*RI-сайт вектора *pEX18Tc* [20], и сконструированная в результате плазмида *pEX18Tc-sprR::Gm* была трансформирована в *E. coli* S17-1 (*λ-pir*), который был использован как донор для передачи этой плазмиды в *S. proteamaculans* 94 *rif-r* штамм конъюгацией. Полученные клетки были посеяны на среду LA, содержащую *Gm*, *Rif* и 5% (wt/vol) сахарозы, после чего клоны, резистентные к гентамицину, рифампицину и сахарозе и чувствительные к тетрациклину, были тестированы с помощью ПЦР с праймерами *Gm-F*, *Gm-R* и праймерами *sprR-F* и *sprR-R*. В результате был получен мутантный штамм *S. proteamaculans* 94 *sprR::Gm*.

5. Анализ биопленок

Свежие культуры, выросшие на среде LA, высевали в LB с необходимыми антибиотиками и инкубировали при аэрации в течение 24 ч при температуре 30°C. Затем культуры разбавляли в 300 раз в LB без антибиотиков. Для измерения образования биопленок культуры выращивали в полистироловых планшетах 24 ч с перемешиванием на качалке при температуре 30°C. Образование биопленок измеряли после удаления среды, промывки ячеек водой и окрашивания прикрепленных клеток красителем кристаллический фиолетовый (1 г кристалвиолета, РЕАХИМ, Россия; 2 г кристаллического фенола; 90 мл дистиллированной воды; 10 мл 96%-ного этанола) в течение 45 мин при комнатной температуре. После окрашивания жидкость сливали, краситель из биопленок экстрагировали 96%-ным этанолом, оптическую плотность раствора измеряли при 595 нм. Для измерения уровня образованных биопленок использовали Model 2550 Microplate Reader (Bio-Rad, США). По интенсивности окрашивания раствора судили об уровне образования биопленок. Каждый

эксперимент повторяли три раза, при этом в каждом варианте культуру выращивали в 4–8 лунках.

6. Влияние *sprR::Gm* мутации на свойства клеток *S. proteamaculans* 94

6.1. Определение ферментативных активностей

Для определения активностей внеклеточных ферментов 3 мкл разведенной в 300 раз ночной культуры бактерий помещались на поверхность среды LA (1.5% агара) с необходимыми добавками. Эксперименты со всеми вариантами проводились 3 раза, с не менее чем тремя повторностями в каждом опыте [14].

Определение внеклеточной протеазной активности. Клетки штаммов высевали уколом на агаризованную среду LA с молоком (молоко с 0.5% жира составляло 1/3 часть от общего объема среды), инкубировали 24–48 ч при 30°C. В случае, когда штаммы обладали внеклеточной протеазной активностью, вокруг колоний наблюдали зоны ферментативного гидролиза казеина молока (зоны просветления). О ферментативной активности судили по радиусу зон гидролиза.

Определение липазной активности. Клетки тестируемых штаммов высевали уколом на среду LA с добавлением Tween-20 (1%) и CaCl₂ (0.01%). Инкубировали 48 ч при 30°C. В случае, когда штаммы обладали липазной активностью, вокруг колоний наблюдали мутные зоны (Tween-20 гидролизолся с образованием лауриновой кислоты, что приводило к образованию в присутствии кальция нерастворимой соли этой кислоты). О ферментативной активности судили по радиусу непрозрачных зон вокруг колоний и степени помутнения среды в пределах непрозрачной зоны.

Определение хитинолитической активности. Тестируемые штаммы высевали уколом на агаризованную среду (1.5% агара) следующего состава: 0.1% (NH₄)₂SO₄, 0.03% MgSO₄ · 7H₂O, 0.08% KH₂PO₄, 0.04% KNO₃, 0.05% дрожжевой экстракт (Difco); в среду добавляли 0.2% коллоидного хитина. Инкубировали 72–96 ч при 30°C. В случае, когда штаммы обладали хитинолитической активностью, около колоний наблюдали зоны ферментативного гидролиза (зоны просветления). О ферментативной активности судили по радиусу зон.

Определение гемолитической активности. Клетки тестируемых штаммов высевали уколом на кровяной агар (среда LA с добавлением 5% стерильной крови человека), инкубировали 3–7 суток при 28°C. О гемолитической активности судили по прозрачным зонам гемолиза вокруг колоний.

6.2. Определение действия летучих соединений, выделяемых *S. proteamaculans* 94

Ранее мы показали, что *S. proteamaculans* 94 синтезирует летучие вещества (ЛВ), в том числе органические летучие вещества, из которых в наибольшем количестве штамм продуцировал диметилдисульфид (ДМДС). Было показано, что общий пул летучих соединений, выделяемых этим штаммом, и индивидуально ДМДС подавляют рост агробактерий, фитопатогенных грибов, нематод и дрозифил [22]. Для определения влияния инактивации гена *sprR* на действие ЛВ на грибы были использованы чашки Петри, разделенные на две части перегородками, которые не прилегали к крышке, оставалось свободное пространство для обмена воздухом. Одну половину чашки засеивали *S. proteamaculans* 94 или мутантом *sprR::Gm* на среде LA (20 мкл ночной культуры, выросшей в ЛВ и содержащей $\sim 4-6 \times 10^7$ клеток распределялись микробиологической петлей по поверхности LA). Чашки инкубировали 24 ч при 28°C. После этого на вторую половину чашки помещали блок с мицелием гриба. Блоки грибов диаметром 8 мм вырезали из агаризованной среды Чапека на чашках Петри, засеянных грибами в виде спор петлей с культуры гриба, после роста в течение пяти суток при 25°C. Чашки плотно герметизировали парафильмом (4 раза) ("Parafilm M" Sealing Film (Pechiney Plastic Packaging Company, Chicago, IL, США)). Рост грибов анализировали через 3–6 дней при 25°C [22].

6.3. Анализ состава жирных кислот

Ночные культуры бактерий разводили до $OD_{600} \sim 0.10$, и клетки росли в течение 20 ч при 30°C. Пробы сухой биомассы клеток (5 мг) обрабатывали в 0.4 мл 1.2 N хлористого водорода в метаноле при 80°C в течение одного часа (кислый метанолиз). Образовавшиеся метиловые эфиры жирных кислот экстрагировали дважды гексаном. Далее проводили газовую хроматографию и масс-спектрометрию. Параметры хроматографии выбирали как рекомендовано в Microbial Identification System (MIS) [23, 24] с Hewlett-Packard 5890A газовым хроматографом и Hewlett-Packard 7673A автоматическим сэмплером. Хромато-масс-спектрометрический анализ (GS-MS) проводили на хромато-масс-спектрометре AT-5975 Agilent Technologies (США). Для хроматографического разделения пробы использовали капиллярную колонку HP-5ms. Хроматографирование проводили в режиме программирования температуры от 135 до 320°C со скоростью 7 град/мин. Обработку данных проводили с помощью штатных программ прибора. Вещества в хроматографических пиках идентифицировали с помощью библиотечных программ с базой данных масс-спектров NIST.

7. Протеомный анализ

Сравнительный протеомный анализ в клетках *S. proteamaculans* 94 и двух мутантных штаммов был проведен в НИИ биомедицинской химии РАМН им. Ореховича, Москва.

Экстракция и разделение белков. Культуры бактерий выращивали при 30°C в течение 17 ч. Клетки осаждали центрифугированием при 10000 об./мин 5 мин, при 4°C, отмывали 3 раза стандартным фосфатным буфером (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10.1 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 , pH 7.4), затем центрифугировали. Супернатант удаляли, а осадок замораживали и хранили при $-80^\circ C$. Для экстракции белков осадки бактериальных клеток ресуспендировали в буфере, содержащем 7 M мочевины, 2 M тио-мочевины, 2% CHAPS, 0.5% Triton X100, 20 mM Tris-base, 2 mM $MgCl_2$, 5 mM PMSF, 65 mM DTT и 1 mM Na_2EDTA , и подвергали обработке ультразвуком. Для каждого образца с целью оценки качества экстракции белков проводился аналитический одномерный, а затем двумерный электрофорез при использовании программного обеспечения Quantity One software (BioRad, США). Стандартное нанесение составляло около 150 мкг на 24 см геля.

Двумерный (2-D) электрофорез. Для проведения электрофореза в первом направлении осуществляли гидратацию 24 см полосок (IPG Strips) с нанесенным на них гелем с pH 3–10 (Agilent, США) в буфере, содержащем 7 M мочевины, 2 M тиомочевины, 4% CHAPS, 65 mM DTT, 1.25% амфолитов 3-10 (Agilent) в течение ночи. Образцы в этом же буфере наносили на стрипы и проводили форез в первом направлении при 80 кВ на приборе Agilent Technologies 3100 Offgel Fractionator (Agilent). Второе направление электрофореза (SDS-PAGE) осуществлялось в 12%-ном полиакриламидном геле. Буфер для электрофореза содержал: Трис, 25 mM; глицин, 192 mM; SDS, 0.1%. После фиксации геля в растворе, содержащем 10% уксусной кислоты и 20% этанола, проводили его окрашивание нитратом серебра [25].

Анализ изображений 2-D гелей. Окрашенные гели сканировали на сканере Bio-Rad GS-800 Calibrated Densitometer. Интенсивность окрашивания белковых пятен сравнивали, используя программное обеспечение Melanie III. Пятна, различавшиеся между образцами по крайней мере в 1.5 раза по интенсивности окрашивания (представлено в процентах), вырезали из геля и анализировали с помощью MALDI-TOF.

Времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS анализ) и идентификация белков. Обработка вырезанных из геля окрашенных серебром белковых пятен осуществлялась по методу Shevchenko et al. [26]. Масс-спектры регистрировали с использованием масс-спектрометра Ultraflex MALDI-TOF-TOF (Bruker Daltonics,

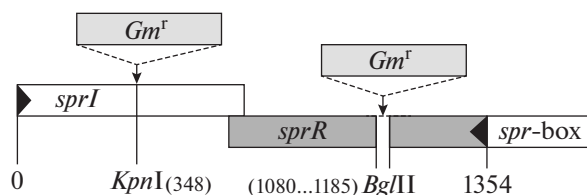


Рис. 1. Локализация мутаций *sprR::Gm* и *sprI::Gm* у *S. proteamaculans* 94. Стрелками обозначено направление транскрипции генов.

Германия), снабженного азотным (N_2) лазером (О-350 нм). Список пиков пептидов был создан в программном обеспечении Flex Analysis 2.4 (Bruker Daltonics). Идентификация белка в соответствии с содержимым пептида проводилась с использованием программного обеспечения Mascot 2.3 (Matrix Science, США), соответствующего базе данных NCBI для таксонов Eubacteria.

Результаты, полученные в трех независимых экспериментах, были выражены в виде среднего значения с учетом среднеквадратичного отклонения (SD) и рассчитаны с помощью программного обеспечения GraphPad PRISM 5.0 (GraphPad Software Inc.).

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Получение мутанта *S. proteamaculans* 94 с инактивированным геном *sprR*

Для изучения особенностей функционирования SprI/SprR QS системы *S. proteamaculans* 94 нами ранее был получен мутант с инактивированным геном *sprI* [14]. В настоящей работе мы получили методом замены гена мутант *sprR::Gm* с нокаутом второго гена SprI/SprR QS системы этой бактерии, кодирующего рецепторный регуляторный белок SprR. Мутация стабильно сохранялась в клетках *S. proteamaculans* 94, поддерживаемых на среде с гентамицином (40 мкг/мл). Анализ синтеза АГЛ, проведенный с двумя биосенсорами в чашках Петри на среде LA, показал, что мутантный штамм активно продуцирует АГЛ. Локализация мутаций *sprR::Gm* и *sprI::Gm* показана на рис. 1.

2. Влияние QS системы SprI/SprR на формирование биопленок у *S. proteamaculans* 94

В регуляции формирования биопленок различными бактериями важную роль играют QS системы регуляции экспрессии генов [12, 27, 28]. Для представителей вида *S. proteamaculans* вопрос о взаимодействии QS систем с образованием биопленок не исследовался.

При исследовании влияния инактивации генов *sprI* и *sprR* на регуляцию образования биопленок у *S. proteamaculans* 94 было показано, что му-

тация в гене *sprR* не оказывала влияния на уровень образования биопленок (рис. 2). Как было отмечено выше, эта мутация не влияла на синтез АГЛ. Напротив, в мутантном по гену *sprI* штамме 94 образование биопленок снижалось вдвое по сравнению с уровнем биопленок в исходном штамме. Ранее мы показали, что клетки этого мутанта не продуцировали АГЛ [14]. Добавление экзогенного 3-оксо-С6-ГЛ, одного из двух доминантных АГЛ, синтезируемых штаммом *S. proteamaculans* 94 дикого типа [14], восстанавливало способность мутанта к формированию биопленки практически до уровня исходного штамма. Добавление других видов АГЛ, синтезируемых клетками *S. proteamaculans* 94 в значительно меньшем количестве (С4-ГЛ, С6-ГЛ), не давало подобного эффекта (рис. 2). Полученные результаты показывают зависимость образования биопленок у *S. proteamaculans* 94 от синтеза АГЛ; существенную роль в контроле формирования биопленок играет 3-оксо-С6-ГЛ.

Эффект мутации в гене *sprI* на формирование биопленок у *S. proteamaculans* 94 проявлялся также при проведении опытов в стеклянных пробирках на среде LB. У исходного штамма *S. proteamaculans* 94 и мутанта *sprR::Gm* на стенках пробирок было заметно образование рыхлых биопленок, в то время как биопленки у мутанта *S. proteamaculans sprI::Gm* на стенках пробирок не образовывались (рис. 3). Мутация в гене *sprI* изменяла также характер роста *S. proteamaculans* 94 в жидкой среде. Для штаммов дикого типа и мутанта по гену *sprR* было характерно образование многоклеточных агрегатов и формирование осадка, а для мутанта *S. proteamaculans* 94 по гену *sprI* был характерен диффузный планктонный рост с равномерным помутнением среды.

3. Изучение влияния мутации *sprR::Gm* на активность экзоферментов, синтезируемых *S. proteamaculans* 94

Известно, что QS системы являются глобальными регуляторами экспрессии генов бактерий. Поэтому нас интересовала роль QS в регуляции клеточных процессов, относящихся к различным сторонам метаболизма *S. proteamaculans* 94. Было исследовано, как влияет нокаут гена QS системы *sprR* на активность некоторых внеклеточных ферментов. Мы показали, что протеазная активность у мутантного штамма *sprR::Gm* практически не отличалась от активности исходного штамма, в отличие от активности этого фермента у штамма с мутацией *sprI::Gm*, где протеолитическая активность была снижена [14]. Мутант *sprR::Gm* не отличался по хитинолитической активности от исходного штамма, в то время как у мутантного штамма *sprI::Gm* хитинолитическая активность отсутствовала. Липазная и гемолитическая ак-

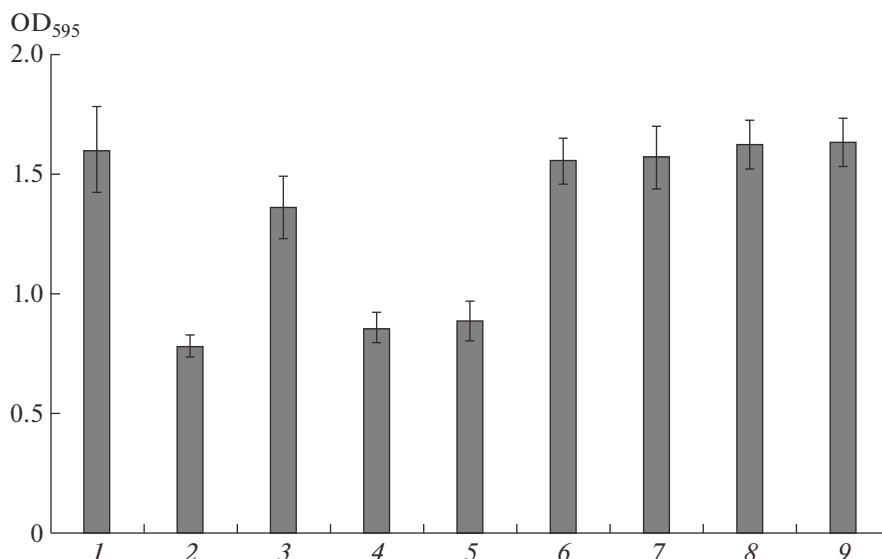


Рис. 2. Образование биопленок исходным штаммом *S. proteamaculans* 94 (1), мутантным штаммом *sprI::Gm* (2), мутантным штаммом *sprI::Gm* с добавлением: 3-оксо-С6-ГЛ (3), С6-ГЛ (4), С4-ГЛ (5); мутантным штаммом *sprR::Gm* (6), мутантным штаммом *sprR::Gm* с добавлением: 3-оксо-С6-ГЛ (7), С6-ГЛ (8), С4-ГЛ (9). Все АГЛ добавляли в конечной концентрации 25 нМ.

тивности клеток мутантов *sprR::Gm* и *sprI::Gm* не отличались от активности исходного штамма *S. proteamaculans* 94 (данные не приводятся).

4. Действие летучих соединений, выделяемых *S. proteamaculans* 94 и *sprR::Gm* мутантом, на фитопатогенные грибы

Мы сравнили действие общего пула летучих соединений, выделяемых *S. proteamaculans* 94 и *sprR::Gm* мутантом, на рост мицелия двух фитопатогенных грибов – *Rhizoctonia solani* и *Helminthosporium sativum*. По данным проведенных экспериментов, мутант *sprR::Gm* подавляет рост мицелия гриба и обладает ингибирующим действием, сходным с действием *S. proteamaculans* 94, т.е. мутация *sprR::Gm*, по-видимому, не затрагивала гены, ответственные за регуляцию синтеза летучих соединений (данные не приводятся).

5. Анализ состава бактериальных жирных кислот (ЖК)

Методом хромато-масс-спектрометрии было проведено сравнение состава жирных кислот у штамма *S. proteamaculans* 94 дикого типа и мутантного штамма *S. proteamaculans sprR::Gm* (табл. 3). В образцах исследуемых штаммов были обнаружены насыщенные, ненасыщенные и гидроксикислоты. Всего в спектрах были идентифицированы 22 жирные кислоты с длиной цепи от 12 до 20 атомов углерода.

В спектре штамма дикого типа *S. proteamaculans* 94 идентифицировано 19 жирных кислот. Ос-

новными насыщенными кислотами являлись гексадекановая, октадекановая и тетрадекановая. Доминирующими ненасыщенными кислотами были 9-октадеценная, 11-октадеценная и 9-гексадеценная. Коэффициент ненасыщенности жирных кислот, определенный как отношение \sum ненасыщенных ЖК/ \sum насыщенных ЖК, у штамма *S. proteamaculans* 94 был 0.83.

Состав жирных кислот мутанта *sprR::Gm* существенно отличался от состава жирных кислот родительского штамма *S. proteamaculans* 94 (см., например, № 10, 14, 16, 17, 18). Мутация в этом гене могла приводить как к снижению, так и к увеличению относительного содержания жирных

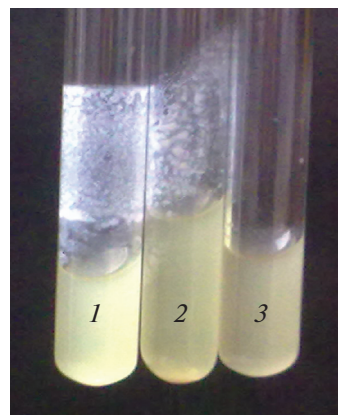


Рис. 3. Образование биопленок на стенках стеклянных пробирок. 1 – *S. proteamaculans* 94, 2 – мутантный штамм *sprR::Gm*, 3 – мутантный штамм *sprI::Gm*.

Таблица 3. Состав жирных кислот в штаммах *S. proteamaculans* 94 (А) и мутанте *S. proteamaculans sprR::Gm* (В)

№	R.T.	Жирная кислота	Содержание жирных кислот, % от суммы площадей всех хроматографических пиков	
			А	В
1	6.983	Додекановая	0.5 ± 0.1	0.9 ± 0.1
2	9.495	9-Тетрадеценная	0	0.4 ± 0.0
3	9.578	11-Тетрадеценная	0	0.6 ± 0.1
4	9.873	Тетрадекановая	2.7 ± 0.3	5.5 ± 0.2
5	10.120	2-Гидрокси-додекановая	0	0.7 ± 0.1
6	11.305	Пентадекановая	0.6 ± 0.1	1.3 ± 0.3
7	12.379	7-Гексадеценная	0.4 ± 0.1	0
8	12.449	9-Гексадеценная	3.4 ± 1.2	20.7 ± 0.8
9	12.797	Гексадекановая	37.2 ± 1.7	36.1 ± 1.6
10	12.839	3-Гидрокси-тетрадекановая	0.6 ± 0.1	8.8 ± 0.5
11	13.570	Изо-гептадекановая	0.2 ± 0.1	0
12	13.694	Антеизо-гептадекановая	0.3 ± 0.1	0
13	13.764	Гептадеценная	0.2 ± 0.0	0
14	13.888	Циклопропан-гептадекановая	0.2 ± 0.1	10.2 ± 0.4
15	14.071	Гептадекановая	0.8 ± 0.1	1.9 ± 0.2
16	15.144	9-Октадеценная	33.2 ± 1.3	8.2 ± 0.5
17	15.186	11-Октадеценная	4.6 ± 0.2	0.4 ± 0.1
18	15.427	Октадекановая	11.0 ± 0.3	3.4 ± 0.2
19	16.170	Октадекадиеновая, конъюгированная	1.3 ± 0.1	0.9 ± 0.2
20	17.556	9-Эйкозеновая	1.5 ± 0.2	0
21	17.597	11-Эйкозеновая	0.9 ± 0.2	0
22	17.845	Эйкозановая	0.5 ± 0.1	0
Коэффициент ненасыщенности жирных кислот			0.83	0.45

Примечание. Приведены средние данные ± стандартная девиация (SD) из анализа двух независимо растущих культур каждого варианта. R.T. – retention time.

кислот. Содержание жирных кислот мутанта характеризовалось более низким коэффициентом ненасыщенности, сравнительно с исходным штаммом (0.45). Спектр жирных кислот мутанта *sprR::Gm* отличался от спектра исходного штамма 94 дикого типа резко увеличенным содержанием циклопропан-гептадекановой и 3-гидрокси-тетрадекановой кислот (в 50- и 15 раз соответственно). Несколько жирных кислот (7, 11–13, 20–22) отсутствовали у мутантного штамма, сравнительно с *S. proteamaculans* 94. Три жирные кислоты (2, 3, 5), отсутствовавшие у штамма 94, были обнаружены у мутантного штамма в количестве меньше 1%. Данные, приведенные выше, показывают, таким образом, что инактивация гена *sprR* *S. proteamaculans* 94 значительно влияла на состав жирных кислот бактерии.

6. Сравнение протеомных карт культур *S. proteamaculans* 94 и мутантов *sprI::Gm* и *sprR::Gm*

Для характеристики полученных мутантов использовали метод протеомного анализа синтезируемых ими белков, сравнительно с белками исходного штамма. Более чем 600 белковых пятен выявилось на каждом из 2-Д гелей, среди которых 30 белковых пятен отличались по интенсивности окрашивания, отражающей существенные количественные изменения в протеомах бактерий дикого типа и мутантов (в 1.5 и более раз).

В случае мутанта *sprI::Gm* экспрессия 20 белков изменялась по сравнению со штаммом дикого типа: экспрессия 11 белков значительно усиливалась, в то время как экспрессия 9 белков снижалась. В случае мутанта *S. proteamaculans sprR::Gm* экспрессия 14 белков изменялась по сравнению со штаммом ди-

Таблица 4. Белковые пятна, демонстрирующие статистически достоверные отличия, и их относительные интенсивности

№	%V		№	%V	
	<i>S. prot.</i> 94	<i>sprI::Gm</i>		<i>S. prot.</i> 94	<i>sprR::Gm</i>
175	0.15 ± 0.00	0.09 ± 0.02	64	0.03 ± 0.00	0
187	0.37 ± 0.01	0.23 ± 0.02	131	0.11 ± 0.01	0.06 ± 0.00
195	1.00 ± 0.11	0.36 ± 0.17	142	0.41 ± 0.06	0.18 ± 0.02
232	0.15 ± 0.01	0.08 ± 0.00	187	0.37 ± 0.01	0.15 ± 0.05
304	0.06 ± 0.00	0	190	0.31 ± 0.00	0.06 ± 0.01
477	0.59 ± 0.07	1.05 ± 0.07	195	1.00 ± 0.11	0.09 ± 0.02
487	0.14 ± 0.01	0.24 ± 0.02	237	0.08 ± 0.01	0
495	0.46 ± 0.08	0.69 ± 0.02	376	0.06 ± 0.00	0
524	0.14 ± 0.00	0.22 ± 0.01	391	0.04 ± 0.01	0
540	0.31 ± 0.08	0.69 ± 0.06	406	0.20 ± 0.01	0.09 ± 0.01
546	0.07 ± 0.01	0.17 ± 0.01	408	0.14 ± 0.03	0
560	0.11 ± 0.03	0	447	0.03 ± 0.01	0.94 ± 0.16
595	0.15 ± 0.01	0.43 ± 0.01	596	0	1.77 ± 0.41
596	0	1.97 ± 0.11	635	0.04 ± 0.01	0
610	0.11 ± 0.00	0.23 ± 0.02			
617	0.26 ± 0.01	0.54 ± 0.04			
619	0.30 ± 0.05	1.16 ± 0.27			
621	0.31 ± 0.02	0.08 ± 0.02			
631	0.14 ± 0.03	0			
642	0.61 ± 0.07	0.05 ± 0.07			

Примечание. Растворимые белки из клеток *S. proteamaculans* 94 и двух мутантов (*sprI::Gm* и *sprR::Gm*) были проанализированы путем разделения на двумерных гелях (2-Д гелях); в первом направлении – по суммарному заряду белков в диапазоне pI 4–7, во втором направлении – по относительной молекулярной массе в районе 75–10 кДа. Каждый штамм представлен тремя независимыми биологическими повторностями. Всего было проанализировано девять гелей (по три для каждого образца). Полужирным шрифтом выделены белки, которые удалось идентифицировать. Значение 0 соответствует отсутствию пятна в данных координатах на геле.

кого типа: экспрессия двух белков заметно усиливалась, а экспрессия 12 белков снижалась (табл. 4).

Выявленные по разнице в интенсивности белковые пятна были проанализированы при помощи MALDI-TOF масс-спектрометрии. В итоге удалось успешно идентифицировать восемь белков (табл. 5). В обоих мутантах наблюдался повышенный уровень экспрессии белков, связанных с устойчивостью штаммов к антибиотикам. Наличие аминогликозид-(3)-N-ацетилтрансферазы (596) в мутантных штаммах, которая отсутствует в штамме дикого типа, определяет их устойчивость к гентамицину. Аминогликозид-(3)-N-ацетилтрансфераза кодируется геном *accC1*, который несет ген-

тамициновая кассета из *p34S-Gm* [21], использованная при получении мутантов. У мутанта *sprR::Gm* была значительно повышена экспрессия β-лактамазы (447). В обоих мутантах наблюдалось значительное снижение экспрессии ФМН-редуктазы (195). У мутанта *sprI::Gm* наблюдалось усиление экспрессии белков, участвующих в защите клеток от стрессов (619, 617, 540). У мутантного штамма *sprR::Gm* происходило снижение уровня экспрессии сукцинил-СоА-синтетазы. Таким образом, мутации в генах, продукты которых были вовлечены в QS-регуляцию, приводили к изменению экспрессии белков, существенных для метаболизма клеток *S. proteamaculans*.

Таблица 5. Белки, идентифицированные в *S. proteamaculans* 94

№	Название белка	Предполагаемые М.в./рI	Номер в базе данных NCBI
Цикл трикарбоновых кислот			
406	Сукцинил-СоА-синтетаза (α -субъединица)	29.8/5.9	157369513
190	Сукцинил-СоА-синтетаза (β -субъединица)	41.3/5.3	157369512
Окислительно-восстановительные реакции			
195	ФМН-редуктаза	26.2/5.0	157368508
Белки общего ответа на стресс			
540	Белок теплового шока GrpE	21.4/4.9	157371919
Защита от окислительного стресса			
619	Тиоредоксин 2	15.6/4.9	157371981
617	Тиоредоксин-зависимая тиолпероксидаза	17.3/5.0	157371748
Устойчивость к антибиотикам			
596	Аминогликозид-(3)-N-ацетилтрансфераза	19.4/5.8	239721
447	β -Лактамаза	31.7/5.7	46129905

ОБСУЖДЕНИЕ

Феномен QS-регуляции вызывает в настоящее время большой интерес исследователей, работающих в различных фундаментальных и прикладных областях биологии, медицины и биотехнологии. Показано, что этот тип регуляции широко распространен у бактерий различных таксономических групп.

Настоящая работа посвящена изучению QS систем грамотрицательных бактерий *Serratia proteamaculans*. Нас интересовало изучение роли QS систем в регуляции ряда метаболических процессов, существенных для жизнедеятельности этих бактерий. Бактерии этого вида характеризуются приспособленностью к обитанию в различных экологических нишах — они используют различные субстраты для питания, живут в почве, в ризосфере растений, участвуют в порче сельскохозяйственных продуктов [11, 13, 29]. QS системы у бактерий *S. proteamaculans* изучены мало, до наших работ [14, 15] имелась только одна статья с достаточно изученной системой QS-регуляции *S. proteamaculans* [11]. В качестве модельного объекта нами был выбран штамм *S. proteamaculans* 94, выделенный из мяса, испортившегося в холодильной камере мясокомбината. Штамм способен гидролизовать коллаген при низкой температуре и является продуцентом нескольких внеклеточных протеиназ [13].

В настоящей работе мы показали, что синтез АГЛ у *S. proteamaculans* 94 не зависит от белка SprR. Организация генов SprI/SprR системы была конвергентной [14]. Ранее было показано, что у бактерий с конвергентной организацией QS генов экспрессия гена синтазы *luxI*-типа, как правило, не зависит от R-белка [8–10, 12]. Это отличается от основной концепции QS-регуляции, где необходима активация АГЛ белка LuxR для экспрессии гена синтазы АГЛ (в случае классической QS системы *Vibrio fischeri*). Анализ нуклеотидной последовательности промоторной области перед геном *sprI* не выявил регуляторного элемента типа *lux*-бокс [14], с которым в системе *V. fischeri* связывается комплекс белка LuxR с АГЛ, что приводит к дальнейшей активации транскрипции *lux*-оперона. Таким образом, приведенные выше данные показывают, что аутоиндукция синтеза АГЛ, наблюдаемая у *V. fischeri*, не характерна для исследуемого штамма *S. proteamaculans* 94. Как мы показали в предыдущей работе, в промоторном районе гена *sprR* присутствует гомолог *lux*-бокса, *spr*-бокс, который перекрывается с –10 сайтом в этом промоторе. Поэтому связывание белка SprR с *spr*-боксом может ингибировать транскрипцию *sprR* гена, мешая связыванию РНК-полимеразы. Такая закономерность была показана для регуляции транскрипции некоторых белков R-типа у *Serratia* и *Pantoea* [14]. Полученные данные показывают сходство регуляторной SprI/SprR QS системы

S. proteamaculans 94 с QS системами других бактерий семейства Enterobacteriaceae.

В настоящей работе была изучена роль QS систем в регуляции клеточных процессов, относящихся к различным сторонам метаболизма *S. proteamaculans* 94. Энтеробактерии рода *Serratia* являются продуцентами большого количества внеклеточных ферментов, используя их для утилизации высокомолекулярных соединений окружающей среды и в качестве факторов вирулентности при инвазии и колонизации других организмов. Мы исследовали влияние мутаций в генах QS системы *S. proteamaculans* 94 на синтез протеаз, липаз, хитиназ и гемолизина. В предыдущей работе было показано, что инактивация гена *sprI* приводила к снижению экзопротеазной, хитинолитической активностей и не вызывала изменения липазной и гемолитической активностей [14]. Мутация в гене *sprR* не оказывала заметного влияния на изученные ферментативные активности.

Представляло интерес исследовать влияние мутаций в QS генах *sprI* и *sprR* на регуляцию образования биопленок у *S. proteamaculans* 94 – процесс, который у многих бактерий зависит от QS-регуляции [12, 27, 28]. Было показано, что мутация в гене *sprR* не оказывала влияния на уровень образования биопленок. В мутантном по гену *sprI* штамме образование биопленок снижалось вдвое по сравнению с уровнем биопленок в исходном штамме. При этом добавление экзогенного 3-оксо-С6-АГЛ (доминирующий тип АГЛ у *S. proteamaculans* 94) восстанавливало способность к формированию биопленки практически до уровня штамма дикого типа. Полученные результаты показывают, что образование биопленок у *S. proteamaculans* 94 регулируется позитивно 3-оксо-С6-ГЛ-зависимой QS системой. Эти данные согласуются с результатами аналогичных исследований *S. liquefaciens* и *S. marcescens* [28, 30]. По данным этих авторов, у АГЛ-дефицитных мутантов способность формировать биопленки снижалась по сравнению со штаммом дикого типа.

Интересно, что у другого исследованного нами вида *Serratia* – *S. plymuthica* (штамм HRO-C48) инактивация гена синтазы АГЛ *splI* вызывала увеличение уровня образованных биопленок в 2–2.5 раза, а введение в клетки этого мутанта плазмиды с клонированными генами *splI/splR* снижало формирование биопленок до нормального уровня. В этом случае формирование биопленок у *S. plymuthica* регулировалось негативно SplIR QS системой. У другого штамма этого вида, *S. plymuthica* IC1270, QS система SplIR также оказывала негативное влияние на образование биопленок.

Введение в клетки *S. plymuthica* IC1270 рекомбинантной плазмиды, несущей клонированные гены *splI/splR* из *S. plymuthica* HRO-C48, приводило к снижению вдвое формирования биопленок [31]. Эти данные показывают, что QS-регуляция формирования биопленок у рода *Serratia* может быть видоспецифичной.

Успешное формирование биопленок связано со способностью бактерий к адгезии. Мы показали, что мутация в гене *sprI* приводила к изменению характера роста клеток *S. proteamaculans* 94 в жидкой среде и резко снижала способность клеток адсорбироваться на поверхности стекла. Это могло быть вызвано изменением структуры клеточных стенок бактерий. В связи с этим мы исследовали состав жирных кислот, многие из которых входят в состав клеточных мембран бактерий, у *S. proteamaculans* 94 и мутантных штаммов [[14] и настоящая работа].

Сравнительный анализ показал значительные изменения состава жирных кислот мутантных штаммов по сравнению со штаммом дикого типа: содержание некоторых жирных кислот изменялось более чем на порядок, существенно изменилось соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. По сравнению со штаммом *S. proteamaculans* 94 дикого типа жирнокислотный состав мутантов с нокаутом генов *sprI* [14] и *sprR* характеризовался меньшей ненасыщенностью, что свидетельствует о более плотной упаковке ЛПС на клеточной поверхности. Возможно, это один из механизмов адаптации клеток к неблагоприятным условиям окружающей среды, позволяющий повысить толерантность мембран к стрессовым факторам. Известно, что соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в составе ЛПС влияет на физические свойства мембран бактерий [32, 33]. Фазовое состояние жидкокристаллической структуры липидного слоя мембраны, степень ее текучести, в свою очередь, оказывают весьма существенное влияние на вязко-эластические свойства клеток, их способность к деформации, на активность мембранно-связанных ферментов, на проницаемость мембран.

Чтобы получить общую оценку количества белков, синтез которых зависел от QS-регуляции, был проведен сравнительный протеомный анализ клеток исходного штамма и мутантов. Полученные результаты демонстрируют, что экспрессия более 30 белков находится под влиянием SprIR QS-системы. Ранее было показано, что экспрессия как минимум 39 белков у *S. proteamaculans* B5a находилась под контролем 3-оксо-С6-ГЛ-зависимой QS системы [11]. Таким образом, наши

данные согласуются с результатами аналогичных исследований других авторов.

В рамках настоящей работы впервые была проведена идентификация некоторых белков, для которых наблюдались отличия в уровне экспрессии в штамме дикого типа и мутантах. В обоих мутантах обнаружены изменения в синтезе существенно важных для метаболизма бактерий белков. Например, мы показали значительное снижение экспрессии ФМН-редуктазы, являющейся одним из компонентов дыхательной цепи бактерий, у обоих мутантов — почти в 3 раза для *sprI::Gm* мутанта и более чем в 10 раз для мутанта *sprR::Gm*. У мутантного штамма *sprI::Gm* наблюдалась усиленная экспрессия белков, участвующих в защите клеток от стрессов: тиоредоксина 2, тиоредоксин-зависимой тиолпероксидазы, белка теплового шока GrpE.

У мутантного штамма *sprR::Gm* отмечено снижение уровня экспрессии двух субъединиц белка сукцинил-СоА-синтетазы: более чем в 2 раза для α -субъединицы и в 5 раз для β -субъединицы. Сукцинил-СоА-синтетаза — один из ключевых ферментов цикла лимонной кислоты, катализирующий реакцию образования свободного сукцината. При этой реакции происходит образование богатого энергией АТФ (ГТФ) за счет АДФ и минерального фосфата с использованием сукцинил-СоА. Изменения, вызванные мутацией в гене *sprR*, могли привести к дефициту АТФ и общего уровня энергии в клетке.

Кроме того, было обнаружено, что у мутанта *sprR::Gm* значительно усиливалась экспрессия β -лактамазы — более чем в 30 раз по сравнению с ее экспрессией в исходном штамме. Эти ферменты отвечают за устойчивость бактерий к β -лактамам антибиотикам, включая карбапенемы. Синтез карбапенемов обнаружен у бактерий рода *Serratia* [12]. Хотя мы не имеем данных о синтезе карбапенема у *S. proteamaculans* 94, можно предположить, что этот антибиотик также продуцируется штаммом 94. В этом случае репрессия синтеза β -лактамазы в штамме дикого типа полезна для бактерии, так как β -лактамаза разлагает карбапенем, который может играть существенную роль в конкуренции с другими бактериями.

Полученные нами данные протеомного анализа показывают, что идентифицированные белки, экспрессия которых изменяется в результате мутаций QS-генов, являются компонентами важных клеточных процессов.

Работа частично финансировалась грантами РФФИ № 18-04-00375, 19-04-00756 и грантом

Минобрнауки России, государственное задание ЯрГУ, работа № 0856-2020-0008.

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. *Fuqua C., Winans S.C., Greenberg E.P.* Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR_LuxI family of quorum sensing transcriptional regulators // *Annu. Rev. Microbiol.* 1996. V. 50. P. 727–751. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.727>
2. *Waters C.M., Bassler B.L.* Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria // *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2005. V. 21. P. 319–346. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001>
3. *Хмель И.А., Метлицкая А.З.* Quorum Sensing регуляция экспрессии генов — перспективная мишень для создания лекарств против патогенности бактерий // *Мол. биология.* 2006. Т. 40. С. 195–210.
4. *Веселова М.А.* Quorum Sensing регуляция у псевдомонад // *Генетика.* 2010. Т. 46. № 2. С. 149–158.
5. *Зайцева Ю.В., Попова А.А., Хмель И.А.* Регуляция типа Quorum Sensing у бактерий семейства Enterobacteriaceae // *Генетика.* 2014. Т. 50. № 14. С. 373–391.
6. *Papenford K., Bassler B.* Quorum-sensing signal-response systems in gram-negative Bacteria // *Nat. Rev. Microbiol.* 2016. V. 14. P. 576–588. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.89>
7. *Whiteley M., Diggle S.P., Greenberg E.P.* Bacterial quorum sensing: The progress and promise of an emerging research area // *Nature.* 2017. V. 551(7680). P. 313–320. <https://doi.org/10.1038/nature.24624>
8. *Beck von Bodman S., Majerczak D.R., Coplin D.L.* A negative regulator mediates quorum-sensing control of exopolysaccharide production in *Pantoea stewartii* subsp. *Stewartii* // *Proc. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. P. 7687–7692. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.13.7687>
9. *Hornig Y.T., Deng S.C., Daykin M. et al.* The LuxR family protein SpnR functions as a negative regulator of N-acylhomoserine lactone-dependent quorum sensing in *Serratia marcescens* // *Mol. Microbiol.* 2002. V. 45. P. 1655–1671. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03117.x>
10. *Minogue T.D., Wehland-von Trebra M., Bernhard F., von Bodman S.B.* The autoregulatory role of EsaR, a quorum-sensing regulator in *Pantoea stewartii* ssp. *stewartii*: evidence for a repressor function // *Mol. Microbiol.* 2002. V. 44. P. 1625–1635. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02987.x>

11. Christensen A.B., Riedel K., Eberl L. et al. Quorum-sensing-directed protein expression in *Serratia proteamaculans* B5a // *Microbiology*. 2003. V. 149. P. 471–483.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.25575-0>
12. Van Houdt R., Givskov M., Michiels C.W. Quorum sensing in *Serratia* // *FEMS Microbiol. Rev.* 2007. V. 31. P. 407–424.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00071.x>
13. Demidyuk I.V., Kalashnikov A.E., Gromova T.Y. et al. Cloning, sequencing, expression, and characterization of protealysin, a novel neutral proteinase from *Serratia proteamaculans* representing a new group of thermolysin-like proteases with short N-terminal region of precursor // *Protein Expression and Purification*. 2006. V. 47. P. 551–561.
<https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.12.005>
14. Zaitseva Y.V., Koksharova O.A., Lipasova V.A. et al. SprI/SprR Quorum Sensing System of *Serratia proteamaculans* 94 // *BioMed. Res. Internat.* Volume 2019, Article ID 3865780, 10 p.
<https://doi.org/10.1155/2019/3865780>
15. Zaitseva Y.V., Lipasova V.A., Plyuta V.A. et al. Effect of inactivation of *luxS* gene on the properties of *Serratia proteamaculans* 94 strain // *Folia Microbiol. (Praha)*. 2019. V. 64. P. 265–272.
<https://doi.org/10.1007/s12223-018-0657-5>
16. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976. 436 с.
17. McClean K.H., Winson M.K., Fish L. et al. Quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acylhomoserine lactones // *Microbiology*. 1997. V. 143. P. 3703–3711.
<https://doi.org/10.1099/00221287-143-12-3703>
18. Shaw P.D., Ping G., Daly S.L. et al. Detecting and characterizing *N*-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. P. 6036–6041.
<https://doi.org/10.1073/pnas.94.12.6036>
19. Ausubel F.M., Brentt R., Kingston R.E. (Eds) *Current Protocols in Molecular Biology*. N.Y.: John Wiley & Sons Inc., 1994.
20. Hoang T.T., Karkhoff-Schweizer R.R., Kutchma A.J., Schweizer H.P. A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants // *Gene*. 1998. V. 212. P. 77–86.
[https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(98\)00130-9](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(98)00130-9)
21. Dennis J.J., Zylstra G.J. Plasmids: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of gram-negative bacterial genomes // *Appl. Environ. Microbiol.* 1998. V. 64. P. 2710–2715. 0099-2240/98/\$04.0010
22. Popova A.A., Koksharova O.A., Lipasova V.A. et al. Inhibitory and toxic effects of volatiles emitted by strains of *Pseudomonas* and *Serratia* on growth and survival of selected microorganisms, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster* // *BioMed Res. Int.* 2014. V. 2014. Article ID 125704, 11 p.
<https://doi.org/10.1155/2014/125704>
23. Microbial ID Inc. *Microbial identification system operational manual, version 4*. Microbial ID Inc., Newark, Del, 1992.
24. Stead D.E., Sellwood J.E., Wilson J., Viney I. Evaluation of a commercial microbial identification system based on fatty acid profiles for rapid, accurate identification of plant pathogenic bacteria // *J. Appl. Bacteriol.* 1992. V. 72. P. 315–321.
25. Yan J.X., Wait R., Berkelman T. et al. A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry // *Electrophoresis*. 2000. V. 21. P. 3666–3672.
[https://doi.org/10.1002/1522-2683\(200011\)21:17<3666::AID-ELPS3666>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200011)21:17<3666::AID-ELPS3666>3.0.CO;2-6)
26. Shevchenko A., Chernushevich I., Wilm M., Mann M. De novo peptide sequencing by nano-electrospray tandem mass spectrometry using triple quadrupole and quadrupole/time-of-flight instruments // *Methods Mol. Biol.* 2000. V. 146. P. 1–16.
<https://doi.org/10.1385/1-59259-045-4:1>
27. Davies D.G., Parsek M.R., Pearson J.P. et al. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm // *Science*. 1998. V. 280. P. 295–298.
28. Labbate M., Queck S.Y., Koh K.S. et al. Quorum sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1 // *J. Bacteriol.* 2004. V. 186. P. 692–698.
<https://doi.org/10.1128/jb.186.3.692-698.2004>
29. Ercolini D., Russo F., Nasi A. et al. Mesophilic and psychrotrophic bacteria from meat and their spoilage potential in vitro and in beef // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. V. 75. P. 1990–2001.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02762-08>
30. Rice S.A., Koh K.S., Queck S.Y. et al. Biofilm formation and sloughing in *Serratia marcescens* are controlled by quorum sensing and nutrient cues // *J. Bacteriol.* 2005. V. 187. P. 3477–3485.
<https://doi.org/10.1128/JB.187.10.3477-3485.2005>
31. Зайцева Ю.В., Волошина П.В., Луи Х. и др. Участие глобальных регуляторов GrrS, RpoS и SplIR в формировании биопленок у *Serratia plymuthica* // *Генетика*. 2010. Т. 46. № 5. С. 616–621.
32. Sinensky M. Homeoviscous adaptation – a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1974. V. 71. P. 522–525.
<https://doi.org/10.1073/pnas.71.2.522>
33. Cybulski L.E., Albanesi D., Mansilla M.C. et al. Mechanism of membrane fluidity optimization: isothermal control of the *Bacillus subtilis* acyl-lipid desaturase // *Mol. Microbiol.* 2002. V. 45. P. 1379–1388.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03103.x>

Features of the SprIR Quorum Sensing System of *Serratia proteamaculans* 94 and Its Participation in the Regulation of Cellular Processes

Yu. V. Zaitseva^{a, b}, V. A. Lipasova^a, O. A. Koksharova^{a, c}, V. A. Plyuta^a,
I. V. Demidyuk^a, L. S. Chernin^d, and I. A. Khmel^{a, *}

^a*Institute of Molecular Genetics of National Research
Center "Kurchatov Institute", Moscow, 123182 Russia*

^b*Demidov Yaroslavl State University, Yaroslavl, 150003 Russia*

^c*Belozersky Institute of Physical-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119992 Russia*

^d*Department of Plant Pathology and Microbiology, the Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, 76100 Israel*

**e-mail: khmel@img.ras.ru*

The quorum sensing (QS) regulatory system of the psychrotrophic strain *Serratia proteamaculans* 94 was investigated. A mutant was constructed with inactivated gene *sprR* encoding the regulatory receptor protein SprR. Inactivation of this gene was shown to affect the composition of fatty acids synthesized by *S. proteamaculans* 94, and did not affect the N-acyl-L-homoserine-lactones (AHL) synthesis, the activities of extra-cellular proteases, chitinases, hemolysins, swimming motility of cells and suppression of mycelium growth of fungal plant pathogens by volatile compounds emitted by this strain. Inactivation of the *sprI* gene (but not the *sprR* gene) reduced the biofilm formation which increased when exogenous AHL was added to the culture. The comparative proteomic analysis of cells of the parent strain and mutant strains with inactivated *sprI* and *sprR* genes showed that the expression of 30 proteins in *S. proteamaculans* 94 is affected by SprIR quorum sensing system.

Keywords: quorum sensing, *Serratia proteamaculans*, biofilms, enzymes, fatty acids, proteomic analysis.

УДК 575.116:633.16

АНАЛИЗ СЦЕПЛЕНИЯ ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ КАЧЕСТВЕННЫЕ ПРИЗНАКИ РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ НА ХРОМОСОМЕ 6

© 2021 г. В. П. Нецветаев*

Белгородский федеральный аграрный научный центр Российской академии наук, Белгород, 308001 Россия

*e-mail: v.netsvetaev@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.03.2020 г.

После доработки 06.04.2020 г.

Принята к публикации 08.07.2020 г.

На основе генетического анализа F_2 по F_3 комбинации $M13 \times r$ “e”+o проведена оценка частот рекомбинации между генетическими факторами хромосомы 6 (=6H) у ячменя. Исследование включало следующие гены: *r*“e” (гладкие ости “e”), *sex 1* (щуплый эндосперм, ксения 1), *o* (оранжевая окраска цветковой чешуи), *gs 4* (отсутствие воскового налета на колосе 4), *Amy 1–7* (α -амилаза 1, тип 7). Локус *Amy 1* идентифицировали путем разделения альфа-амилазы с помощью электрофореза при pH 8.3. На основе пятиточного теста установлен следующий порядок расположения изученных локусов в хромосоме 6 (=6H): **6S–r“e” (=raw 5) – gs 4 (=gsh 4) – o (=rob 1) – cen– Sex 1 – Amy 1 – 6L**. Оценка сцепления и анализ данных литературы свидетельствуют, что среди указанных генов локусы *Sex 1* и *Amy 1* находятся в длинном плече хромосомы 6, остальные генетические факторы ассоциированы с коротким плечом этой хромосомы. Центромера находится между генетическими факторами *Sex 1* и *o* (=rob 1). В целом представленные данные свидетельствуют о необходимости корректировки генетической карты сцепления хромосомы 6 (= 6H) ячменя.

Ключевые слова: ячмень, рекомбинация, гены, карта сцепления, изоферменты альфа-амилаза, хромосома 6 (= 6H).

DOI: 10.31857/S0016675821020077

Альфа-амилаза (К.Ф. 3.2.1.1) зерновых обнаруживается в прорастающих семенах ячменя [1–3]. Следует отметить, что зрелые и прорастающие зерна обладают также бета-амилазной активностью (К.Ф. 3.2.1.2). Есть несколько физико-химических способов, позволяющих отличить α - и β -амилазы. Так, в присутствии мочевины происходит инактивация β -амилазы при сохранении α -амилазной активности [3], что позволяет провести генетический анализ изоферментного состава α -амилазы. Для выявления вариантов альфа-амилазы ячменя используется изоэлектрофокусирование [4] или обычный электрофорез при pH 8.3 [5]. Изоферменты альфа-амилаз у ячменя контролируются двумя локусами *Amy 1* и *Amy 2*. На основе анализа пшенично-ячменных дополненных линий установлено, что локус *Amy 1* находится в хромосоме 6 (=6H), а фактор *Amy 2* в хромосоме – 1 (=7H) ячменя [4]. Анализ сцепления с маркерными генами хромосомы 1 (=7H) показал, что локус *Amy 2* расположен в длинном плече хромосомы 1 на расстоянии $19.91 \pm 3.55\%$ рекомбинации от гена *n* (=nud1), обуславливающего голозерность зерна [6]. По данным G. Nielsen и O. Frydenberg [7] *Amy 1* ориентирован в длинном плече хромосомы 6 в следующем порядке, относительно двух из-

вестных генов: *o* – x_n – *Amy 1*. В сводной карте сцепления хромосомы 6 локус *Amy 1* находится в длинном плече хромосомы 6 дистально по отношению к гену x_n [8, 9].

Наши данные показали некорректность расположения локуса *Amy 1* и известных генов на сводной карте сцепления хромосомы 6. В связи с этим приводим полученные нами результаты по корректировке места положения ряда известных генов, контролирующих морфологические признаки растений ячменя и локуса *Amy 1*, на карте сцепления хромосомы 6.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для картирования и локализации генов, ответственных за синтез этого фермента, исследовали гибридную комбинацию от скрещивания образцов ячменя, несущих маркерные гены, охватывающие хромосому 6 и отличающиеся по изоэнзимам α -амилаз. В комбинации скрещивания один родитель – Risø M13 (=Risø 13) – являлся носителем следующих аллелей: *R*“e” (Зазубренные ости “e”), *sex 1* (=lys 5) (щуплый эндосперм, ксения 1), *O* (Соломенная окраска цветковой чешуи), *Gs 4* (Наличие воскового налета на колосе 4),

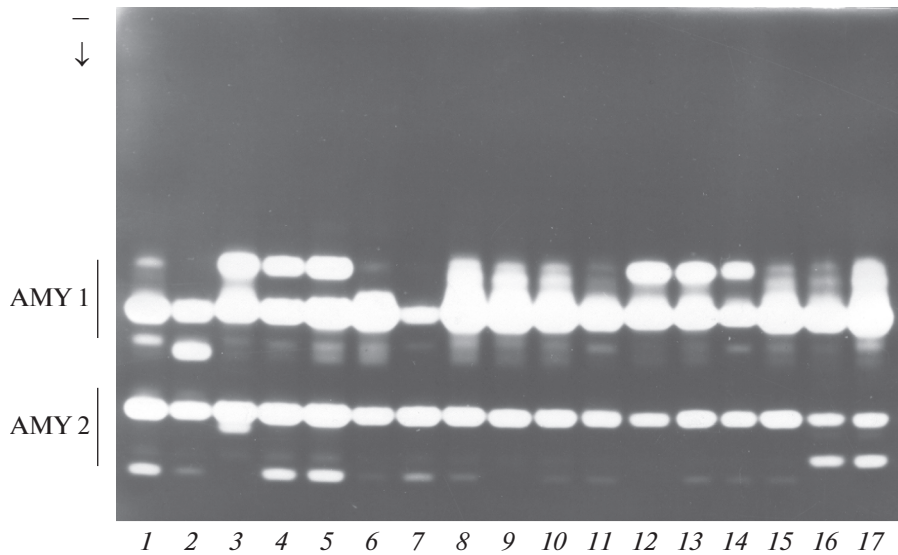


Рис. 1. Зимограммы α -амилаз отдельных зерен различных сортов ячменя: 1 – DoubletXXXHORDq; 2, 3 – Треби (к-11835); 4, 5 – Харьковский 74; 6, 7 – Уссурийский 8 (к-18334); 8, 9 – Круглик 21 (к-13031); 10, 11 – Носовский 9; 12, 13 – Носовский 6 (к-19828); 14, 15 – Носовский 2 (к-19016); 16, 17 – Одесский 36.

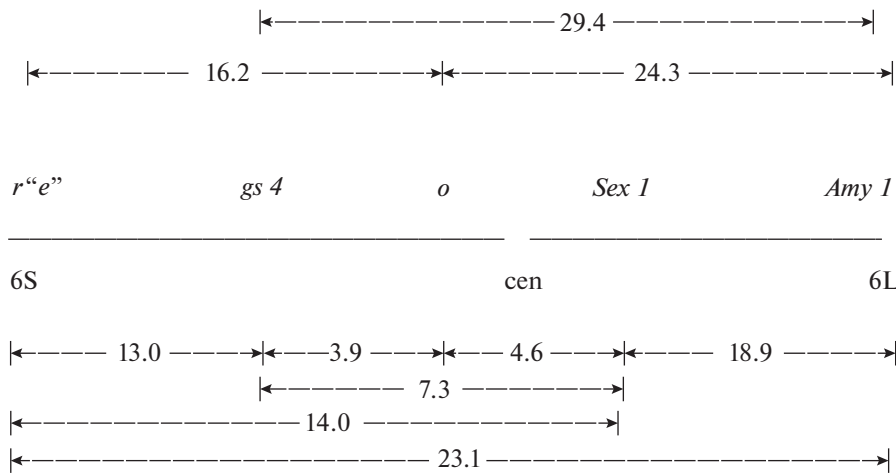


Рис. 2. Карта сцепления пяти локусов хромосомы 6 (=6H) ячменя.

V (Двурядный колос), *Amy 1-6* (α -амилаза 1 тип 6). Другой родитель *r* “*e*” + *o* нес, соответственно, следующие альтернативные генетические факторы: *r* “*e*” (гладкие ости “*e*”), *Sex 1* (Выполненный эндосперм), *o* (оранжевая окраска цветковой чешуи), *gs 4* (отсутствие воскового налета на колосе 4), *v* (шестирядный колос), *Amy 1-7* (α -амилаза 1 тип 7). По α -амилазе 2 родители не различались и несли вариант AMY 2–1 (рис. 1). Гены *r* “*e*”, *o*, *gs 4*, *sex 1* расположены в хромосоме 6, а *v* находится в хромосоме 2 [8, 9].

Учитывая рекомендуемые изменения в символике обозначения используемых генов [10], в скобках привожу рекомендуемые их символы: *r* “*e*” (=raw 5) – гладкие ости 5, *o* (=rob 1) – оран-

жевая лемма 1, *sex 1* – шуплый эндосперм, ксения 1, *gs 4* (=gsh 4) – глянецвый 4. Наиболее распространенные старые названия генов приведены в табл. 1 и на рис. 2.

Зерно, предназначенное для электрофоретического анализа α -амилазы, проращивали в темноте при 20°C в течение 5–7 суток. Для экстракции фермента проросшую зерновку освобождали от пленок, помещали в толстостенную стеклянную пробирку, заливали раствором 0.2%-ного хлористого кальция с 20%-ной сахарозой и 0.03%-ного бромфенолового синего. После измельчения эндосперма палочкой из стекла или нержавеющей стали, суспензию настаивали 1 ч при комнатной температуре. После центрифугирования надосадочную

Таблица 1. Оценка сцепления *Amy 1* с генетическими факторами хромосомы 6 (=6H) (данные F₂ по F₃ M13 × × r “e” + o)

Аллели $\frac{A}{a} \times \frac{B}{b}$	Фенотипы в F ₂ (F ₂ по F ₃)			χ^2_L	Рекомбинация, %	
	BB	Bb	bb			
$\frac{R\text{“e”}}{r\text{“e”}} \times \frac{O}{o}$	AA Aa aa	21 5 0	8 36 1	1 7 0	55.52	16.23 ± 3.30
$\frac{R\text{“e”}}{r\text{“e”}} \times \frac{Gs\ 4}{gs\ 4}$	AA Aa aa	24 6 0	6 36 1	0 6 0	74.28	13.01 ± 2.90
$\frac{R\text{“e”}}{r\text{“e”}} \times \frac{V}{v}$	AA Aa aa	6 14 0	14 29 1	10 5 0	2.59	Независимая
$\frac{R\text{“e”}}{r\text{“e”}} \times \frac{Sex\ 1}{sex\ 1}$	AA Aa aa	0 7 0	10 39 1	20 2 0	58.39	14.03 ± 3.01
$\frac{O}{o} \times \frac{Gs\ 4}{gs\ 4}$	AA Aa aa	26 4 0	0 41 2	0 0 6	127.40	3.88 ± 1.57
$\frac{O}{o} \times \frac{V}{v}$	AA Aa aa	6 9 5	15 27 2	5 9 1	1.02	Независимая
$\frac{O}{o} \times \frac{Sex\ 1}{sex\ 1}$	AA Aa aa	0 0 7	5 44 1	21 1 0	99.98	4.59 ± 1.68
$\frac{Gs\ 4}{gs\ 4} \times \frac{Sex\ 1}{sex\ 1}$	AA Aa aa	0 1 6	9 41 0	21 1 0	90.10	7.33 ± 2.13
$\frac{Gs\ 4}{gs\ 4} \times \frac{V}{v}$	AA Aa aa	7 9 4	16 26 2	7 8 0	1.68	Независимая
$\frac{V}{v} \times \frac{Sex\ 1}{sex\ 1}$	AA Aa aa	4 2 1	12 29 9	4 13 5	2.77	Независимая
$\frac{R\text{“e”}}{r\text{“e”}} \times \frac{Amy\ 1-7}{Amy\ 1-6}$	AA Aa aa		15 44 1	15 4 0	23.81	23.08 ± 5.31
$\frac{O}{o} \times \frac{Amy\ 1-7}{Amy\ 1-6}$	AA Aa aa		13 39 8	13 6 0	16.17	24.26 ± 5.40
$\frac{Sex\ 1}{sex\ 1} \times \frac{Amy\ 1-7}{Amy\ 1-6}$	AA Aa aa		7 44 9	0 6 13	19.69	18.90 ± 4.89
$\frac{Gs\ 4}{gs\ 4} \times \frac{Amy\ 1-7}{Amy\ 1-6}$	AA Aa aa		17 37 6	13 6 0	11.79	29.37 ± 5.98
$\frac{V}{v} \times \frac{Amy\ 1-7}{Amy\ 1-6}$	AA Aa aa		14 35 11	6 9 4	0.11	Независимая

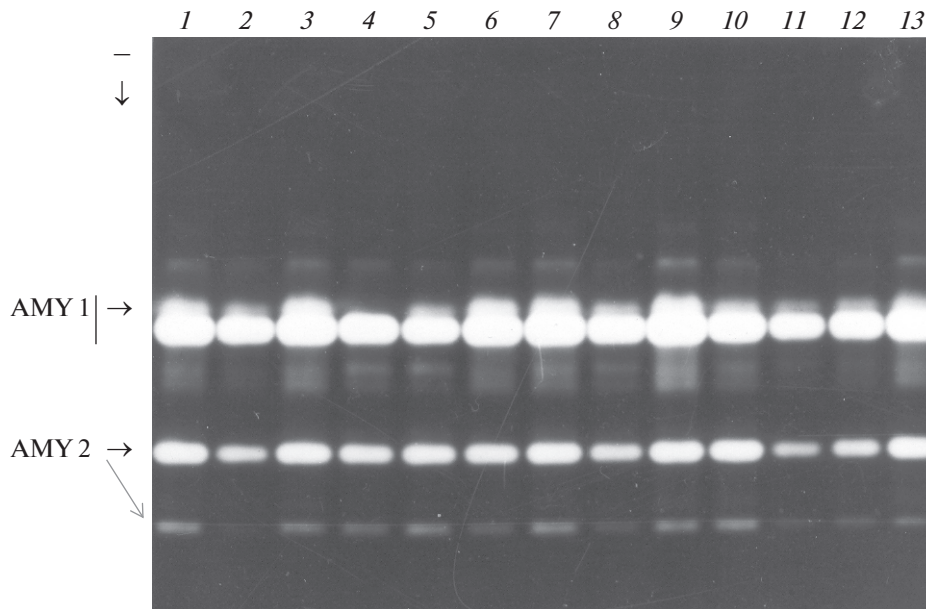


Рис. 3. Зимограммы α -амилаз зерна гибридов $F_2 M13 \times r$ "e" + o. M13 имеет зимограмму, подобную представленной на дорожке 4 (AMY 1–6), второй родитель – как на дорожке 3 (AMY 1–7). Стрелкой отмечен изоэнзим AMY 1, по которому наблюдалось различие.

жидкость использовали для электрофореза. Электрофоретическое разделение α -амилаз и выявление его изоферментного состава проводили по прописи В.П. Нецветаева [5]. С целью инактивации β -амилазы в гель вводили 5 М мочевины.

Для оценки сцепления использовали χ^2 -тест [11]. Величину рекомбинацию определяли методом максимального правдоподобия [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Типы изоферментов амилаз, контролируемых локусами *Amy 1* и *Amy 2* иллюстрирует рис. 1. Здесь приведены зимограммы этого фермента некоторых сортов ячменя. Как видно, зона изоферментов с медленной подвижностью контролируется локусом *Amy 1*, а синтез более подвижных ферментов обусловлен локусом *Amy 2*. Результаты по локализации *Amy 2* в хромосоме 1 (=7Н) представлены ранее [6].

На рис. 3 приведены зимограммы родителей и потомства F_2 комбинации скрещивания $Ris\delta M13 \times r$ "e" + o. Как видно, различия между изоферментами AMY 1–6 и AMY 1–7, контролируемые локусом *Amy 1*, затрагивают только верхнюю часть спектра. $Ris\delta M13$ не имеет активности в самой верхней части зимограммы. Напротив, у родителя r "e" + o в этой части спектра наблюдается ферментативная активность (отмечено стрелкой).

Результаты расщепления потомства F_2 (тестирование по F_3) комбинации $Ris\delta M13 \times r$ "e" + o и оценка сцепления между генами, по которым отличались родители, представлены в табл. 1. Как

видно, гены хромосомы 6 (=6Н) обнаружили между собой сцепление. С другой стороны, локус *V* (= *Vrs 1*) двурядный колос, *v* (= *vrs 1*) шестирядный колос находятся в хромосоме 2 (=2Н) и, соответственно, показано независимое наследование со всеми генами хромосомы 6.

На основе полученных данных можно составить карту сцепления пяти изученных генов хромосомы 6 (рис. 2). Следует отметить, что порядок расположения исследуемых генов не совпадает с генетической картой этой хромосомы ячменя, представленной ранее [8, 9].

Из показанных на рис. 3 генов, фактор *Oo* подвергался телотрисомному анализу. В результате было установлено, что ген *o* (оранжевая окраска цветковой чешуи) находится в коротком плече хромосомы 6 [13]. В дальнейшем D. Falk [14, 15], пользуясь этим же методом, подтвердил положение локуса *o* в коротком плече хромосомы 6 и установил, что ген *sex 1* находится проксимально, в длинном плече этой хромосомы. Следовательно, центромера ориентирована между генами *o* и *Sex 1*. Положение других представленных здесь генов этой хромосомы с помощью телотрисомного анализа по плечам не исследовано. На обобщенных картах сцепления этой хромосомы [8, 9] локусы *r* "e", *gs 4*, *Sex 1* расположены в длинном плече хромосомы 6. В частности R. Yoshimi и T. Konishi [16] при картировании локусов *Aat* и *19* относительно гена *o* отнесли его положение к длинному плечу хромосомы 6 проксимально. Они не учли более ранних сообщений [13–15] о переносе положения гена *o* в короткое плечо этой хромосомы около

центромеры. Соответственно в последнем описании этих генов и хромосомном положении их на картах сцепления указано длинное плечо хромосомы 6 (6L) [10].

К настоящему времени имеются достаточно подробные карты сцепления хромосомы 6 ячменя [17, 18]. К сожалению они охватывают только ДНК-маркеры, но не включают гены, отвечающие за морфологические признаки растений ячменя. В то же время следует отметить, что местоположение локуса *Amy 1* относительно этих маркеров на хромосоме 6 указано. Так, по данным X. Qi с соавт. [17] *Amy 1* занимает положение в 84.9 сМ на карте хромосомы 6, но плечо не указано. P. Langridge с соавт. [18] отметили положение центромеры на этой хромосоме и показали, что локус *Amy 1* находится на расстоянии в 19.6 сМ от центромеры в длинном плече хромосомы 6. При использовании картирующей функции D. Kozambi [19] оценка расстояния между генами *Sex 1* и *Amy 1* в нашем случае составила 20.00 ± 5.71 сМ. Если рассчитывать это расстояние на основе картирующей функции N. Bailey [20], оно будет равно 23.5 ± 7.86 сМ. Следовательно, учитывая ошибку оценки дистанции, в обоих случаях очевидно, что данные P. Langridge с соавт. [18] близки к нашим результатам. Тогда наиболее вероятно, что ген *Sex 1* действительно может находиться в длинном плече вблизи центромеры хромосомы 6; это не противоречит приведенным выше данным, а также подтверждает сведения D. Falk [14, 15]. Расположение локусов *Aat* и *19* в длинном плече хромосомы 6 согласуется с полученными нами данными, и укладывается в карту сцепления этих генов относительно локусов *Amy 1* и *o*.

Таким образом, на основе учета данных по величинам рекомбинации R. Yoshimi и T. Konishi [16] наиболее вероятен следующий порядок расположения представленных локусов: 6S–*o*–*sep*–*Sex 1*–*Amy 1*–*Aat*–*19*–6L. Это допустимо при условии нахождения сегмента *Aat*–*19* в длинном плече хромосомы 6. К сожалению для картирования этого участка хромосомы недостаточно одного маркерного гена *o*, который использовали R. Yoshimi и T. Konishi [16].

При обобщении полученных нами результатов и представленных литературных данных наиболее вероятное расположение изученных нами генов относительно друг друга и по плечам на хромосоме 6 иллюстрирует рис. 2. Таким образом, на основе пятиточечного теста установлен порядок расположения пяти локусов в хромосоме 6 (=6H) ячменя: 6S–*r*^{"e"} (=raw 5)–*gs 4* (=gsh 4)–*o* (=rob 1)–*cen*–*Sex 1*–*Amy 1*–6L.

Представленные данные свидетельствуют о необходимости корректировки генетической карты сцепления хромосомы 6 (=6H) ячменя. Эти

изменения затрагивают четыре локуса, контролирующих морфологические признаки ячменя.

Работа выполнена по Госзаданию: № 007-00489-18-00.

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. *Schwimmer S.* The malt amylases // *Brewers Digest*. 1951. V. 26. P. 47–52.
2. *Harris G.* The enzyme content and enzymatic transformation of malt // *Barley and Malt* / Ed. Cook A.H. N.Y., London, 1962. P. 583–894.
3. *Frydenberg O., Nielsen G.* Amylase isozymes in germinating barley seeds // *Hereditas*. 1966. V. 54. № 8. P. 123–139.
4. *Brown A.H.D., Jacobsen J.V.* Genetic basis and natural variation of α -amylase isozymes in barley // *Genet. Res. Camb.* 1982. V. 40. P. 315–324. <https://doi.org/10.1017/S0016672300019182>
5. *Нецветаев В.П.* Расположение β -амилазного локуса (*Bmy 1*) в хромосоме 4 ячменя // *Цитология и генетика*. 1993. Т. 27. № 5. С. 74–78.
6. *Netsvetaev V.P.* Chromosomal location of loci *Est12* and *Amy2* in barley // *Barley Genet. Newsletter*. 1993. V. 22. P. 42–43.
7. *Nielsen G., Frydenberg O.* Linkage between the loci *Amy 1* (α -amylase), *o* (orange lemma) and *x_n* (xanta seedling) // *Barley Genet. Newsletter*. 1974. V. 4. P. 53–54.
8. *Sogaard B., Von Wettstein-Knowless P.* Barley: Genes and chromosomes // *Carlberg Res. Communications*. 1987. V. 52. № 2. P. 123–196.
9. *Tsuchiya T.* Linkage maps of barley // *Barley Genet. Newsletter*. 1984. V. 14. P. 81–84.
10. *Franckowiak J.D., Lundqvist U.* Descriptions of barley genetic stocks tables 2 and 3 (2018) // *Barley Genet. Newsletter*. 2018. V. 48. P. 13–189.
11. *Рокицкий П.Ф.* Введение в статистическую генетику. Минск: Высшая школа, 1974. 442 с.
12. *Allard R.W.* Formulas and tables to facilitate the calculation of recombination values in heredity // *Hilgardia*. 1956. V. 24. № 10. P. 235–278.
13. *Shahla A., Shim J.W., Tsuchiya T.* Association of the gene *o* for orange lemma with the short arm of chromosome 6 (6S) in barley // *Barley Genet. Newsletter*. 1983. V. 13. P. 83–84.
14. *Falk D.E.* Creation of a marked telo 6S trisomic for chromosome 6 // *Barley Genet. Newsletter*. 1993. V. 23. P. 32.
15. *Falk D.E.* Coordinator's report: Chromosome 6 // *Barley Genet. Newsletter*. 1993. V. 23. P. 154.

16. *Yoshimi R., Konishi T.* Linkage analysis of several isozyme loci in barley // *Barley Genet. Newsletter.* 1994. V. 24. P. 35–37.
17. *Qi X., Stam P., Lindhout P.* Comparison and integration of four barley genetic maps // *Genome.* 1996. V. 39. P. 379–394.
<https://doi.org/10.1139/g96-049>
18. *Langridge P., Karakousis A., Collins N. et al.* A consensus linkage map of barley // *Mol. Breeding.* 1995. V. 1. P. 389–395.
19. *Kozambi D.* The estimation of map distances from recombination values // *Ann. Eugen.* 1944. V. 12. P. 172–175.
20. *Bailey N.T.J.* Introduction to the Mathematical Theory of Linkage. Oxford: Univ. Press, 1961. 56 p.

Linkage Analysis of Genes Controlling the Qualitative Characteristics of Barley Plants in Chromosoma 6

V. P. Netsvetaev*

Belgorod Federal Agrarian Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Belgorod, 308001 Russia

**e-mail: v.netsvetaev@yandex.ru*

Based on the genetic analysis of F_2 by F_3 in the combination $M13 \times r \text{ "e"} + o$, the recombination frequencies between genetic factors of chromosome 6 (=6H) barley were estimated. The study included the following genes: *r "e"* (smooth awns "e"), *sex 1* (shrunken endosperm xenia 1), *o* (orange lemma 1), *gs 4* (glossy sheath 4), *Amy 1–7* (α -amylase 1, type 7). The *Amy 1* locus was identified by separation of alpha-amylase by electrophoresis at pH 8.3. Based on the five-point test, the following order to location of the studied loci in chromosome 6 (=6H) was established: **6S** – *r "e"* (=raw 5) – *gs 4* (=gsh 4) – *o* (=rob 1) – **cen** – *Sex 1* – *Amy 1* – **6L**. The linkage estimation and literature analysis showed that among the indicated genes, the *Amy 1* and *Sex 1* loci are located in the long arm of chromosome 6. The other genetic factors are associated with the short arm of this chromosome. The centromere is between the genetic factors of *Sex 1* and *o* (=rob 1). In general, the data presented indicate the need to review the genetic linkage map of chromosome 6 (=6H) barley.

Keywords: barley, recombination, genes, linkage map, alpha-amylase isoenzymes, chromosome 6 (=6H).

**ЭКОЛОГО-ФИТОЦЕНОТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ,
ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ И СТРУКТУРА
ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ РЕЛИКТОВОГО ВИДА АКВАФЛОРЫ
Isoetes lacustris L. В БЕЛАРУСИ¹**

© 2021 г. А. Б. Власова^{1, *}, А. Н. Юхимук¹, М. А. Джус², М. С. Тухфатуллина¹, Б. П. Власов²

¹Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси, Минск, 220012 Беларусь

²Белорусский государственный университет, Минск, 220030 Беларусь

*e-mail: nastassia_vlasova@yahoo.com

Поступила в редакцию 12.03.2020 г.

После доработки 01.09.2020 г.

Принята к публикации 01.10.2020 г.

С использованием RAPD- и ISSR-систем изучены генетическое разнообразие и структура популяций *Isoetes lacustris* L. реликтового вида аквафлоры, приуроченного к олиготрофным озерам и резко сокращающегося численность в Европе. Для четырех изученных популяций вида на южной границе ареала в Беларуси совокупно выявлено 127 маркеров (90.6 полиморфных, 83.5% информативных). На уровне вида показатели генетической изменчивости составили: $H_e = 0.247$, $P_p = 100\%$, $I = 0.390$. Выявлен средний уровень подразделенности ($\Phi_{PT} = 0.269$, $p \geq 0.001$; $F_{st} = 0.193$, $p \geq 0.0001$) и генетического обмена (2.7 мигранта на поколение). Большая доля изменчивости (73.13%) приходится на внутривидовой уровень, 13.36% – на межвидовой, а 13.51% объясняет различия между регионами (южными и северными популяциями). Ранжирование по генетическому разнообразию ($H_e = 0.063–0.243$; $P_p = 17.92–93.4\%$; $I = 0.095–0.379$) и обнаружение индивидуальных аллелей определяет уникальность каждой популяции и значимость в программах по охране вида. Уменьшение уровня генетического разнообразия в малочисленных изолированных популяциях в совокупности с лимитирующими факторами (естественные – южный предел распространения, антропогенные – эвтрофирование и изменение режима озер) представляют угрозу для развития популяций и распространения вида в Беларуси. На основе интегрального анализа эколого-фитоценологических характеристик обитаний *I. lacustris*, уровня и структуры генетического разнообразия его популяций предложены меры по *in situ* и *ex situ* сохранению вида.

Ключевые слова: *Isoetes lacustris*, экологические параметры, RAPD, ISSR, генетическое разнообразие, граница ареала.

DOI: 10.31857/S0016675821020132

При продолжающейся фрагментации природных обитаний видов антропогенные воздействия и глобальное изменение климата оказывают существенное влияние на демографическую и генетическую структуру их популяций и повышают риски исчезновения видов. Сегодня природоохранная и ландшафтная генетика использует эффективные диагностические методы оценки уровня генетического разнообразия (ГР), формирующих его экологических факторов, эволюционного (адаптационного) потенциала и сопротивляемости видов, содействуя предотвращению потерь биологического разнообразия и их обитаний [1–3]. Популяции видов растений на границе ареалов важны для долго-

временного выживания вида, и их изучение помогает оценить эволюционный потенциал таксона, как локально, так и в пределах ареала (в т. ч. в связи с изменением климата), прояснить историю распространения вида [4]. Краевые популяции находятся под воздействием более сильного давления отбора и ограниченного потока генов, они как правило локально адаптированы, т.е. могут поддерживать необходимый пул ГР и обеспечивать возникновение полезных адаптаций. Данные популяции являются важными объектами для сохранения [4, 5].

Бореальная аквафлора особо подвержена трансформации и сокращает численность в связи с незначительными локальными изменениями среды [6]. Обитание ряда реликтовых видов Беларуси приурочено к уникальной группе озер пре-

¹ Дополнительные материалы (ESM 1–ESM 11) для этой статьи доступны по doi 10.31857/S0016675821020132 для авторизованных пользователей.

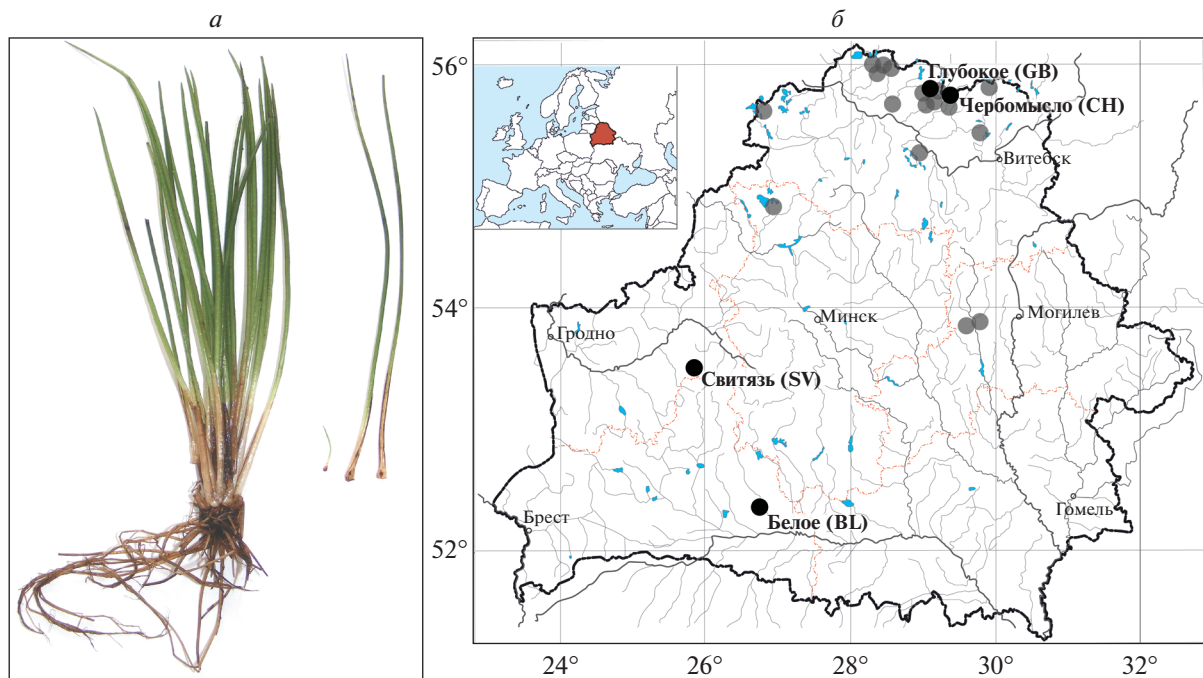


Рис. 1. а — общий вид *I. lacustris*. б — местонахождения *I. lacustris* на территории Беларуси и точки сбора материала для генетических исследований (●).

имущественно ледникового происхождения (на севере республики в регионе Белорусского Поозерья) и карстового происхождения (на юге республики в регионе Полесья), возраст обеих групп озер около 12 тыс. лет [7, 8]. В Республике Беларусь одним из уязвимых реликтовых видов, находящихся здесь на южной границе распространения, является разноспоровый представитель плаунообразных — полушник озерный (*Isoetes lacustris* L., Isoetaceae Dumort; декаплоид $2n = 10x = 110$), погруженное вечнозеленое многолетнее растение (рис. 1,а) [9]. В Восточной Европе ареал этого циркумбореального вида приходится на страны Прибалтики, Украину (крайне редко) и Россию. Полушник обитает в узком диапазоне экологических условий — в основном в олиготрофных или мезотрофных пресных озерах с низкой минерализацией (менее 100 мг/л), высокой прозрачностью (более 4 м), как правило кислой (рН 4–6) реакцией среды. Произрастает на песчаных или песчаноилистых грунтах в прибрежной зоне, а также на глубине до 4–5 м. Местообитания полушника обладают высоким экологическим статусом и включены в список редких биотопов Республики Беларусь и Европы [10]. *I. lacustris* является индикатором состояния этих экосистем и охраняется в большинстве стран Европы, в т. ч. России, ряде штатов США [11–15]. С начала XX столетия численность и распространение вида в Европе резко сокращается вследствие загрязнения, эвтрофикации озер, механического уничтожения растений [11, 13]. В

Беларуси полушник озерный включен в Красную книгу с 1981 г. (категория охраны — 3; Vu — под прямой угрозой исчезновения) [15]. Несмотря на то, что практически все местообитания вида на территории страны находятся на особо охраняемых природных территориях (ООПТ), в последние десятилетия наблюдается резкое сокращение его численности [7, 8, 16]. Биологические особенности и экологические предпочтения *I. lacustris* (близ южного предела распространения) обуславливают высокий риск его исчезновения в связи с антропогенными факторами и изменением климата.

Род *Isoetes* включает около 200 космополитно распространенных, древних в эволюционном отношении видов, обладающих зачастую реликтовыми ареалами [12]. Для некоторых видов *Isoetes* разработаны программы по сохранению, в т. ч. на основе данных о генетической вариабельности с использованием доминантных ДНК-маркеров (AFLP, RAPD, ISSR и др.) [12, 17–22]. Для *I. lacustris* предложены методы мониторинга популяций на основе морфофизиологических показателей растений [23], а также приемы сохранения *in vitro* [24]. Имеются данные по филогеографической структуре полушника озерного на Британских островах [25], однако популяционная структура и ГР вида не исследованы.

Целью данной работы было оценить популяционно-генетический потенциал полушника озерного в Беларуси и его роль в распростране-

нии вида на южной границе ареала. В задачи входило: а) провести сравнительную эколого-ботаническую инвентаризацию местообитаний и оценить состояние популяций полушника; б) оценить ГР вида на меж- и внутривидовых уровнях на основе RAPD и ISSR; в) на основании интегрального анализа данных экологического мониторинга и параметров ГР предложить стратегию устойчивой охраны генофонда вида в республике.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования и инвентаризация популяций. На территории Беларуси *I. lacustris* распространен преимущественно в озерах северной части республики. Известно 21 место произрастания вида (или локалитета), из них 16 подтверждены гербарными сборами (рис. 1, б) [26]. В данной работе исследованы четыре популяции, выбор которых обусловлен их расположением в двух основных регионах распространения вида – Белорусском Поозерье на севере республики (озера Глубокое, **GB** и Чербомысло, **CH**) и Белорусском Полесье в южной части страны (озера Белое, **BL** и Свитязь, **SV**), где вид характеризуется наиболее значительным сокращением площади произрастания на протяжении последних 15 лет (рис. 1, б, ESM 1; см. дополнительные материалы в электронной версии **ESM 1–ESM 11**) [10, 11]. Учет параметров среды произрастания вида (физико-химические показатели водной среды) и его относительной численности (занимаемая площадь, частное проективное покрытие (ЧПП, 1–100%)), обилие по Друде (1–6 баллов) проводили во время вегетационного периода в 2001–2016 гг. по адаптированной методике [27]. По совокупности относительной численности видов оценена толерантность вида (ценотическая и экологическая) к среде произрастания, которую определяли как “оптимум” (соответствовал максимальным показателям развития вида, балл 4–5), “угнетение” (низкие значения величин, балл 2–3), и “гибель” (отсутствие или наличие единичных экземпляров растений, балл 0–1) [27]. В работе использованы данные многолетних мониторинговых обследований озер Беларуси с 1973 г. (НИЛ Озероведения, БГУ), в т. ч. их морфометрические параметры, состав грунтов и физико-химические показатели водной среды [8]. Оценку фитоценотического разнообразия местообитаний проводили на основании геоботанических описаний [27, 28].

Сбор материала для генотипирования проводили в 2010 и 2011 гг. Образцы (фрагменты листьев) отбирали произвольно у особей, находящихся на расстоянии не менее 10 м друг от друга. Из каждой популяции отобрано от четырех до 30 образцов, число которых коррелировало с площадью и численностью популяции.

RAPD- и ISSR-анализ. Геномную ДНК экстрагировали из обезвоженных в силикагеле листьев с использованием СТАВ-буфера [29]. После тестирования были отобраны три RAPD- и четыре ISSR-праймера (ESM 5). Состав RAPD-ПЦР (25 μ L): 1 \times ПЦР буфер (2.0 mM MgCl₂), 0.4 mM dNTPs, 20 pM праймера, 0.5 ед. Taq-полимеразы (ПраймТех, Беларусь) и 20 ng ДНК. Состав ISSR-ПЦР (25 μ L): 1 \times ПЦР-буфер с (NH₄)₂SO₄, 2.0 mM MgCl₂, 0.4 mM dNTPs, 30 pM праймера, 1 ед. Taq-полимеразы (ПраймТех, Беларусь), 30 ng ДНК. Режим RAPD-ПЦР: 96°C (5 мин); 96°C (30 с), Та (30 с), 72°C (2 мин), 40 циклов; 72°C (10 мин); ISSR-ПЦР: 96°C (5 мин), Та (30 с), 72°C (1 мин), 1 цикл; 96°C (30 с), Та (30 с, +1°C/цикл), 72°C (1 мин), 30 циклов; 72°C (10 мин). Продукты ПЦР разделяли на Bioanalyzer 2100 (Agilent; ISSR) и в 1%-ном агарозном геле (RAPD). Размер фрагментов рассчитывали в Expert 2100 (Agilent) или QuantityOne (Bio-Rad) на основе стандартов молекулярных масс (ПраймТех, Беларусь). Учитывали только четкие, дискретные, воспроизводимые ампликоны. Присутствие фрагмента обозначали как “1”, а отсутствие как “0”.

Обработка данных, статистический анализ. Число маркеров, процент полиморфизма и информационный индекс полиморфизма праймеров PIC (Polymorphic Information Content) [30] рассчитывали вручную. Согласно методу, предложенному для доминантных маркеров [31], локусы, частота которых превышает $1 - (3/N)$, где N – число особей в анализе, не учитывали. Общее (N_a) и эффективное число аллелей (N_e), число полиморфных локусов и их процент (P_p), число редких аллелей, ожидаемую гетерозиготность (H_e), индекс разнообразия Шеннона (H) оценивали в GenAlex 6.5 [32], поток генов (Nm) рассчитывали в PopGen v1.32. Анализ главных координат (PCoA) выполняли в GenAlEx, выделяя северный и южный регионы. Популяционную структуру анализировали в Structure 2.3 [33], при количестве кластеров (K) 1–10, по 20 прогонов для каждого, число burn-in периодов – 1000000, количество итераций длины пробега – 100000, значения подобия $Q > 0.7$, применяя модели кластеризации “admixture” и “no admixture”. Наиболее вероятное значение K оценивали на основании delta K (ΔK) [34]. Распределение уровней генетического разнообразия и генетическую подразделенность популяций (фРТ, аналог F_{st}) оценивали методом анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) в GenAlEx 6.5 в соответствии с регионом произрастания. ГР и F_{st} также оценивали байесовским методом для доминантных маркеров [35] в AFLP-SURV 1.0 (при числе перестановок для F_{st} теста – 500, бутстрэп – 1000). Латентный генетический потенциал (Latent genetic potential, LPG) оценивали по F. Bergmann et al. [36]. Тест Мантеля [37] (GenAlEx 6.5, при 999

пермутациях) применяли для оценки корреляции географических (ГД; логарифмическая функция расстояния, $\log(1 + \text{ГД})$) и генетических дистанций между популяциями и ФРТ. Аналогично анализировали редуцированный массив данных (примерно уравнинное количество особей из каждого озера, когда для популяций GB и CH анализировали только десять особей) для изучения ГР малочисленных популяций и оценки корректности полученных данных. Зависимость параметров ГР от экологических параметров и относительной численности оценивали, используя регрессионный анализ Пирсона в MS Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Экологическая инвентаризация местообитаний I. lacustris и характеристика растительных сообществ

Озера Свитязь и Белое значительно подвержены процессам эвтрофирования в результате рекреационного использования. Для озер Чербымысло и Глубокое эти процессы наблюдаются в меньшей степени (табл. ESM 2). Сравнительная характеристика сообществ погруженной и прибрежной растительности исследованных водоемов позволила выявить предполагаемые виды-индикаторы оптимальных условий произрастания полувшиника, присутствие которых взаимосвязано с относительной численностью популяций *I. lacustris* и вероятно с гидрохимическим режимом (приведены в табл. ESM 4).

Относительная численность *I. lacustris* в изученных озерах (обилие, толерантность и ЧПП; 2001–2011 гг.) варьировала: наибольшие показатели зафиксированы для озер Чербымысло и Глубокое, меньшие – для Белое и Свитязь (ESM 2). Значимая корреляция параметров относительной численности выявлена с гидрохимическими показателями водной среды: содержание Mg^{2+} , общая минерализация, общий фосфор ($p \leq 0.05$, ESM 3). Корреляция обилия с рН и прозрачностью была сильной, но не значимой ($r = -0.82$ и $r = 0.74$; соответственно, $p > 0.05$, ESM 3).

Полиморфизм и внутривидовая изменчивость

Отобранные RAPD- и ISSR-праймеры обнаруживали вариабельность участков ДНК у 71 особи *I. lacustris* имели высокую информативность (число фрагментов на образец, P_p , PIC, H и H_e) и генерировали совокупно 127 аллелей (ESM 5). RAPD- и ISSR-данные по отдельности выявили сходный характер распределения ГР (ESM 6), а также значимую корреляцию матриц генетических расстояний (u_{NeiP}) между особями на их основании ($r = 0.154$, $p = 0.005$, тест Мантеля; $r = 0.378$, $p \leq$

≤ 0.0001 , регрессионный анализ), что дало основание объединить RAPD- и ISSR-маркеры для дальнейших расчетов ГР. После стандартизации [31] число локусов составило 106 или 83.5% (табл. 1). Уникальные аллели отмечены для всех популяций кроме BL, а их максимальное число (13 или 12.7%) выявлено для GB. Значения ожидаемой гетерозиготности (H_e) по популяциям варьировали от 0.063 (BL) до 0.243 (GB). Процент полиморфных локусов (P_p) составил в среднем 56.6%; наибольшее значение (93.4%) обнаружено для GB, наименьшее (17.92%) – для BL (табл. 1). Максимальное значение индекса разнообразия Шеннона (I) зарегистрировано для GB (0.379), минимальное – для BL (0.095), при среднем значении 0.246. На видовом уровне $H_e = 0.247$, $I = 0.39$. Ожидаемая гетерозиготность на уровне вида, оцененная Байесовским методом, была несколько выше и составила $H_e = 0.251$ (табл. 1). Данный метод выявил минимальную разницу параметров ГР для полного и редуцированного массивов данных (см. методику, данные не приведены); наименьшие показатели вновь отмечены для популяции BL, наибольшие – для GB. Таким образом, на основании нескольких алгоритмов анализа вариационный ряд распределения параметров ГР и латентного генетического потенциала популяций (показатель адаптивности) в направлении их снижения был аналогичным: оз. Глубокое (GB) → оз. Чербымысло (CH) → оз. Свитязь (SV) → оз. Белое (BL) (рис. 2, табл. 1).

Межпопуляционная дифференциация и генетическая структура популяций

Кластеризация UPGMA на основе генетических дистанций не всегда совпадала с принадлежностью особей к популяции (ESM 10). PCoA особей иллюстрирует, что три главных оси отвечают за 13.54, 11.43 и 6.23% разнообразия соответственно, при этом первыми двумя осями обусловлено 24.97% изменчивости (рис. 3,а). Отметим, что ось 4 (Coord. 4) достоверно выявила различия между BL и SV (рис. 3,б). PCoA на популяционном уровне (рис. 3,в) обнаружил наличие градиентов “запад–восток” (Coord. 1, все популяции) и “север–юг” (Coord. 2, все популяции кроме GB и CH, дистанция между которыми составляет всего 2 км, см. ESM 1). Согласно программе “Structure” наиболее вероятное количество групп K было равно трем (ESM 11). Самые высокие значения подобия выявлены в модели admixture с корреляцией локусов для этих трех кластеров (данные не приведены). Анализ подтвердил наличие дифференциации между близкорасположенными GB и CH: 88.9% особей GB отнесены к K1 ($Q \geq 0.781$), а особи CH распределились между тремя выявленными кластерами (11.1% отнесены к K1, 37.0% – K2, и 14.8% – K3, $Q \geq 0.795$). Две другие популяции,

Таблица 1. Генетическая вариабельность внутри- и между популяциями *I. lacustris*, рассчитанная на основании RAPD- и ISSR-маркеров

Популяция (код)	<i>n</i>	Число локусов		Генетическое разнообразие								
		<i>N</i>	<i>N_r</i> , %	<i>N_a</i>	<i>N_e</i>	<i>P_p</i>	<i>P_pB*</i>	<i>I</i>	<i>H_e</i>	<i>H_eB*</i>	<i>uH_e</i>	LGP
Глубокое (GB)	27	102	13↓ (12.75↓)	1.934 (0.250)	1.400 (0.352)	93.4	74.5	0.379 (0.022)	0.243↓ (0.017)	0.268 (0.017)	0.248↓ (0.017)	56.616
Чербомысло (CH)	27	89	2↓ (2.25↓)	1.830 (0.377)	1.357 (0.345)	83.02	66.0	0.342↑ (0.024)	0.219↑ (0.017)	0.237 (0.017)	0.224↑ (0.018)	50.131
Свитязь (SV)	7	46	1↓ (2.17↓)	1.321 (0.469)	1.193 (0.337)	32.08	43.4	0.167 (0.025)	0.112↓ (0.018)	0.170 (0.019)	0.121↓ (0.019)	13.523
Белое (BL)	4	39	0 (0)	1.179 (0.385)	1.106 (0.261)	17.92	36.8	0.095 (0.020)	0.063↓ (0.014)	0.134 (0.016)	0.072↓ (0.016)	7.745
Общее внутри популяций (среднее)	16.25	69	4↓ (5.8↓)	1.566 (0.372)	1.264 (0.138)	56.6 (18.59)	55.18	0.246 (0.013)	0.159 (0.009)	0.202 (0.031)	0.166↓ (0.009)	32.004 (24.929)
Общее по совокупности всех локусов и популяций	65	106	16↓ (15.09↓)	2 (0)	1.412 (0.331)	100	100	0.390 (0.021)	0.247 (0.016)	0.251	0.250 (0.016)	62.342

Примечание. *n* – количество проанализированных особей; *N* – общее число локусов после стандартизации; *N_r* – число уникальных аллелей; *N_a* – наблюдаемое число аллелей; *N_e* – эффективное число аллелей; *P_p* – процент полиморфных локусов; *H_e* – ожидаемая гетерозиготность (или генное разнообразие по Неи); *I* – информационный индекс Шеннона, LGP – латентный генетический потенциал. В скобках приведены величины стандартного отклонения. *B** – значения оценены Байесовским методом. Стрелками отмечено увеличение (↑) или уменьшение (↓) параметра по сравнению с полученным при обработке локусов уменьшенного числа особей из популяций GB (10) и CH (10, объяснения в тексте).

находящиеся на юге, – BL и SV – определены как одна (K3, *Q* = 0.766–0.986). Значения дифференциации для трех выделенных кластеров составили: *F_{st(K1)}* = 0.282; *F_{st(K2)}* = 0.296; *F_{st(K3)}* = 0.589 (ESM 7).

Согласно AMOVA, наибольший компонент изменчивости (73.13%) обнаружен на внутривнутрипопуляционном уровне, а примерно равные части оставшейся вариабельности распределены между популяциями – 13.36% и выделенными региона-

ми – 13.51% (северные и южные популяции; табл. 2). Дифференциация была значимая (*p* ≥ 0.0001), умеренная на общепопуляционном уровне (*φPT* = 0.269), и более слабая – между популяциями (*φPR* = 0.154) и регионами (*φRT* = 0.135) (табл. 2). Общая байесовская дифференциация популяций оказалась значимой и так же среднего уровня (*F_{st}* = 0.193, *p* = 0.03), что подтверждает их генетическое родство. Попарные значения межпопуля-

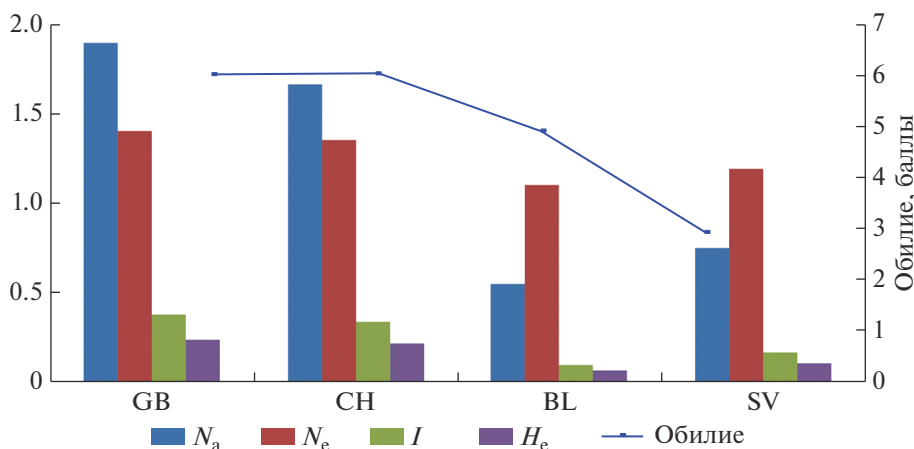


Рис. 2. Параметры ГР популяций *I. lacustris* и их сопряженность с параметром обилие. Популяции: Глубокое (GB); Чербомысло (CH); Белое (BL); Свитязь (SV).

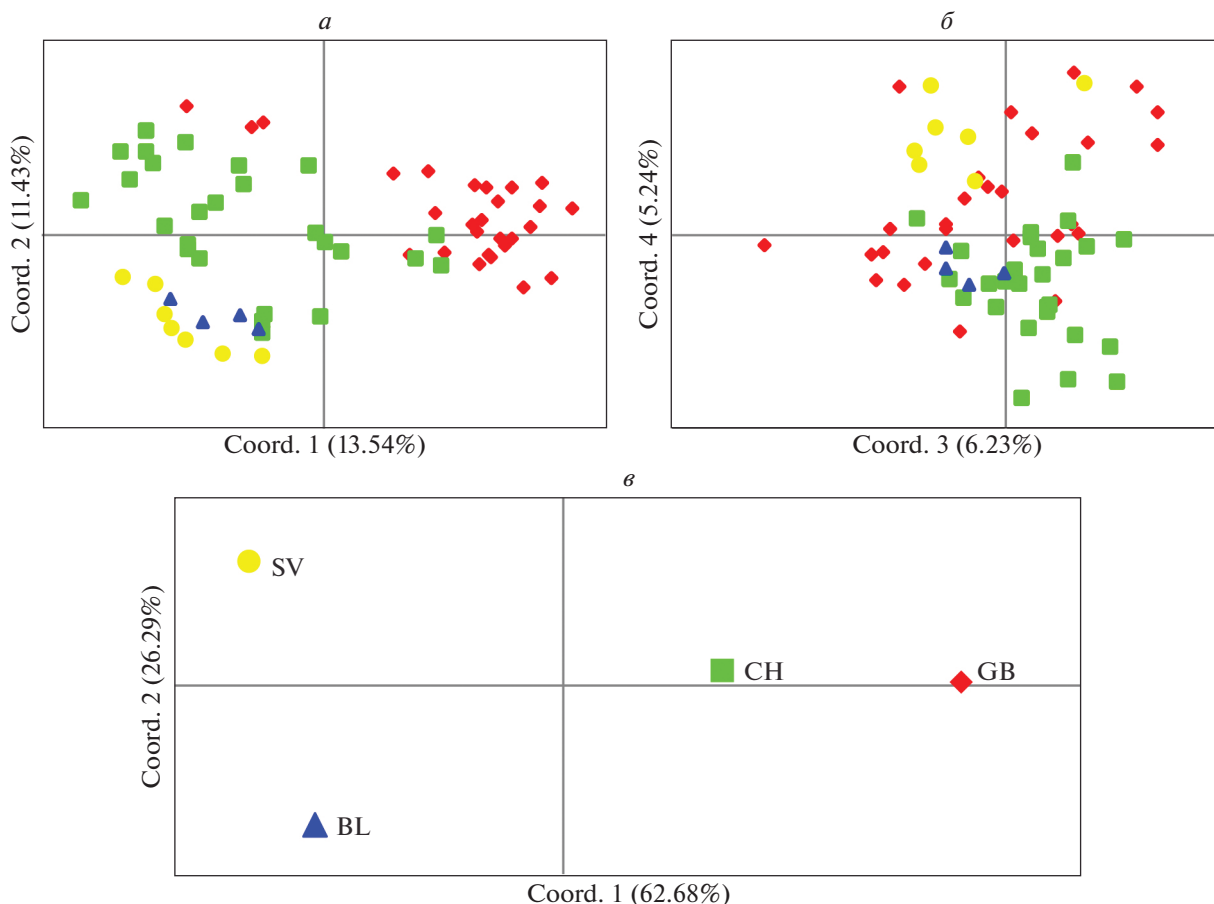


Рис. 3. Анализ главных координат (PCoA) особей *I. lacustris* из четырех популяций Беларуси на основании матрицы парных генетических дистанций ($uNeiP$), рассчитанных по совокупности RAPD- и ISSR-маркеров. *a* – группировка особей согласно 1 и 2 осям, *б* – группировка по 3 и 4 осям, *в* – на основании популяционных генетических дистанций. Обозначения популяций: Глубокое (GB) – ромбы; Чербомысло (CH) – квадраты; Белое (BL) – треугольники; Свитязь (SV) – круги.

ционных значений дифференциации (фРТ) значимо различались ($p \leq 0.007$): от 0.151 (CH–BL) до 0.313 (GB–SV), в среднем составили 0.230 (табл. 3). Различия в дифференциации согласуются с оцененным уровнем генетического обмена между популяциями (данные не приведены), который был наиболее высок между GB и CH ($Nm = 6.13$), и значительно ниже между BL и SV ($Nm = 1.17$). Поток генов на видовом уровне – 2.7 мигранта на поколение – подтверждает довольно высокую миграцию для региона Беларуси.

Корреляционный анализ географических ($\log(1 + \text{ГД})$) и генетических дистанций ($uNeiP$ и опосредованно фРТ) между популяциями ($r = 0.636$ и 0.426 соответственно, $p > 0.05$), а также на уровне индивидуальных растений ($uNeiP$, $r = 0.029$, $p = 0.316$) не выявил значимой зависимости ГР от удаленности в пространстве, предполагая, что этот фактор не является основным, определяющим вариабельность между популяциями.

Корреляция экологических характеристик местообитаний, параметров развития и ГР популяций I. lacustris

Для обследованных озер обнаружена сильная корреляция параметров ГР *I. lacustris* с девятью эколого-морфологическими характеристиками озер из более чем 20-ти изученных (ESM 8, рис. 2). В период, предшествующий измерениям ГР (2001–2006 г.) популяции GB, CH и BL отнесены к группе “оптимум”, а SV – к угнетенной популяции [8] (ESM 2). Однако по совокупности показателей генетического разнообразия BL угнетена наравне с SV (рис. 2), что выражалось в сокращении относительной численности вида в оз. Белое, зафиксированной в 2016 г. (ESM 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Интегральная эколого-генетическая оценка уязвимых видов аквафлоры крайне важна для их сохранения. Нами показано нарастание экологических угроз для *I. lacustris* в Беларуси в связи с эв-

Таблица 2. Анализ молекулярной дисперсии (АМОВА) популяций *I. lacustris*

Источник вариабельности	Степень свободы, <i>d.f.</i>	Сумма квадратов	Средняя сумма квадратов	Компонент дисперсии, Est. Var., %	Дифференциация, ϕ , $p \geq 0.0001$	Диаграмма распределения молекулярной дисперсии
Между регионами (Р)	1	81.573	81.573	2.468 (13.51)	$\phi_{RT} = 0.135$	
Между популяциями (П)	2	104.976	52.488	2.439 (13.36)	$\phi_{PR} = 0.154$	
Внутри популяций (ВП)	61	814.688	13.356	13.356 (73.13)	$\phi_{PT} = 0.269$	
Общее	64	1001.238	—	18.262 (100)	—	

трофированием водоемов. Выявленные флористические индикаторы эвтрофирования (ESM 4) могут использоваться в прогнозировании нежелательных для вида изменений среды, подтверждая данные литературы [13].

Полученные нами показатели ГР *I. lacustris* на южной границе ареала на видовом уровне на основе RAPD- и ISSR-маркеров можно оценить как средний уровень ($H_e = 0.247$), в т. ч. по сравнению с сопоставимыми данными, представленными для других *Isoetes* на основе доминантных маркеров [17–22]. Стоит учитывать, что ГР во многом определяется биологией развития и способом размножения видов в связи со средой их обитания [38]. Так, довольно низкие показатели ГР заявлены для ди- или тетраплоидов, вегетативно размножающихся или с ограниченным размножением спорами видов: полушников из Новой Зеландии *I. kirkii* A. Braun и *I. alpina* Kirk ($H_e = 0.03$, RAPD) [21], *I. sinensis* T.C. Palmer в Китае ($H_e = 0.118$, AFLP) и других азиатских видов [17, 18]. Более высокие показатели характерны для тетраплоидов и диплоидов с преимущественно половым размножением. Для средиземноморского реликта *I. malinverniana* Ces. et De Not ($H = 0.263$, ISSR + AFLP; $H = 0.268$, ISSR) и эндемика амазонии *I. cangae* J.B.S. Pereira, Salino et Stützel ($H_e = 0.245$, ISSR) показатели ГР среднего уровня сравнимы с полученными нами для *I. lacustris* [20, 22]. Помимо численности и уровней ГР, жизненная форма и способ размножения вида, вероятно, определяют три основных сценария распределения генетической вариабельности для полушников. 1) ГР в основном (60–80%) распределено между популяциями, и меньшая часть (20–40%) – внутри них (виды из Азии и Новой Зеландии, *I. kirkii* и *I. alpina*, см. выше) [17, 21]. 2) Около половины ГР распределено внутри популяций (*I. hypsophila* Hand.–Mazz. в Китае; вегетативно размножающийся диплоид) [18]. 3) Большинство разнообразия зафиксировано внутри популяций (~68–85%) для *I. malinverniana* в Италии [20], *I. yunguensis* Q.F.

Wang et W.C. Taylor в Китае (диплоид, с преимущественно перекрестным оплодотворением) [17]), и *I. cangae* [22].

Выявленные для *I. lacustris* в Беларуси средний уровень дифференциации ($\phi_{PT} = 0.269$; $F_{st} = 0.193$) и большая доля внутривидового разнообразия (73.13%), в целом характерны для перекрестно-опыляемых и длительно живущих видов [38]. Обнаруженный разброс показателей ГР и их значимая сопряженность с численностью популяций (обилие и толерантность, рис. 2, ESM 8) согласуется с принятым положением, что малые и изолированные популяции не могут поддерживать достаточный пул разнообразия, по сравнению с большими [1, 2, 38]. Так, для более крупных и близкорасположенных популяций, как GB и CH (2 км), которые согласно нашим данным Structure и $\phi_{PT} = 0.155$ являются субпопуляциями, процесс недавнего резкого снижения численности и вероятно ГР (для CH) будет менее чувствителен благодаря интенсивному генетическому обмену между ними ($Nm = 6.13$, при среднем – 2.7 мигранта на поколение). Стоит отметить, что озера Глубокое и Чербомысло обособлены с момента образования, гидрологически не связаны и в настоящее время. Меньшие и изолированные популяции – оз. Белое (BL) и Свитязь (SV) – более уязвимы из-за недостаточности ресурсов эффективного накопления изменчивости (низкий обмен $Nm = 1.17$, экологиче-

Таблица 3. Матрица попарных значений дифференциации (ϕ_{PT} , ниже диагонали; $p \leq 0.007$) и несмещенных генетических дистанций Неи (u_{NeiP} , выше диагонали) популяций *I. lacustris*

	GB	CH	BL	SV	
	—	0.043	0.133	0.147	GB
	0.155	—	0.081	0.085	CH
	0.254	0.151	—	0.075	BL
	0.313	0.250	0.259	—	SV

ские риски, снижение ГР) и краевой локализации. Довольно высокий поток генов на видовом уровне ($Nm = 2.7$) и отсутствие изоляции расстоянием предполагает в изученном регионе вклад полового размножения и распространение спор и частей растений на дальние расстояния с возможным участием мигрирующих и перелетных птиц. Можно заключить, что обнаруженный тип распределения и сравнительно высокие значения видовых показателей ГР вероятно обусловлены особенностями биологии и расселения полушника озерного: гетероспоровостью, половым размножением и высокой плоидностью ($10\times$), вовлечением материала из других генераций благодаря многолетней жизненной форме и способностью спор сохранять жизнеспособность в озерах до десяти лет [24].

Региональная дифференциация и градиент ГР между северными и южными популяциями (~14%, табл. 2) согласуется с различным происхождением этих озер (ледниковые на севере и карстовые на юге). Также это может указывать на независимо протекающие региональные эволюционные процессы и накопление адаптивных мутаций (важных при противостоянии резким изменениям качества среды) [4, 5] и на важность сохранения всех краевых местообитаний (BL и SV, рис. 1), особенно в связи с современными процессами изменения климата.

Выявленная сопряженность эрозии ГР полушника со снижением численности с одной стороны, и качества среды с другой, лучше объясняла снижение общей устойчивости популяции, чем все эти факторы по отдельности (ESM 3, ESM 8). Таким образом, для *I. lacustris* обнаружена взаимосвязь “лимитирующие факторы → численность ↔ ГР”, подтвержденная для других видов [39]. Полученные нами данные в совокупности позволяют использовать ГР как более чувствительную меру численности вида, а интегральный анализ всех компонентов как функцию для выявления лимитирующих факторов.

Для разработки стратегий сохранения вида также важна информация о его расселении на исследуемой территории. По совокупности гидрологических показателей и типометрии озер, а также анализа гербарных сборов, мы предполагаем, что ранее мест для обитания полушника озерного на территории Беларуси было больше, чем в настоящее время. По фрагментарным находкам спор *I. lacustris* места произрастания этого вида отмечены в юго-западном регионе Беларуси [40], вид обитает и южнее, на Украине [41]. С учетом появления вида в пределах Кольского п-ова в диапазоне 12.0–10.0 тыс. календарных лет назад (кал. л.н.) [42], появление *I. lacustris* в регионе Беларуси предполагается со времени формирования озер, начиная с ~13.5 тыс. кал. л.н. в регионе Полесья (В.П. Зерницкая, перс. сообщ.). Способ-

ность вида мигрировать на дальние расстояния и различия уровней ГР в разных географических точках дает возможность предположить, что малочисленные изолированные популяции *I. lacustris* на юге республики, объединенные программой Structure в один кластер, представляют собой реликты позднеледникового периода, заселившиеся вероятно из рефугиальных зон на территории региона. И хотя наши методы в полной мере не позволяют раскрыть всю историческую картину расселения вида, косвенные доказательства — время возникновения озера, спорадические локальные популяции на юге региона, их малочисленность и низкий уровень ГР, позволяют предполагать, что южные популяции старше, чем их северные соседи. Согласно уровням и распределению ГР, мы предполагаем, что по мере отступления ледникового щита, послеледниковое расселение вида в пределах Беларуси могло происходить из южных водоемов в северную ее часть. После формирования популяций полушника в озерах Поозерья на севере республики — регионе последнего оледенения, между популяциями севера и юга (а возможно и сопредельных территорий) продолжился генетический обмен, способствующий увеличению ГР, что также может объяснять наличие центра современного распространения вида в пределах Беларуси на севере республики. Вместе с тем средний уровень дифференциации, говорит о сравнительно недавней фрагментации или уничтожении пригодных для обитания вида мест, вследствие антропогенной трансформации, вероятно масштабной мелиорации в 20-х и 50–60-х гг. XX в. и экстенсивного сельского хозяйства.

Заключение и стратегии охраны

Снижение качества водной среды уникальных олиготрофных озер повсеместно в Европе ведет к драматическим потерям численности популяций полушника озерного или полной их утрате. В Беларуси, где проходит южная граница распространения *I. lacustris*, угроза для исчезновения вида заключается в основном в нарастании эвтрофирования водоемов: вид исчез в примерно 17% мест произрастания за несколько десятилетий. Среди них озера, подвергающиеся комплексу негативных воздействий в связи с хозяйственной деятельностью арендаторов водоемов (туристический комплекс “Красный Бор”, оз. Белое Доброплесы) или высокой рекреационной нагрузкой (оз. Белое, Мядельский р-н) [7, 8, 16]. Полученные данные имеют важное значение для практической охраны вида на пределе распространения. В частности, выявлено достоверное влияние лимитирующих факторов, связанных с притоком веществ и загрязнением вод (азотными и фосфорными соединениями), снижением прозрачности и увеличения рН водной среды на численность и уровни ГР попу-

ляций *I. lacustris*, а также на присутствие видов фитоиндикаторов этих состояний. По происхождению данные угрозы в основном антропогенного характера: приток загрязнений, рекреация, мелиорация, изменение уровня поверхностных и грунтовых вод (ESM 9).

По совокупности эколого-генетических данных можно заключить, что несмотря на то, что на видовом уровне сохраняется благоприятный баланс генетического разнообразия, сопряженность его потери с воздействием негативных антропогенных воздействий предполагает снижение эволюционного потенциала вида и дальнейшее сокращение числа его местообитаний на территории республики. Все изученные популяции уникальны по своим генетическим характеристикам, подвержены обмену генетической информацией (средний уровень Nm и подразделенности, большая часть ГР приходится на внутривидовый уровень) и вносят важный вклад в общее состояние генофонда вида. Сохранение каждой популяции вида и места произрастания — задача природоохранной практики *in situ*. Успешность мер охраны можно повысить при использовании индивидуального подхода, особенно для снижающих численность популяций (в т. ч. организация заповедной зоны, сохранение гидрологического режима озер, снижение антропогенной нагрузки; см. ESM 9). Развитие научно обоснованных программ по *ex situ* сохранению вида (создание банка спор из всех известных местообитаний для наибольшего охвата генетического разнообразия вида, размножение растений в аквакультуре для последующей репатриации [24, 43, 44]) будет способствовать повышению шансов на устойчивое развитие и сохранение каждой популяции (см. ESM 9). Эколого-генетический мониторинг популяций и их ранжирование по ГР обоснованы на всех этапах *in situ* и *ex situ* сохранения вида, в т. ч. для прогнозирования динамики развития популяций полушника, при любых манипуляциях по восстановлению популяций [45]. Перспективными исследованиями, важными для сохранения полушника озерного, являются реконструкция филогеографии и истории послеледникового расселения вида, расширение списка исследуемых местообитаний, идентификация генов, ответственных за приобретенные адаптации к изменениям окружающей среды.

Авторы признательны: к. б. н. В.С. Панкратову и рецензенту за внимательное прочтение рукописи и ценные замечания, к. г. н. В.П. Зерницкой за важные комментарии по расселению вида.

Работа выполнена в рамках задания “Мониторинг водной растительности”, раздел НСМОС начиная с 2000 г., гранта БРФФИ № Б10-132.

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. Frankham R. Genetics and extinction // Biol. Conserv. 2005. V. 126. № 2. P. 131–140.
2. Allendorf F.W., Luikart G.H., Aitken S.N. Conservation and the Genetics of Populations, 2nd ed. Hoboken (New Jersey): Wiley-Blackwell, 2012. 624 p.
3. Manel S., Schwartz M.K., Luikart G., Taberlet P. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics // Trends Ecol. & Evol. 2003. V. 18. № 4. P. 189–197. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00008-9](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00008-9)
4. Hampe A., Petit R.J. Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters // Ecol. Lett. 2005. V. 8. № 5. P. 461–467. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00739.x>
5. Lessica P., Allendorf F.W. When are peripheral populations valuable for conservation? // Conserv. Biol. 1995. V. 9. P. 753–760.
6. Heino J., Virkkala R., Toivonen H. Climate change and freshwater biodiversity: Detected patterns, future trends and adaptations in northern regions // Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 2009. V. 84. № 1. P. 39–54. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00060.x>
7. Vlasov B.P. Geoeological features of Belarus lakes — the habitats of relict species *Isoetes lacustris* L. // Acta Geogr. Silesiana. 2012. V. 12. P. 57–64.
8. Власов Б.П. Особенности уникальных озер Беларуси как формирующая основа ресурсов реликтовых видов *Isoetes* L. и *Lobelia dortmanna* L. // Вестник БГУ. Серия 2. Химия. Биология. География. 2014. № 1. С. 62–67.
9. Jermy A.C. Isoetaceae // Pteridophytes and Gymnosperms / Eds Kramer K.U., Green P.S. Berlin/Heidelberg: Springer, 1990. P. 26–31.
10. Пугачевский А.В., Вершицкая И.Н., Ермохин М.В. и др. Редкие биотопы Беларуси. Минск: Альтиора — Живые Краски, 2013. 236 с.
11. Voge M. Environmentally related demography: Field studies on *Isoetes lacustris* L. (Lycophyta, Isoetaceae) in Europe // Pteridology in the New Millennium. Dordrecht: Springer, 2003. P. 233–260.
12. Brunton D.F., Troia A. Global Review of recent taxonomic research into *Isoetes* (Isoetaceae), with implications for biogeography and conservation // Fern Gaz. 2018. V. 20. P. 309–333.
13. Arts G.H. Deterioration of Atlantic soft water macrophyte communities by acidification, eutrophication and alkalisation // Aquat. Bot. 2002. V. 73. № 4. P. 373–393. [https://doi.org/10.1016/S0304-3770\(02\)00031-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3770(02)00031-1)
14. Красная книга Российской Федерации (растения и грибы) / Под ред. Трутнева Ю.П. и др., сост. Ка-

- мелин Р.В. и др. М.: Тов-во научн. изд. КМК, 2008. 855 с.
15. Красная книга Республики Беларусь: редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений / Под ред. Качановского И.М. и др. 4-е изд. Минск: Беларус. Энцыкл. імя П. Броўкі, 2015. 448 с.
 16. *Вознячук И.П., Масловский О.М., Романенко Я.А. и др.* Мониторинг растительного мира // Национальная система мониторинга окружающей среды Республики Беларусь: результаты наблюдений, 2013 / Под ред. Кузьмина С.И. [Электронный ресурс]. Минск: РУП "Бел НИЦ "Экология", 2014. С. 200–237.
 17. *Kang M., Ye Q., Huang H.* Genetic consequence of restricted habitat and population decline in endangered *Isoetes sinensis* (Isoetaceae) // *Ann. Bot.* 2005. V. 96. № 7. P. 1265–1274.
<https://doi.org/10.1093/aob/mci277>
 18. *Chen Y.Y., Liao L., Li W., Li Z.* Genetic diversity and population structure of the endangered alpine quillwort *Isoetes hypsophila* Hand.-Mazz. revealed by AFLP markers // *Plant Syst. Evol.* 2010. V. 290. P. 127–139.
<https://doi.org/10.1007/s00606-010-0355-5>
 19. *Mengxue M.A., Xiang D.O., Kuo L.I. et al.* Outcrossing rates and gene flow in natural population of the endangered endemic aquatic lycophyte *Isoetes yunguiensis* as revealed by ISSR markers // *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj Napoca.* 2019. V. 47. №. 2. P. 339–346.
<https://doi.org/10.15835/nbha47111264>
 20. *Gentili R., Abeli T., Rossi G. et al.* Population structure and genetic diversity of the threatened quillwort *Isoetes malinverniana* and implication for conservation // *Aquat. Bot.* 2010. V. 93. № 3. P. 147–152.
<https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2010.05.003>
 21. *Hofstra D., de Winton M.* Geographic scales of genetic variation amongst *Isoetes* in New Zealand // *Aquat. Bot.* 2016. V. 131. P. 28–37.
<https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2016.02.004>
 22. *Santos M.P., Araújo J.V., Lopes A.V. et al.* Genetic diversity by ISSR of two endemic quillworts (*Isoetes* L.) species from Amazon Iron Rocky Outcrops, *Isoetes cangae* e *I. serracarajensis* // *BioRxiv.* 2019. P. 635771.
<https://doi.org/10.1101/635771>
 23. *Vöge M.* Monitoring the vitality of *Isoetes lacustris* by using a non-destructive method // *Limn. Rev.* 2015. V. 14. № 3. P. 153–158.
<https://doi.org/10.1515/limre-2015-0005>
 24. *Civrilikova M., Znachor P., Vrba J.* The effect of temperature on the phenology of germination of *Isoetes lacustris* // *Preslia.* 2014. V. 86. № 3. P. 279–292.
 25. *Wood D.P., Olofsson J.K., McKenzie S.W., Dunning L.T.* Contrasting phylogeographic structures between freshwater lycophytes and angiosperms in the British Isles // *Bot. Lett.* 2018. V. 165. P. 476–486.
<https://doi.org/10.1080/23818107.2018.1505545>
 26. *Блажевич Р.Ю., Дмитриева С.А., Парфёнов В.И. и др.* Флора Беларуси. Сосудистые растения. Т. 1. Lycopodiophyta. Equisetophyta. Polypodiophyta. Ginkgophyta. Pinophyta. Gnetophyta // Под ред. Парфёнова В.И. Минск: Беларус. навука, 2009. 199 с.
 27. *Власов Б.П., Гигевич Г.С., Грищенкова Н.Д.* Концепция и методика мониторинга водной растительности // Методика проведения мониторинга растительного мира в составе Национальной системы мониторинга окружающей среды Республики Беларусь / Под ред. Пугачевского А.В. Минск: Право и экономика, 2011. С. 28–39.
 28. *Сценановіч І.М.* Эколага-фларыстычны дыягназ сінтаксонаў прыроднай травяністай расліннасці Беларусі. Мінск: Камтат, 2000. 140 с.
 29. *Dempster E.L., Pryor K.V., Francis D. et al.* Rapid DNA extraction from ferns for PCR-based analyses // *Biotechniques.* 1999. V. 27. № 1. P. 66–68.
 30. *Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms // *Am. J. Hum. Gen.* 1980. V. 32. P. 314–331.
 31. *Lynch M., Milligan B.G.* Analysis of population genetic structure with RAPD markers // *Mol. Ecol.* 1994. V. 3. № 2. P. 91–99.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1994.tb00109.x>
 32. *Peakall R., Smouse P.E.* GenAEx 6.4: Genetic analysis in Excel. Population Genetic Software for teaching and research // *Mol. Ecol. Notes.* 2010. V. 6. P. 288–295.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
 33. *Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P.* Inference of population structure using multilocus genotype data // *Genetics.* 2000. V. 155. P. 945–959.
 34. *Evanno G., Regnaut S., Goudet J.* Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study // *Mol. Ecol.* 2005. V. 14. № 8. P. 2611–2620.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
 35. *Zhivotovsky L.A.* Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers // *Mol. Ecol.* 1999. V. 8. P. 907–913.
 36. *Bergmann F., Gregorius H.R., Larsen J.B.* Levels of genetic variation in European silver fir (*Abies alba*) // *Genetica.* 1990. V. 82. № 1. P. 1–10.
<https://doi.org/10.1007/BF00057667>
 37. *Mantel N.* The detection of disease clustering and a generalized regression approach // *Cancer Research.* 1967. V. 27. P. 209–220.
 38. *Hamrick J.L., Godt M.W.* Effects of life history traits on genetic diversity in plant species // *Philos. Trans. Royal Soc. of London. Series B: Biol. Sci.* 1996. V. 351(1345). P. 1291–1298.
<https://doi.org/10.1098/rstb.1996.0112>
 39. *Vergeer P., Rengelink R., Ouborg N.J., Roelofs J.G.* Effects of population size and genetic variation on the response of *Succisa pratensis* to eutrophication and acidification // *J. Ecol.* 2003. P. 600–609.
 40. *Горовец В.К.* Водная растительность некоторых озер Полесской низменности // Тр. комплексной экспед. по изучению водоемов Полесья. Минск: БГУ им. В.И. Ленина, 1956. С. 255–288.
 41. *Прядко О.І., Дідух Я.П.* Молоділляк озерний — *Isoetes lacustris* L. // Червона книга України. Рослинний світ / Під заг. ред. Дідуха Я.П. Київ: Глобалконсалтинг, 2009. С. 11.

42. Лаврова Н.Б., Филимонова Л.В. Использование анализа состава ископаемой флоры для реконструкции растительности и палеоэкологических условий позднеледниковья Карелии // Труды Карельского научного центра РАН. 2018. № 10. С. 27–43.
<https://doi.org/10.17076/eco882>
43. Власова А.Б., Джус М.А., Власов Б.П. Охрана и мониторинг состояния популяций редкого вида аквафлоры Беларуси полушника озерного (*Isoetes lacustris* L.). Минск: БГУ, 2015. 32 с.
44. Спиридович Е.В., Фоменко Т.И., Власова А.Б. и др. Асептическая коллекция и банк ДНК Центрального ботанического сада НАН Беларуси как эффективные инструменты сохранения редких растений // Вести НАН Беларуси. Серия биол. наук. 2017. № 3. С. 117–128.
45. Maschinski J., Albrecht M.A. Center for Plant Conservation's Best Practice Guidelines for the reintroduction of rare plants // Plant Divers. 2017. V. 39. № 6. P. 390–395.
<https://doi.org/10.1016/j.pld.2017.09.006>

Ecological and Phytocenotic Differentiation, Genetic Variability and Structure of Natural Populations of the Relict Species of Aquatic Flora

Isoetes lacustris L. in Belarus

N. B. Vlasava^{a,*}, A. N. Yukhimuk^a, M. A. Dzhus^b, M. S. Tukhfatullina^a, and B. P. Vlasov^b

^aCentral Botanical Gardens of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220012 Belarus

^bBelarusian State University, Minsk, 220030 Belarus

*e-mail: nastassia_vlasova@yahoo.com

Using RAPD and ISSR systems the genetic diversity and population structure of *Isoetes lacustris* L. on the southern border of its range in Belarus, the relict species of aquaflora, confined to oligotrophic lakes and drastically decreasing in Europe, were studied. For four studied populations in total 127 markers (90.6% polymorphic, 106 informative) were revealed. At the species level genetic variability parameters comprise: $H_e = 0.247$, $P_p = 100\%$, $I = 0.390$. The average level of subdivision ($\phi_{PT} = 0.269$, $p \geq 0.001$; $F_{st} = 0.193$, $p \geq 0.0001$) and gene flow (2.7 migrants per generation) were revealed. A larger proportion of the variability (73.13%) falls on the intra-population level, 13.36% between populations, and 13.51% explains the difference between regions (southern and northern populations). The ranging of populations by genetic diversity ($H_e = 0.063–0.243$; $P_p = 17.92–93.4\%$; $I = 0.095–0.379$) and identification of individual loci determines uniqueness of each population and significance in conservation programs. A decrease of the level of genetic diversity in the small isolated populations in combination with limiting factors (natural – the southern limit of distribution, anthropogenic – eutrophication and changes in the lake regime) are of high risk for the development of populations and the distribution of the species in Belarus. Using integrated analysis of ecological and phytocenotic characteristics of habitat, level and structure of genetic variability of its populations measures for *in situ* and *ex situ* species conservation were proposed.

Keywords: *Isoetes lacustris*, environmental parameters, RAPD, ISSR, genetic diversity, border of the range.

УДК 633.11:575.174.015.3-047.44

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОМА D СИНТЕТИЧЕСКОЙ ПШЕНИЦЫ, ПОЛУЧЕННОЙ НА ОСНОВЕ *Ae. tauschii* L.

© 2021 г. И. В. Потоцкая^{1, *}, В. П. Шаманин^{1, **}, С. С. Шепелев¹, М. Бхатта², А. И. Моргунов^{1,3}

¹Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина, Омск, 644008 Россия

²Университет Висконсина, Мэдисон, 53705 США

³Университет штата Вашингтон, Пулман, 99164 США

*e-mail: iv.pototskaya@omgau.org

**e-mail: vp.shamanin@omgau.org

Поступила в редакцию 26.03.2020 г.

После доработки 18.05.2020 г.

Принята к публикации 17.06.2020 г.

Методом SNP-анализа с помощью панели iSelect90K изучено генетическое разнообразие линий синтетической гексаплоидной пшеницы, полученных в университете Киото (Япония) в результате гибридизации сорта твердой пшеницы Langdon (*Triticum durum*, $2n = 4x = 28$, ВВАА) с образцами *Aegilops tauschii* ($2n = 2x = 14$, DD) различного эколого-географического происхождения. Уровень геномной вариативности оценивали по значениям генетических расстояний Emma (Efficient Mixed-Model Association) и геномной матрицы родства (G). Генетическое разнообразие генома D синтетических линий на 50% выше, чем у геномов А и В. Наибольший генетический полиморфизм отмечен у линии Langdon/Ku-2105 из провинции Пехлеви на южном побережье Каспийского моря и линии Langdon/Ig 131606 из Кыргызстана. Меньшим генетическим разнообразием по D-геному отличались линии из Индии (Langdon/Ig 48042), провинций Ирана Сари и Бальбусар (Langdon/Ku-2088, Langdon/Ku-2093, Langdon/Ku-2096) и Туркменистана (Langdon/Ig 26387). Таким образом, вовлечение в гибридизацию синтетических гексаплоидов пшеницы на основе образцов *Ae. tauschii* из района Каспийского бассейна позволит расширить генетическое разнообразие сортов пшеницы и повысить эффективность использования генетических ресурсов.

Ключевые слова: линия синтетической гексаплоидной пшеницы, *Ae. tauschii*, SNP-локусы, геном D, генетическое разнообразие.

DOI: 10.31857/S0016675821020089

Использование потенциала синтетических гексаплоидов на основе эгилопса Тауша (*Aegilops tauschii* Coss., геном D) доказало свою эффективность в селекции для расширения генетического разнообразия, повышения адаптивности и урожайности сортов пшеницы [1]. Более 62 сортов пшеницы, полученных на основе синтетических форм, успешно внедрены в производство 150 стран мира и их число стремительно растет [2, 3]. Основное генетическое разнообразие вида *Ae. tauschii* сосредоточено на территории, простирающейся от Закавказья до восточного побережья Каспийского моря в Иране, от Центрального Ирана до Китая. В общей сложности более 600 образцов *Ae. tauschii* из 20 стран мира были вовлечены в селекционные программы путем интрогрессивной гибридизации или скрещивания с синтетической пшеницей [4]. Наиболее широко применение генетического материала синтетических гексаплоидов СИММУТ нашло в Китае, где в 2003–2005 гг. создали четыре сорта, один из которых Chuanmai 42

[5]. На основе этого высокоурожайного сорта, устойчивого к желтой ржавчине, получено 12 коммерческих сортов пшеницы [6].

Повышение эффективности и точности отбора селекционного материала с ценными интрогрессиями от синтетических гексаплоидов является важной задачей для маркер-ориентированной селекции. Первым шагом на пути решения такой задачи стало создание картирующей популяции ITMI (International Triticeae Mapping Initiative), полученной путем гибридизации сорта Opata 85 и синтетического гексаплоида W7984. С помощью картирующей популяции ITMI были выявлены QTL, в том числе D-генома, определяющие хозяйственно ценные признаки [7, 8].

SNP-локусы (однонуклеотидный полиморфизм) благодаря равномерному распределению по всему геному (одна однонуклеотидная замена на 99 пар нуклеотидов) послужили основой для разработки платформ полногеномного генотипи-

рования [9]. Так, в китайской академии сельскохозяйственных наук (CAAS) были использованы ДНК-чипы, содержащие 600 К SNP, для идентификации QTL, контролирующих число зерен [10]. Сравнительно недавно из ДНК-чипов 35 К, 90 К и 660 К отобрано 700 и 1000 SNPs с высокой степенью детектирования для конструирования чипов 15 К и 50 К (Triticum TraitBreed array) [11]. Анализ полиморфизма ДНК с помощью SNP-маркеров успешно используется в исследованиях по изучению генетического разнообразия, по ДНК-паспортизации коммерческих сортов пшеницы, картированию QTL и методу GWAS [12].

Количественно генетическое сходство сортов можно изучить с помощью коэффициентов родства. Включение в гибридизацию родительских форм с низкими коэффициентами родства вызывает богатый формообразовательный процесс и увеличивает долю генетической дисперсии количественных признаков в гибридном потомстве [13]. В селекционных программах, наряду с анализом генеалогических профилей, прогноз геномного родства возможен за счет использования неравновесного сцепления локусов количественных признаков (QTL) и SNP-маркеров, плотно охватывающих весь геном. Данные SNP-геномирования эффективны для выявления генетической ценности родительских форм, что позволяет повысить вероятность отбора ценных генотипов в гибридных популяциях [14].

Очевидно, что привлечение в селекцию синтетической пшеницы, имеющей большее генетическое разнообразие в сравнении с коммерческими сортами пшеницы, позволяет привнести в селекционный материал новые аллели генов [15, 16]. Однако, несмотря на проведенные исследования по геномированию синтетической пшеницы и отбору генотипов по локусам количественных признаков [12], поиск источников для расширения генотипического потенциала сортов пшеницы и создание на их основе исходного материала, устойчивого к негативным абиотическим и биотическим стрессовым факторам в связи с проблемой потепления климата и возрастом инфекционной нагрузки, весьма актуальны в селекции пшеницы.

Цель исследований – SNP-анализ линий синтетической пшеницы с геномом *Ae. tauschii* различного эколого-географического происхождения и выделение источников для расширения генотипического потенциала сортов пшеницы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Омским ГАУ при сотрудничестве с CIMMYT в университете Nebraska-Lincoln (США) проведено геномирование 143 образцов из коллекционного питомника ОмонГАИ, включающего 13 линий

синтетической гексаплоидной пшеницы японского университета Киото [17]. Синтетические линии университета Киото получены в результате гибридизации сорта твердой пшеницы Langdon (*Triticum durum*, $2n = 4x = 28$, ВВАА) с образцами *Aegilops tauschii* ($2n = 2x = 14$, DD) различного эколого-географического происхождения (табл. 1) из коллекции университета Киото и Международного центра сельскохозяйственных исследований в засушливых регионах ICARDA (International Center for Agricultural Research in the Dry Areas) [18].

SNP-анализ. В Центре генетических ресурсов университета Nebraska-Lincoln (США) проведен SNP-анализ 143 образцов питомника ОмонГАИ с помощью панели iSelect90K, содержащей 81587 SNP, с охватом хромосом трех геномов. Выделение геномной ДНК проводили набором BioSprint 96 (QIAGEN, Valencia, Калифорния, США) в соответствии с инструкциями производителя. Метод GBS выполнен на основе протокола [19]. Создание библиотек геномирования последовательностей ДНК проводилось с применением рестрикционных энзимов *PstI* и *MspI*. Идентификация SNP-локусов осуществлена с использованием программы TASSEL v. 5.2.40 [20], GBS v. 2 Pipeline [21] и физической карты референсного генома пшеницы от International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC, RefSeq V1.0, 2017 г.).

Статистический анализ генетического разнообразия. Уровень геномной варибельности оценивали по значениям генетических расстояний Emma (Efficient Mixed-Model Association) [22] и геномной матрицы родства (G) [23] в оболочке R-Studio с использованием пакета прикладных программ GAPIT 3.0 (Genomic Association and Prediction Integrated Tool) [24].

Вычисление генетических расстояний по методу Emma проводили по формуле:

$$y = X\beta + Zu + e,$$

где y – вектор популяционных эффектов; β – вектор фиксированных эффектов, u – случайный эффект смешанной модели; e – вектор случайных эффектов; X – матрица фиксированных эффектов; Z – матрица инцидентности случайных эффектов.

Расчет геномной матрицы родства проводили по алгоритму, разработанному Р.М. VanRaden [23], (метод 1) по формуле:

$$G = \frac{ZZ'}{2 \sum p_i(1 - p_i)},$$

где: $Z = M - P$ (матрица SNP эффектов); M – матрица размером $n \times m$ (число особей на число локусов), состоящая из элементов – оценок гомозиготных и гетерозиготных локусов, принятых за: AA = 1, AB = 0, BB = -1; P – вектор-столбец, представляющий удвоенную сумму гетерозигот-

Таблица 1. Синтетические линии университета Киото

Синтетическая линия	Происхождение <i>Ae. tauschii</i>	Подвид <i>Ae. tauschii</i>
Langdon/Ku-2105	Пехлеви, Иран	<i>typica</i>
Langdon/Ku-2092	Бабульсар, Иран	<i>strangulata</i>
Langdon/Ig 131606	Талас, Кыргызстан	Не известен
Langdon/Ig 48042	Джамму-Кашмир, Индия	Не известен
Langdon/Ku-20-9	Бабульсар, Иран	<i>strangulata</i>
Langdon/Ku-2079	Альябад, Иран	<i>strangulata</i>
Langdon/Ku-2100	Рамсар, Иран	<i>meyeri</i>
Langdon/Ku-2096	Бабульсар, Иран	<i>strangulata</i>
Langdon/Ku-2088	Сари, Иран	<i>strangulata</i>
Langdon/Ku-2075	Бабульсар, Иран	<i>strangulata</i>
Langdon/Ku-2093	Бабульсар-Чалус, Иран	<i>strangulata</i>
Langdon/Ku-2097	Бабульсар, Иран	<i>typica</i>
Langdon/Ig 126387	Ашхабад, Туркменистан	Не известен

Примечание. KU – Plant Germ-Plasm Institute, Faculty of Agriculture, Kyoto University; Ig – International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA).

ных маркеров (локусов) или частоту второго SNP аллеля, где $i = 2(p_j - 0.5)$; p_i – частота i -аллеля SNP (А или В) для j -го сорта.

Построение дендрограммы на основании данных SNP-анализа выполнено с помощью программы SPSS версии PASW Statistics 20.0 (IBM, США).

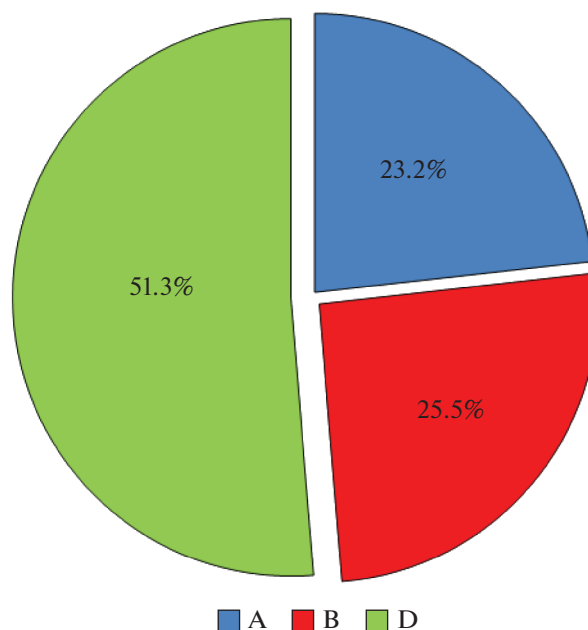
РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате SNP-анализа у синтетических линий университета Киото идентифицировано 47525 SNP-локусов. Из данного набора линий выявлены различия по 15553 SNP. Из 15553 локусов – 411 с отсутствующими данными (более 2%) были исключены из анализа. Распределение 15142 SNPs между геномами было следующим: А-, В- и D-геномы имели 3517 SNPs (23.2%), 3858 (25.5%) и 7767 (51.3%) соответственно (рис. 1, 2).

Число SNPs на хромосому варьировало от 385 (4В) до 1484 (7D). Распределение SNPs между А и В геномами было практически равным, тогда как полиморфизм генома D был на 50% выше, чем у геномов А и В. Определены показатели генетических расстояний с использованием метода Emma и геномной матрицы родства (табл. 2, рис. 3).

Синтетические линии, полученные с участием образцов *Ae. tauschii* из провинций Ирана Рамсар и Бальбусар, а также из коллекции ICARDA имеют наибольшее генетическое сходство (показатель генетического расстояния по Emma составил 0.86, или 86% общих SNP) и объединены в два кластера (рис. 3).

К первому относятся линии, полученные на основе образцов *Ae. tauschii* из Ирана: Langdon/Ku-2100, Langdon/Ku-2096 и Langdon/Ku-2097, ко второму – Langdon/Ig 131606 (Кыргызстан), Langdon/Ig 48042 (Индия) и Langdon/Ig 26387 (Туркменистан) (генетические дистанции по методу Emma равны 0.83, 0.84, 0.86). Высокие положительные значения коэффициента геномного родства (0.64–0.89) также свидетельствуют о близком генетическом сходстве данных линий.

**Рис. 1.** Распределение 15142 SNPs по геномам А, В и D.

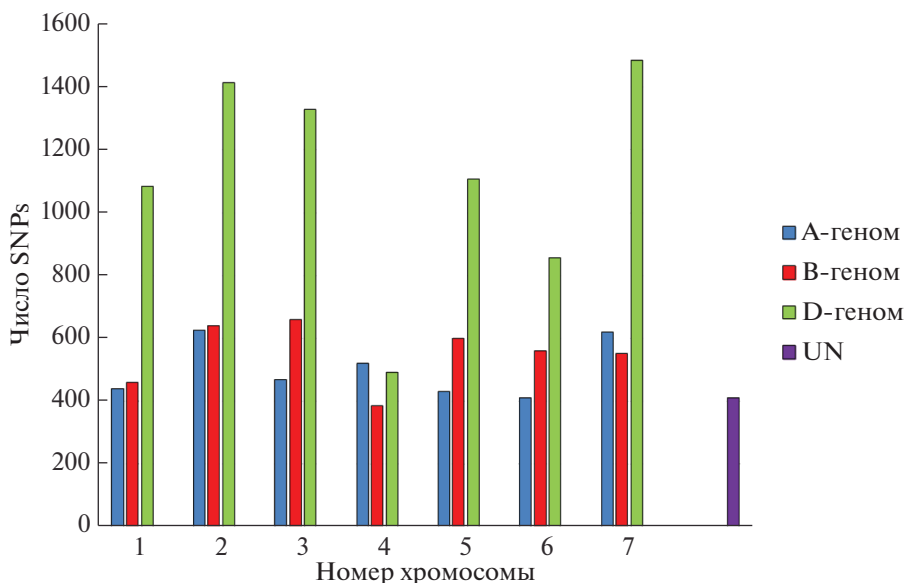


Рис. 2. Распределение 15142 SNPs по 21 хромосоме и SNPs с отсутствующими данными (UN) 13 синтетических линий.

Остальные линии образуют отдельные субкластеры с высокой долей одинаковых SNP-локусов. Максимальные генетические различия (коэффициент геномного родства составил -0.44) отмечены между линиями Langdon/Ig 48042 (Индия) и Lang-

don/Ku-2100, Langdon/Ku-2096, Langdon/Ku-2097 (Иран); Langdon/Ig 126387 (Туркменистан) и Langdon/Ku-20-9, Langdon/Ku-2100, Langdon/Ku-2097 (Иран), что объясняется различным географическим происхождением образцов *Ae. tauschii*.

Таблица 2. Уровень генетического разнообразия синтетических линий пшеницы с участием образцов *Ae. tauschii* различного происхождения

Синтетическая линия	Langdon/Ku-2105	Langdon/Ku-2092	Langdon/Ig 131606	Langdon/Ig 48042	Langdon/Ku-20-9	Langdon/Ku-2079	Langdon/Ku-2100	Langdon/Ku-2096	Langdon/Ku-2088	Langdon/Ku-2075	Langdon/Ku-2093	Langdon/Ku-2097	Langdon/Ig 126387
Ku-2105	1.71	81	79	80	81	79	80	81	81	80	82	80	79
Ku-2092	-0.15	1.42	79	80	83	80	81	81	84	82	84	81	79
Ig 131606	-0.12	-0.26	1.65	84	79	77	78	78	79	78	80	78	83
Ig 48042	-0.15	-0.27	0.69	1.47	81	79	80	80	81	80	81	80	86
Ku-20-9	-0.09	0.01	-0.24	-0.25	1.39	81	81	82	84	82	84	81	80
Ku-2079	-0.11	-0.04	-0.23	-0.21	-0.01	1.63	79	79	81	80	81	79	78
Ku-2100	-0.18	-0.23	-0.42	-0.44	-0.21	-0.28	1.49	86	81	80	82	86	78
Ku-2096	-0.16	-0.23	-0.42	-0.44	-0.19	-0.30	0.71	1.42	82	81	83	86	79
Ku-2088	-0.12	0.16	-0.26	-0.26	0.06	0.06	-0.29	-0.26	1.36	82	85	81	80
Ku-2075	-0.16	0.02	-0.27	-0.26	0.03	0.03	-0.24	-0.24	0.02	1.57	83	80	79
Ku-2093	-0.12	0.09	-0.31	-0.31	0.03	-0.01	-0.17	-0.16	0.13	0	1.35	82	80
Ku-2097	-0.18	-0.24	-0.43	-0.44	-0.23	-0.31	0.69	0.68	-0.32	-0.26	-0.19	1.62	78
Ig 126387	-0.16	-0.28	0.64	0.89	-0.44	-0.20	-0.44	-0.43	-0.27	-0.25	-0.34	-0.44	1.56

Примечание. Количество одинаковых SNPs (%) по Емта – над диагональю, коэффициент геномного родства между образцами – под диагональю, доля гомозиготных локусов каждого образца – по диагонали: варьирует от 0 (все локусы находятся в гетерозиготном состоянии) до 2 (все локусы находятся в гомозиготном состоянии).

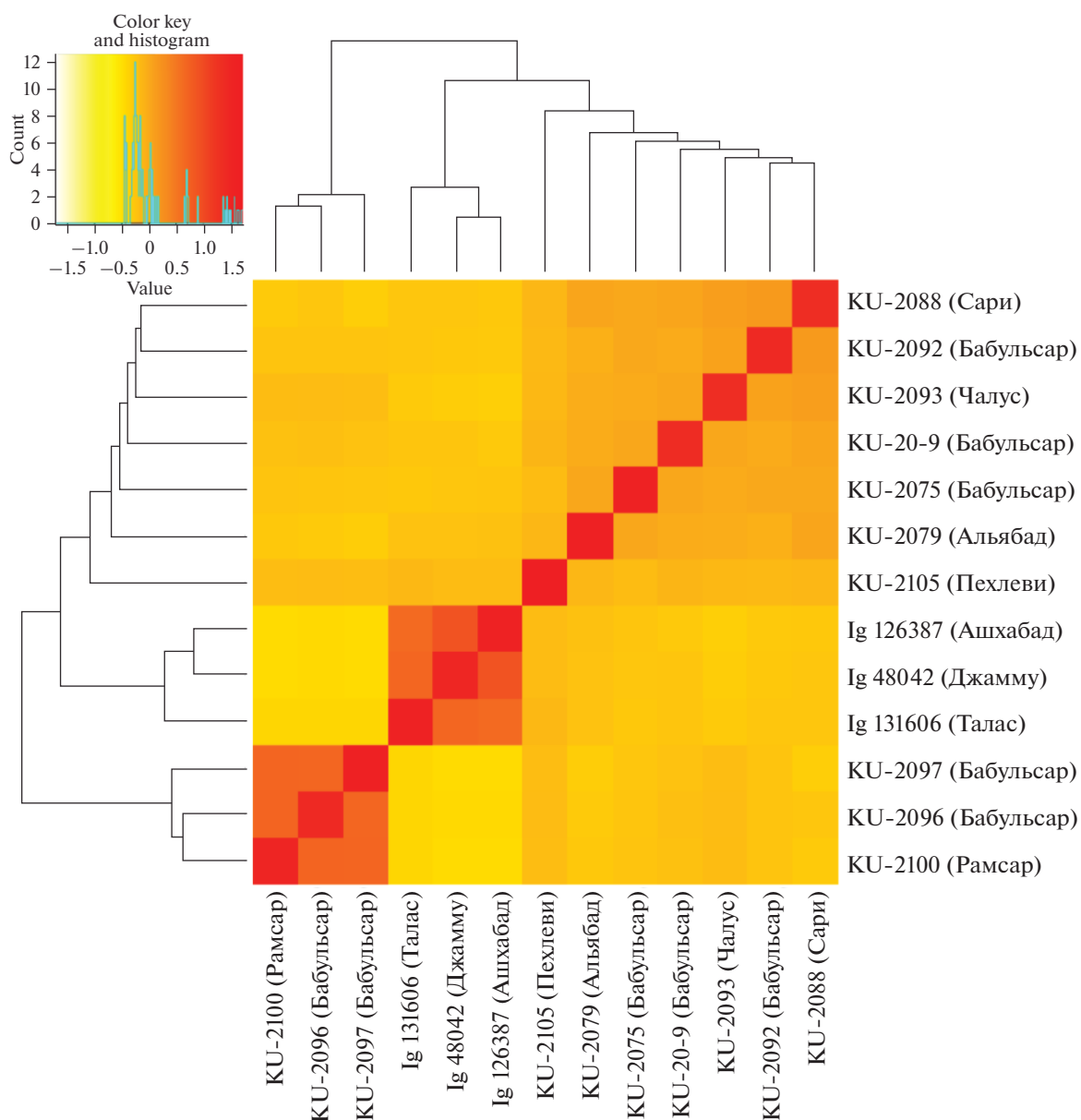


Рис. 3. Тепловая карта корреляционного анализа изученных 13 синтетических линий на основании данных SNP-анализа.

Линии из разных провинций Ирана имели близкое генетическое родство, например Langdon/Ku-2088 (провинция Сари) с линиями из провинции Бальбусар – Langdon/Ku-2092 (0.16) и Langdon/Ku-2093 (0.13). Исключение составили две линии из провинции Бальбусар – Langdon/Ku-2096 и Langdon/Ku-2097, оказавшиеся в первом кластере, при этом образец *Ae. tauschii* Ku-2097 относится к подвиду *typica*. Оценка геномного родства не только подходит для анализа родственных выборок, но и учитывает степень гомозиготности образцов. Например, линии Langdon/Ku-2105 (1.71) и Langdon/Ig 131606 (1.65) имеют наибольшую долю локусов в гомозиготном со-

стоянии, что представляет особенный интерес для селекционной работы.

Поскольку синтетические линии университета Киото получены на основе одного тетраплоидного компонента (Langdon), генетические дистанции по методу Emma у изученных линий составили 77–86%, тем не менее основной вклад в генетическую изменчивость синтетических линий вносит D-геном (51.3%). Наличие D-генома образцов *Ae. tauschii* разного эколого-географического происхождения позволил провести сравнительный анализ между линиями по D-геному (табл. 3).

Таблица 3. Сравнительный анализ “уникальных” SNPs по D-геному между синтетическими линиями по методу Emma

Синтетическая линия	Количество SNP							Итого:
	1D	2D	3D	4D	5D	6D	7D	
Langdon/Ku-2105	5	19*	17*	3	4	6*	13*	67
Langdon/Ku-2092	2	9*	12*	0	0	3	9*	35
Langdon/Ig 131606	9*	14*	7*	0	7*	10*	17*	64
Langdon/Ig 48042	1	0	0	0	0	3	4	8
Langdon/Ku-20-9	0	7*	10*	2	2	5	7*	33
Langdon/Ku-2079	8*	2	2	3	2	6*	10*	33
Langdon/Ku-2100	5	8*	2	1	4	4	1	25
Langdon/Ku-2096	4	7	0	0	2	1	0	14
Langdon/Ku-2088	2	0	1	0	0	2	2	7
Langdon/Ku-2075	9*	5	0	1	4	9*	1	29
Langdon/Ku-2093	4	2	1	1	4	2	4	18
Langdon/Ku-2097	5	5	0	2	1	2	10*	25
Langdon/Ig 126387	6*	4	2	0	1	0	3	16
Итого:	60	82	54	13	31	53	81	

* Значимо на уровне $P < 0.05$.

Наибольший генетический полиморфизм также отмечен у линии Langdon/Ku-2105 (67 уникальных SNPs по геному D) из провинции Пехлеви на южном побережье Каспийского моря, а также у линии Langdon/Ig 131606 (64 SNPs) из Кыргызстана. Меньшим генетическим разнообразием по D-геному отличаются линии из Индии (Langdon/Ig 48042), провинций Ирана Сари, Бальбусар (Langdon/Ku-2088, Langdon/Ku-2093, Langdon/Ku-2096) и Туркменистана (Langdon/Ig 26387). При этом наибольшая разница отмечена между линиями по хромосомам 2D (82 SNPs) и 7D (81 SNPs), тогда как наименьшие – по хромосоме 4D (13 SNPs).

ОБСУЖДЕНИЕ

Формирование генома *T. aestivum* произошло вследствие многократных скрещиваний *T. turgidum* ssp. *durum*, вероятно, с ограниченным числом образцов *Ae. tauschii* ssp. *strangulata* в местах перекрытия ареалов этих подвидов [25–27]. Современные сорта яровой пшеницы характеризуются низким генетическим разнообразием генома D из-за потери ценных генов и аллелей в результате целенаправленной селекции на повышение урожайности и многовекового возделывания этой культуры [28]. ДНК-полиморфизм геномов A и B сортов мягкой пшеницы также редуцирован в сравнении с геномами A и B твердой пшеницы. В этой связи передача генов посредством синтетической пшеницы от вида *T. durum* в геном *T. aestivum* способствует расширению генетического

разнообразия исходного материала в селекции пшеницы [4, 12].

В наших предыдущих работах проведен сравнительный анализ генетического сходства линий синтетической пшеницы селекции CIMMYT и университета Киото с лучшими сортами из Северной Америки, России и Казахстана, который показал значимость синтетической пшеницы в качестве ценного генетического ресурса новых аллелей генов для селекции пшеницы. Результаты исследований выявили также генетические различия у синтетических линий не только по геному D, но также по геномам A и B [15, 29].

Для синтетических линий, полученных на основе образцов *Ae. tauschii* из южных районов Каспийского бассейна, характерно большее генетическое разнообразие, поскольку именно на этой территории произрастают редкие и эндемичные образцы, в том числе ssp. *strangulata* – вероятный донор генома D мягкой пшеницы, продолжается активный формообразовательный процесс данного вида эгилопса [30, 31]. Полученные данные согласуются с результатами других исследований. Например, J. Wang с коллегами [32] с помощью SNP-анализа изучали генетическое разнообразие коллекции образцов *Ae. tauschii* и пришли к выводу, что наибольший полиморфизм D-генома отмечен у двух групп образцов, произрастающих на юге и юго-западе Каспийского бассейна.

На основе результатов SNP-анализа построены дендрограммы для оценки степени сходства однонуклеотидного полиморфизма между изу-

ченными синтетическими линиями. На филогенетическом дереве синтетических линий выделено три кластера: синтетические линии с участием образцов *Ae. tauschii* из провинций Ирана Рамсар и Бальбусар, линии с участием образцов *Ae. tauschii* коллекции ICARDA (Туркменистан, Кыргызстан и Индия) и линии из различных провинций Ирана. Генетическая однородность линий из провинций Ирана Бабульсар, Альябад, Сари и Чалус свидетельствует о высоком филогенетическом сходстве образцов *Ae. tauschii*, произрастающих на территории данных провинций. В этом кластере наибольший уровень генетического разнообразия отмечен у линии Langdon/Ku-2105 из провинции Пехлеви.

Анализ полиморфизма синтетических линий с помощью генетических расстояний по методу Етта и геномной матрицы родства позволил оценить сходство синтетических линий, полученных на основе образцов *Ae. tauschii* разного эколого-географического происхождения. Генетическое разнообразие генома D на 50% выше, чем у геномов А и В, что свидетельствует о ценности изученных синтетических линий в качестве генетического резерва для расширения полиморфизма сортов пшеницы. Выявлены наибольшие различия между линиями по хромосомам 2D (82 SNPs) и 7D (81 SNPs).

Отмечена высокая степень генетической однородности линий по D-геному, полученных на основе образцов *Ae. tauschii* из провинций Ирана Сари и Бальбусар (Langdon/Ku-2088, Langdon/Ku-2093, Langdon/Ku-2096), а также линий из Индии (Langdon/Ig 48042) и Туркменистана (Langdon/Ig 26387).

SNP-анализ у линий Langdon/Ku-20-9, Langdon/Ku-2100, Langdon/Ku-2079, Langdon/Ku-2075, Langdon/Ku-2092 и Langdon/Ku-2097 из разных провинций Ирана выявил 25–35 уникальных SNPs D-генома. Выделены две линии – Langdon/Ku-2105 из города Пехлеви на южном побережье Каспийского моря и Langdon/Ig 131606 из Кыргызстана, характеризующиеся наибольшим числом уникальных SNP-локусов D-генома – 67 и 64 и максимальными значениями генетического расстояния по VanRaden – 1.71 и 1.65 соответственно.

Проведенное исследование подтверждает особый статус образцов *Ae. tauschii*, произрастающих на юге Каспийского бассейна, для расширения полиморфизма генома D и поиска генов, контролирующих хозяйственно ценные признаки в селекции пшеницы. Японские синтетические линии, имеющие высокий уровень генетического разнообразия, представляют интерес для селекционных программ в качестве ценного генетического ресурса с целью расширения генотипического потенциала коммерческих сортов пшеницы

и повышения эффективности использования генетических ресурсов.

Данное исследование проведено при финансовой поддержке РФФ (проект № 16-16-10005).

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. *Rasheed A., Ogbonnaya F.C., Lagudah E. et al.* The goat grass genome's role in wheat improvement // *Nat. Plants*. 2018. V. 4. P. 56–58. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0105-1>
2. *Li A., Liu D., Yang W. et al.* Synthetic hexaploid wheat: yesterday, today, and tomorrow // *Engineering*. 2018. V. 4. P. 552–558. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.07.001>
3. *Singh S., Vikram P., Sehgal D. et al.* Harnessing genetic potential of wheat germplasm banks through impact-oriented-prebreeding for future food and nutritional security // *Sci. Rep.* 2018. № 8: 12527. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30667-4>
4. *Ogbonnaya F.C., Imtiaz M., Bariana H.S.* Mining synthetic hexaploids for multiple disease resistance to improve wheat // *Austr. J. Agricultural Res.* 2008. V. 59(5). P. 421–431. <https://doi.org/10.1071/AR07227>
5. *Li J., Wan H., Yang W.Y.* Synthetic hexaploid wheat enhances variation and adaptive evolution of bread wheat in breeding processes // *J. Syst. Evol.* 2014. V. 52. P. 735–742. <https://doi.org/10.1111/jse.12110>
6. *Hao M., Zhang L., Zhao L. et al.* A breeding strategy targeting the secondary gene pool of bread wheat: introgression from a synthetic hexaploid wheat // *Theor. Appl. Genet.* 2019. V. 132. P. 2285–2294. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03354-9>
7. *Баталова Г.А., Русакова И.И., Кочерина Н.В. и др.* Оценка линий ITMI и картирование QTL у яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в условиях северо-востока Российской Федерации. Киров: Изд-во Зонального НИИСХ Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого, 2016. 52 с.
8. *Шаманин В.П., Шепелев С.С., Пожжерукова В.Е. и др.* Картирование QTL у гексаплоидной мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в условиях Западно-Сибирской равнины // *С-х. биология*. 2018. Т. 53. № 1. С. 50–60. <https://doi.org/10.15389/agrobiol.2018.1.50rus>
9. *Paux E., Sourdille P., Mackay I. et al.* Sequence-based marker development in wheat: advances and applications to breeding // *Biotechnol. Adv.* 2012. V. 30. P. 1071–1088. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv>

10. Cui F., Zhang N., Fan X.L. et al. Utilization of a Wheat660 K SNP array-derived high-density genetic map for high-resolution mapping of a major QTL for kernel number // *Sci. Rep-UK*. 2017. V. 7. P. 3788. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04028-6>
11. Rasheed A., Xia X. From markers to genome-based breeding in wheat // *Theor. Appl. Genet.* 2019. V. 132(3). P. 767–784. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03286-4>
12. Rasheed A., Mujeeb-Kazi A., Ogbonnaya F.C. et al. Wheat genetic resources in the post-genomics era: promise and challenges // *Ann. Bot.* 2018. V. 121. P. 603–616. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx148>
13. Мартынов С.П., Добротворская Т.В. Генеалогический и статистический анализ генетического разнообразия с помощью информационно-аналитической системы генетических ресурсов пшеницы GRIS // *Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции*. СПб: ООО “Р-КОПИ”, 2012. С. 193–210.
14. Crossa J., Perez P., Hickey J. et al. Genomic prediction in CIMMYT maize and wheat breeding programs // *Heredity*. 2014. V. 112. P. 48–60. <https://doi.org/10.1038/hdy.2013.16>
15. Bhatta M., Shamanin V., Shepelev S. et al. Marker-trait associations for enhancing agronomic performance, disease resistance, and grain quality in synthetic and bread wheat accessions in Western Siberia // *G3: Genes, Genomes, Genetics*. 2019. V. 19(1). P. 4209–4222. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400811>
16. Ogbonnaya F.C., Abdalla O., Mujeeb-Kazi A. et al. Synthetic hexaploids: Harnessing species of the primary gene pool for wheat improvement // *Plant Breed. Rev.* 2013. V. 37. P. 35–122. <https://doi.org/10.1002/9781118497869.ch2>
17. Шаманин В.П., Потоцкая И.В., Шепелев С.С. и др. Синтетическая пшеница: монография. Омск: Изд-во ФГБОУ ВО Омский ГАУ, 2018. 172 с.
18. Matsuoka Y., Takumi S., Kawahara T. Natural variation for fertile triploid F₁ hybrid formation in allohexaploid wheat speciation // *Theor. Appl. Genet.* 2007. V. 115(4). P. 509–518. <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0584-3>
19. Poland J.A., Brown P.J., Sorrells M.E. et al. Development of high density genetic maps for barley and wheat using a novel two enzyme genotyping-by-sequencing approach // *PLoS One*. 2012. V. 7:e32253. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032253>
20. Bradbury P.J., Zhang Z., Kroon D.E. et al. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples // *Bioinformatics*. 2007. V. 23. P. 2633–2635. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm308>
21. Glaubitz J.C., Casstevens T.M., Lu F. et al. TASSEL-GBS: a high capacity genotyping by sequencing analysis pipeline // *PLoS One*. 2014. V. 9: e90346. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090346>
22. Kang H.M., Zaitlen N.A., Wade C.M. et al. Efficient control of population structure in model organism association mapping // *Genetics*. 2008. V. 178. P. 1709–1723. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.080101>
23. VanRaden P.M. Efficient methods to compute genomic predictions // *J. Dairy Sci.* 2008. V. 91. P. 4414–4423. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0980>
24. Lipka A.E., Kandianis C.B., Hudson M.E. et al. From association to prediction: Statistical methods for the dissection and selection of complex traits in plants // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2015. V. 24. P. 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.02.010>
25. Кулуев А.Р., Матниязов Р.Т., Чемерис Д.А. и др. Современные представления о родственных взаимоотношениях в пшенично-эгилопсом альянсе (с краткой исторической справкой) // *Биомика*. 2016. Т. 8. № 4. С. 297–310.
26. Xu L., Tang Y., Gao S. et al. Comprehensive analyses of the annexin gene family in wheat // *BMC Genomics*. 2016. № 17: 415. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2750-y>
27. Awni R., Nave M., Barad O. et al. Wild emmer genome architecture and diversity elucidate wheat evolution and domestication // *Science*. V. 357(6346). P. 93–97. <https://doi.org/10.1126/science.aan0032>
28. Cox T.S., Wu J., Wang S. et al. Comparing two approaches for introgression of germplasm from *Aegilops tauschii* into common wheat // *Crop J.* 2017. V. 5. P. 355–362. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.05.006>
29. Bhatta M., Shamanin V., Shepelev S. et al. Genetic diversity and population structure analysis of synthetic and bread wheat accessions in Western Siberia // *J. Appl. Genet.* 2019. V. 60(3–4). P. 283–289. <https://doi.org/10.1007/s13353-019-00514-x>
30. Cox T.S. Deepening the wheat gene pool // *J. Crop Prod.* 1997. V. 1. P. 145–168. https://doi.org/10.1300/J144v01n01_01
31. Saedi H., Tabatabaei B.E.S., Rahimmalek M. et al. Genetic diversity and gene-pool subdivisions of diploid D-genome *Aegilops tauschii* Coss. (Poaceae) in Iran as revealed by AFLP // *Genet. Resour. Crop Evol.* 2008. V. 55(8). P. 1231–1238. <https://doi.org/10.1007/s10722-008-9323-0>
32. Wang J.R., Luo M.C., Chen Z.X. et al. *Aegilops tauschii* single nucleotide polymorphisms shed light on the origins of wheat D-genome genetic diversity and pinpoint the geographic origin of hexaploid wheat // *New Phytologist*. 2013. V. 198. P. 925–937.

Analysis of the Genome D Polymorphism of Synthetic Wheat Obtained on the Basis of *Ae. tauschii* L.

I. V. Pototskaya^{a,*}, V. P. Shamanin^{a,**}, S. S. Shepelev^a, M. Bhatta^b, and A. I. Morgounov^{a,c}

^a*Stolypin Omsk State Agrarian University, Omsk, 644008 Russia*

^b*University of Wisconsin, Madison, 53726 USA*

^c*Washington State University, Pullman, 99164 USA*

**e-mail: iv.pototskaya@omgau.org*

***e-mail: vp.shamanin@omgau.org*

SNP analysis was performed using iSelect90K for identification of the genetic diversity of synthetic hexaploid wheat lines of Kyoto University (Japan) bred by crossing of durum wheat variety Langdon (*Triticum durum*, $2n = 4x = 28$, BBAA) with entries of *Aegilops tauschii* ($2n = 2x = 14$, DD) of different ecological origin. The level of genomic variability was calculated by Emma approach (Efficient Mixed-Model Association) and using genomic relationship matrix (G). The genetic diversity of the genome D of synthetic lines 50% more than that of genomes A and B. The greatest genetic polymorphism of the line Langdon/Ku-2105 from Pahlavi province on the southern coast of Caspian Sea and the line Langdon/Ig 131606 from Kyrgyzstan was observed. Lines from India (Langdon/Ig 48042), Iranian provinces Sari and Balbusar (Langdon/Ku-2088, Langdon/Ku-2093, Langdon/Ku-2096), and Turkmenistan (Langdon/Ig 26387) are characterized with lower genetic diversity of the genome D. Thus, the involvement into hybridization of synthetic hexaploid wheat on the basis of *Ae. tauschii* entries from the Caspian basin will extend the genetic diversity of wheat varieties and increase the efficiency of genetic resources using.

Keywords: synthetic hexaploid wheat line, *Ae. tauschii*, SNP loci, genome D, genetic diversity.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИИ ГОЛШТИНИЗИРОВАННОГО ЧЕРНО-ПЕСТРОГО СКОТА ПО МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМ ЛОКУСАМ

© 2021 г. О. С. Шаталина¹, *, И. В. Ткаченко¹, А. А. Ярышкин¹

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

*e-mail: shatalinao@list.ru

Поступила в редакцию 12.03.2020 г.

После доработки 01.05.2020 г.

Принята к публикации 25.08.2020 г.

Приведены результаты исследования генетической структуры популяции крупного рогатого скота по 12 микросателлитным локусам. Объект исследования – 702 особи крупного рогатого скота голштинизированной черно-пестрой породы. Установлено, что в среднем гетерозиготность животных по локусам составляет 78.3%. Среднее число аллелей на локус составляет 7.0 ± 0.08 . Наибольшее распространение в популяции получил аллель 248 пн локуса SPS115 – 0.644. Генотип 248/248 локуса SPS115 имеет наибольшую частоту встречаемости – 0.446. В популяции выявлено 169 редких генотипов с частотой встречаемости меньше 0.010.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, популяция, микросателлитный локус, аллель, генотип.

DOI: 10.31857/S0016675821020090

Популяционная генетика представляет большой интерес для биологов, так как дает новые знания о генетической структуре популяций различных видов животных, селекционных процессах, дрейфе генов, степени инбридинга, оценке генетических расстояний между семействами, генетическом разнообразии. Межпородное скрещивание приводит к тому, что в популяцию животных привносятся новые гены. Закрепление ценных хозяйственно полезных признаков при помощи инбридинга способствует увеличению количества гомозиготных особей в популяции.

Генетическая структура популяции исследуется по генам и микросателлитным локусам. Изучается сцепленное наследование генов, локусов, изменчивость и ассоциации с хозяйственно полезными признаками. Так, Н.В. Ковалюк с соавт. [1] изучена генетическая изменчивость гена *BoLA-DRB3* крупного рогатого скота. С.Р. Хатами с соавт. [2] исследован полиморфизм генов пролактина и гормона роста и их взаимосвязь с хозяйственно полезными признаками. Также учеными изучены фрагменты ДНК, фланкированных микросателлитными локусами с целью выявления породных маркеров крупного рогатого скота, овец и других животных [3–6].

В последнее десятилетие широкое распространение получили исследования микросателлитных локусов. Т.Ю. Киселева с соавт. [7] выявили

неравновесие по сцеплению локусов крупного рогатого скота. Проведены исследования генетического разнообразия крупного рогатого скота различных пород по микросателлитным локусам [8–11]. Изучены количественные показатели аллелей. Выявлено, что число аллелей на локус варьирует от 7 до 18 [12–16]. Также исследования проведены на популяции лошадей, овец, лосей и оленей [17–20].

Цель настоящей работы – определение генетической структуры популяции голштинизированного черно-пестрого скота по микросателлитным локусам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено в Уральском НИИСХ – филиале ФГБНУ УрФНИЦ УрО РАН в 2019 г. Объектом исследования служил голштинизированный черно-пестрый скот (*Bos taurus*) ($n = 702$). ДНК выделяли из цельной крови с антикоагулянтом при помощи набора ДНК–Экстран 1 (ООО “НПФ Синтол”, Россия) согласно методике изготовителя. ПЦР проводили на амплификаторе PCR-9700. Определены 12 микросателлитных локусов, рекомендованных Международным обществом генетики животных (ISAG): BM1824, BM2113, ETH3, ETH10, ETH225, INRA23, SPS115, TGLA53, TGLA122, TGLA126, TGLA227, BM1818,

Таблица 1. Структура популяции крупного рогатого скота по гомозиготности микросателлитных локусов ($n = 702$)

Микросателлитные локусы	Особь, %	
	гетерозиготные	гомозиготные
BM1824	78.2	21.8
BM2113	87.2	12.8
ETH3	75.4	24.6
ETH10	75.8	24.2
ETH225	78.7	21.3
INRA023	80.5	19.5
SPS115	56.9	43.1
TGLA53	93.9	6.1
TGLA122	86.0	14.0
TGLA126	70.8	29.2
TGLA227	87.9	12.1
BM1818	69.0	31.0
Среднее	78.3	21.6

с использованием набора CorDIS Cattle (ООО “Гордиз”, Россия). Микросателлитный профиль животных установлен при использовании генетического анализатора Genetic Analyzer AB 3130 и программ Data Collection v.3.1 и GeneMapper v.4.0. В ходе изучения генетической структуры популяции крупного рогатого скота выявлены: количество гомозиготных и гетерозиготных животных по локусам, а также аллели и генотипы по каждому локусу. Информативными считали аллели, имеющие частоту встречаемости выше 5%. Статистический анализ проведен при помощи программ IBM SPSS Statistics 23 и Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследована гомозиготность крупного рогатого скота голштинизированной черно-пестрой породы по 12 микросателлитным локусам. Результаты отражены в табл. 1.

Выявлено, что количество гетерозиготных особей значительно превышает количество гомозиготных по всем 12 локусам. По локусу TGLA53 обнаружено наименьшее количество гомозиготных особей – 6.1%. Наибольший процент гомозиготных животных выявлен в локусе SPS115 – 43.1%. Также установлены высокие показатели гомозиготности в локусах BM1818 и TGLA126 – 31 и 29.2% соответственно. В среднем по популяции гетерозиготность составила 78.3%, гомозиготность – 21.6%. Аналогичные данные получены Т.Н. Карымсаковым с соавт. [13].

В микросателлитных локусах распространен множественный аллелизм. На рис. 1, 2 представлен

полиморфизм аллелей по 12 микросателлитным локусам. В локусах BM1824, SPS115, TGLA126, BM1818 выявлено наименьшее число аллелей – пять. В локусе TGLA53 установлено наибольшее число аллелей – 12, что свидетельствует о высоком генетическом разнообразии [21, 22]. В среднем число аллелей на локус составляет 7.0 ± 0.08 . Аналогичные данные получены Н.И. Стрекозовым с соавт., Н.С. Фураевой с соавт. на крупном рогатом скоте сычевской, бурой швицкой и ярославской пород, число аллелей на локус составило 7.4 [11, 23]. Исследования, проведенные учеными на герефордской и симментальской породах, выявили более низкое число аллелей на локус – 3.3 в герефордской породе и 5.3 в симментальской породе [24, 25]. В популяции голштинизированного крупного рогатого скота наибольшую распространенность в общем количестве локусов получил аллель 248 пн локуса SPS115 (0.644), наименьшую – аллель 141 пн локуса BM2113 (0.001).

По локусу BM1824 наиболее часто присутствует аллель 188 пн, его частота встречаемости составляет 0.405. Редким аллелем данного локуса является аллель 190 – 0.026. В локусе установлено четыре информативных аллеля – 178, 180, 182, 188 пн и один низкоинформативный аллель – 190 пн. По локусу BM2113 распространены аллели 135 и 125 пн (0.298 и 0.314 соответственно). Редким аллелем в данном локусе является 141 пн – 0.001, возможно данный аллель появился вследствие мутационного процесса. В локусе присутствуют пять информативных аллелей – 125, 127, 135, 137, 139 пн и два низкоинформативных аллеля – 131 и 141 пн. В ярославской породе у животных имеется большее разнообразие по данному локусу – 10 аллелей, в черно-пестрой голштинизированной породе – семь аллелей [23]. В локусе ETH3 получил распространение аллель 117 пн – 0.480. Редко встречаются аллели 123 и 109 пн, по 0.013 каждый. По локусу выявлены пять информативных аллелей – 117, 119, 127, 121, 125 пн и три аллеля с низкой информативностью – 129, 123 и 109 пн. В ярославской породе данный локус представлен меньшим генетическим разнообразием – шесть аллелей, в то время как в черно-пестрой голштинизированной породе – восемь аллелей [23]. По локусу ETH10 часто встречается аллель 219 пн – 0.472, наиболее редким в данном локусе является аллель 209 – 0.008. В локусе ETH10 присутствуют четыре информативных аллеля – 219, 223, 225 и 217 пн и три низкоинформативных – 221, 213, 209 пн.

Локус TGLA53 представлен большим числом аллелей – 12, в ярославской породе животные по данному локусу имеют 10 аллелей [23]. Наибольшее распространение получили аллели 168, 160 и 162 пн (0.161, 0.183 и 0.200 соответственно). Редкими аллелями в данном локусе являются 182 и 172 пн – 0.005 и 0.008 соответственно. По данному локусу выявлено семь информативных аллелей –

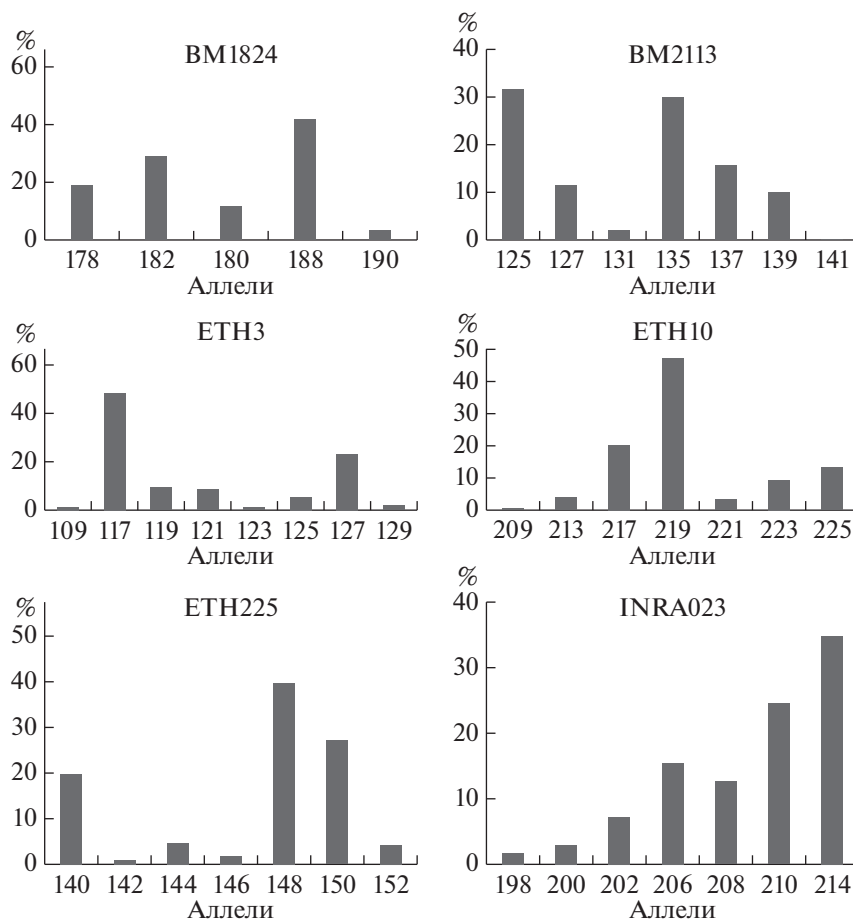


Рис. 1. Частоты встречаемости (%) аллелей локусов BM1824, BM2113, ETH3, ETH10, ETH225, INRA023.

154, 158, 160, 162, 168, 176 и 186 пн и пять аллелей с низкой информативностью – 166, 172, 182, 184 и 170 пн. В локусе TGLA122 животных черно-пестрой голштинизированной породы наблюдается большое генетическое разнообразие – 10 аллелей, в симментальской породе в данном локусе выявлено шесть аллелей [25]. При этом наибольшее распространение имеют аллели 149 и 143 пн – 0.215 и 0.235 соответственно, хотя их концентрация в популяции ниже, чем у других распространенных аллелей локусов. Редкими аллелями локуса являются 181 и 139 пн – 0.008 и 0.019. В локусе TGLA122 установлено семь информативных аллелей – 149, 143, 171, 183, 163, 151 и 161 пн. Низкоинформативными показали себя аллели с длиной 181, 139 и 141 пн. Распространенным аллелем локуса ETH225 признан аллель 148 (0.397), редким – 146 пн (0.024). В данном локусе присутствуют три информативных аллеля – 140, 148 и 150 пн, причем аллель 148 является наиболее информативным. Аллели 142, 144, 152 и 146 пн обладают низкой информативностью.

По локусу INRA023 наиболее распространен аллель 214 пн. Редко встречается аллель 198 –

0.019. По локусу INRA023 выявлено пять информативных аллелей – 202, 206, 208, 210 и 214 пн и два низкоинформативных – 198 и 200 пн. В локусе SPS115 установлен самый распространенный аллель – 248 пн, который обладает высокой информативностью. Редких аллелей (менее 0.02) в данном локусе не выявлено. Информативными аллелями локуса являются 248, 256, 254 и 252 пн. В симментальской породе также данный аллель 248 является самым распространенным, его частота встречаемости составляет 0.778 [25]. По локусу TGLA126 наиболее распространен аллель 117 пн – 0.486. Редким аллелем локуса является аллель 119 пн – 0.020. Данный аллель – единственный неинформативный аллель локуса TGLA126. В локусе TGLA227 наблюдается большое разнообразие – девять аллелей. Наибольшей распространенностью обладает аллель 97 пн – 0.28. Редкими аллелями локуса являются 79 и 101 пн – 0.013 и 0.016 соответственно. В данном локусе присутствуют шесть информативных аллелей – 89, 91, 83, 97, 81 и 103 пн. Три аллеля являются неинформативными – 101, 79 и 99 пн. В локусе BM1818 лидирующее положение заняли ал-

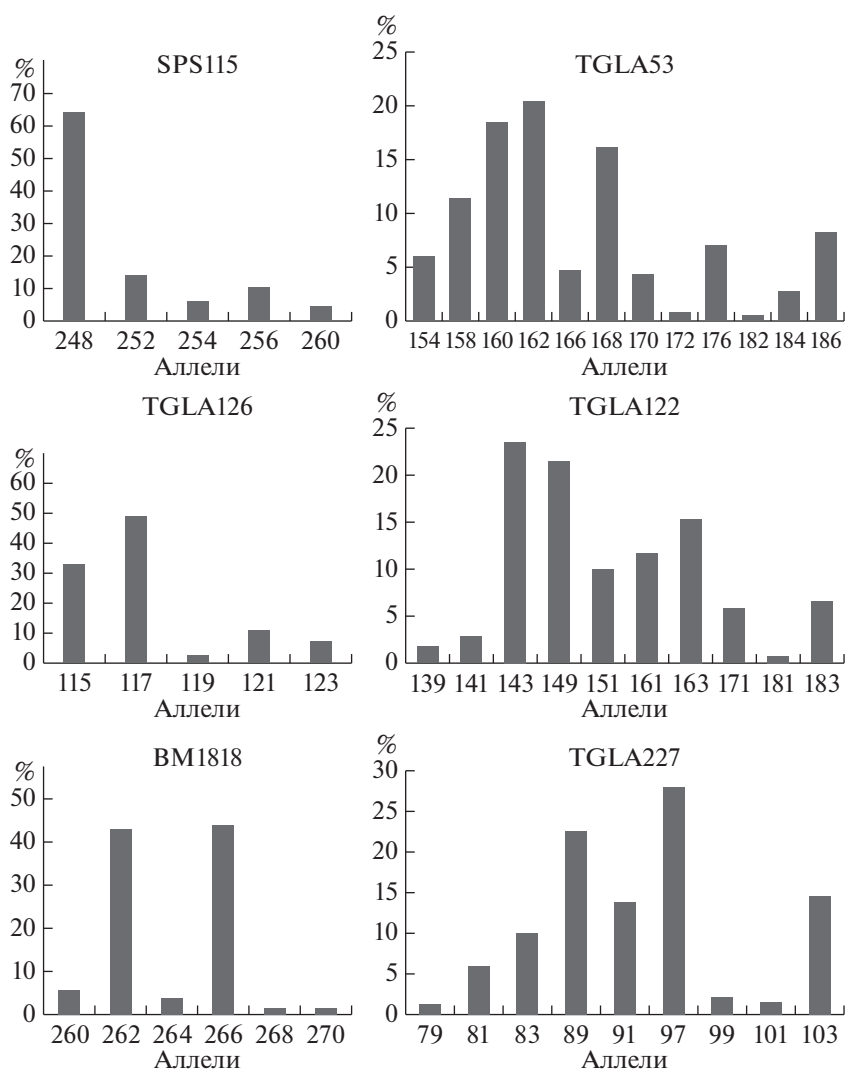


Рис. 2. Частоты встречаемости (%) аллелей локусов SPS115, TGLA53, TGLA122, TGLA126, TGLA227, BM1818.

лели 262 и 266 – 0.430 и 0.444 соответственно. Реже других встречаются аллели 268 и 270 пн – 0.14 каждый. Аллели 262 и 266 пн данного локуса можно считать высокоинформативными, аллели 268 и 270 пн – низкоинформативными. В популяции крупного рогатого скота голштинизированной черно-пестрой породы число аллелей на локус варьировало от пяти до 12. Необходимо отметить, что в бурой швицкой породе крупного рогатого скота аллель 262 локуса BM1818 – самый распространенный, его частота встречаемости составляет 0.680 [11], в то время как в черно-пестрой голштинизированной породе самый распространенный аллель 248 – 0.644. Кроме того, несмотря на меньшее число аллелей на локус в герфордской породе, в локусе BM1818 присутствуют девять аллелей, а в черно-пестрой голштинизированной – шесть аллелей [24]. При этом в симментальской породе данный локус представлен мень-

шим разнообразием аллелей – четыре аллеля на локус [25].

Также исследованы генотипы микросателлитных локусов популяции крупного рогатого скота (рис. 3). По локусу TGLA122 у особей крупного рогатого скота установлено 70 генотипов, что свидетельствует о высоком полиморфизме локуса. Генетическая структура популяции по данному локусу состоит из 61 гетерозиготного и восьми гомозиготных генотипов: 149/149, 143/143, 151/151, 163/163, 141/141, 183/183, 139/139 и 171/171. Наибольшая частота встречаемости отмечена у генотипа 143/149 – 0.108. В популяции обнаружено большое число редких генотипов – 41. Установлено 15 генотипов с частотой встречаемости 0.001 (143/181, 161/163, 153/149, 161/181, 173/183, 171/173, 171/181, 147/149, 139/149, 151/153, 149/175, 141/153, 153/171, 139/139 и 161/169), а также 13 генотипов с частотой встречаемости 0.002 (153/183,

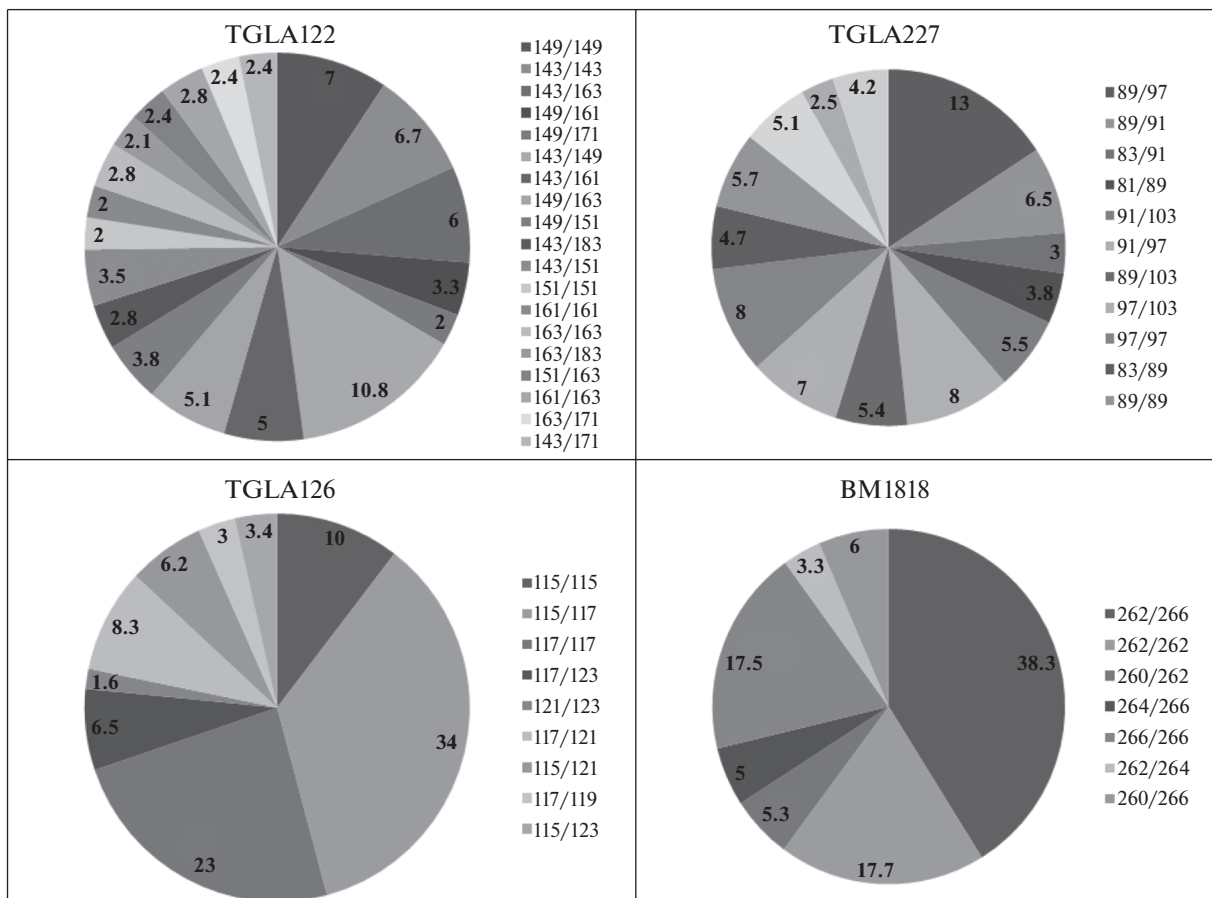


Рис. 3. Процентное соотношение распространенных генотипов локусов TGLA122, TGLA227, TGLA126, BM1818.

147/163, 151/181, 143/175, 181/183, 149/173, 141/161, 183/183, 139/141, 141/163, 143/147, 141/151, 171/171). В популяции крупного рогатого скота по локусу TGLA122 выявлено шесть генотипов с частотой встречаемости 0.004 (141/171, 143/173, 153/163, 141/141, 163/181, 139/143) и три генотипа с частотой встречаемости 0.005 (139/161, 139/151, 139/163). Частота встречаемости генотипов 171/183 и 139/183 составляет 0.006, 141/149 и 141/183 – 0.008.

Локус TGLA227 представлен большим генетическим разнообразием – в нем установлено 53 генотипа, что также позволяет предположить о его высоком полиморфизме. При этом гомозиготных генотипов по локусу всего четыре – 97/97, 89/89, 81/81 и 83/83 и 49 генотипов – гетерозиготны. Самый распространенный генотип данного локуса – 89/97 (0.130). Также в популяции крупного рогатого скота по локусу TGLA227 имеется большое число генотипов с частотой встречаемости менее 0.01. Так, 11 генотипов имеют частоту встречаемости 0.001 – 99/103, 79/91, 77/83, 97/101, 77/91, 79/97, 89/101, 81/87, 91/95, 83/101 и 99/101. У 8 генотипов установлена частота встречаемости 0.002 – 91/101, 101/103, 87/103, 81/99, 81/81, 87/91, 83/99, 87/93. Выявлены пять генотипов с частотой

встречаемости 0.004 – 79/103, 83/87, 81/93, 77/89, 77/103. Частота встречаемости генотипов 83/93, 89/99, 91/93, 87/89, 93/103 и 83/83 составляет 0.005. Генотипы 97/99, 87/97, 81/83 и 81/91 имеют частоту встречаемости 0.008, генотипы 81/83 и 77/97 – 0.007, а генотип 103/103 – 0.009.

В локусе TGLA126 представлено 16 генотипов, среди них – четыре гомозиготных: 115/115, 117/117, 121/121 и 123/123 и 12 гетерозиготных. Наибольшее распространение получили четыре генотипа – 115/115, 117/121, 117/123 и 115/121 – 0.100, 0.083, 0.065 и 0.063 соответственно. Наиболее редкие генотипы данного локуса: 107/117, 111/121 – по 0.001 каждый; 123/123 – 0.002; 119/123, 119/121 – по 0.004 каждый.

В локусе BM1818 установлено 17 генотипов. Наиболее распространенными являются генотипы 262/266, 262/262 и 266/266 – 0.383, 0.177 и 0.175 соответственно. Редкими генотипами по данному локусу являются 260/268, 260/260 и 258/262 – по 0.001 каждый; 264/268 – 0.002; 258/268 – 0.005 и 260/264 – 0.007. Частота встречаемости данных генотипов меньше одного процента. В популяции по локусу BM1818 выявлено три гомозиготных ге-

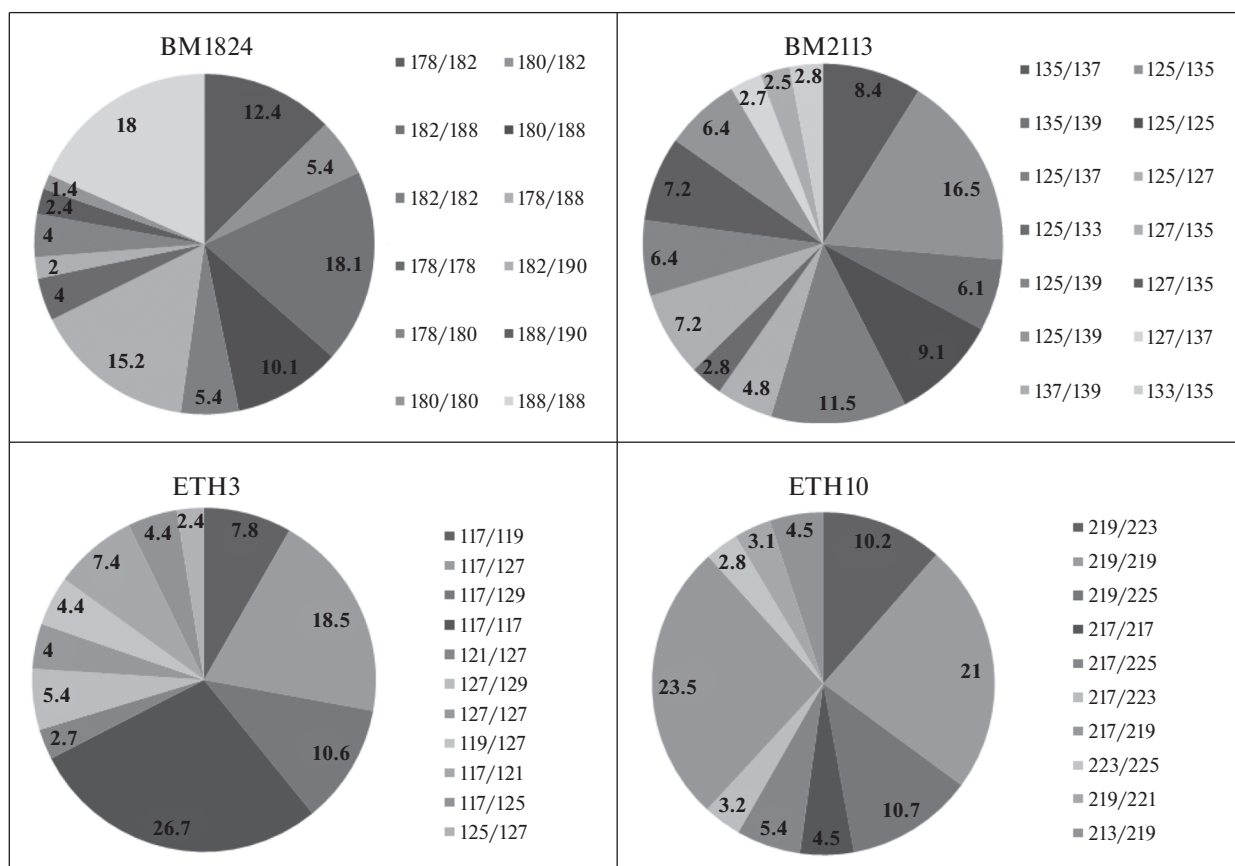


Рис. 4. Процентное соотношение распространенных генотипов локусов BM1824, BM2113, EТН3, EТН10.

нотипа – 262/262, 266/266, 260/260 и 14 гетерозиготных.

Локус BM1824 представлен 15 генотипами. Гомозиготных генотипов по данному локусу четыре – 182/182, 180/180, 188/188 и 178/178. Наибольшую частоту встречаемости имеют генотипы 182/188 и 188/188 – 0.181 и 0.180 соответственно. Также выявлено три генотипа с низкой встречаемостью – 174/182 (0.001), 180/190 (0.007) и 178/190 (0.008) (рис. 4).

В популяции крупного рогатого скота по локусу BM2113 установлено 19 генотипов. Наибольшее распространение получил генотип 125/135 – 0.165, наименьшее – генотип 133/139 – 0.007. Установлено три гомозиготных по данному локусу генотипа – 125/125, 137/137 и 127/127.

Локус EТН3 в популяции представлен 18 генотипами. Гомозиготные генотипы в данной популяции – 117/117, 119/119, 129/129 и 121/121. Наибольшую частоту встречаемости имеет генотип 117/117 – 0.267. Также установлены пять генотипов с низкой частотой встречаемости: 119/119 и 121/121 – 0.004, 119/125 – 0.005, 129/129 и 121/125 – 0.008 каждый.

По локусу EТН10 выявлен 21 генотип, среди них четыре гомозиготных – 219/219, 217/217, 225/225 и 223/223. Наибольшее распространение имеет генотип 217/219 – 0.235. Также выявлены пять редко встречающихся генотипов – 209/225 и 213/223 – 0.002, 209/217 – 0.004, 223/223 и 209/219 – 0.008 каждый.

Локус EТН225 представлен в данной популяции 18 генотипами. Установлено три гомозиготных генотипа (150/150, 140/140 и 148/148) и 15 гетерозиготных. Наибольшее распространение получил генотип 148/150 – 0.301. Также установлено три редко встречающихся генотипа – 146/152 (0.002), 140/142 (0.005) и 142/150 (0.007) (рис. 5).

Исследованы особи крупного рогатого скота по локусу INRA023. Всего установлено 29 генотипов, среди них четыре гомозиготных (202/202, 210/210, 208/208 и 206/206) и 25 гетерозиготных. Наибольшую частоту встречаемости имеет генотип 210/214 – 0.182. Также выявлено 11 генотипов с частотой встречаемости меньше 0.01. Два генотипа имеют частоту встречаемости 0.002 (198/202, 212/214), пять генотипов (198/208, 198/206, 202/204, 200/208, 204/208) – частоту встречаемости 0.004, и генотип 200/206 – 0.008.

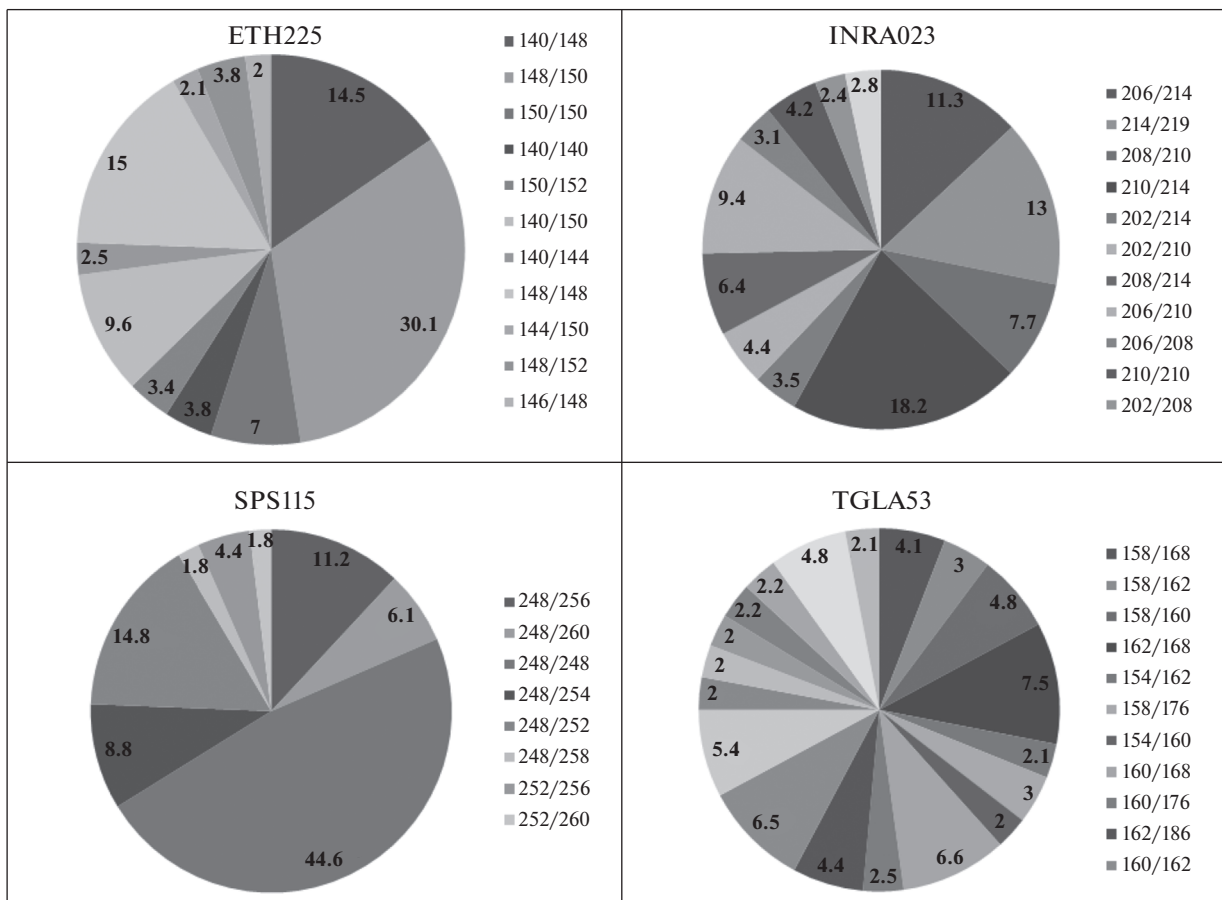


Рис. 5. Процентное соотношение распространенных генотипов локусов ETH225, INRA023, SPS115, TGLA53.

Локус SPS115 в популяции крупного рогатого скота черно-пестрой породы представлен 16 генотипами. Установлено четыре гомозиготных генотипа (248/248, 252/252, 256/256 и 260/260) и 12 гетерозиготных. Наибольшее распространение получил генотип 248/248 – 0.446. Также установлено пять редких генотипов. Частота встречаемости генотипов 254/258 и 260/260 составляет 0.002, 256/258 и 256/260 – 0.004 и 256/256 – 0.005.

В популяции крупного рогатого скота по локусу TGLA53 обнаружено 80 генотипов. Данный локус ввиду значительного количества аллелей и генотипов возможно отнести к высокополиморфным. Число гомозиготных генотипов у особей – восемь (168/168, 162/162, 160/160, 176/176, 186/186, 154/154, 170/170, 166/166), гетерозиготных – 72. Наибольшую частоту встречаемости имеет генотип 162/168 – 0.075. Также в популяции установлено 48 редких генотипов. У исследованных животных присутствуют 18 генотипов с частотой встречаемости 0.001 (172/184, 154/174, 168/174, 178/184, 186/186, 154/184, 158/182, 154/154, 172/186, 158/174, 170/170, 166/172, 162/172, 160/172, 164/176, 168/178, 176/182, 154/164) и 13 генотипов с частотой встречаемости 0.002 (160/182, 162/174, 154/178, 166/170,

184/186, 164/184, 160/174, 158/178, 164/186, 166/166, 158/164, 166/176, 158/158). Также выявлено семь генотипов с частотой встречаемости 0.004 (160/164, 154/170, 160/184, 164/168, 166/182, 154/166, 162/178) и три генотипа с частотой встречаемости 0.005 (170/184, 176/184 и 178/186). Частота встречаемости генотипов 158/184 и 154/176 составляет 0.007, 176/176 и 170/176 – 0.008 и 170/186, 168/170 и 158/170 – 0.009.

ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведенных исследований генетической структуры популяции крупного рогатого скота черно-пестрой породы установлено, что гомозиготность по микросателлитным локусам варьирует от 6.1% по локусу TGLA53 до 43.1% по локусу SPS115. Число аллелей на локус в голштинизированной черно-пестрой породе варьирует от пяти до 12 и составляет в среднем семь аллелей. В сычевской, бурой швицкой и ярославской породах получены аналогичные данные по среднему числу аллелей на локус, в то время как в герфордской и симментальской породах данный показатель снижен до 3.3 и 5.3 аллеля на локус соот-

ветственно. Наибольшую распространенность среди аллелей 12 локусов в популяции имеет аллель 248 пн локуса SPS115 – 0.644. Редкими аллелями популяции являются аллель 141 пн локуса BM2113 – 0.001 и аллель 182 пн локуса TGLA53 – 0.005. Всего по 12 микросателлитным локусам выявлено 52 информативных аллеля. Наиболее распространенным генотипом является генотип 248/248 локуса SPS115 – 0.446. Высокая частота встречаемости данного генотипа позволяет назвать его характерным для голштинизированной черно-пестрой породы. Также у исследованных особей установлено 169 генотипов с частотой встречаемости меньше 0.01. Установлено три высокополиморфных локуса: TGLA53, TGLA227, TGLA122. Гомозиготные генотипы присутствуют как среди распространенных, так и среди редко встречающихся, что свидетельствует о том, что гомозиготное состояние генотипа не связано с его частотой встречаемости. Установлено, что при увеличении общего числа генотипов локуса с 15–18 до 70–80 возрастает количество редких аллелей в данных локусах с 0.20–0.30 до 0.58–0.68, что обусловлено большим генетическим разнообразием. Популяция крупного рогатого скота черно-пестрой голштинизированной породы представлена значительным числом аллелей и генотипов, что позволяет делать предположения об уровне инбридинга в данной популяции. Симментальская и ярославская породы крупного рогатого скота имеют меньшее генетическое разнообразие. По изученным микросателлитным локусам они имеют разницу на 1–2 аллеля на локус по сравнению с черно-пестрой голштинизированной породой.

Источником финансирования являлось выполнение государственного задания по теме: “Разработать селекционно-генетические и теоретические основы сохранения и эффективного использования генофонда крупного рогатого скота в Уральском регионе с применением современных биотехнологий”.

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. Ковалюк Н.В., Сацук В.Ф., Волченко А.Е. Изменчивость гена *BoLA-DRB3* у крупного рогатого скота молочного направления продуктивности и его влияние на параметры жизнеспособности // Генетика. 2012. Т. 48. № 8. С. 962–965.
2. Хатами С.Р., Лазебный О.Е., Максименко В.Ф., Сулимова Г.Е. ДНК-полиморфизм генов гормона роста и пролактина у ярославского и черно-пестрого скота в связи с молочной продуктивностью // Генетика. 2005. Т. 41. № 2. С. 229–236.
3. Глазко В.И. Геномное распределение ISSR-маркеров (AG)9C и (GA)9C у видов Bovinae и Caprinae // С.-х. биология. 2009. Т. 44. № 4. С. 31–36.
4. Глазко В.И., Столповский Ю.А. Структурно-функциональные особенности микросателлитов в геномах крупного рогатого скота и овец // Докл. РАСХН. 2011. № 1. С. 41–45.
5. Столповский Ю.А., Ахани Азари М., Евсюков А.Н. и др. Сравнительный анализ полиморфизма ISSR-маркеров у пород крупного рогатого скота // Генетика. 2011. Т. 47. № 2. С. 213–226.
6. Столповский Ю.А., Ахани Азари М., Кол Н.В. и др. Дифференциация генофонда пород крупного рогатого скота по ISSR-PCR-маркерам // Изв. Тимирязевской с.-х. академии. 2009. № 3. С. 89–97.
7. Киселева Т.Ю., Kantanen J., Воробьев Н.И. и др. Неравновесие по сцеплению микросателлитных локусов у шести локальных популяций крупного рогатого скота // Генетика. 2014. Т. 50. № 4. С. 464–473.
8. Волкова В.В., Денискова Т.Е., Костюнина О.В. и др. Характеристика аллелофонда локальных пород крупного рогатого скота России по микросателлитным маркерам // Генетика и разведение животных. 2018. № 1. С. 3–10. <https://doi.org/10.31043/2410-2733-2018-1-3-10>
9. Копылов К.В., Шелёв А.В., Копылова К.В., Березовский А.В. Генетическая структура популяций украинской черно-пестрой и украинской красно-пестрой молочных пород по полиморфизму QTL и STR маркеров // Вестник Сумского национ. аграрного ун-та. 2014. № 7. С. 31–37.
10. Нурбаев С.Д., Омбаев А.М., Карымсаков Т.Н. и др. Определение чистопородности популяций крупного рогатого скота мясного направления продуктивности по микросателлитным ДНК // Зоотехния. 2017. № 8. С. 10–13.
11. Стрекозов Н.И., Зиновьева Н.А., Горелов П.В. и др. Генетическая характеристика созданных типов скота бурой швицкой и сычевской пород с использованием полиморфизма микросателлитных локусов // С.-х. биология. 2009. Т. 44. № 2. С. 10–15.
12. Гайнуллина К.П. Некоторые аспекты применения микросателлитных маркеров в сельскохозяйственной практике // Изв. Оренбургского гос. аграрного ун-та. 2018. № 5. С. 232–234.
13. Карымсаков Т.Н., Гладырь Е.А., Нурбаев С.Д. и др. Сравнительная характеристика аллелофонда крупного рогатого скота трех родственных пород черно-пестрого корня, разводимых в республике Казахстан // Молочное и мясное скотоводство. 2017. № 3. С. 11–14.
14. Кольцов Д.Н., Волкова В.В., Гладырь Е.А. и др. Характеристика аллелофонда сычевской породы крупного рогатого скота по ДНК микросателлитам // Достижения науки и техники АПК. 2012. № 8. С. 56–57.
15. Модоров М.В., Ткаченко И.В., Грин А.А. Генетическая изменчивость голштинизированного черно-пестрого скота на территории Свердловской области // Вопр. нормативно-правового регулирования

- ния в ветеринарии. 2019. № 4. С. 111–113.
<https://doi.org/10.17238/issn2072-6023.2019.4.111>
16. Часовщикова М.А., Шевелева О.М. Генетическая характеристика крупного рогатого скота герефордской породы тюменской области с использованием микросателлитных ДНК-маркеров // Вестник ИРГСХА. 2018. № 88. С. 141–150.
 17. Чысыма Р.Б., Храброва Л.А., Зайцев А.М. и др. Оценка генетического разнообразия в популяциях тувинских лошадей по локусам систем крови и микросателлитным ДНК // С.-х. биология. 2017. Т. 52. № 4. С. 679–685.
<https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.4.679eng>
 18. Озеров М.Ю., Танио М., Марзанов Н.С. и др. Микросателлитный анализ эволюционно-генетических связей у различных пород овец // Докл. РАСХН. 2006. № 2. С. 30–33.
 19. Марзанов Н.С., Девришов Д.А., Марзанова С.Н. и др. Популяционно-генетическая характеристика лосей по локусам микросателлитов // Пробл. биологии продуктивных животных. 2018. № 1. С. 75–82.
<https://doi.org/10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2018.1.75-82>
 20. Баранова А.И., Холодова М.В., Сипко Т.П. Генетическая структура дикого северного оленя (*Rangifer tarandus*) России на основании полиморфизма микросателлитных локусов: Материалы Всерос. науч. конф., посвященной 70-летию юбилею кафедры “Зоология и экология” Пензенского гос. ун-та и памяти профессора В.П. Денисова (1932–1997) “Актуальные вопросы современной зоологии и экологии животных”. Пенза, 2016. 21 с.
 21. Марзанов Н.С., Озеров М.Ю., Насибов М.Г., Марзанова Л.К. Микросателлиты и их использование для оценки генетического разнообразия животных (обзор иностранной литературы) // С.-х. биология. 2004. Т. 39. № 2. С. 104–111.
 22. Митютько В.И., Грачев В.С. Генетическое разнообразие у сельскохозяйственных животных и механизмы его изменения // Изв. Санкт-Петербургского гос. аграрного ун-та. 2011. № 23. С. 140–146.
 23. Фураева Н.С., Ганченкова Т.Б., Кертуев Р.М., Калашишникова Л.А. Генетическая гетерогенность быков-производителей ярославской породы по маркерам ДНК // Молочное и мясное скотоводство. 2016. № 6. С. 2–5.
 24. Седых Т.А., Глазырь Е.А., Долматова И.Ю. и др. Полиморфизм микросателлитных локусов крупного рогатого скота герефордской породы различных эколого-генетических генераций // Вестник АПК Ставрополя. 2014. № 3(15). С. 121–128.
 25. Денискова Т.Е., Волкова В.В., Костюнина О.В. и др. Характеристика аллелофонда популяции симментальского и помесного скота Поволжья с использованием микросателлитов // Вестник Алтайского гос. аграрного ун-та. 2019. № 3(173). С. 100–106.

Genetic Structure of the Population of Holstein Black-and-White Cattle by Microsatellite Loci

O. S. Shatalina^{a,*}, I. V. Tkachenko^a, and A. A. Yaryshkin^a

^aUral Federal Agrarian Scientific Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Science, Ekaterinburg, 620142 Russia

*e-mail: shatalinao@list.ru

This article presents the results of a study of the genetic structure of a cattle population at 12 microsatellite loci. The object of the study was 702 specimens of cattle of Holstein black-motley breed. It was found that on average the heterozygosity of animals at the loci is 78.3%. The average number of alleles per locus is 7.0 ± 0.08 . The most widespread in the population was the 248 bp allele, locus SPS115 – 0.644. Genotype 248/248 of the SPS115 locus has the highest frequency of occurrence – 0.446. 169 rare genotypes with a frequency of occurrence of less than 0.01 were identified in the population.

Keywords: cattle, population, microsatellite locus, allele, genotype.

АНАЛИЗ ТРАНСКРИПТОВ ГЕНОВ ПРОТАМИНОВ 1 И 2 ТИПОВ И ФРАГМЕНТАЦИЯ ДНК В СПЕРМАТОЗОИДАХ У ПАЦИЕНТОВ КЛИНИК ВРТ

© 2021 г. М. А. Ищук^{1,2,*}, О. В. Мальшева¹, Е. М. Комарова¹, И. Д. Мекина¹,
Е. А. Лесик¹, А. М. Гзгзян^{1,2}, И. Ю. Коган¹, В. С. Баранов^{1,2}

¹Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта,
Санкт-Петербург, 199034 Россия

²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

*e-mail: mashamazilina@gmail.com

Поступила в редакцию 20.03.2020 г.

После доработки 28.07.2020 г.

Принята к публикации 10.09.2020 г.

Изучение кодирующих и некодирующих РНК сперматозоидов перспективно для поиска новых клинических маркеров мужской фертильности и разработки оптимального алгоритма преодоления бесплодия. Целью данной работы был поиск взаимосвязи между количеством мРНК протаминов 1 и 2 типов в эякулированных сперматозоидах и фрагментацией их ДНК, а также результатами спермиологического анализа пациентов. Работа выполнена на 33 образцах эякулята мужчин, проходивших обследование и лечение по поводу бесплодия. Для всех пациентов был проведен стандартный спермиологический анализ, оценка одно- и двунитевых разрывов ДНК сперматозоидов методом TUNEL, выделение РНК из сперматозоидов и количественный анализ транскриптов генов протаминов методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Согласно полученным данным изменение соотношения между мРНК протаминов 1 и 2 типов связано с нарушением параметров спермограммы; в группе пациентов с патозооспермией ($n = 14$) данное соотношение достоверно выше, чем в группе пациентов с нормозооспермией ($n = 19$) (3.43 ± 0.22 против 2.86 ± 0.16 , $p < 0.05$). Выявлена статистически значимая корреляция ($r = 0.33$, $p < 0.05$) между долей сперматозоидов с фрагментированной ДНК и соотношением количества мРНК генов *PRM2* и *PRM1*. В группе пациентов с долей сперматозоидов с фрагментированной ДНК выше референсного значения ($n = 14$) соотношение протаминов статистически значимо выше, чем в группе пациентов с аналогичным показателем в пределах нормы ($n = 19$) (3.26 ± 0.19 против 2.74 ± 0.18 , $p < 0.05$). Установлено, что нарушение параметров спермограммы (патозооспермия) и повышение фрагментации ДНК сперматозоидов ассоциируется с уменьшением экспрессии гена *PRM2* по сравнению с *PRM1*.

Ключевые слова: сперматозоиды, РНК, фрагментация ДНК, мужское бесплодие, вспомогательные репродуктивные технологии.

DOI: 10.31857/S0016675821020053

При оплодотворении ооцита сперматозоид привносит половину диплоидного генома будущего эмбриона. Считается, что геном зрелых сперматозоидов у млекопитающих транскрипционно и трансляционно неактивен. Между тем, период спермиогенеза (когда происходит формирование зрелых сперматозоидов из гаплоидных сперматид) включает глобальную реорганизацию и конденсацию хроматина, удаление большей части цитоплазмы и формирование функционально активного сперматозоида [1].

Известно, что основные транскрипционные и трансляционные процессы, контролируемые формированием зрелого сперматозоида, происходят непосредственно после завершения второго

мейотического деления. При этом большая часть синтезированной РНК удаляется вместе с редуцируемой цитоплазмой, а зрелый сперматозоид содержит специфические белки и целый комплекс различных кодирующих и некодирующих РНК, которые могут влиять на развитие будущего эмбриона [2–5]. Некоторые из этих РНК вероятно представляют собой остаточные транскрипты, другие же могут быть непосредственно вовлечены в регуляцию экспрессии генов зиготы или потенциально могут транслироваться с помощью аппарата ооцита [6–10].

В ходе спермиогенеза млекопитающих структура хроматина претерпевает выраженные изменения. Вначале гистоновые белки хроматина

округлых сперматид замещаются на транзиторные белки (TNP1, TNP2), которые уже на следующей стадии (элонгированные сперматиды) замещаются основными аргинин-богатыми белками (протамины 1 и 2 типов). Ядерные белки-протамины обеспечивают более плотную упаковку ДНК в сперматозоидах. Аминокислотная последовательность обоих протаминов установлена в 1986 г. [11], гены, определяющие их синтез (*PRM1* и *PRM2*), локализованы на хромосоме 16 в локусе 16p13.3. Оба гена протамины *PRM1* и *PRM2* транскрибируются в ходе ранних этапов спермиогенеза [12]. мРНК протаминов *PRM1* и *PRM2*, в отличие от их белковых продуктов, обнаруживается в округлых сперматиде [13]. После завершения связывания протаминов с хроматином сперматозоида транскрипция генов *PRM1* и *PRM2* полностью прекращается [14]. Трансляция *PRM1*- и *PRM2*-транскриптов начинается и завершается к стадии элонгированных сперматид [15]. Протамин *PRM1* синтезируется как зрелый белковый продукт, который состоит из 50 аминокислотных остатков. мРНК протамины *PRM2* транслируется до белкового предшественника, состоящего из 103 аминокислот, который подвергается протеолитическому расщеплению до зрелой формы, содержащей 50 аминокислотных остатков [16].

Известно, что эмбриональное развитие напрямую зависит от состояния генома сперматозоида, участвовавшего в оплодотворении [17]. В ходе созревания сперматозоид теряет большую часть цитоплазмы, что делает его ядро более уязвимым для внешних факторов. Конденсация хроматина за счет замещения гистонов на протамины в определенной мере имеет для генома протективное значение. Показано, что аномальное соотношение протаминов 1 и 2 типов связано с нарушением конденсации хроматина в сперматозоидах [14, 18], что делает их более уязвимыми к мутагенному действию внешних факторов, в том числе активных форм кислорода [19].

Матричные РНК протаминов в зрелых сперматозоидах человека вероятно являются остаточными транскриптами, которые после конденсации ядра сохраняются в эякулированных сперматозоидах [20, 21]. Считается, что содержание этих транскриптов связано с экспрессией генов в ходе сперматогенеза [22] и отражает качество компактизации ДНК в зрелом сперматозоиде.

Нарушение компактизации хроматина в сперматозоидах делает ДНК более чувствительной к воздействию свободных радикалов, что в свою очередь приводит к появлению в ней разрывов. Однако не установлено, какой уровень фрагментации ДНК в сперматозоиде является критичным. Показано, что после оплодотворения, часть разрывов в ДНК сперматозоида может репарироваться за счет ооцита [23]. Не существует обще-

принятого порогового значения количества (%) сперматозоидов с фрагментированной ДНК в эякуляте, совместимой с нормальным оплодотворением и развитием эмбриона. Вопрос остается открытым также из-за того, что невозможно предсказать, какой именно сперматозоид будет участвовать в оплодотворении при естественном зачатии или при использовании вспомогательных репродуктивных технологий. Различные методы детекции повреждений ДНК сперматозоидов, отсутствие стандартизированных методик и разнообразие критериев включения пациентов в группы исследования также приводят к противоречивым результатам.

В настоящее время рутинные методы оценки мужской фертильности, используемые в клинической практике, имеют определенные ограничения и не позволяют оценить оплодотворяющий потенциал сперматозоида. В этой связи перспективным является изучение многочисленных кодирующих и не кодирующих РНК сперматозоида для поиска новых клинических маркеров мужской фертильности и разработки оптимального алгоритма преодоления бесплодия. Целью данной работы был поиск взаимосвязи между количеством мРНК протаминов 1 и 2 типа в эякулированных сперматозоидах и фрагментацией их ДНК, а также результатами спермиологического анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено в отделе репродуктологии НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта (Санкт-Петербург) с разрешения этического комитета. Материалом для исследования послужили образцы эякулята 33 пациентов, проходивших обследование в отделении вспомогательных репродуктивных технологий.

Подготовка и оценка эякулята

Для всех пациентов был проведен стандартный спермиологический анализ, который включал в себя оценку объема эякулята, концентрации, подвижности и морфологии сперматозоидов согласно руководству Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) [24]. После этого эякулят отмывали с помощью центрифугирования в градиенте плотности силиконовых частиц *SupraSperm* (Origio, Denmark) (80 : 55%, об/об) в течение 20 мин при 300g. После центрифугирования удаляли супернатант и осадок промывали культуральной средой для подготовки сперматозоидов к оплодотворению *Sperm Preparation Medium* (Origio, Denmark). Проводили повторное центрифугирование 10 мин при 300g, удаляли супернатант и выделяли фракцию живых подвижных сперма-

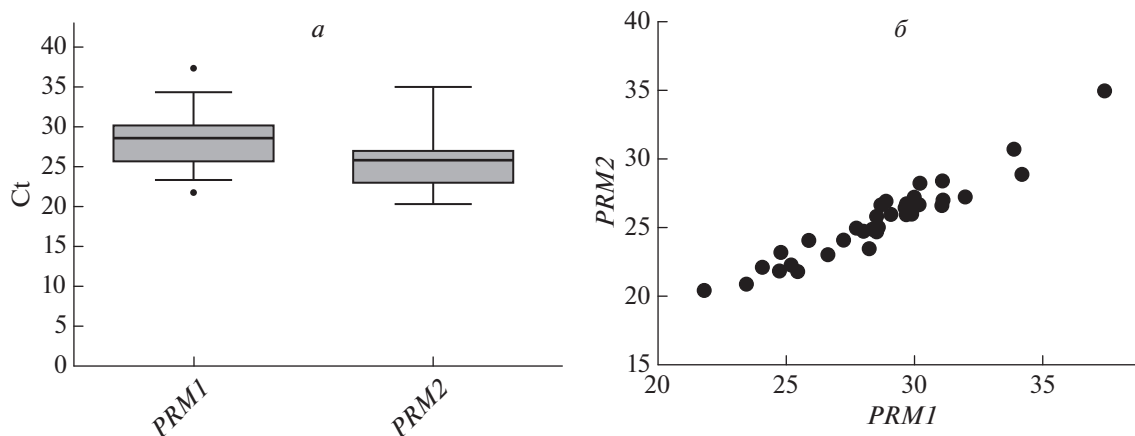


Рис. 1. *a* – Ct матричных РНК *PRM1*, *PRM2*, выделенных из эякулированных сперматозоидов. *б* – линия регрессии для Ct мРНК *PRM1* и *PRM2*, выделенных из эякулированных сперматозоидов. Коэффициент корреляции Пирсона $r = 0.96, p < 0.0001$.

тозоидов методом флотации. Обработанный эякулят был разделен на две части, одна из которых использовалась для оценки доли сперматозоидов с фрагментированной ДНК методом флуоресцентного мечения одно- и двунитевых разрывов ДНК (TUNEL), а другая – для анализа мРНК протамина PRM1 и PRM2 с помощью ПЦР в реальном времени.

Флуоресцентное мечение одно- и двунитевых разрывов в ДНК методом TUNEL

Выявление в сперматозоидах фрагментированной ДНК методом TUNEL проводили согласно описанной ранее методике с модификациями [25]. Часть предобработанного эякулята обрабатывали гипотоническим раствором 0.33%-ного цитрата натрия. После центрифугирования 15 мин при 600g суспензию со сперматозоидами фиксировали с помощью этанол-уксусного фиксатора (3 : 1) и хранили до приготовления препаратов при температуре -20°C . Исследование фрагментации ДНК сперматозоидов проводили методом TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP Nickand Labelling). Согласно инструкции фирмы-производителя, суховоздушные препараты сперматозоидов отмывали в фосфатно-солевом буфере ($1\times$ PBS). После дополнительной фиксации в 4%-ном растворе параформальдегида (ПФА) препараты инкубировали в пермобилизирующем растворе 0.1% Triton X-100, растворенном в 0.1%-ном цитрате натрия, в течение 15 мин при температуре -20°C (Sigma, Germany). Далее под покрывное стекло добавляли реакционную смесь: 4.5 мкл $1\times$ TdT буфера и 0.5 мкл фермента (Roche, Germany). Позитивный и негативный контроля проводили согласно инструкции фирмы-производителя. Препараты инкубировали 1 ч

при температуре 37°C . После двукратной отмывки в буфере реакцию останавливали дистиллированной водой, препараты проводили по серии спиртов возрастающей концентрации (70° , 80° , 96°) и заключали в фотозащитный раствор, содержащий краситель DAPI (4,6-diamino-2-phenylidole) в концентрации 1 мкг/мл (Sigma, Германия). Флуоресцентный сигнал оценивали с помощью микроскопа Leica DM 2500 с камерой Leica DFC 345 FX (Leica Microsystems GmbH, Германия). Для получения фотоизображения использовали программное обеспечение Leica Application Suite версия 3.8.0 (Leica Microsystems GmbH, Германия). Для каждого образца оценивали не менее 2000 сперматозоидов.

Флуоресцентный сигнал детектировали при микроскопическом анализе с помощью флуоресцентного микроскопа. Производили подсчет сперматозоидов, в которых присутствует/отсутствует флуоресцентный сигнал, что позволяет оценить общую долю сперматозоидов с наличием разрывов в ДНК – показатель доли сперматозоидов с “частично фрагментированной ДНК”. Также производили подсчет сперматозоидов, в которых флуоресценция занимает всю площадь головки, что говорит о тотальной фрагментации ДНК в клетке – показатель доли сперматозоидов с “полной” фрагментацией ДНК. Пороговое значение сперматозоидов с частично фрагментированной ДНК – 15% [26, 27], с полной фрагментацией ДНК – 0.35% (рис. 1). Референсное значение по доле клеток с полной фрагментацией ДНК было установлено по результатам собственных исследований спермы доноров (неопубликованные данные).

Таблица 1. Показатели параметров спермиологического анализа в группах пациентов с нормозооспермией и патозооспермией

Результат спермограммы	Возраст (лет)	Объем эякулята, мл	Концентрация сперматозоидов, млн/мл	Подвижность сперматозоидов (% прогрессивно подвижных сперматозоидов)	Морфология сперматозоидов (% морфологически нормальных сперматозоидов)
Нормозооспермия ($n = 19$)	36.0 ± 6.6	3.3 ± 1.0	85.6 ± 40.7	48.9 ± 14.7	8.8 ± 3.0
Патозооспермия ($n = 14$)	35.9 ± 5.6	3.5 ± 1.0	48.9 ± 39.9	49.1 ± 20.1	3.9 ± 2.6
<i>p</i> -value	0.99	0.53	0.05*	0.61	0.0001*

Примечание. Приведены средние значения в группах \pm стандартное отклонение. * – статистически значимые различия между группами.

Выделение РНК, обратная транскрипция, RT-PCR (ОТ-ПЦР)

Для свежих образцов эякулята с помощью оптического микроскопа, оборудованного 100 \times объективом, производили оценку чистоты отмывки сперматозоидов от соматических и круглых клеток. Все образцы были выравнены по концентрации, выделение РНК производили из 1 млн клеток на колонках с силикагелевой мембраной Pure-Link RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу фирмы-производителя. Элюцию проводили в 30 мкл буфера TE. Для проведения обратной транскрипции использовали набор High Capacity Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкциями производителя, в объеме 20 мкл, в присутствии случайных гексануклеотидных праймеров (random primers) (3 мг/мл) с добавлением 10 мкл полученного раствора тотальной РНК.

ПЦР в реальном времени проводили на приборе Real-Time PCR System 7500 (Applied Biosystems, США) с использованием расходных материалов производства Thermo Fisher Scientific, США – TaqMan Gene Expression Assays: Hs00358158_g1 для гена *PRM1*, Hs04187294_g1 для гена *PRM2*. Для анализа общего содержания транскриптов генов *PRM1* и *PRM2* оценивали значение порогового цикла *Ct* для каждого образца (выделение РНК из 1 млн клеток). Для определения соотношения мРНК протаминов 1 и 2 использовали значение ΔC_{tPRM} для мРНК генов *PRM1* и *PRM2* ($C_{tPRM2} - C_{tPRM1}$). Результаты экспериментов анализировали с использованием программы ExpressionSuite, версия 1.0.3 (Thermo Fisher Scientific, США).

Статистический анализ

Статистический анализ данных проводили с помощью программы GraphPad6 (GraphPad Software, США).

Нормальность распределения оценивали согласно критерию Шапиро–Уилка. В случае нормального распределения, средние сравнивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Для данных, не подчиняющихся нормальному распределению, применяли непараметрические критерии. Для сравнения медиан использован *U*-критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при значении $p \leq 0.05$.

Для оценки взаимосвязи между *Ct* (*PRM1*) и *Ct* (*PRM2*) рассчитывали коэффициент корреляции Пирсона. Для определения связи между ΔC_{tPRM} и параметрами спермограммы, а также взаимосвязи с долей сперматозоидов с фрагментированной ДНК рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена (*r*).

РЕЗУЛЬТАТЫ

На основе результатов стандартного спермиологического анализа выделены две группы пациентов. Первую группу составили пациенты с нормозооспермией, $n = 19$ (т.е. с нормальными показателями спермограммы), вторую – пациенты с различными формами патозооспермии ($n = 14$), а именно: со снижением подвижности сперматозоидов – с астенозооспермией ($n = 1$), с нарушением морфологии сперматозоидов – тератозооспермией ($n = 11$), а также с сочетанными отклонениями – с олиготератозооспермией ($n = 1$) и олигоастенотератозооспермией ($n = 1$) (табл. 1).

Для всех пациентов проведена оценка доли сперматозоидов с фрагментированной ДНК методом флуоресцентного мечения одно- и двуниевых разрывов ДНК (TUNEL), которая варьировала от 0.8 до 20.5% по показателю частичной фрагментации и от 0 до 3.3% по показателю полной фрагментации. В группах сравнения среднее количество сперматозоидов с частично фрагментированной ДНК среди пациентов с нормозооспермией составило $5.8 \pm 5.1\%$, для пациентов с

патозооспермией – $6.5 \pm 5.0\%$; с полной фрагментацией ДНК – $0.65 \pm 0.86\%$ и $0.67 \pm 0.73\%$ соответственно. Таким образом, исследуемые группы по доле сперматозоидов с фрагментированной ДНК между собой статистически значимо не отличались ($p > 0.05$) (t -критерий Стьюдента).

С помощью ПЦР в реальном времени проведена количественная оценка мРНК в исследуемых образцах по генам протаминов 1 и 2 типов. Оценены пороговые циклы (Ct) для мРНК протаминов PRM1 и PRM2, которые варьировали для PRM1 от 21.8 и до 34.2 (28.5 ± 3.3), а для PRM2 – от 20.4 до 28.9 (25.5 ± 2.9) (рис. 1, а). Коэффициент корреляции по количеству мРНК протамина 1 типа к протамину 2 типа составил $r = 0.96$ ($p < 0.0001$; коэффициент корреляции Пирсона) (рис. 1, б).

В исследуемой выборке общее количество мРНК генов PRM1 и PRM2 (значение Ct) у пациентов с нормозооспермией ($n = 19$) и патозооспермией ($n = 14$), а также у пациентов с разной долей сперматозоидов с фрагментированной ДНК статистически значимо не отличалось (U -критерий Манна–Уитни; $p > 0.05$). Не обнаружено значимой корреляции между соотношением мРНК протаминов PRM1 и PRM2 (показатель ΔCt_{PRM}) и такими параметрами спермограммы, как концентрация, подвижность и морфология сперматозоидов (коэффициент корреляции Спирмена) (табл. 2).

Однако при сравнении соотношений количества мРНК генов PRM1 и PRM2 (ΔCt_{PRM}) между пациентами с нормозооспермией и патозооспермией обнаружено статистически значимое различие: 2.86 ± 0.16 против 3.43 ± 0.22 ($p < 0.05$) (U -критерий Манна–Уитни) (рис. 2). Более высокие значения показателя ΔCt_{PRM} свидетельствуют о

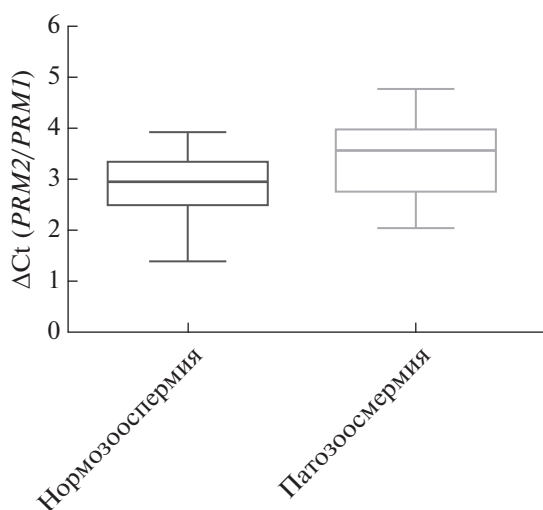


Рис. 2. ΔCt_{PRM} в группах пациентов с нормозооспермией и патозооспермией (U -критерий Манна–Уитни), $p < 0.05$.

Таблица 2. Показатели коэффициента корреляции Спирмена между ΔCt PRM1/PRM2 и различными показателями параметров спермиологического анализа

Параметр спермограммы	Коэффициент корреляции (r) между ΔCt PRM2/PRM1 и параметром спермограммы	p -value
Концентрация сперматозоидов	0.13	0.46
Подвижность сперматозоидов	0.21	0.25
Морфология сперматозоидов	-0.12	0.49

снижении уровня мРНК гена PRM2 относительно мРНК гена PRM1.

Также статистически значимые различия выявлены при анализе взаимосвязи между фрагментацией ДНК сперматозоидов и соотношением мРНК протаминов PRM1 и PRM2. В группе с повышенной долей сперматозоидов с полной фрагментацией ДНК ($>0.35\%$; $n = 14$) значение ΔCt_{PRM} значимо выше, чем в группе пациентов с показателями полной фрагментации в пределах референсного значения ($\leq 0.35\%$; $n = 19$): 3.26 ± 0.19 и 2.74 ± 0.18 соответственно ($p < 0.05$) (t -критерий) (рис. 3). Между долей сперматозоидов с полной фрагментацией ДНК и ΔCt_{PRM} показана статистически значимая корреляция ($r = 0.33$; $p < 0.05$) (коэффициент корреляции Спирмена).

Доля сперматозоидов с частичной фрагментацией ДНК в исследуемой выборке у пациентов варьировала в пределах от 1 до 20.5%, среднее значение составило $6.28 \pm 5.01\%$. У большинства пациентов данный показатель был в пределах референсных значений, в связи с этим не было про-

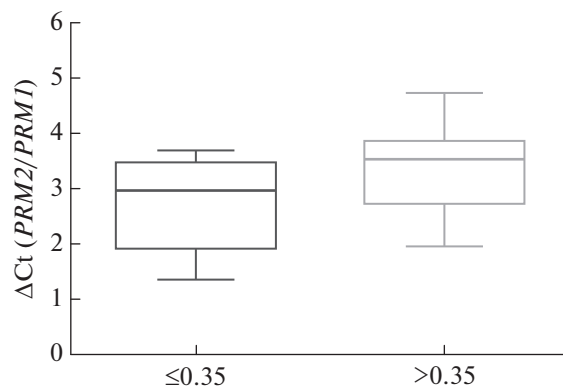


Рис. 3. ΔCt_{PRM} в группах пациентов с долей сперматозоидов с полной фрагментацией ДНК $\leq 0.35\%$ и $>0.35\%$ (t -критерий Стьюдента), $p < 0.05$.

ведено сравнения между группами ($\leq 15\%$ ($n = 30$) и $> 15\%$ ($n = 3$)), выделенными по доле сперматозоидов с частичной фрагментацией ДНК, из-за малого количества пациентов в группах.

ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе сперматогенеза гаплоидные сперматиды проходят фазу элонгации, утрачивают большую часть цитоплазмы (цитоплазматическая капля) и дифференцируются в зрелые сперматозоиды [28]. Показано, что в зрелых сперматозоидах человека не происходит синтеза РНК *de novo* [29], однако в них содержатся разнообразные типы (более 3000 транскриптов) как кодирующих, так и некодирующих РНК [4, 30].

В последние годы научные исследования в области мужского бесплодия и сперматогенеза сосредоточены на поисках информативных маркеров качества мужских половых клеток. Экспрессия протаминов имеет важное значение для нормального процесса сперматогенеза и, следовательно, мужской фертильности, поэтому изучение мРНК протаминов 1 и 2 типов является перспективным направлением в исследовании причин мужского бесплодия. А. Ахмади с соавт. показали на ооцитах хомячка, что деструкция протаминов, вызванная дисульфид-восстанавливающим агентом дитиотреитолом, приводит к снижению связывания сперматозоидов с ооцитами и их способности к пенетрации яйцеклетки [31].

Одним из возможных прогностических показателей качества сперматогенеза может быть соотношение белков протаминов в сперматозоидах. Согласно имеющимся данным, количественное соотношение белков PRM1/PRM2 у фертильных мужчин приближается к единице [14, 32]. Более поздние исследования показали сходные соотношения матричной РНК протаминов PRM1/PRM2. Установлено, что количество белков протаминов коррелирует с количеством протаминовых транскриптов [33, 34].

Используя количественную ПЦР в реальном времени, мы оценили количество транскриптов генов *PRM1* и *PRM2*, выделенных из сперматозоидов, изолированных из эякулята с помощью градиента силиконовых частиц. Обнаружено, что увеличение значения ΔCt_{PRM} (снижение уровня мРНК гена *PRM2* относительно уровня мРНК гена *PRM1*), связано с нарушением параметров спермограммы, и у пациентов с патозооспермией этот показатель статистически значимо выше, чем у пациентов с нормозооспермией.

Наши результаты согласуются с данными других исследователей. А.Е. Платс с соавт. продемонстрировали различия в содержании тотальной РНК у мужчин с тератозооспермией и с нормозооспермией [35]. Позднее было продемонстрировано снижение

уровня мРНК генов *PRM1* и *PRM2* у мужчин с астенозооспермией по сравнению с контрольной группой фертильных мужчин [22]. Существуют данные о связи между количеством транскриптов генов *PRM1*, *PRM2* и *TNP2* в зрелых сперматозоидах и их морфологией [36].

В нашей выборке не найдено различий по общему количеству мРНК генов *PRM1* и *PRM2* у мужчин с нормозооспермией и патозооспермией, а также у мужчин с различным уровнем фрагментации ДНК в сперматозоидах. Однако полученные результаты подтверждают исследования других авторов, свидетельствующих о важной роли соотношения протаминов для поддержания нормальной морфологии сперматозоидов и целостности их ДНК. Согласно данным литературы соотношение мРНК протаминов 1 и 2 типов в эякулированных сперматозоидах различается у фертильных мужчин и у мужчин с бесплодием, а у мужчин с нормозооспермией данный показатель приближается к единице [33, 34]. В настоящем исследовании группа пациентов с нарушением фертильности, связанным с патозооспермией, статистически значимо отличалась от группы пациентов с нормальной фертильностью по соотношению мРНК PRM2/PRM1, при этом у пациентов с патозооспермией данный показатель выше единицы почти в 3.5 раза.

Очевидно, что нормальное эмбриональное развитие напрямую зависит от сохранности генома сперматозоида, оплодотворившего яйцеклетку [17]. В ходе созревания сперматозоид теряет большую часть цитоплазмы, что делает его ядро более уязвимым для внешних факторов. Кроме того, в зрелом сперматозоиде не происходят процессы репарации. Чтобы защитить ДНК сперматозоида во время его прохождения из мужского репродуктивного тракта в женский, ДНК мужских гамет упаковывается отличным от соматических клеток образом: большая часть гистонов заменяется на протамины, архитектура хроматина состоит из тороидальных структур [1]. Белки протаминов необходимы для правильной компактизации хроматина сперматозоида, а нарушение этого процесса предрасполагает к патоморфологическим аномалиям функциональной неполноценности сперматозоидов [37].

Согласно данным настоящего исследования нарушение в соотношении мРНК протаминов связано с повышением уровня фрагментации ДНК сперматозоидов: между долей сперматозоидов с полной фрагментацией ДНК и соотношением мРНК PRM2/PRM1 показана статистически значимая корреляция. Кроме того, в группе пациентов с долей сперматозоидов с фрагментированной ДНК выше референсного значения соотношение PRM1/PRM2 значимо выше, чем в группе пациентов с аналогичным показателем в пределах нормы. Вероятно, это является отраже-

нием эффективности компактизации ДНК в ходе спермиогенеза. Нарушение этого процесса приводит к тому, что ядерная ДНК сперматозоида менее стабильна и становится мишенью для мутагенного эффекта активных форм кислорода [38]. Согласно данным литературы повреждение ДНК сперматозоидов влияет на первые деления дробления зиготы, формирование бластоциты, эффективность имплантации и вынашивание беременности [19, 38–43]. Нарушения репарации разрывов ДНК как в сперматогенезе, так и после оплодотворения могут также приводить к возникновению хромосомных перестроек, в том числе хромотрипсиса, и наследованию их эмбрионами [45, 46].

На сегодняшний день очевидно, что стандартные методы оценки мужской фертильности имеют свои ограничения и недостаточны в случаях супружеских пар с идиопатическим бесплодием. Более того, по оценкам ВОЗ около 15% бесплодных мужчин имеют нормальные показатели спермиологического анализа [47], что указывает на присутствие других факторов, которые играют важную роль в мужской фертильности и не могут быть оценены с помощью анализа спермограммы. В этой связи изучение экспрессии протаминов и их связи с целостностью ДНК сперматозоидов является перспективным направлением для дальнейших исследований причин мужского бесплодия.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 18-75-10046.

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. *Oliva R.* Protamines and male infertility // *Hum. Reprod. Update.* 2006. V. 12. № 4. P. 417–435. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml009>
2. *Jodar M., Selvaraju S., Sendler E. et al.* The presence, role and clinical use of spermatozoal RNAs // *Hum. Reprod. Update.* 2013. V. 19. № 6. P. 604–624. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmt031>
3. *Sendler E., Johnson G.D., Mao S. et al.* Stability, delivery and functions of human sperm RNAs at fertilization // *Nucl. Ac. Res.* 2013. V. 41. № 7. P. 4104–4117. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt132>
4. *Jodar M., Sendler E., Moskovtsev S.I. et al.* Absence of sperm RNA elements correlates with idiopathic male infertility // *Sci. Transl. Med.* 2015. V. 7. P. 295. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aab1287>
5. *Godia M., Swanson G., Krawetz S.A.* A history of why fathers' RNA matters // *Biol. Reprod.* 2018. V. 99. № 1. P. 147–159. <https://doi.org/10.1093/biolre/i0y007>
6. *Krawetz S.A.* Paternal contribution: new insights and future challenges // *Nat. Rev. Genet.* 2005. V. 6. № 8. P. 633–642. <https://doi.org/10.1038/nrg1654>
7. *Carrell D.T.* Epigenetics of the male gamete // *Fertil. Steril.* 2012. V. 97. № 2. P. 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.12.036>
8. *Rando O.J.* Daddy issues: Paternal effects on phenotype // *Cell.* 2012. V. 151. № 4. P. 702–708. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.020>
9. *Castillo J., Estanyol J.M., Balleascà J.L., Oliva R.* Human sperm chromatin epigenetic potential: Genomics, proteomics, and male infertility // *Asian J. Andrology.* 2015. V. 17. P. 601–609. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.153302>
10. *Chen Q., Yan W., Duan E.* Epigenetic inheritance of acquired traits through sperm RNAs and sperm RNA modifications // *Nat. Rev. Genet.* 2016. V. 17. № 12. P. 733–743. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.106>
11. *Ammer H., Henschen A., Lee C.H.* Isolation and amino acid sequence analysis of human sperm protamines P1 and P2. Occurrence of two forms of protamine P2 // *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* 1986. V. 367. № 1. P. 515–522. <https://doi.org/10.1515/bchm3.1986.367.1.515>
12. *Steger K., Klönisch T., Gavenis K. et al.* Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermiogenesis // *Mol. Hum. Reprod.* 1998. V. 4. № 10. P. 939–945. <https://doi.org/10.1093/molehr/4.10.939>
13. *Steger K., Pauls K., Klönisch T. et al.* Expression of protamine-1 and -2 mRNA during human spermiogenesis // *Mol. Hum. Reprod.* 2000. V. 6. № 3. P. 219–225. <https://doi.org/10.1093/molehr/6.3.219>
14. *Aoki V.W., Emery B.R., Liu L., Carrell D.T.* Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity // *J. Androl.* 2006. V. 27. № 6. P. 890–898. <https://doi.org/10.2164/jandrol.106.000703>
15. *Morales C.R., Kwon Y.K., Hecht N.B.* Cytoplasmic localization during storage and translation of the mRNAs of transition protein 1 and protamine 1, two translationally regulated transcripts of the mammalian testis // *J. Cell Sci.* 1991. V. 100. № 1. P. 119–131. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1795020>
16. *Balhorn R., Cosman M., Thornton K. et al.* Protamine mediated condensation of DNA in mammalian sperm // *The Male Gamete: From Basic Science to Clinical Applications.* Salt Lake City, Utah: American Society of Andrology, 1999. P. 707–907.
17. *Simon L., Murphy K., Shamsi M.B. et al.* Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development // *Hum. Reprod.* 2014. V. 29. № 11. P. 2402–2412. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu228>

18. *Mengual L., Ballescà J.L., Ascaso C., Oliva R.* Marked differences in protamine content and P1/P2 ratios in sperm cells from Percoll fractions between patients and controls // *J. Androl.* 2003. V. 24. № 3. P. 438–447. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2003.tb02692.x>
19. *Wright C., Milne S., Leeson H.* Sperm DNA damage caused by oxidative stress: Modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility // *Reprod. Biomed. Online.* 2014. V. 28. № 6. P. 684–703. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.02.004>
20. *Miller D., Briggs D., Snowden H. et al.* A complex population of RNAs exists in human ejaculate spermatozoa: Implications for understanding molecular aspects of spermiogenesis // *Gene.* 1999. V. 237. № 2. P. 385–392. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(99\)00324-8](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(99)00324-8)
21. *Ostermeier G.C., Dix D.J., Miller D. et al.* Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men // *Lancet.* 2002. V. 360. № 9335. P. 772–777. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)09899-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09899-9)
22. *Kempisty B., Depa-Martynow M., Lianeri M. et al.* Evaluation of protamines 1 and 2 transcript contents in spermatozoa from asthenozoospermic men // *Folia Histochem. Cytobiol.* 2007. V. 45. № 1. P. 109–113. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18292846>
23. *González-Marín C., Gosálvez J., Roy R.* Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells // *Int. J. Mol. Sci.* 2012. V. 13. № 11. P. 14026–14052. <https://doi.org/10.3390/ijms131114026>
24. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. M.: Капитал, 2010. 287 с.
25. *Efimova O.A., Pendina A.A., Tikhonov A.V. et al.* Genome-wide 5-hydroxymethylcytosine patterns in human spermatogenesis are associated with semen quality // *Oncotarget.* 2017. V. 8. № 51. P. 88294–88307. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18331>
26. *Virro M.R., Larson-Cook K.L., Evenson D.P. et al.* Sperm chromatin structure assay (sca®) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles // *Fertil. Steril.* 2004. V. 81. № 5. P. 1289–1295. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2003.09.063>
27. *Evenson D., Wixon R.* Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay // *Rep. BioMed Online.* 2006. V. 12. № 4. P. 466–472. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)62000-7](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)62000-7)
28. *Hecht N.B.* Regulation of “haploid expressed genes” in male germ cells // *J. of Reprod. and Fertility.* 1990. V. 88. P. 679–693. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0880679>
29. *Grunewald S., Paasch U., Glander H.J., Anderegg U.* Mature human spermatozoa do not transcribe novel RNA // *Andrologia.* 2005. V. 37. № 2. P. 69–71. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2005.00656.x>
30. *Steger K.* Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids // *Anat. Embryol. (Berl).* 1999. V. 199. № 6. P. 471–487. <https://doi.org/10.1007/s004290050245>
31. *Ahmadi A., Ng S.C.* Destruction of protamine in human sperm inhibits sperm binding and penetration in the zona-free hamster penetration test but increases sperm head decondensation and male pronuclear formation in the hamster-ICSI assay // *J. Assist. Reprod. Genet.* 1999. V. 16. № 3. P. 128–132. <https://doi.org/10.1023/a:1022527714175>
32. *Nanassy L., Liu L., Griffin J.T., Carrell D.* The clinical utility of the protamine 1/protamine 2 ratio in sperm // *Protein Pept. Lett.* 2012. V. 18. № 8. P. 772–777. <https://doi.org/10.2174/092986611795713934>
33. *Depa-Martynow M., Kempisty B., Jagodziński P.P. et al.* Impact of protamine transcripts and their proteins on the quality and fertilization ability of sperm and the development of preimplantation embryos // *Reprod. Biol.* 2012. V. 12. № 1. P. 57–72. [https://doi.org/10.1016/s1642-431x\(12\)60077-1](https://doi.org/10.1016/s1642-431x(12)60077-1)
34. *Rogenhofer N., Dansranjav T., Schorsch M. et al.* The sperm protamine mRNA ratio as a clinical parameter to estimate the fertilizing potential of men taking part in an ART programme // *Hum. Reprod.* 2013. V. 28. № 4. P. 969–978. <https://doi.org/10.1093/humrep/des471>
35. *Platts A.E., Dix D.J., Chemes H.E. et al.* Success and failure in human spermatogenesis as revealed by teratozoospermic RNAs // *Hum. Mol. Genet.* 2007. V. 16. № 7. P. 763–773. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm012>
36. *Savadi-Shiraz E., Edalatkhah H., Talebi S. et al.* Quantification of sperm specific mRNA transcripts (PRM1, PRM2, and TNP2) in teratozoospermia and normozoospermia: New correlations between mRNA content and morphology of sperm // *Mol. Reprod. Dev.* 2015. V. 82. № 1. P. 26–35. <https://doi.org/10.1002/mrd.22440>
37. *Miyagawa Y., Nishimura H., Tsujimura A. et al.* Single-nucleotide polymorphisms and mutation analyses of the TNP1 and TNP2 genes of fertile and infertile human male populations // *J. Androl.* 2005. V. 26. № 6. P. 779–786. <https://doi.org/10.2164/jandrol.05069>
38. *Evenson D.P., Larson K.L., Jost L.K.* Sperm chromatin structure assay: Its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques // *J. Androl.* 2002. V. 23. № 1. P. 25–43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11780920>
39. *Seli E.* Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART // *Hum. Reprod. Update.* 2005. V. 11. № 4. P. 337–349. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi011>
40. *Shamsi M.B., Kumar R., Dada R.* Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction // *Indian J. Med. Res.* 2008. V. 127. № 2. P. 115–123. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18403788>
41. *Simon L., Castillo J., Oliva R., Lewis S.E.* Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes // *Reprod. Biomed. Online.* 2011. V. 23. № 6. P. 724–734. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2011.08.010>
42. *Hosen M.B., Islam M.R., Begum F. et al.* Oxidative stress induced sperm DNA damage, a possible reason for

- male infertility // Iran J. Reprod. Med. 2015. V. 13. № 9. P. 525–532.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26568756>
43. Simon L., Zini A., Dyachenko A. et al. A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome // Asian J. Androl. 2017. V. 19. № 1. P. 80–90.
<https://doi.org/10.4103/1008-682X.182822>
44. Zheng W.W., Song G., Wang Q.L. et al. Sperm DNA damage has a negative effect on early embryonic development following *in vitro* fertilization // Asian J. Androl. 2018. V. 20. № 1. P. 75–79.
https://doi.org/10.4103/aja.aja_19_17
45. Pellestor F., Gatinois V., Puechberty J. et al. Chromothripsis: Potential origin in gametogenesis and preimplantation cell divisions. A review // Fertil. Steril. 2014. V. 102. № 6. P. 1785–1796.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.09.006>
46. Koltsova A.S., Pendina A.A., Efimova O.A. et al. On the complexity of mechanisms and consequences of chromothripsis: An update // Frontiers in Genetics. 2019. V. 10. № 4. Frontiers Media S.A.P. 393.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00393>
47. Agarwal A., Allamaneni S.R. Sperm DNA damage assessment: A test whose time has come // Fertil. Steril. 2005. V. 84. № 4. P. 850–853.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.03.080>

Protamine 1 and 2 mRNAs Abundance in Human Spermatozoa and Its Relation to Semen Quality and Sperm DNA Fragmentation among Fertility Clinic Patients

M. A. Ishchuk^{a, b, *}, O. V. Malysheva^a, E. M. Komarova^a, I. D. Mekina^a,
 E. A. Lesik^a, A. M. Gzgzyan^{a, b}, I. Yu. Kogan^a, and V. S. Baranov^{a, b}

^aOtt Research Institute of Obstetrics, Gynecology, and Reproductology, Saint Petersburg, 199034 Russia

^bSaint Petersburg State University, Saint Petersburg, 199034 Russia

*e-mail: mashamazilina@gmail.com

Sperm contain a complex population of coding and non-coding RNA, and the utility of sperm RNA in fertility research are currently being explored. The aim of this study was to estimation of protamines 1 and 2 transcripts content in human ejaculated spermatozoa in relation to semen quality and sperm DNA fragmentation between fertile and infertile patients. Human ejaculates were obtained from 33 patients and semen analyses were assessed by WHO criteria (2010). We evaluated the sperm DNA fragmentation measured by TUNEL assay. Patient's ejaculates were purified by density-gradient centrifugation, sperm cells were lysed, mRNA extracted, reverse transcribed and subjected to real-time qPCR using specific primer pairs for protamine-1, protamine-2 and 18S RNA. The sperm protamine mRNA ratio in normozoospermic men ($n = 19$; $2.86 \pm \pm 0.16$) differed significantly from that of patozoospermic patients ($n = 14$; 3.43 ± 0.22 ; $p < 0.05$). A significant correlation was shown between sperm DNA fragmentation and the PRM2/PRM1 mRNA ratio ($r = 0.33$; $p < 0.05$). In the group of patients with an increased sperm DNA fragmentation ($n = 14$; 3.26 ± 0.19) the PRM2/PRM1 ratio was significantly higher than in the group of patients with normal rates ($n = 19$; 2.74 ± 0.18 ; $p < 0.05$). Abnormal sperm protamine ratio associated with poor semen quality and DNA fragmentation. Finding sperm-quality markers would help to understand the causes of male infertility and to improve the male reproductive health.

Keywords: human sperm, sperm DNA fragmentation, sperm RNA, male infertility, assisted reproductive technologies.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА INDEL ЛЕЙКОЦИТАРНОГО АНТИГЕНА ЧЕЛОВЕКА G (*HLA-G*) И СЕЗОНА РОЖДЕНИЯ НА РИСК РАЗВИТИЯ ШИЗОФРЕНИИ И ЕЕ КЛИНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ

© 2021 г. Г. И. Коровайцева^{1, *}, М. В. Габаева¹, И. В. Олейчик¹, В. Е. Голимбет¹

¹Научный центр психического здоровья, Москва, 115522 Россия

*e-mail: korovaitseva@mail.ru

Поступила в редакцию 23.03.2020 г.

После доработки 24.04.2020 г.

Принята к публикации 25.08.2020 г.

Модулируя иммунологические отношения между матерью и плодом, а также взаимодействуя с различными средовыми факторами, *HLA-G* играет важную роль в развитии головного мозга эмбриона и потому рассматривается в качестве одного из факторов риска шизофрении. Мы изучали связь INDEL полиморфизма гена *HLA-G* с шизофренией и ее клиническими особенностями с учетом сезона рождения. Выборка больных включала в себя 1171 человека с шизофренией, группу контроля составили 575 психически здоровых человек без наследственной отягощенности психическими заболеваниями. Выявлено взаимодействие изучаемого полиморфизма и сезона рождения. Обнаружено, что у мужчин, носителей генотипа *D/D*, родившихся летом, риск развития шизофрении увеличивается (ОШ = 1.95, 95% ДИ: 1.01–3.78). Проведенный нами анализ показал, что независимо от сезона рождения больных шизофренией полиморфизм INDEL не оказывает влияния на клинические особенности шизофрении: возраст начала заболевания и выраженность симптоматики.

Ключевые слова: INDEL полиморфизм, ген *HLA-G*, сезон рождения, шизофрения.

DOI: 10.31857/S0016675821020065

Шизофрения является сложным и клинически неоднородным заболеванием, патогенез которого изучен лишь частично. Одним из механизмов, который может лежать в основе развития шизофрении, считают сложные взаимодействия иммунных нарушений и головного мозга. Полученные к настоящему времени данные исследований людей и моделей животных свидетельствуют о важной роли воспаления в развитии шизофрении [1–3]. В ряде исследований было обнаружено повышение уровня провоспалительных цитокинов и их рецепторов в плазме крови и спинномозговой жидкости [4–6], а также изменение экспрессии генов этих цитокинов в головном мозге больных шизофренией [7].

Лейкоцитарные антигены человека (локус *HLA*) – важные регуляторы иммунного ответа. Они оказывают влияние на гомеостаз цитокинов, с аномальным уровнем которых может быть связана патология шизофрении, и потому рассматриваются рядом авторов в качестве генов-кандидатов шизофрении. Антиген G лейкоцитов человека (*HLA-G*) является единственным антигеном *HLA*, который экспрессируется на клетках цитотрофобласта плаценты. Модулируя иммунологические отношения между матерью и плодом, *HLA-G* играет

важную роль в эмбриональном развитии, в частности в развитии головного мозга эмбриона. Изменение экспрессии белка *HLA-G* из-за генетических и средовых вариаций может привести не только к различным осложнениям беременности, но и к иммунопатологиям, которые, как считается, создают риск развития шизофрении [8–11]. Особый интерес вызывает один из вариантов гена *HLA-G* – вставка/удаление 14 пн в экзоне 8 в 3'-нетранслируемой (3'UTR) области, или INDEL полиморфизм. Данный полиморфизм является функциональным и связан с уровнем экспрессии гена и стабильностью мРНК, которые могут быть изменены при шизофрении [8, 12–14]. Также отмечалось, что этот полиморфизм влияет на морфологические характеристики головного мозга [15, 16].

Было показано, что помимо генетических факторов риска воздействие ряда факторов окружающей среды может влиять на развитие головного мозга и, как следствие, лежать в основе развития шизофрении. Причем эффект некоторых генов-кандидатов является значительным, только если принять во внимание определенные средовые факторы [17]. Одним из таких средовых факторов является сезон рождения [18–20]. Пы-

таясь объяснить механизм взаимосвязи между риском развития шизофрении и сезоном рождения, авторы выдвигают предположения о роли инфекции, температуры, длительности светового дня и ряда других факторов в период беременности [20–22].

Цель нашего исследования – изучение влияния вариантов INDEL полиморфизма гена *HLA-G* и сезона рождения как средового фактора на риск развития и клинические особенности шизофрении в российской популяции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Общая выборка больных включала в себя 1171 человека с шизофренией и расстройствами шизофренического спектра (рубрики F20–F25 по МКБ-10; средний возраст 34.8 ± 12.9 года, 484 мужчин и 687 женщин). Группу контроля составили 575 психически здоровых человек без наследственной отягощенности психическими заболеваниями (средний возраст 34.2 ± 12.1 года, 252 мужчины и 323 женщины). Более 95% в каждой группе – этнически русские. Все обследованные давали информированное согласие на сбор биологического материала, сбор анамнеза, тестирование и проведение молекулярно-генетического исследования.

Количественную оценку психопатологической симптоматики у больных (в баллах) проводили с помощью шкалы PANSS (The Positive and Negative Syndrome Scale) по трем субшкалам – позитивной, негативной и общей психопатологической.

Сезон рождения всех участников исследования определяли двумя способами: 1) по календарному принципу; 2) по астрономическому принципу [23]. Астрономический способ деления на сезоны учитывает длину светового дня и времена года отсчитываются от точек солнцестояния и равноденствия. Согласно этому, зимним сезоном рождения считали рождение с 22 декабря по 21 марта; весенним – с 22 марта по 20 июня; летним – с 21 июня по 22 сентября и осенним – с 23 сентября по 21 декабря.

ДНК выделяли из венозной крови стандартным методом фенол/хлороформной экстракции. Генотипирование локуса INDEL гена *HLA-G* проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), выполненной по стандартной процедуре с небольшими модификациями на амплификаторе C1000 Touch (Bio-Rad). Использовали олигонуклеотидные праймеры: прямой 5'-TCA CCC CTC ACT GTG ACT GA-3' и обратный 5'-AGG AAA GGT GAT TGG GGA AG-3'. Полученные ПЦР-фрагменты разделяли в 10%-ном полиакриламидном геле. Размер ПЦР-фрагмента,

содержащего вставку 14 пн (аллель *I*), составлял 219 пн, фрагмента без вставки (аллель *D*) – 205 пн.

При анализе данных соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга оценивали с помощью критерия χ^2 . Для оценки значимости различий в распределении аллелей и генотипов полиморфного локуса в изучаемых подгруппах использовали критерий χ^2 Пирсона. Риск того или иного аллеля или генотипа в развитии шизофрении определяли с помощью показателя отношение шансов (ОШ) с 95%-ным доверительным интервалом (ДИ). За порог статистической значимости при определении ОШ был принят стандартный уровень $p = 0.05$. Многофакторный дисперсионный анализ применяли для оценки взаимодействия генетических вариаций, сезона рождения и пола пациентов на выраженность клинических симптомов заболевания. Апостериорный анализ проводили с использованием поправки Бонферрони на множественность сравнений.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ выборки больных показал следующее распределение генотипов INDEL *HLA-G*: *D/D* – 423 (36%), *I/D* – 573 (49%), *I/I* – 175 (15%). Распределение генотипов в группе здорового контроля было: *D/D* – 183 (32%), *I/D* – 298 (52%), *I/I* – 94 (16%). Распределение частот генотипов в обеих выборках соответствовало равновесию Харди–Вайнберга (χ^2 в группе больных – 0.71, в группе контроля – 2.2). Достоверных различий частот аллелей и генотипов в выборках больных и контроля не обнаружено. Частоты аллелей и генотипов у мужчин и женщин значимо не различались между собой как в группе больных шизофренией, так и в контрольной группе.

Количество рождений в различные сезоны (календарные и астрономические) у больных шизофренией и в контрольной группе практически не различалось и составляло от 23 до 28%.

При выделении календарных сезонов рождения анализ распределения частот аллелей и генотипов выявил достоверное увеличение частоты генотипа *D/D* у больных шизофренией, рожденных летом, по сравнению со здоровыми индивидами из контрольной группы, рожденных в том же сезоне ($\chi^2 = 4.16$, $p = 0.04$). Для того чтобы выяснить, связано ли это различие с полом, мы проанализировали распределение частот генотипов в группах мужчин и женщин. Обнаружено достоверное увеличение частоты *D/D* у больных шизофренией мужчин по сравнению с мужчинами из контрольной группы: $\chi^2 = 4.01$, $p = 0.04$; ОШ = 1.95, 95% ДИ (1.01–3.78). Распределение рождений по календарным сезонам в зависимости от пола в контрольной группе и у больных шизофренией показано в табл. 1.

Таблица 1. Количество больных шизофренией и здоровых индивидов в зависимости от пола, рожденных в различные календарные сезоны

Пол	Больные шизофренией (<i>n</i> = 1171)				Контрольная группа (<i>n</i> = 575)			
	зима <i>n</i> = 330 (28%)	весна <i>n</i> = 278 (24%)	лето <i>n</i> = 276 (23%)	осень <i>n</i> = 287 (25%)	зима <i>n</i> = 150 (26%)	весна <i>n</i> = 142 (25%)	лето <i>n</i> = 138 (24%)	осень <i>n</i> = 145 (25%)
Женщины	195 (59%)	178 (64%)	158 (57%)	156 (54%)	81 (54%)	85 (60%)	69 (50%)	88 (61%)
Мужчины	135 (41%)	100 (36%)	118 (43%)	131 (46%)	69 (46%)	57 (40%)	69 (50%)	57 (39%)

Таблица 2. Распределение частот аллелей и генотипов INDEL *HLA-G* у больных шизофренией и здоровых индивидов, рожденных летом (календарный сезон)

Генотип <i>HLA-G</i> (INDEL), аллель	Больные шизофренией (<i>n</i> = 276)		Контрольная группа (<i>n</i> = 138)	
	женщины (<i>n</i> = 158)	мужчины (<i>n</i> = 118)	женщины (<i>n</i> = 69)	мужчины (<i>n</i> = 69)
<i>D/D</i>	60 (0.38)	46 (0.39)*	22 (0.32)	17 (0.25)
<i>I/D</i>	68 (0.43)	60 (0.51)	36 (0.52)	41 (0.59)
<i>I/I</i>	30 (0.19)	12 (0.1)	11 (0.16)	11 (0.16)
<i>D</i>	188 (0.59)	152 (0.64)	80 (0.58)	75 (0.54)
<i>I</i>	128 (0.41)	84 (0.36)	58 (0.42)	63 (0.46)

*Частота генотипа *D/D* у мужчин, больных шизофренией, достоверно отличается от частоты генотипа у мужчин в контрольной группе ($\chi^2 = 4.01, p = 0.04$).

Значения частот генотипов и аллелей у больных шизофренией и людей из контрольной группы, рожденных в летний сезон, представлены в табл. 2.

При анализе выборок с использованием астрономического деления на сезоны, учитывающего длину светового дня, мы не выявили эффекта взаимодействия генотипа и сезона на риск развития шизофрении.

Оценивая влияние сезонов рождения, как календарных, так и астрономических, на выраженность позитивной, негативной и общей психопатологической симптоматики, мы не обнаружили значимых эффектов. Не обнаружено эффекта взаимодействия генотипа, пола и сезона рождения на выраженность симптоматики при шизофрении.

Было изучено влияние INDEL полиморфизма и сезона рождения как средового фактора на возраст начала заболевания. Показано, что ни сезон рождения, ни генотип не влияет на возраст проявления симптомов. Однако при введении в анализ фактора пол были обнаружены различия между возрастом начала заболевания у мужчин и женщин, рожденных летом (календарный сезон). У мужчин средний возраст к началу заболевания (18.4 года) был ниже, чем у женщин (21.8 лет) ($F = 8.1, d.f. = 1, p = 0.005$). Но при этом ни одни из генотипов INDEL с этим снижением не ассоциировал.

ОБСУЖДЕНИЕ

Накапливаются данные, свидетельствующие о том, что большинство факторов риска шизофрении действуют во время пренатального и перинатального периода жизни, и гены, связанные с заболеванием, оказывают влияние на развитие головного мозга не напрямую, а через плаценту [2, 24, 25]. Гены и факторы окружающей среды взаимодействуют и модулируют развитие мозга человека на ранних этапах его развития, вызывая различные нарушения состояния плаценты.

Одним из наиболее часто обсуждаемых средовых факторов, влияние которого может быть связано с развитием шизофрении у потомства, является сезон рождения. При этом в ряде популяций у лиц с шизофренией наблюдается избыток зимне-весенних родов [18–20]. Тем не менее не все исследования подтверждают увеличение риска для тех, кто рожден в этот период [26–28]. В настоящей работе мы также не обнаружили избыточного числа рождений больных шизофренией в зимнем и весеннем сезоне. Распределение рождений по сезонам было равномерным и практически не отличалось от контрольной группы. Полученные нами данные согласуются с результатами одного из исследований российской популяции. В нем не было выявлено существенных сезонных колебаний частоты рождения у больных шизофренией, хотя и были выделены пики рождаемо-

сти при анализе рождений по месяцам [28]. По всей видимости, сезон рождения самостоятельно не влияет на развитие шизофрении. Для возникновения заболевания необходимо наличие целого ряда дополнительных факторов (генетических и средовых), воздействие которых увеличит риск развития шизофрении.

Ряд наблюдений свидетельствует о том, что полиморфизм INDEL гена *HLA-G* является важным параметром, влияющим на регуляцию гена при некоторых патологиях, связанных с экспрессией белка HLA-G [8, 12, 29, 30]. Так, например, в индийской и французской популяциях показана протектирующая роль генотипа *I/I* для биполярного расстройства [30, 31]. Причем последующий анализ показал, что распространенность защитного генотипа ниже среди больных, родившихся в зимний период [31]. В другом исследовании, напротив, было обнаружено, что генотип *I/I* является фактором риска развития шизофрении в индийской популяции. Авторы также показали ассоциацию генотипа *I/I* с позитивной симптоматикой у мужчин [8]. Полученные нами результаты не подтверждают связи генотипа *I/I* с риском заболевания в группе этнических русских. Однако мы обнаружили эффект взаимодействия генетического фактора и сезона рождения на риск развития шизофрении. У больных шизофренией мужчин, рожденных летом, частота генотипа *D/D* была выше, чем у мужчин из контрольной группы, рожденных в тот же период.

Рассматривая зимне-весенний сезон рождения в качестве средового фактора, влияющего на развитие шизофрении, многие авторы выдвигают гипотезу о роли инфекции, температуры, длительности светового дня и ряда других факторов, действующих в этот период [20–22, 32]. Тем не менее нельзя не принять во внимание и то, что событие, повлиявшее на развитие заболевания, могло произойти не в период рождения, а в первом или втором триместре беременности. В нашем исследовании это конец осени–зима и зима–начало весны соответственно. Все обычно рассматриваемые средовые факторы риска (вирусная или бактериальная инфекция, низкая температура, недостаток витамина D, длительность светового дня) могут особенно сильно проявиться в эти сезоны и сыграть важную роль, учитывая важность первого и второго триместров беременности для нормального развития мозга плода. Конечно, ни сезон рождения, ни сезон зачатия не являются единственной причиной развития шизофрении. Скорее всего, факторы, проявляющиеся в эти сезоны, оказывают влияние на нервное развитие плода при наличии определенной генетической уязвимости. В настоящей работе мы показали, что генотип *D/D* является таким генетическим фактором. То, что мы обнаружили ассоциацию *D/D* с шизофренией только у мужчин, может объясняться тем, что экзогенные факторы

по-разному влияют на головной мозг плода в зависимости от пола [18].

Известно, что полиморфизм INDEL влияет на уровень экспрессии гена *HLA-G* и с увеличением экспрессии связан генотип *D/D* [29, 33, 34]. Так как HLA-G является иммуносупрессором, повышение уровня экспрессии *HLA-G* приводит к снижению эффективности иммунного ответа и способствует созданию толерогенных условий для чужеродных антигенов, влияя на ответы цитокинов и цитотоксических Т-лимфоцитов. Это может вызвать нарушение иммунного баланса между матерью и плодом и способствовать изменению иммунного профиля в развивающемся головном мозге. То есть HLA-G-опосредованные иммунные нарушения на ранних сроках беременности могут приводить к нарушению развития нервной системы плода и, как следствие, к развитию шизофрении у потомства.

Таким образом, в настоящей работе впервые была изучена связь полиморфизма INDEL гена *HLA-G* с риском развития шизофрении в российской популяции. Мы обнаружили эффект взаимодействия генетического фактора и сезона рождения. У мужчин, носителей генотипа *D/D*, рожденных летом, риск развития шизофрении увеличивается. Показано что независимо от сезона рождения больных шизофренией полиморфизм INDEL не оказывает влияния на клинические особенности шизофрении: возраст начала заболевания и выраженность симптоматики.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках госзадания по научной теме 0508-2019-0035.

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. *Debnath M., Chaudhuri T.K.* The role of HLA-G in cytokine homeostasis during early pregnancy complicated with maternal infections: a novel etiopathological approach to the neurodevelopmental understanding of schizophrenia // *Med. Hypotheses*. 2006. V. 66. № 2. P. 286–293. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2005.06.033>
2. *Smith S.E., Li J., Garbett K. et al.* Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6 // *J. Neurosci.* 2007. V. 27. № 40. P. 10695–10702. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2178-07.2007>

3. Müller N., Schwarz M.J. Immune system and schizophrenia // *Curr. Immunol. Rev.* 2010. V. 6. P. 213–220. <https://doi.org/10.2174/157339510791823673>
4. Rodrigues-Amorim D., Rivera-Baltanas T., Spuch C. et al. Cytokines dysregulation in schizophrenia: systematic review of psychoneuroimmune relationship // *Schizophr. Res.* 2018. V. 197. P. 19–33. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2017.11.023>
5. Norbert M. Inflammation in schizophrenia: Pathogenic aspects and therapeutic considerations // *Schizophr. Bul.* 2018. V. 44. № 5. P. 973–982. <https://doi.org/10.1093/schbul/sby024>
6. Goldsmith D.R., Rapaport M.H., Miller B.J. A meta-analysis of blood cytokine network alterations in psychiatric patients: Comparisons between schizophrenia, bipolar disorder and depression // *Mol. Psychiatry.* 2016. V. 21. № 12. P. 1696–1709. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.3>
7. Lanz T.A., Reinhart V., Sheehan M.J. et al. Postmortem transcriptional profiling reveals widespread increase in inflammation in schizophrenia: A comparison of prefrontal cortex, striatum, and hippocampus among matched tetrads of controls with subjects diagnosed with schizophrenia, bipolar or major depressive disorder // *Transl. Psychiatry.* 2019. V. 9. P. 151–163. <https://doi.org/10.1038/s41398-019-0492-8>
8. Rajasekaran A., Shivakumar V., Kalmady S.V. et al. The impact of HLA-G 3' UTR variants and sHLA-G on risk and clinical correlates of schizophrenia // *Hum. Immunol.* 2016. V. 77. № 12. P. 1166–1171. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2016.08.013>
9. Quach K., Grover S.A., Kenigsberg S., Librach C.L. A combination of single nucleotide polymorphisms in the 3'untranslated region of HLA-G is associated with pre-eclampsia // *Hum. Immunol.* 2014. V. 75. P. 1163–1170. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2014.10.009>
10. Baricordi O.R., Stignani M., Melchiorri L., Rizzo R. HLA-G and inflammatory diseases // *Inflamm. Allergy Drug. Targets.* 2008. V. 7. P. 67–74. <https://doi.org/10.2174/187152808785107615>
11. Moreau P., Flajollet S., Carosella E. Non-classical transcriptional regulation of HLA-G: an update // *J. Cell Mol. Med.* 2009. V. 13. № 9B. P. 2973–2989. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00800.x>
12. Afkhami F., Yazdani N., Khaniani M.S., Derakhshan S.M. Role of 14-Bp HLA-G, INDEL polymorphism in recurrent miscarriage // *Global J. Health Sci.* 2016. V. 8. № 12. P. 45–52. <https://doi.org/10.5539/gjhs.v8n12p45>
13. Rousseau P., Le Discorde M., Mouillot G. et al. The 14bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability // *Hum. Immunol.* 2003. V. 64. № 11. P. 1005–1010. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2003.08.347>
14. Hviid T.V., Rizzo R., Melchiorri L. et al. Polymorphism in the 5' upstream regulatory and 3' untranslated regions of the HLA-gene in relation to soluble HLA-G and IL-10 expression // *Hum. Immunol.* 2006. V. 67. № 1–2. P. 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2005.12.003>
15. Bergdolt L., Dunaevsky A. Brain changes in a maternal immune activation model of neurodevelopmental brain disorders // *Progress in Neurobiology.* 2019. V. 175. P. 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.12.002>
16. Rajasekaran A., Shivakumar V., Venugopal D. et al. Association of HLA-G 14bp INS/DEL polymorphism with brain morphology in schizophrenia // *Mol. Cytogenet.* 2014. V. 7. Suppl. 1. P. 43. <https://doi.org/10.1186/1755-8166-7-S1-P43>
17. Misiak B., Stramecki F., Gawęda Ł. et al. Interactions between variation in candidate genes and environmental factors in the etiology of schizophrenia and bipolar disorder: a systematic review // *Mol. Neurobiol.* 2018. V. 55. № 6. P. 5075–5100. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0708-y>
18. Вильянов В.Б., Егоров С.В. Сезонные факторы в рождении больных шизофренией // *Успехи соврем. естествознания.* 2002. Т. 2. С. 31–36.
19. Davies G., Welham J., Chant D. et al. A systematic review and meta-analysis of Northern Hemisphere season of birth studies in schizophrenia // *Schizophr. Bul.* 2003. V. 29. № 3. P. 587–593. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.schbul.a007030>
20. Mendonça I.F.A.S., Machado I.D.R., de Lima J.A.F. et al. Correlation between schizophrenia and seasonality of birth in a tropical region // *Rev. Bras. Epidemiol.* 2009. V. 12. № 4. P. 541–548. <https://doi.org/10.1590/S1415-790X2009000400004>
21. Tochigi M., Okazaki Y., Kato N., Sasaki T. What causes seasonality of birth in schizophrenia? // *Neurosci. Res.* 2004. V. 48. P. 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2003.09.002>
22. McGrath J.J., Eyles D.W., Pedersen C.B. et al. Neonatal vitamin D status and risk of schizophrenia: A population-based case-control study // *Arch. Gen. Psychiatry.* 2010. V. 67. P. 889–894. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2010.110>
23. Кондрашов А.П. Новейшая книга фактов. Том 1. Астрономия и астрофизика. География и другие науки о Земле. Биология и медицина. М.: РИПОЛ Классик, 2008. 510 с.
24. Canetta S.E., Brown A.S. Prenatal infection, maternal immune activation, and risk for schizophrenia // *Transl. Neurosci.* 2013. V. 3. № 4. P. 320–327. <https://doi.org/10.2478/s13380-012-0045-6>
25. Estes M.L., McAllister A.K. Maternal immune activation: implications for neuropsychiatric disorders // *Science.* 2016. V. 353. P. 772–777. <https://doi.org/10.1126/science.aag3194>
26. Tatsumi M., Sasaki T., Iwanami A. et al. Season of birth in Japanese patients with schizophrenia // *Schizophr. Res.* 2002. V. 54. № 3. P. 213–218. [https://doi.org/10.1016/s0920-9964\(01\)00204-3](https://doi.org/10.1016/s0920-9964(01)00204-3)
27. Demler T.L. Challenging the hypothesized link to season of birth in patients with schizophrenia // *Innov. Clin. Neurosci.* 2011. V. 8. № 9. P. 14–19.
28. Болотина О.В., Ливанова Ю.Г., Колисниченко Е.В. Сезонность рождения больных шизофренией // *Журн. "Бюл. мед. интернет-конф."*. 2014. Т. 4. № 11. С. 1298–1299.

29. Rizzo R., Audrito V., Vacca P. et al. HLA-G is a component of the chronic lymphocytic leukemia escape repertoire to generate immune suppression: Impact of the *HLA-G* 14 base pair (rs66554220) polymorphism // *Haematologica*. 2014. V. 99. № 5. P. 888–896. <https://doi.org/10.3324/haematol.2013.095281>
30. Sundaresh A., Wu C.L., Chinnadurai R.K. et al. The HLA-G genetic contribution to bipolar disorder: a trans-ethnic replication // *Immunol. Invest.* 2018. V. 47. № 6. P. 593–604. <https://doi.org/10.1080/08820139.2018.1469649>
31. Debnath M., Busson M., Jamain S. et al. The HLA-G low expressor genotype confers protection against bipolar disorder // *Hum. Immunol.* 2013. V. 74. № 5. P. 593–597. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2012.11.032>
32. Sørensen H.J., Mortensen E.L., Reinisch J.M., Mednick S.A. Association between prenatal exposure to bacterial infection and risk of schizophrenia // *Schizophr. Bul.* 2009. V. 35. № 3. P. 631–637. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbn121>
33. Chen X.Y., Yan W.H., Lin A. et al. The 14 bp deletion polymorphisms in HLA-G gene play an important role in the expression of soluble HLA-G in plasma // *Tissue Antigens*. 2008. V. 72. P. 335–341. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2008.01107.x>
34. Rizzo R., Hviid T.V., Govoni M. et al. HLA-G genotype and HLA-G expression in systemic lupus erythematosus: HLA-G as a putative susceptibility gene in systemic lupus erythematosus // *Tissue Antigens*. 2008. V. 71. P. 520–529. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2008.01037.x>

The Effect of INDEL Polymorphism of the Human Leukocyte Antigen G (*HLA-G*) and the Season of Birth on the Risk of Schizophrenia and Its Clinical Features

G. I. Korovaitseva^{a,*}, M. V. Gabaeva^a, I. V. Oleichik^a, and V. E. Golimbet^a

^a*Mental Health Research Center, Moscow, 115522 Russia*

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

By modulating the immunological relationship between the mother and the fetus, as well as interacting with various environmental factors, HLA-G plays an important role in the development of the brain of the embryo and is therefore considered as one of the risk factors for schizophrenia. We studied the relationship of INDEL *HLA-G* gene polymorphism with schizophrenia and its clinical features, taking into account the season of birth. The sample of patients included 1171 people with schizophrenia, the control group consisted of 575 mentally healthy people without a family history of mental disorders. The interaction of INDEL polymorphism and the season of birth was revealed. It has been found that in men with the D/D genotype born in the summer, the risk of schizophrenia increases (OR = 1.95, 95% CI: 1.01–3.78). Our analysis showed that the INDEL polymorphism does not interact with the season of birth as an environmental factor and does not affect the clinical features of schizophrenia: the age of onset of the disease and the severity of symptoms.

Keywords: INDEL polymorphism, *HLA-G* gene, season of birth, schizophrenia.

**МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ОТБОРА
ПО ОГРАНИЧЕННОМУ ПОЛОМ ПРИЗНАКУ: К ВОПРОСУ
О СУЩЕСТВОВАНИИ ПОЛИМОРФИЗМА ПО РАЗМЕРУ ПОМЕТА
В ЕСТЕСТВЕННЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ ПЕСЦОВ**

© 2021 г. О. Л. Жданова¹ *, Е. Я. Фрисман². **

¹Институт автоматизации и процессов управления Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Владивосток, 690041 Россия

²Институт комплексного анализа региональных проблем Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Биробиджан, 679016 Россия

*e-mail: axanka@iacp.dvo.ru

**e-mail: frisman@mail.ru

Поступила в редакцию 10.04.2020 г.

После доработки 08.06.2020 г.

Принята к публикации 25.08.2020 г.

Предложена модель отбора по признаку, ограниченному полом и проявляющемуся у особей женской части популяции. Модель модифицирована для описания отбора по такому признаку в экологически лимитированной популяции с возрастной структурой. Результаты моделирования направлены на объяснение существующего генетического разнообразия по размеру помета в различных (естественных и искусственных) популяциях песцов (*Alopex lagopus*). Модель предполагает, что поддержание полиморфизма по размеру помета связано с наличием периодических изменений в обеспеченности естественных популяций песцов кормом и существенно зависит от параметра, описывающего относительное преимущество в выживаемости особей из малых пометов при бескормице. В работе показано, что отбор по ограниченному полом признаку обеспечивает поддержание полиморфизма по размеру помета в более широком диапазоне значений данного параметра, чем отбор по не ограниченному полом признаку, описываемый классической моделью отбора для случая, когда выживаемость и плодовитость особи определяются только ее собственным генотипом вне зависимости от пола. Известно, что наличие возрастной или стадийной структуры в популяции значительно увеличивает шансы сохранения генетического разнообразия в нестационарной среде. Расширение предложенной модели отбора на популяцию с двумя стадиями развития позволило показать, что полиморфизм по размеру помета возможен в еще более широких границах значений рассматриваемого параметра.

Ключевые слова: эволюция популяций, естественный отбор, ограниченный полом признак, математическое моделирование, полиморфизм.

DOI: 10.31857/S0016675821020156

Эколого-генетическое направление математической биологии, рассматривающее взаимосвязанные изменения численности и генетической структуры популяции появилось в 60-е годы прошлого столетия, когда формировались представления о плотностно- и частотно-зависимых составляющих в действии естественного отбора [1–4]. Работы в этой области позволили охарактеризовать действие эволюционных факторов, в первую очередь естественного отбора, на динамику генетической структуры и численности популяций, которые сталкиваются с естественным ограничением экологических ресурсов (т.е. находящихся под действием лимитирующих факторов окружающей среды)

[5, 6]. Эколого-генетический подход открывает большие перспективы для изучения эволюции естественных популяций, а также для прогнозирования изменений, связанных с антропогенным воздействием [7–9]. При этом возникают серьезные сложности, связанные с верификацией исследуемых моделей, так как для оценки используемых экологических и генетических параметров необходимы данные эколого-генетического мониторинга на длительном временном промежутке. Получить такие данные удовлетворительного объема и содержания довольно сложно. Тем не менее выявление в реальных популяциях даже качественных закономерностей эволюции и динамики, ана-

логичных описываемым рассматриваемыми моделями, является необходимым шагом на пути становления объединенной эколого-генетической теории. Возможно, отсутствие или грубость оценок, полученных на реальных популяциях, обусловили ряд неудачных попыток (например, [10]) экспериментально подтвердить гипотезу о связи популяционных циклов с действием естественного отбора по отдельному генному локусу, что привело к укоренению представлений о полигенных эффектах в теории эволюции жизненного цикла [11–13]. Однако работа Аксенович с соавт. [14], выполненная на реальных данных о размере помета у песцов (*Alopex lagopus*), позволила вновь вернуться к однолокусной модели, что в корне меняет устоявшуюся парадигму жизненного цикла (Life History paradigm) [15].

Естественные популяции песка, населяющие прибрежные и континентальные территории, радикально различаются по своей репродуктивной стратегии. Прибрежные песцы питаются морскими птицами, рыбой, тюленями и морскими беспозвоночными [16]. Из года в год наблюдаются лишь очень небольшие колебания доступности этих ресурсов. Каждый год прибрежные песцы производят приплод небольшого размера [17]. Континентальные песцы питаются мелкими грызунами, главным образом полевками, численность которых характеризуется циклическими колебаниями [18]. В голодные годы популяции континентальных песцов демонстрируют крайне низкий репродуктивный уровень, а в годы с обильной пищей (когда в популяциях жертвы наблюдается подъем численности) резко увеличивают свою плодовитость [19–21]. Это позволяет предположить, что прибрежные песцы однородны по размеру помета, а континентальные неоднородны и представлены особями с разной потенциальной плодовитостью. В работе [14] на основе комплексного сегрегационного анализа типа наследования размера помета в расширенной генеалогии фермерских песцов было показано, что данный признак является аутосомным женским признаком, а его наследование можно описать в рамках смешанной модели с основным геном и контролем малого размера помета по рецессивному типу.

Применение классических уравнений математической теории популяционной генетики для описания динамики популяции песцов оказывается затруднительным, поскольку генотип потомков определяют оба родителя, а их число и выживаемость в помете – генотип матери. В результате такой ограниченности признака полом нарушаются соотношения Харди–Вайнберга, связывающие частоты аллелей и генотипов в смежных поколениях, что приводит к необходимости вводить в уравнения эволюции частоты генотипов, а не аллелей. Это делает эволюционные уравнения крайне сложными даже в случае однородной популяции без

учета ее возрастной структуры [22–24]. Возможности сохранения полиморфизма при таком типе отбора в циклически изменяющихся условиях посвящено немало работ, при этом цикл окружающей среды обычно считается равным двум [25–27], а возрастная структура не рассматривается, т.е. популяция считается однородной.

В настоящей работе мы сначала приведем вывод уравнений динамики частот генотипов в однородной двуполой популяции, находящейся под действием отбора по ограниченному полом признаку, влияющему на приспособленность и проявляющемуся у женской части популяции. Затем адаптируем эту модель для рассматриваемой ситуации, когда происходят периодические изменения в окружающей среде, связанные с динамикой пищевых ресурсов. Будем полагать, что период внешнего цикла равен четырем, причем в течение этого цикла есть только один пик ресурсов и три такта с малым их количеством. Учтем при этом, что наиболее плодовитый доминантный генотип при ограничении пищевых ресурсов оказывается менее приспособленным, чем рецессивный генотип с меньшей плодовитостью.

Далее мы модифицируем предложенную модель и учтем наряду с отбором по признаку “размер помета”, который ограничен полом, еще и возрастную структуру популяции и экологическое лимитирование роста численности [28].

Проанализируем и сравним условия поддержания полиморфизма при циклическом отборе в рамках классической модели отбора, в случае отбора по признаку, ограниченному полом, в однородной популяции и в популяции с возрастной структурой и экологическим лимитированием.

Одной из первых задач математической популяционной генетики стал количественный анализ результата действия отбора по признаку, влияющему на приспособленность особей и контролирующемуся одним аутосомным диаллельным локусом, в менделевской панмиктической изолированной популяции диплоидных организмов [29, 30]; анализ основан на модели:

$$p_A(n+1) = p_A(n)(w_{AA}p_A(n) + w_{Aa}p_a(n))/\bar{w}_n, \quad (1)$$

где n – номер поколения; $p_A(n)$ – частота аллеля A и $p_a(n)$ – частота аллеля a в n -ом поколении; w_{AA} , w_{Aa} и w_{aa} – приспособленности генотипов AA , Aa и aa соответственно; $\bar{w}_n = w_{AA}p_A^2(n) + 2w_{Aa}p_A(n)p_a(n) + w_{aa}p_a^2(n)$ – средняя приспособленность популяции в n -ом поколении. При этом под приспособленностью w_{ij} генотипа ij (i и j могут принимать значения A или a) обычно понимается **среднее** число гамет, произведенных на одну родившуюся особь соответствующего генотипа и вошедших в зиготы следующего поколения [31]. Это определение эквивалентно более простому определению при-

способности w_{ij} , как произведению **средней** выживаемости v_{ij} особей данного генотипа на **среднее** число потомков m_{ij} , произведенных одной особью этого генотипа. Предполагается, что при стабильных внешних условиях приспособленности генотипов зависят только от самих генотипов и не меняются со временем.

Для объяснения существующего генетического разнообразия по размеру помета в различных (естественных и искусственных) популяциях песцов Аксенович и др. [14] высказали гипотезу, что каждый год самки с генотипами AA и Aa производят большие пометы (в среднем m_1 щенков на помет), а самки aa — маленькие (со средним m_2). Далее предполагалось, что при дефиците пищевых ресурсов коэффициент выживаемости маленьких пометов, произведенных матерями с генотипом aa , в k раз превосходит таковой в больших пометах, произведенных матерями с генотипами Aa и AA . Было предложено следующее уравнение динамики частоты аллеля a в чередующихся поколениях:

$$p_a(n+1) = p_a(n) \frac{m_1 - p_a(n)(m_1 - km_2)}{m_1 - p_a^2(n)(m_1 - km_2)}. \quad (*)$$

Это уравнение оказывается эквивалентно частному случаю модели (1) и может быть получено подстановкой $w_{AA} = w_{Aa} = m_1v$ и $w_{aa} = m_2vk$.

Анализ, выполненный в работе [14] и основанный, в частности, на численных итерациях уравнения (*), показал, что в результате эволюции

1) прибрежные популяции песцов могли утратить аллель A (доминантный, помет большого размера) и оказаться мономорфными по аллелю a (рецессивный признак, малый размер помета), что является результатом действия отбора против гомозигот (AA) и гетерозигот (Aa): $w_{AA} = w_{Aa} < w_{aa}$;

2) континентальные популяции могут быть полиморфными из-за циклических изменений в действии отбора, связанных с циклами доступности пищевых ресурсов: в голодные годы отбор действует против особей из больших пометов, так как из-за нехватки корма выживаемость в них в k раз ниже, чем в малых. Каждые 4 года подъем популяции грызунов приводит к обилию пищи песцов и к изменению направления отбора в пользу особей из больших пометов, поскольку при избытке корма выживаемость особей в больших и малых пометах выравнивается ($k = 1$), но число родившихся в больших пометах естественно больше, чем в малых. При соотношении по числу новорожденных щенков в больших и малых пометах 12 : 8, значения $k = 1.7$ в годы небольших запасов корма и снижающиеся значения $k = 1$ раз в 4 года с обилием запасов пищи приводят к установлению сбалансированного полиморфизма с равными частотами аллелей A и a . Однако при более низких значениях величины k в годы неболь-

ших запасов корма ($k < 1.5$) в континентальных популяциях песцов должна происходить фиксация доминантного аллеля. Таким образом, вопрос о существовании полиморфизма по размеру помета в континентальных популяциях песцов остается открытым. В случае фиксации доминантного аллеля можно предположить, что фермерские песцы унаследовали аллели большого и малого размера помета от своих континентальных и прибрежных предков соответственно. Другая, более интересная, гипотеза состоит в том, что они могли унаследовать оба аллеля от континентальных песцов, при условии, что система сбалансированного генетического полиморфизма по размеру помета поддерживалась в естественных популяциях. Хедрик [32] отмечает, что условие установления полиморфизма в модели Аксенович и др. [14] можно получить, используя результаты [33], рассчитав более точные границы различий выживаемости в голодные годы в больших и малых пометах: $1.666 < k < 1.718$, и это является крайне строгим ограничением — около 3% от возможных значений k , ставящим под сомнение справедливость предложенной модели для реальных популяций песцов. Далее Хедрик [32] уточняет, что если отбор идет только по женской линии вероятность существования полиморфизма уменьшается более чем в 4 раза (0.7%); при этом, к сожалению, не приводится модель, на которой основаны данные расчеты.

В настоящей работе мы покажем, что отбор по признаку, ограниченному полом, наоборот увеличивает возможности установления полиморфизма и, следовательно, гипотеза о системе сбалансированного генетического полиморфизма по размеру помета, существующего в естественных популяциях песцов, имеет серьезные основания.

ЕСТЕСТВЕННЫЙ ОТБОР ПО ОГРАНИЧЕННОМУ ПОЛОМ ПРИЗНАКУ, КОНТРОЛИРУЕМОМУ ОДНИМ ДИАЛЛЕЛЬНЫМ ЛОКУСОМ

Отметим, что модель (1) для рассматриваемой ситуации не вполне корректна, так как приспособленность индивидуума (w_{ij}) определяется его собственным генотипом (ij), в то время как на самом деле она должна определяться генотипом матери, а именно принадлежностью потомка к большому или малому помету. По-видимому, в данном случае более адекватной будет модель действия отбора по ограниченному полом признаку, влияющему на приспособленность и проявляющемуся у женской части популяции. При построении такой модели естественно сделать следующие основные предположения:

1. Признак аутосомный, т.е. генотип потомка определяют оба родителя.

2. Приспособленность w_{ij} определяется генотипом матери и выражается как произведение **средней** выживаемости v_{ij} женских особей с генотипом ij на **среднее** число потомков m_{ij} , произведенных одной женской особью этого генотипа.

3. Считаем, что частоты генов одинаковы в мужской и женской частях популяции, однако на этапе вывода модели необходимо рассматривать процесс размножения с учетом разделения полов, так как важно отследить влияние генотипа матери.

$$\begin{cases} p_{AA}(n+1) = \left(w_{AA}p_{AA}(n) + \frac{1}{2}w_{Aa}p_{Aa}(n) \right) \left(p_{AA}(n) + \frac{1}{2}p_{Aa}(n) \right) / W(n), \\ p_{Aa}(n+1) = \left\{ \frac{1}{2}w_{Aa}p_{Aa}(n) + w_{AA}p_{AA}(n) \left(1 - p_{AA}(n) + \frac{1}{2}p_{Aa}(n) \right) + w_{aa} \left(1 - p_{AA}(n) - \right. \right. \\ \left. \left. - p_{Aa}(n) \right) \left(p_{AA}(n) + \frac{1}{2}p_{Aa}(n) \right) \right\} / W(n), \end{cases} \quad (2)$$

где $p_{AA}(n)$, $p_{Aa}(n)$ и p_{aa} — частоты соответствующих генотипов в n -ом поколении, w_{ij} — приспособленность генотипа ij женской части популяции, произведение **средней** выживаемости v_{ij} женских особей с генотипом ij на **среднее** число потомков m_{ij} , произведенных одной женской особью этого генотипа,

$$W(n) = w_{AA}p_{AA}(n) + w_{Aa}p_{Aa}(n) + w_{aa}(1 - p_{AA}(n) - p_{Aa}(n)).$$

Типы отбора и особенности динамики модели (2)

Прежде чем перейти к анализу возможных режимов динамики частот аллелей генов, влияющих на размер помета у песцов, имеет смысл проанализировать, какое вообще разнообразие режимов динамики может порождать модель (2). Естественно сравнить эти режимы с хорошо известными и подробно описанными (например, в [31]) режимами классической модели, основанной на уравнении (1). Исследование, включающее приведенный в Приложении 1 анализ условий существования и устойчивости стационарных точек системы (2), позволяет заключить, что для модели (2) можно выделить те же динамические режимы — типы отбора, как и в классическом случае. Так, при повышенной приспособленности гетерозигот ($w_{Aa} < w_{AA}$ и $w_{AA} < w_{aa}$; рис. 1,а) происходит установление стабильного (сбалансированного) полиморфизма; при пониженной приспособленности гетерозигот наблюдается бистабильность, когда любое из двух мономорфных равновесий может быть достигнуто в зависимости от начальных условий (рис. 1,б); при промежуточном домини-

В Приложении 1 получены уравнения динамики частот генотипов в популяции с неперекрывающимися поколениями, находящейся под действием отбора по ограниченному полом признаку, влияющему на приспособленность и проявляющемуся у женской части популяции. Рассматривается диаллельный признак с произвольным доминированием и предполагается, что условия среды не меняются (полное доминирование и циклическое изменение средовых условий введем позже для описания наследования размера помета у песцов). Уравнения динамики имеют вид (Приложение 1):

ровании осуществляется направленный отбор и происходит вытеснение неоптимального аллеля (рис. 1,в). При этом динамика модели (2) (рис. 1, кружки) отличается от динамики модели классического отбора (1) (рис. 1, линии): отбор идет медленнее. По-видимому, это связано с нарушением соотношения Харди–Вайнберга, которое представляет собой избыток гетерозигот, наблюдаемый в процессе движения к равновесию (рис. 2).

На рис. 2 представлены примеры динамики частот генотипов (p_{AA} и p_{Aa}) для разных типов отбора, также приведена динамика величин отклонения от равновесия Харди–Вайнберга, которые вычислялись следующим образом: $\text{HW_dev}(p_{AA}) = p_{AA} - p_A^2$, $\text{HW_dev}(p_{Aa})/2 = (p_{Aa} - 2p_A(1 - p_A))/2$. Можно видеть, что отклонение от равновесия Харди–Вайнберга всегда присутствует в процессе перехода к равновесию и представляет собой избыток гетерозигот ($\text{HW_dev}(p_{Aa}) > 0$), вне зависимости от начальных условий; на графиках слева начальные условия соответствуют равновесию Харди–Вайнберга, а справа — нет. По мере приближения к стационарной точке величина отклонения уменьшается и устанавливается равновесие Харди–Вайнберга.

Проведенное исследование показало, что действие отбора по признаку, ограниченному полом и проявляющемуся у женской части популяции, при стабильных внешних условиях фактически тождественно по конечным результатам отбору, описываемому классической моделью (1), однако существенно отличается по времени и характеру траектории перехода к положению равновесия. Это позволяет предполагать, что в переменных

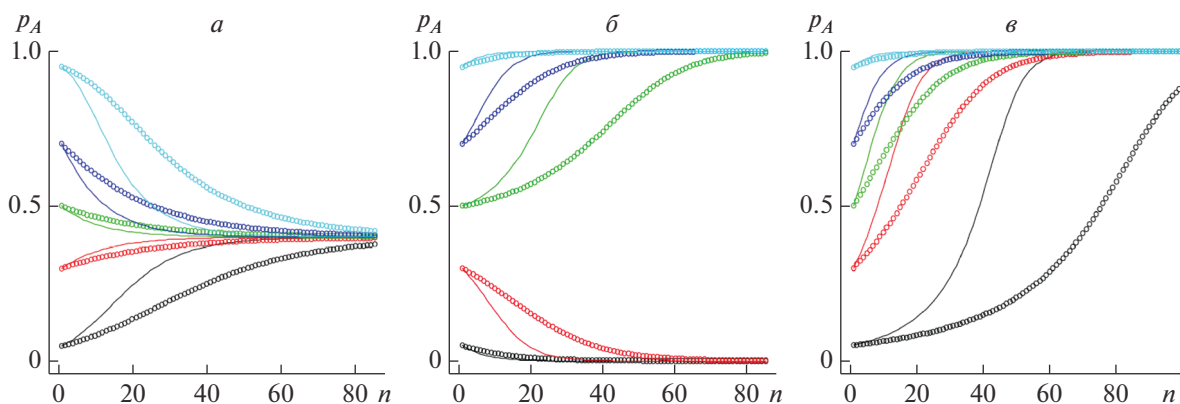


Рис. 1. Динамика частоты аллеля A (p_A) в череде поколений n при различных типах отбора, линии соответствуют модели (1), кружки – модели (2); разными цветами обозначена динамика при различных значениях частоты аллеля A в начальный момент времени. a – установление полиморфизма при повышенной приспособленности гетерозигот: $w_{aa} = 1.3, w_{Aa} = 1.5, w_{AA} = 1.2$; $б$ – дизруптивный отбор: $w_{aa} = 1.45, w_{Aa} = 1.2, w_{AA} = 1.5$; $в$ – вытеснение неоптимального аллеля при промежуточном доминировании: $w_{aa} = 1.15, w_{Aa} = 1.2, w_{AA} = 1.5$.

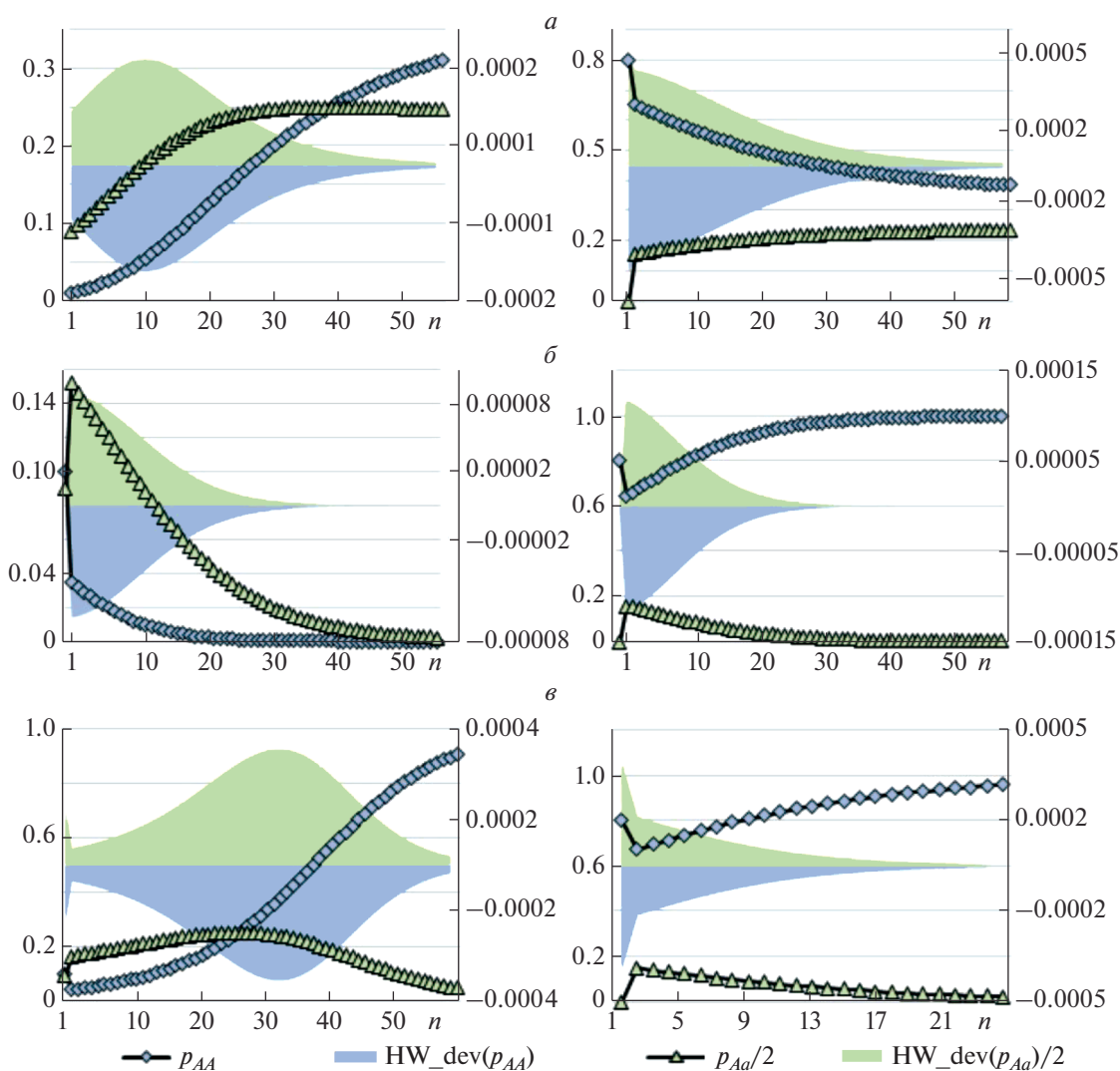


Рис. 2. Динамика частот генотипов p_{AA} и p_{Aa} (ось слева) и их отклонений от равновесия Харди–Вайнберга ($HW_dev(p_{AA})$ и $HW_dev(p_{Aa})$, ось справа) в череде поколений n при различных типах отбора (значения приспособленностей фрагментов рисунка соответствуют рис. 1). Начальные условия: слева – равновесие ХВ: $p_{AA}(0) = 0.01, p_{Aa}(0) = 0.18$, справа – нарушение равновесия ХВ: $p_{AA}(0) = 0.8, p_{Aa}(0) = 0.0$.

внешних условиях можно ожидать принципиально больших различий.

Вернемся к обсуждению наследования большого и малого размера помета у песцов. Учитывая полное доминирование, здесь можно выписать следующее соотношение приспособленностей генотипов: $w_{AA} = w_{Aa} < w_{aa}$ для прибрежных популяций, где в условиях постоянного ограничения пищевых ресурсов выживаемость в малых пометах выше, чем в больших, настолько, что к концу молочного вскармливания там оказывается больше живых щенков, чем в изначально больших пометах. Это соответствует направленному отбору, в результате которого происходит вытеснение аллеля A . С другой стороны, в фермерских популяциях, где пищи достаточно, соотношение приспособленностей меняется на обратное $w_{AA} = w_{Aa} > w_{aa}$ и происходит уже вытеснение рецессивного аллеля a , контролирующего малый размер помета. Полиморфизм при постоянных приспособленностях в рамках данной модели (т.е. модели (2) при постоянных приспособленностях и полном доминировании) получить нельзя, для этого нужно учесть цикличность условий окружающей среды, которые приводят к циклическим изменениям соотношения приспособленностей.

Циклический отбор по размеру помета у песцов

В условиях изменяющихся пищевых ресурсов, характерных для континентальных популяций песцов, должны изменяться и приспособленности генотипов. Повторим моделирование, позволившее получить сбалансированный полиморфизм по рассматриваемому гену [14], при этом будем использовать уточненную модель (2), учитывая, что проявление данного признака ограничено полом, и учтем циклическое изменение условий среды, заключающееся в значительном сезонном увеличении запасов пищи каждые 4 года.

Поскольку было оценено, что в среднем самки генотипов AA и Aa производят 12 детенышей каждый год ($m_{AA} = m_{Aa} = 12$), а самки aa — восемь ($m_{aa} = 8$), репродуктивная способность самок с генотипами AA и Aa в 1.5 раза выше, чем у самок aa . При этом нет данных о том, что выживаемость самок связана с размерами помета или как-то зависит от обилия корма, поэтому выживаемость самок естественно считать постоянной $v_{AA} = v_{Aa} = v_{aa} = v$. Вместе с тем выживаемость детенышей не зависит от величины помета, в котором они появились (и соответственно от генотипа матери), только в годы с обильной пищей, а в голодные годы — в маленьких пометах выживаемость детенышей выше, чем в больших. Поскольку речь идет именно о пометах при вскармливании, это можно учесть в рамках модели (2), полагая, что в голод-

ные годы фертильность многоплодных особей (m_{AA} и m_{Aa}) в k раз меньше, чем в годы с обильной пищей, где k — соотношение выживаемости приплода из больших пометов в “тучные” и голодные годы.

Итак, будем основываться на модели (2), но полагать приспособленности периодически меняющимися величинами. Каждые 4 года мелкие грызуны демонстрируют всплеск численности [34, 35] и наиболее плодовитые генотипы песца (AA и Aa) в эти годы имеют наибольший адаптивный успех, поэтому в каждый 4-й год:

$$w_{AA} = w_{Aa} = v m_{AA} = 12v,$$

$$w_{aa} = v m_{aa} = 8v, \text{ т.е. } w_{AA} = w_{Aa} = 1.5w_{aa},$$

в остальные годы:

$$w_{AA} = w_{Aa} = v m_{AA}/k = 12v/k,$$

$$w_{aa} = v m_{aa} = 8v, \text{ т.е. } w_{AA} = w_{Aa} = 1.5w_{aa}/k,$$

где v — выживаемость самок песцов после переживания в помете. Заметим, что для достижения полиморфизма величина коэффициента k должна быть больше 1.5, поскольку живых щенков в малых пометах в голодные годы должно быть больше, чем в больших, иначе произойдет вытеснение аллеля a . Вместе с тем точные оценки абсолютных значений величин приспособленностей не столь важны. Характер динамики определяется их относительными значениями. Так, можно положить $w_{aa} = 1$, а $w_{AA} = w_{Aa} = 1.5$ в годы с обильной пищей и $w_{AA} = w_{Aa} = 1.5/k$ в голодные годы, или $w_{aa} = 1.4$ а $w_{AA} = w_{Aa} = 2.1$ в годы с обильной пищей и $w_{AA} = w_{Aa} = 2.1/k$ в голодные годы.

Результаты моделирования с такими периодически меняющимися приспособленностями представлены на рис. 3. Как и в случае отбора с постоянными приспособленностями, видно замедление отбора по признаку, ограниченному полом (кружки), по сравнению с простым отбором, описываемым уравнением (1), но при таких же периодически меняющихся значениях приспособленностей генотипов, как и в модели (2) (линии). На рис. 3,а приведена динамика для значений k , из интервала рассчитанного [31] $1.666 < k < 1.718$, где полиморфизм возможен в рамках модели простого отбора. Из рис. 3,б можно видеть, что если учитывать тип данного признака (ограниченность полом), то поддержание полиморфизма оказывается возможным в более широком диапазоне значений k . В частности, при $k = 1.725$ и даже 1.74 отчетливо видно сохранение полиморфизма после 1500 поколений динамики модели (2) с указанными периодически меняющимися значениями приспособленностей, в то время как модель (1) при этих же периодически изменяющихся приспособленностях демонстрирует полную утрату аллеля A . На рис. 3,а, б начальные условия выбраны так, что оба аллеля

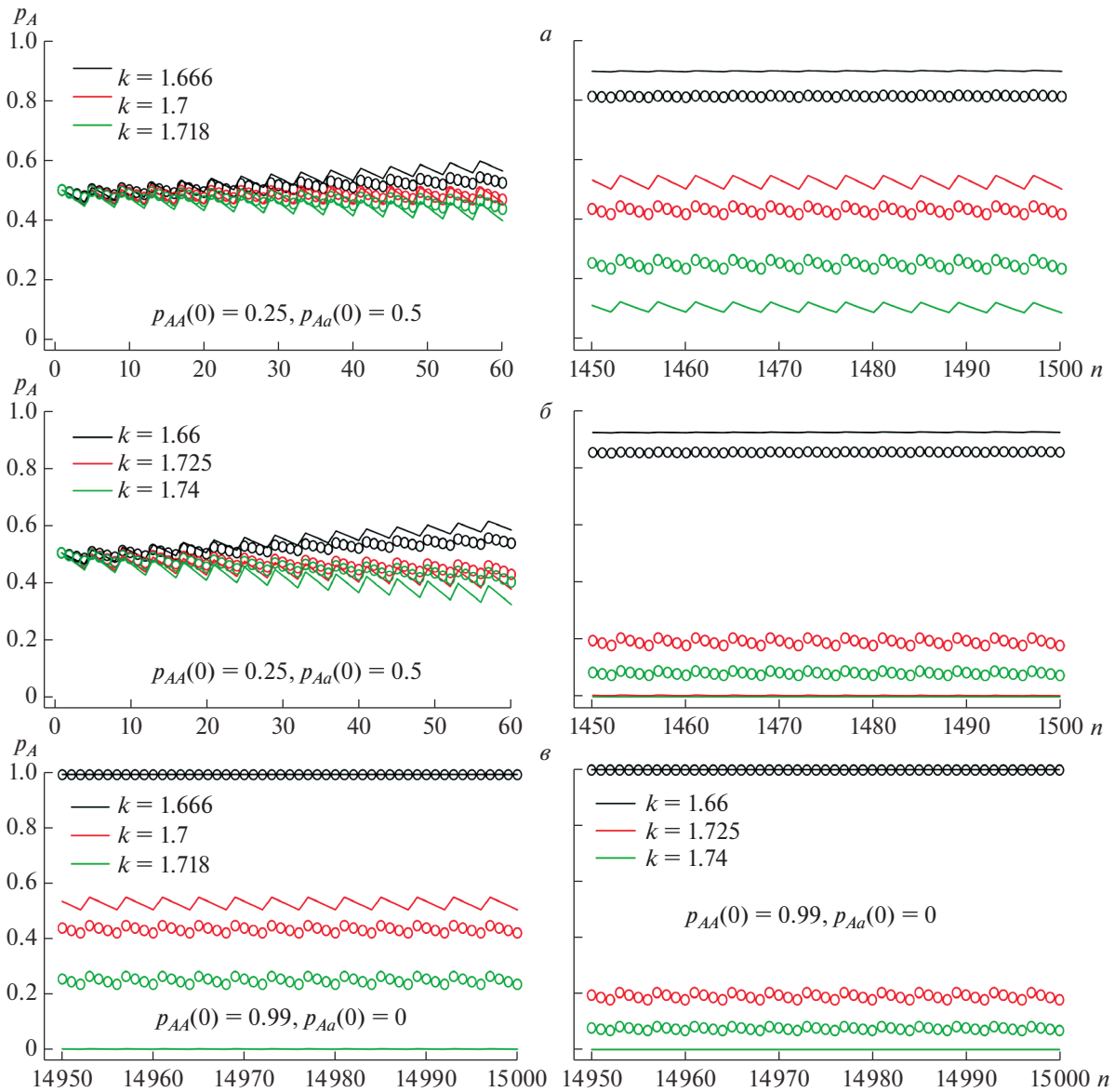


Рис. 3. Динамика частоты аллеля A (p_A) в череде поколений n при различных значениях k . Значения параметров: $w_{aa} = 1.4$, $w_{Aa} = w_{AA} = 2.1$. *a, б* – слева приведена динамика на начальном этапе 0–60-е поколение, справа – с 1450 по 1500, при начальных значениях $p_{AA}(0) = 0.25$, $p_{Aa}(0) = 0.5$; *в* – динамика после 14950 поколений, при начальных значениях $p_{AA}(0) = 0.99$, $p_{Aa}(0) = 0.0$.

имеют одинаковую частоту ($p_A = p_a = 0.5$). Если предполагать, что аллель a появился в результате мутации, то на начальном этапе он присутствовал в очень небольшой дозе; на рис. 3, *в* приведена динамика при других начальных условиях ($p_A = 0.99$, $p_a = 0.01$); здесь понадобилось значительно большее количество расчетных поколений, чтобы увидеть эффект отбора. Естественно, что потеря аллеля a здесь более вероятна при небольшом преимуществе в выживаемости малых пометов (при $k = 1.666, 1.66$); при больших значениях k полиморфизм сохраняется в модели (2); в модели (1) при тех же периодических изменениях величин

приспособленностей происходит вытеснение аллеля A уже при $k = 1.718$, что связано не с изменением начального значения, а с увеличением количества поколений расчета.

ЕСТЕСТВЕННЫЙ ОТБОР ПО ОГРАНИЧЕННОМУ ПОЛОМ ПРИЗНАКУ В ЛИМИТИРОВАННОЙ ПОПУЛЯЦИИ С ВОЗРАСТНОЙ СТРУКТУРОЙ

Следующий фактор, который не был учтен при моделировании, – это возрастная подразделенность у пса. Известно, что наличие возраст-

ной или стадийной структуры в популяции значительно увеличивает шансы сохранения генетического разнообразия в нестационарной среде [36]. Далее мы откажемся от предположения о перекрывающихся поколениях и перейдем к обсуждению действия отбора в структурированной популяции.

В моделях динамики (1), (2) рассматривается лишь изменение генетической структуры популяции в предположении, что различные ее поколения не перекрываются. Однако это предположение несправедливо, если продолжительность жизни каждого поколения оказывается существенно больше времени, протекающего между сезонами размножения. В этом случае каждая локальная популяция во время размножения состоит из особей, принадлежащих к разным возрастным группам, и численности каждой выделяемой возрастной группы естественно рассматривать в качестве переменных модели.

Рассмотрим модель популяции с возрастной структурой, которая может быть представлена совокупностью двух возрастных классов: младшего, включающего неполовозрелых особей, и старшего, состоящего из особей, участвующих в размножении.

Обозначим через X_n – численность младшего возрастного класса в n -ый сезон размножения, а Y_n – численность репродуктивной части популяции. Период размножения заканчивается появлением новорожденных особей следующего поколения. Будем предполагать, что времени, протекающего между двумя последовательными периодами размножения, достаточно для развития особей младшего возраста до половозрелого состояния, а новорожденных до состояния младшего возраста. Допустим, что выживаемость и воспроизводительная способность половозрелых особей не зависят от возраста.

Лимитирование численности младшего возрастного класса осуществляется путем уменьшения выживаемости приплода с ростом его численности, которое происходит по линейному закону: $f(X) = 1 - X/K$, как в модели Ферхюльста. Здесь K – это емкость экологической ниши, или максимально возможная численность младшего возрастного класса. В этом случае естественно перейти к относительным значениям численностей: $x = X/K$, $y = Y/K$. Тогда уравнения, описывающие динамику относительных численностей рассматриваемых возрастных групп в череде поколений, будут следующими:

$$\begin{cases} x_{n+1} = wy_n \\ y_{n+1} = x_n(1 - x_n) + cy_n, \end{cases} \quad (3)$$

где w – это репродуктивный потенциал старшего возрастного класса, c – его выживаемость.

В случае, когда репродуктивный потенциал (w) связан с признаком, который ограничен полом, зависит от генотипа матери и определяется генетически одним адаптивным диаллельным геном, динамику численности и генетического состава двухвозрастной популяции можно описать следующей системой уравнений [Приложение 2]:

$$\begin{cases} x(n+1) = y(n)w(n), \\ y(n+1) = (1 - x(n))x(n) + cy(n), \\ q_{AA}(n+1) = \left(w_{AA}p_{AA}(n) + \frac{1}{2}w_{Aa}p_{Aa}(n) \right) \times \\ \times \left(p_{AA}(n) + \frac{1}{2}p_{Aa}(n) \right) / w(n), \\ q_{Aa}(n+1) = \left\{ \frac{1}{2}w_{Aa}p_{Aa}(n) + w_{AA}p_{AA}(n) \times \right. \\ \times \left. \left(1 - p_{AA}(n) + \frac{1}{2}p_{Aa}(n) \right) + w_{aa}(1 - p_{AA}(n) - \right. \\ \left. - p_{Aa}(n) \right) \left(p_{AA}(n) + \frac{1}{2}p_{Aa}(n) \right) \right\} / w(n), \\ p_{AA}(n+1) = \{ q_{AA}(n)(1 - x(n))x(n) + \\ + p_{AA}(n)cy(n) \} / \{ (1 - x(n))x(n) + cy(n) \}, \\ p_{Aa}(n+1) = \{ q_{Aa}(n)(1 - x(n))x(n) + \\ + p_{Aa}(n)cy(n) \} / \{ (1 - x(n))x(n) + cy(n) \}, \end{cases} \quad (4)$$

где p_{ij} – это частоты генотипов ij в половозрелой части популяции, q_{ij} – в неполовозрелой (i и $j = A$ и a); $w(n) = w_{AA}p_{AA}(n) + w_{Aa}p_{Aa}(n) + w_{aa}(1 - p_{AA}(n) - p_{Aa}(n))$ – средняя приспособленность потомства на первом году жизни.

Жизненный цикл пса в большей степени соответствует модели двухвозрастной популяции, поскольку продолжительность жизни половозрелых особей составляет несколько лет, а детеныши, как правило, вступают в процесс размножения на втором году жизни.

Традиционное аналитическое исследование системы (4), аналогичное исследованию системы (2), приведенному в Приложении 1, показывает, что модель (4) имеет три генетически различных равновесия: два мономорфных и одно полиморфное, совпадающие с равновесиями модели (2). Причем равновесные частоты генотипов в обеих возрастных группах совпадают: $p_{ij} = q_{ij}$. Стационарные значения численности возрастных классов определяются как: $x = (w + c - 1)/w$, $y = (w + c - 1)/w^2$. При этом направление отбора определяет взаимное расположение приспособленностей генотипов, а величина $(w + c)$ определяет динамику численности. Здесь мы опустим подробное обсуждение возможной динамики модели (4) и перейдем к моделированию расхождения репродуктивных стратегий в естественных популяциях песцов.

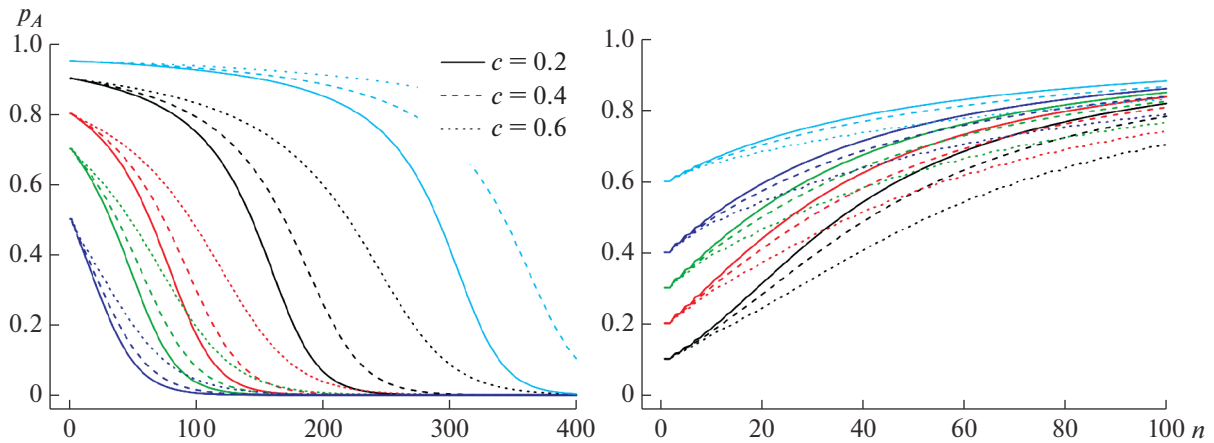


Рис. 4. Динамика частоты аллеля A (p_A) в череде поколений n при различных значениях параметра c . Кривые разных цветов соответствуют различным начальным условиям. Слева – вытеснение аллеля A , $w_{aa} = 2$, $w_{Aa} = 1.5$, $w_{AA} = 1.5$; справа – вытеснение аллеля a , $w_{aa} = 1.4$, $w_{Aa} = 2.1$, $w_{AA} = 2.1$.

Моделирование дифференциации репродуктивных стратегий у прибрежных и континентальных песцов с помощью модели отбора в двухвозрастной популяции

Как и в предыдущей модели для прибрежных популяций, естественный отбор направлен против аллеля A ($w_{aa} > w_{AA}$, $w_{AA} = w_{Aa}$) и популяция становится мономорфной (рис. 4, слева). Скорость вытеснения аллеля A зависит от величин w_{ij} , c и начальной частоты аллеля A . Таким образом, полученные результаты согласуются с наблюдаемой в настоящее время ситуацией, когда прибрежные песцы производят пометы небольшого размера, т.е. их популяция мономорфна по рассматриваемому гену. На рис. 4 справа изображена ситуация, характерная для фермерских популяций, где пищевых ресурсов достаточно и происходит вытеснение аллеля a .

Далее будем моделировать динамику континентальных популяций, учитывая циклы кормовой базы тем же способом, что и в однородной модели (рис. 3), при этом динамика зависит от дополнительного параметра c – выживаемости половозрелых особей. Результаты моделирования представлены на рис. 5. Присутствие половозрелых особей, которые участвуют в размножении неоднократно, значительно меняет картину, полиморфизм может сохраняться в более широком диапазоне значений k , чем в однородной популяции. При этом отбор идет медленнее, после 1500 поколений (рис. 5, слева внизу) полиморфизм существует при всех заданных значениях параметров: k от 1.55 до 1.8 и c от 0.2 до 0.5. Дальнейшие расчеты показывают, что ситуация еще меняется, происходит медленное вытеснение неоптимальных аллелей: аллеля a при небольшом преимуществе в выживаемости малых пометов ($k = 1.55$ и 1.6) и аллеля A при очень большом ($k = 1.8$). При

этом выживаемость половозрелой группы (c) по-разному влияет на результат отбора. Большие значения c предотвращают утрату аллеля малого помета (a) при небольшом его преимуществе по выживаемости (рис. 5, $k = 1.6$, $c = 0.5$), а малые значения c , наоборот, препятствуют установлению мономорфизма и потере аллеля A в случае большого преимущества по выживаемости малых пометов (рис. 5, $k = 1.8$, $c = 0.2$).

Рассмотренные нами модели не учитывают возможного обмена генами между континентальными и прибрежными популяциями, который, по-видимому, существует. В частности, недавно был зафиксирован случай миграции самки песца из прибрежного в континентальный район со сменой пищевого рациона (от разнообразной морской пищи к леммингам) [37]. Полагая, что такой генетический обмен происходит регулярно и в обе стороны, можно предположить, что прибывающий с мигрантами аллель A довольно быстро элиминируется из генофонда прибрежных популяций, так как направленный отбор там более быстрый (рис. 4, слева); в то время как даже небольшое пополнение континентальных популяций песцов особями с генотипом aa способствует поддержанию полиморфизма даже при небольшом преимуществе по выживаемости в малых пометах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Математическая теория естественного отбора по признакам, сцепленным с полом, хорошо разработана [31, 38, 39]; однако известны и другие типы признаков, обусловленных генами, расположенными в аутосомах, но проявляющихся по-разному в зависимости от пола [40, 41]. В частности, развитие признаков, ограниченных полом, обусловлено генами, расположенными в аутосомах обоих

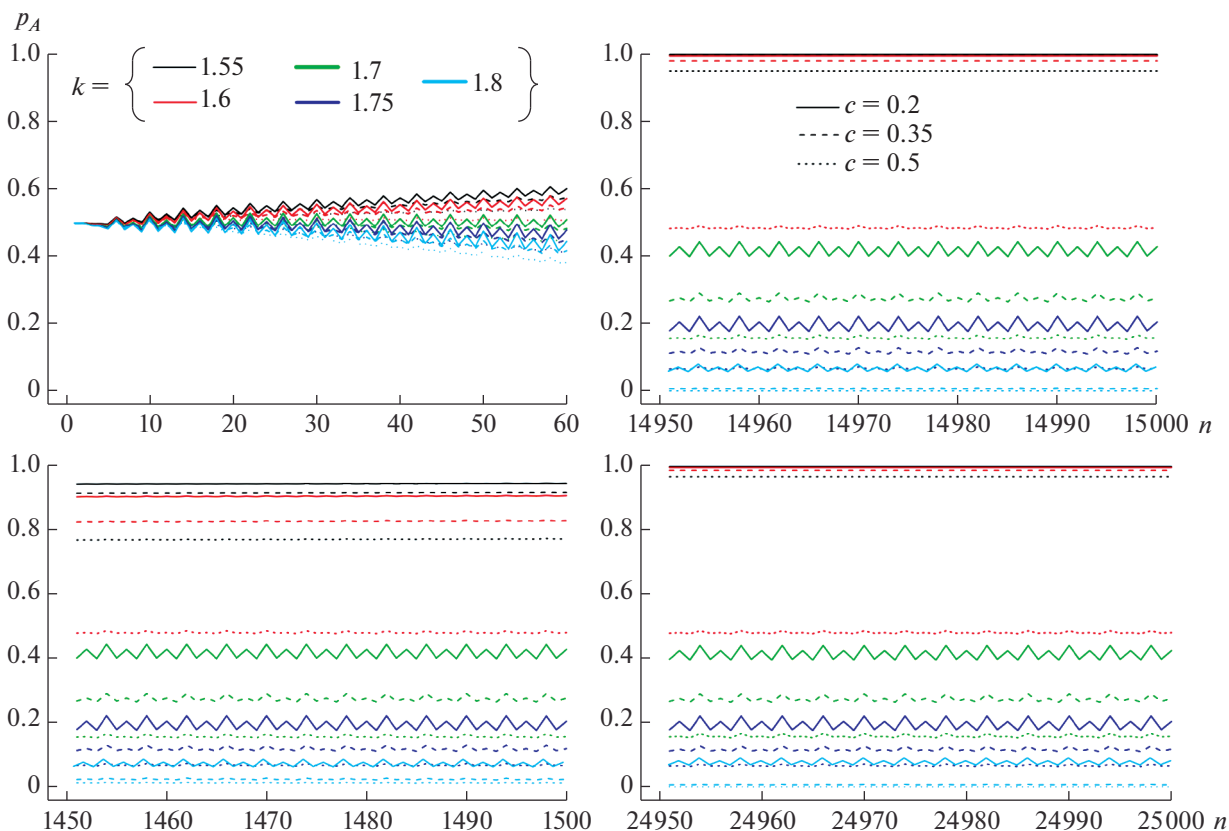


Рис. 5. Динамика частоты аллеля A (p_A) в череде поколений n при различных значениях k и c . Значения параметров: $w_{aa} = 1.4$, $w_{Aa} = w_{AA} = 2.1$. Слева сверху приведена динамика на начальном этапе 0–60-е поколение, на других фрагментах – после нескольких сотен (тысяч) поколений, при начальных значениях $p_{AA}(0) = 0.25$, $p_{Aa}(0) = 0.5$.

полов, но проявляются они только у одного пола. К данным признакам относится продуктивность животных, например молочность и жирность молока у крупного рогатого скота, яйценоскость и размер яиц у кур, а также размер помета у многоплодных животных.

Понимание результатов действия отбора по таким признакам весьма важно. Однако применение классических уравнений математической теории популяционной генетики здесь ограничено тем фактом, что генотип потомков определяют оба родителя, а их выживаемость – генотип матери. В результате нарушаются соотношения Харди–Вайнберга, связывающие частоты аллелей и генотипов в смежных поколениях, что приводит к необходимости писать уравнения эволюции для частот генотипов, а не аллелей, как в классической теории отбора, и делает эволюционные уравнения крайне сложными даже в случае однородной популяции без учета ее возрастной структуры [22–24]. Возможности сохранения полиморфизма при таком типе отбора в циклически изменяющихся условиях посвящено немало работ, при этом цикл окружающей среды обычно считается равным 2 [25–27].

В настоящей работе предложена модель отбора по материнской линии признака “размер помета”, ограниченного полом, в экологически лимитированной популяции с возрастной структурой для объяснения существующего генетического разнообразия по размеру помета в различных (естественных и искусственных) популяциях песцов. Проанализирована возможность поддержания полиморфизма в рамках классической теории и в случае отбора по материнской линии.

На данный момент вопрос о существовании полиморфизма по размеру помета в континентальных популяциях песцов остается открытым, так как возможно и другое объяснение наличия аллелей большого и малого размера помета у фермерских песцов. В частности, могла произойти фиксация доминантного аллеля в континентальных популяциях, и тогда фермерские песцы унаследовали разные аллели от своих континентальных и прибрежных предков. Более интересная гипотеза состоит в том, что они унаследовали оба аллеля от континентальных песцов, при условии, что система сбалансированного генетического полиморфизма по размеру помета поддерживалась в естественных популяциях. Однако условие установ-

ления полиморфизма, которое дает классическая модель отбора, является крайне строгим ограничением по диапазону параметра k , характеризующего преимущество в выживаемости малых пометов в голодные годы.

Моделирование, проведенное в данной работе, учитывающее характер наследования данного признака, а именно его ограниченность полом, позволяет расширить диапазон значений k , обеспечивающих поддержание полиморфизма. Кроме того, известно, что наличие возрастной или стадийной структуры в популяции значительно увеличивает шансы сохранения генетического разнообразия в нестационарной среде [36]. Обобщение модели отбора на популяцию с двумя стадиями развития позволило увидеть, что полиморфизм возможен в еще более широких границах значений рассматриваемого параметра. Кроме того, поддержанию полиморфизма в континентальных популяциях песцов должен способствовать приток генов из прибрежных популяций за счет миграций. Таким образом, проведенное исследование показало, что отбор по ограниченому полом признаку и наличие возрастной структуры увеличивают возможность сохранения полиморфизма в популяции континентальных песцов.

Работа выполнена в рамках государственных заданий Института автоматики и процессов управления ДВО РАН, Института комплексного анализа региональных проблем ДВО РАН, а также при частичной финансовой поддержке РФФИ (проект 18-04-00073).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. MacArthur R.H., Wilson E.O. The Theory of Island Biogeography. Princeton; N.J.: Princeton Univ. Press, 1967. 203 p.
2. Charlesworth B. Selection in density-regulated populations // Ecology. 1971. V. 52. P. 469–474.
3. Rougharden J. Density dependent natural selection // Ecology. 1971. V. 52. P. 453–468.
4. Pianka E.R. Evolutionary Ecology. N.Y.: Harper and Row, 1978, 2nd ed. 397 p.
5. Hanski I. Metapopulation Ecology. Oxford Univ. Press, 1999.
6. Жданова О.Л., Колбина Е.А., Фрисман Е.Я. Проблемы регулярного поведения и детерминированного хаоса в математической модели эволюции менделевской лимитированной популяции // Дальневост. математический журн. 2003. Т. 4. № 2. С. 289–303.
7. Фрисман Е.Я., Жданова О.Л., Колбина Е.А. Влияние промысла на генетическое разнообразие и характер динамического поведения менделевской лимитированной популяции // Генетика. 2010. Т. 46. № 2. С. 272–281.
8. Жданова О.Л., Фрисман Е.Я. Влияние оптимального промысла на характер динамики численности и генетического состава двухвозрастной популяции // Изв. РАН. Серия биол. 2013. № 6. С. 738–749.
9. Жданова О.Л., Фрисман Е.Я. Модельный анализ последствий оптимального промысла для эволюции двухвозрастной популяции // Информатика и системы управления. 2014. Т. 40. № 2. С. 12–21.
10. Boonstra R., Boag P.T. A test of the Chitty hypothesis: inheritance of life-history traits in meadow voles *Microtus pennsylvanicus* // Evolution. 1987. V. 41. № 5. P. 929–947.
11. Stearns S.C. The Evolution of Life Histories. Oxford: Oxford Univ. Press, 1992. 249 p.
12. Mousseau T.A., Sinervo B., Endler J. Adaptive Genetic Variation in the Wild. N.Y.: Oxford Univ. Press, 2000. 265 p.
13. Roff D.A. Life History Evolution. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates Inc., 2002. 365 p.
14. Axenovich T.I., Zorkoltseva I.V., Akberdin I.R. et al. Inheritance of litter size at birth in farmed arctic foxes (*Alopex lagopus*, Canidae, Carnivora) // Heredity. 2007. V. 98. P. 99–105.
15. Nespolo R.F. A simple adaption to cycling selection: A complex population dynamic explained by a single-locus Mendelian model for litter size // Heredity. 2007. V. 98. P. 63–64.
16. Володин И.А., Калашикова М.В., Клишкова Е.С. и др. Структура поселения песца *Alopex lagopus beringensis* на северной оконечности острова Беринга // Зоол. журн. 2012. Т. 91. № 10. С. 1231–1243.
17. Hersteinsson P., Macdonald D.W. Diet of Arctic foxes (*Alopex lagopus*) in Iceland // J. Zool. 1996. V. 240. P. 457–474.
18. Angerbjörn A., Tannerfeldt M., Erlinge S. Predator-prey relationships: Arctic foxes and lemmings // J. Anim. Ecol. 1999. V. 68. P. 34–49.
19. Tannerfeldt M., Angerbjörn A. Fluctuating resources and the evolution of litter size in the arctic fox // Oikos. 1998. V. 83. P. 545–559.
20. Tannerfeldt M., Angerbjörn A. Life history strategies in a fluctuating environment: establishment and reproductive success in the arctic fox // Ecography. 1998. V. 19. P. 209–220.
21. Elmhagen B., Tannerfeldt M., Verucci P., Angerbjörn A. The arctic fox (*Alopex lagopus*) – an opportunistic specialist // J. Zool. 2000. V. 251. P. 139–149.
22. Wright S. Evolution and the Genetics of Populations: V. 2. The Theory of Gene Frequencies. Chicago, 1969. 512 p.
23. Nagylaki T. Introduction to Theoretical Population Genetics. Berlin: Springer-Verlag, 1992. 369 p.
24. Gavrilits S. One-locus two-allele models with maternal (parental) selection // Genetics. 1998. V. 149. № 2. P. 1147–1152.
25. Reinhold K. Evolutionary genetics of sex-limited traits under fluctuating selection // J. Evolutionary Biol. 1999. V. 12. № 5. P. 897–902.
26. Reinhold K. Maintenance of a genetic polymorphism by fluctuating selection on sex-limited traits // J. Evolutionary Biol. 2000. V. 13. № 6. P. 1009–1014.

27. Yamamichi M., Hosono M. Roles of maternal effects in maintaining genetic variation: Maternal storage effect // *Evolution*. 2017. V. 71. № 2. P. 449–457.
28. Жданова О.Л., Фрисман Е.Я. Математическое моделирование механизма дифференциации репродуктивных стратегий в естественных популяциях (на примере песцов, *Alopex lagopus*) // *Компьютер. Исследования и моделирование*. 2016. Т. 8. № 2. С. 213–228.
29. Haldane J.B.S. A mathematical theory of natural and artificial selection. Part 1 // *Trans. Camb. Philos. Soc.* 1924. V. 23. P. 19–41.
30. Fischer R.A. *The Genetical Theory of Natural Selection*. Oxford: Clarendon Press, 1930. 360 p.
31. Ратнер В.А. Математическая популяционная генетика: (Элементарный курс). Сиб. отд-ние: Наука, 1977. 127 с.
32. Hedrick P.W. Cyclic fitness variation and polymorphism: Cycling selection for litter size in arctic foxes // *Heredity*. 2007. V. 98. P. 339. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800980>
33. Haldane J.B.S., Jayakar S.D. Polymorphism due to selection of varying direction // *J. Genetics*. 1963. V. 58. № 2. P. 237–242.
34. Frøfford K. Reproductive effort in the arctic fox *Alopex lagopus*: a review // *Norw. J. Agric. Sci.* 1993. V. 7. P. 301–309.
35. Kaikusalo A., Angerbjörn A. The arctic fox population in Finnish Lapland during 30 years, 1964–93 // *Ann. Zool. Fenn.* 1995. V. 32. P. 69–77.
36. Ellner S. Environmental fluctuations and the maintenance of genetic diversity in age or stage-structured populations // *Bull. Mathematical Biol.* 1996. V. 58. № 1. P. 103–127.
37. Fuglei E., Tarroux A. Arctic fox dispersal from Svalbard to Canada: one female's long run across sea ice // *Polar Research*. 2019. V. 38. P. 3512. <https://doi.org/10.33265/polar.v38.35127>
38. Li C.C. *First Course in Population Genetics*. Pacific Grove, California: Boxwood Press, 1976. 631 p.
39. Hedrick P.W. *Genetics of Populations*, 2nd edn. Sudbury, MA: Jones and Bartlett, 2000. 553 p.
40. Лобашев М.Е. Генетика. 2-е изд. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1967. 752 с.
41. Falconer D.S. *Introduction to Quantitative Genetics*, 3rd edn. N.Y.: John Wiley and Sons, 1989. 438 p.

Mathematical Modeling of Selection by Sex-Limited Trait: To the Question of Maintaining a Polymorphism by Litter Size in Natural Populations of Arctic Foxes

O. L. Zhdanova^{a,*} and E. Ya. Frisman^{b,**}

^a*Institute for Automation and Control Processes, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690041 Russia*

^b*Complex Analysis and Regional Problems Institute, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Birobidzhan, 679016 Russia*

*e-mail: axanka@iacp.dvo.ru

**e-mail: frisman@mail.ru

This paper proposes a model of selection by a sex-limited trait expressing in females. The model has been modified to describe natural selection by such trait in ecologically limited populations with age structure. Simulation results are aimed at explaining the existing genetic diversity by litter size in various (natural and artificial) populations of Arctic foxes (*Alopex lagopus*). The model assumes the maintenance of polymorphism in litter size is ensured by the presence of periodic changes in the availability of food for natural populations of Arctic foxes and significantly depends on a parameter describing the relative advantage in the survival of individuals from low litters during years with low food supply. The work shows that selection by a sex-limited trait ensures that polymorphism by litter size is maintained in a wider range of values of this parameter than selection by a simple trait described by the classical selection model for the case when the individual's survival and fecundity are determined only by its own genotype, regardless of sex. The presence of an age or stage structure in a population is known to increase significantly the chances of maintaining genetic diversity in a fluctuating environment. A generalization of the proposed selection model for a population with two stages of development allows to show a polymorphism is possible within even wider range of the parameter considered.

Keywords: population evolution, natural selection, sex-limited trait, mathematical modeling, polymorphism.

НОВАЯ ДЕЛЕЦИЯ мтДНК МЫШИ ЛИНИИ BALB/c

© 2021 г. В. Н. Антипова*

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики
Российской академии наук, Московская обл., Пущино, 142290 Россия*

**e-mail: valery_a@rambler.ru*

Поступила в редакцию 23.02.2020 г.

После доработки 20.04.2020 г.

Принята к публикации 17.06.2020 г.

В тканях головного мозга, селезенки, сердца и периферической крови самца мыши линии BALB/c выявлена новая крупномасштабная делеция митохондриальной ДНК размером 7653 пн.

Ключевые слова: митохондриальная ДНК, делеция, мышь.

DOI: 10.31857/S0016675821020028

Митохондриальная ДНК (мтДНК) млекопитающих – это небольшая (около 16.6 пн) кольцевая молекула. Она кодирует белковые субъединицы митохондриальных комплексов, которые участвуют в окислительном фосфорилировании [1]. Мутации мтДНК, приводящие к нарушениям в системе окислительного фосфорилирования [2], вызывают дисфункцию митохондрий и мультисистемные заболевания [3, 4].

Важным мутационным событием, возникающим в митохондриальном геноме, является образование таких структурных нарушений, как делеции. Чаще всего это крупномасштабные (протяженные) делеции, до нескольких тысяч пар нуклеотидов, приводящие к утрате некоторых генов [5].

Множественные делеции (молекулы мтДНК с делециями разного размера) часто происходят из-за мутаций в ядерных генах, которые необходимы для правильной репликации и/или поддержания митохондриального генома. Они встречаются в соматических клетках и возникают в течение жизни индивида. Такие мутации наследуются по менделевскому типу [6, 7]. Одиночные делеции возникают случайно во время репликации мтДНК в ооците или на ранних стадиях эмбрионального развития [7]. Они почти никогда не наследуются [8].

Точный механизм образования делеций мтДНК неизвестен. Наиболее обсуждаемыми являются модели формирования делеций в процессе репликации [9, 10] или в процессе репарации двухцепочечных разрывов [11]. В модели репликации с проскальзыванием цепи (slipped-strand replication model) предполагается, что разрыв в смещенной одноцепочечной матричной тяжелой цепи между 3' и 5' прямыми повторами может способствовать отжигу 3' прямого повтора этой цепи с

гомологичным 5' прямым повтором на матричной легкой цепи. Репликация, начавшаяся на участке начала репликации легкой цепи приведет к образованию дочерней молекулы с делецией [12]. Согласно второй модели, делеции мтДНК являются результатом процесса репарации двухцепочечных разрывов. 3' → 5' экзонуклеазная активность митохондриальной ДНК-полимеразы приводит к образованию одноцепочечных участков ДНК в области двухцепочечных разрывов. Эти одноцепочечные участки (с 5' и 3' повторами) могут отжигаться с микрогомологичными последовательностями, например, повторами. После репарации, лигирования и деградации одноцепочечных нитей формируется митохондриальный геном с делецией [11]. В недавнем исследовании были предложены экспериментальные доказательства того, что в процесс образования делеций мтДНК включена рекомбинация по механизму выбора копии (copy-choice recombination model) [13]. В данной модели делеции образуются во время синтеза легкой цепи мтДНК, когда матричная тяжелая цепь является одноцепочечной. Повторы на тяжелой цепи могут быть приближены друг к другу из-за образования вторичных структур, что может вызвать приостановку репликации и диссоциацию ДНК-полимеразы от матричной цепи. Если диссоциация произойдет во время синтеза (первого) повтора, 3'-конец растущей цепи и полимеразы могут взаимодействовать с участком матричной цепи, содержащей гомологичный повтор. Когда синтез ДНК возобновляется, промежуточная последовательность удаляется. Детальный анализ моделей образования делеций мтДНК представлен в обзорных работах [12, 14].

Синтез праймеров был произведен ООО “Синтол” (Россия). Реакция амплификации состояла из 30 циклов и проводилась в условиях: денатурация при 94°C в течение 30 с, отжиг и элонгация при 68°C 8 мин. Предварительная денатурация при 94°C – 4 мин, завершающий синтез – 10 мин при 72°C.

Реакционная смесь ПЦР (общий объем 25 мкл) содержала: 75 мМ трис-НСl, рН 8.8, 20 мМ (NH₄)₂SO₄, 2.5 мМ MgCl₂, 200 мкМ каждого dNTP, 250 нМ каждого праймера, 0.01%-ный Твин 20, 100 нг общей ДНК и 0.5 единицы суммарной смеси полимераз Taq-Pfu (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Литва) в соотношении 16 : 1. Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 1%-м агарозном геле с бромистым этидием (0.5 мг/л). Полоски геля с ДНК очищались с помощью набора QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, США). Секвенирование было выполнено ООО “Синтол” (Россия).

При амплификации фрагмента митохондриального генома размером 8999 пн на образце ДНК из клеток головного мозга мыши помимо фрагмента ожидаемой длины был получен дополнительный фрагмент ≈1300 пн. Такой же дополнительный фрагмент амплифицировался на образцах ДНК из клеток сердца, селезенки и периферической крови (рис. 1,а).

Прямое секвенирование этого фрагмента показало, что он является следствием делеции размером 7653 пн (удалена нуклеотидная последовательность с положения 7291 по положение 14943) (рис. 1,б и в). Как и большинство крупномасштабных делеций мтДНК, обнаруженная делеция находится между участками начала репликации легкой и тяжелой цепей [16] и приводит к утрате генов: *mt-Co2*, *mt-Co3*, *mt-Atp8*, *mt-Atp6*, *mt-Nd3*, *mt-Nd4l*, *mt-Nd4*, *mt-Nd5*, *mt-Nd6*, семи генов тРНК и частично *mt-Cytb*, которые имеют решающее значение для нормального функционирования системы окислительного фосфорилирования.

Рядом с точками разрывов расположен прямой повтор ACCCC. При образовании делеции повтор на 5'-конце сохраняется, а на 3'-конце теряется вместе с промежуточной последовательностью (рис. 1,в). Наличие прямого повтора позволяет отнести делецию к I классу [17].

По мнению авторов работы [18] распределение точек разрыва делеций в митохондриальном геноме млекопитающих не случайное. Преимущественно они сосредоточены внутри или вблизи областей мтДНК, содержащих прямые повторы или способных к образованию неканонических структур (шпилек, крестов) [16] или G-квадруплексов [19]. Такие области митохондриального генома рассматриваются как регионы, более подверженные разрушению механическим или химическим стрессом и более уязвимые для воз-

действия активных форм кислорода и свободных радикалов [16].

С помощью ресурса nBMST [20] был выполнен анализ нуклеотидных последовательностей рядом с точками разрывов делеции 7653 пн для поиска участков, способных к образованию неканонических структур. В пределах 40 пн таких участков выявлено не было.

Поскольку точки разрыва делеции не найдены ни в базе MitoBreak (<http://mitobreak.portugene.com>) [18], ни в каких-либо публикациях PubMed, можно заключить, что выявлена новая крупномасштабная делеция мтДНК мыши размером 7653 пн.

Работа частично выполнена на базе лаборатории радиационной молекулярной биологии ИТЭБ РАН и автор выражает благодарность сотрудникам данной лаборатории. Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-00845-20-00.

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. Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G. et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome // Nature. 1981. V. 290. P. 457–465. <https://doi.org/10.1038/290457a0>
2. Greaves L.C., Reeve A.K., Taylor R.W., Turnbull D.M. Mitochondrial DNA and disease // J. Pathol. 2012. V. 226. P. 274–286. <https://doi.org/10.1002/path.3028>
3. Schaefer A.M., McFarland R., Blakely E.L. et al. Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults // Ann. Neurol. 2008. V. 63. P. 35–39. <https://doi.org/10.1002/ana.21217>
4. Schaefer A.M., Taylor R.W., Turnbull D.M., Chinnery P.F. The epidemiology of mitochondrial disorders – past, present and future // Biochim. Biophys. Acta. 2004. V. 1659. P. 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.09.005>
5. Cooper J.M., Mann V.M., Schapira A.H. Analyses of mitochondrial respiratory chain function and mitochondrial DNA deletion in human skeletal muscle: Effect of ageing // J. Neurol. Sci. 1992. V. 113. P. 91–98. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(92\)90270-u](https://doi.org/10.1016/0022-510x(92)90270-u)
6. Ahmed N., Ronchi D., Comi G.P. Genes and pathways involved in adult onset disorders featuring muscle mitochondrial DNA instability // Int. J. Mol. Sci. 2015. V. 16. P. 18054–18076. <https://doi.org/10.3390/ijms160818054>
7. Schon E.A., DiMauro S., Hirano M. Human mitochondrial DNA: Roles of inherited and somatic mutations // Nat. Rev. Genet. 2012. V. 13. P. 878–890. <https://doi.org/10.1038/nrg3275>
8. Chinnery P.F., DiMauro S., Shanske S. et al. Risk of developing a mitochondrial DNA deletion disorder //

- Lancet. 2004. V. 364. P. 592–596.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16851-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16851-7)
9. *Shoffner J.M., Lott M.T., Voljavec A.S. et al.* Spontaneous Kearns-Sayre/chronic external ophthalmoplegia plus syndrome associated with a mitochondrial DNA deletion: a slip-replication model and metabolic therapy // PNAS USA. 1989. V. 86. P. 7952–7956.
<https://doi.org/10.1073/pnas.86.20.7952>
 10. *Schon E.A., Rizzuto R., Moraes C.T. et al.* A direct repeat is a hotspot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA // Science. 1989. V. 244. P. 346–349.
<https://doi.org/10.1126/science.2711184>
 11. *Krishnan K.J., Reeve A.K., Samuels D.C. et al.* What causes mitochondrial DNA deletions in human cells? // Nat. Genet. 2008. V. 40. P. 275–279.
<https://doi.org/10.1038/ng.f.94>
 12. *Oliveira M.T., Pontes C.B., Ciesielski G.L.* Roles of the mitochondrial replisome in mitochondrial DNA deletion formation // Genet. Mol. Biol. 2020. V. 43. (Suppl. 1). P. e20190069.
<https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2019-0069>
 13. *Persson Ö., Muthukumar Y., Basu S. et al.* Copy-choice recombination during mitochondrial L-strand synthesis causes DNA deletions // Nat. Commun. 2019. V. 10. P. 759–763.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-08673-5>
 14. *Nissanka N., Minczuk M., Moraes C.T.* Mechanisms of mitochondrial DNA deletion formation // Trends in Genetics. 2019. V. 35. № 3. P. 235–244.
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2019.01.001>
 15. *Антипова В.Н., Малахова Л.В., Безлепкин В.Г.* Выявление делеций митохондриальной ДНК в тканях мышцей, подвергнутых воздействию рентгеновского излучения // Биофизика. 2011. Т. 56. № 3. С. 439–445.
 16. *Damas J., Carneiro J., Gonçalves J. et al.* Mitochondrial DNA deletions are associated with non-B DNA conformations // Nucl. Ac. Res. 2012. V. 40. P. 7606–7621.
<https://doi.org/10.1093/nar/gks500>
 17. *Mita S., Rizzuto R., Moraes C.T. et al.* Recombination via flanking direct repeats is a major cause of large-scale deletions of human mitochondrial DNA // Nucl. Ac. Res. 1990. V. 18. P. 561–567.
<https://doi.org/10.1093/nar/18.3.561>
 18. *Damas J., Carneiro J., Amorim A., Pereira F.* MitoBreak: The mitochondrial DNA breakpoints database // Nucl. Ac. Res. 2014. V. 42. (Database issue): D1261–1268.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt982>
 19. *Dong D.W., Pereira F., Barrett S.P. et al.* Association of G-quadruplex forming sequences with human mtDNA deletion breakpoints // BMC Genomics. 2014. V. 15. P. 585–677.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-677>
 20. *Cer R.Z., Donohue D.E., Mudunuri U.S. et al.* Non-B DB v2.0: A database of predicted non-B DNA-forming motifs and its associated tools // Nucl. Ac. Res. 2013. V. 41. (Database issue): D94–D100.
<https://doi.org/10.1093/nar/gks955>
 21. *Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M.* Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // Bioinformatics. 2012. V. 28. P. 1166–1167.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>

A New Deletion of Mitochondrial DNA of a BALB/c mouse

V. N. Antipova*

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Moscow oblast, Pushchino, 142290 Russia

**e-mail: valery_a@rambler.ru*

A large deletion of mitochondrial DNA 7653 bp long has been identified in tissues of the brain, the spleen, the heart and peripheral blood of a BALB/c male mouse.

Keywords: mitochondrial DNA, deletion, mouse.