СОДЕРЖАНИЕ

Том 57, номер 3, 2021

Обзорные и теоретические статьи	
Ген <i>Clock</i> , мелатонин и цикл "сон-бодрствование"	
Н. В. Семёнова, И. М. Мадаева, Л. И. Колесникова	247
Генетические нарушения активности PRC2 при онкологии: проблемы и перспективы	
Д. А. Четверина, Д. В. Ломаев, П. Г. Георгиев, М. М. Ерохин	255
Роль генетических факторов в организации и регуляции развития эндокринных тканей <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i>	
Д. В. Голиусова, Н. В. Клементьева, А. В. Панова, Н. Г. Мокрышева, С. Л. Киселев	270
Генетика растений	
Вариабельность и экспрессия паралогов фитоинсинтазы (PSY) у видов перца клады Annuum	
М. А. Филюшин, Е. А. Дьяченко, Г. И. Ефремов, Е. З. Кочиева, А. В. Щенникова	280
Генетическая изменчивость в популяциях <i>Pinus sylvestris, Picea obovata,</i> <i>Abies sibirica</i> и на вырубках в южной тайге Средней Сибири	

И. В. Тихонова, А. К. Экарт, А. Н. Кравченко, Н. А. Тихонова
296
Идентификация и полиморфизм гена ГДФ-L-галактозофосфорилазы (ApGGP1) у сортов лука-порея
О. К. Анисимова, А. В. Щенникова, Е. З. Кочиева, М. А. Филюшин
311
Особенности экспрессии чужеродных генов в сложноорганизованных инсерциях у трансгенных растений табака с мозаичным характером проявления гена nptII
Т. В. Маренкова, В. В. Кузнецов, Е. В. Дейнеко
321

Гены яровизации (*VRN*) и фотопериода (*PPD*) у староместных яровых сортов гексаплоидной пшеницы

А. Ю. Драгович, А. В. Фисенко, А. А. Янковская

Генетика животных

332

345

Филогенетические отношения камбалообразных рыб семейства Pleuronectidae (Ostichties: Pleuronectiformes) на основе участка гена *16S* рРНК

А. Д. Редин, Ю. Ф. Картавцев

тт

Краткие сообщения

изоляция расстоянием у северных осетин	
Г. И. Ельчинова, В. В. Кадышев, Р. А. Зинченко	358
Генетическое разнообразие и дифференциация северных популяций дуба черешчатого России по результатам анализа новых маркеров SNP	
Б. Деген, Ю. А. Янбаев, Р. Ю. Янбаев, С. Ю. Бахтина, А. А. Габитова, А. А. Тагирова	361

Contents

_

_

Vol. 57, No. 3, 2021

-

Reviews and Theoretical Articles	
<i>Clock</i> Gene, Melatonin and the Sleep–Wake Cycle	
N. V. Semenova, I. M. Madaeva, and L. I. Kolesnikova	247
Genetic Disorders of PRC2 Activity in Oncology: Problems and Prospects	
D. A. Chetverina, D. V. Lomaev, P. G. Georgiev, and M. M. Erokhin	255
The Role of Genetic Factors in Organization and Regulation of Endocrine Tissues Development <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i>	
D. V. Goliusova, N. V. Klementieva, A. V. Panova, N. G. Mokrysheva, and S. L. Kiselev	270
Plant Genetics	
Variability and Expression Pattern of Phytoene Synthase (PSY) Paralogs in Pepper Species	
M. A. Filyushin, E. A. Dyachenko, G. I. Efremov, E. Z. Kochieva, and A. V. Shchennikova	280
Genetic Variability in the Populations of <i>Pinus sylvestris</i> , <i>Picea obovata</i> , <i>Abies sibirica</i> , and in Cuttings in the Southern Taiga of Central Siberia	
I. V. Tikhonova, A. K. Ekart, A. N. Kravchenko, and N. A. Tikhonova	296
Identification and Variability of the GDP-L-Galactose Phosphosphorylase Gene <i>ApGGP1</i> in Leek Cultivars	
O. K. Anisimova, A. V. Shchennikova, E. Z. Kochieva, and M. A. Filyushin	311
Features of Expression of Foreign Genes in Complex Insertions in Transgenic Tobacco Plants with a Mosaic Pattern of the <i>npt</i> II gene	
T. V. Marenkova, V. V. Kusnetsov, and E. V. Deineko	321
Vernalization (VRN) and Photoperiod (PPD) Genes in Spring Hexaploid Wheat Landraces	
A. Yu. Dragovich, A. V. Fisenko, and A. A. Yankovskaya	332
Animal Genetics	
Phylogenetic Relationships of Flounders from the Family Pleuronectidae (Ostichties: Pleuronectiformes) Based on <i>16S</i> rRNA Gene	
A. D. Redin and Yu. Ph. Kartavtsev	345
Short Communications	
Isolation by Distance in North Ossetians	
G. I. El'chinova, V. V. Kadyshev, and R. A. Zinchenko	358
Genetic Diversity and Differentiation of Northern Populations of Pedunculate OAK Based on Analysis of New SNP Markers	
B. Degen, Y. A. Yanbaev, R. Y. Ianbaev, S. Y. Bakhtina, A. A. Gabitova, and A. A. Tagiriva	361

ОБЗОРНЫЕ И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 575.22:575.826

ГЕН Clock, МЕЛАТОНИН И ЦИКЛ "СОН-БОДРСТВОВАНИЕ"

© 2021 г. Н. В. Семёнова^{1, *}, И. М. Мадаева¹, Л. И. Колесникова¹

¹Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, 664003 Россия *e-mail: natkor_84@mail.ru Поступила в редакцию 24.04.2020 г. После доработки 07.08.2020 г.

Принята к публикации 25.08.2020 г.

В обзоре рассмотрена роль гена *Clock* и мелатонина как участников циркадных ритмов человека. Представлены результаты исследований по ассоциации полиморфных вариантов гена *Clock* и цикла "сон—бодрствование", а также циркадных ритмов секреции мелатонина при разных хронотипах и наличии инсомнических нарушений. Рассмотрена гипотеза о роли полиморфного маркера *3111T/C* гена *Clock* в формировании инсомнии у женщин европеоидной расы, проживающих на территории Восточной Сибири.

Ключевые слова: ген *Clock*, мелатонин, циркадные ритмы, сон, инсомния. **DOI:** 10.31857/S0016675821030127

В настоящее время распространенность нарушений цикла "сон-бодрствование" варьирует от 5.6 до 73.8% и зависит от возраста, гендерной и этнической принадлежности [1]. Коморбидность данных нарушений с другими патологическими состояниями и медико-социальные последствия, к которым они приводят [2], требуют разработки эффективных методов их диагностики и коррекции, платформой для чего являются результаты фундаментальных исследований, изучающих молекулярные механизмы циркадных ритмов.

ГЕН *CLOCK* КАК УЧАСТНИК ЦИРКАДНЫХ РИТМОВ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Первыми научными исследованиями, показавшими существование генетического механизма циркадных ритмов, стали работы американских ученых, проведенные в 60-70-х гг. ХХ в. [3]. До настоящего времени интерес к изучению данного вопроса не угасает, а наоборот – возрастает с каждым годом, свидетельством чего является огромное количество исследований. Накопленные к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что одним из циркадных генов, управляющих значительным рядом метаболических и физиологических функций в организме. в том числе циклом "сон-бодрствование", является ген Clock (Circadian locomoter output cycles protein kaput), впервые идентифицированный в 1997 г. J. Takahashi. Участие этого гена в регуляции циркадных ритмов млекопитающих отмечено в петлях обратной связи транскрипции-трансляции и происходит посредством димеризации его белкового продукта с белком BMAL1 (Brain muscle arntlike) в клеточном ядре [4].

В настоящее время у млекопитающих выявлены три петли обратной связи транскрипциитрансляции. В первой петле белковый гетеродимер CLOCK:BMAL1 активирует транскрипцию генов Crvptochrome (Crv1, Crv2) и Period (Per1, Per2, Per3) через связывание с последовательностью Е-box генов-мишеней. Результатом этого является постепенная аккумуляция в цитоплазме белков CRY и PER, и при достижении критического уровня последнего к концу дня происходит его димеризация с образованием гетеродимеров PER:PER или PER:CRY. Фосфорилирование белка PER происходит с помощью киназы СК1 (Casein kinase 1 family of kinases) с последующим образованием комплекса CRY:PER:CK1 с максимальным уровнем в ночное время, предотвращающего дальнейшее фосфорилирование и деградацию в цитоплазме белка PER. В данном комплексе фосфорилирование белков PER и CRY осуществляется другими киназами, позволяя комплексу транслоцироваться в ядро и ингибировать эффект позитивных транскрипционных факторов.

Участие гетеродимера CLOCK:BMAL1 во второй петле заключается в его связывании с E-box промоторов генов *Ror*α и *Rev-erb*α, продукты которых независимо транслоцируются в ядро с последующей конкуренцией за связывание с последовательностью RORE в промоторной области *Bmal1*. Результатом связывания с данной последовательностью RORA, максимальные уровни которого отмечаются на рассвете, является активация гена *Bmal1*; при связывании REV-ERBα, пики которого выявлены в сумерках, с последовательностью RORE происходит подавление транскрипции гена.

В третьей петле белковые продукты генов *Dec1* (Differentiated embryonic chondrocyte) и *Dec2* ингибируют транскрипцию гетеродимера CLOCK:BMAL1, усиливая ингибирующее действие комплекса CRY:PER:CK1 [5].

Большинство клеток в организме обладают молекулярными часами и синхронизируются с помощью главного водителя ритма, расположенного в супрахиазматических ядрах гипоталамуса. В настоящее время исследования генетических механизмов циркадных ритмов продолжаются в связи с неясной природой циркадной регуляции генов, не имеющих последовательности E-box, а также в связи с определением роли дополнительных часовых компонентов [6].

ПОЛИМОРФНЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНА *CLOCK* И ЦИКЛ "СОН–БОДРСТВОВАНИЕ"

К настоящему времени ассоциации полиморфных вариантов гена *Clock* и цикла "сонбодрствование" рассмотрены по большей части при изучении однонуклеотидной замены в его 3'нетранслируемой области (3111T/C, rs1801260). В научных исследованиях по взаимосвязи полиморфизма 3111T/C гена Clock с хронотипом показана большая распространенность аллеля 3111С и ассоциация генотипа 3111С/С у здоровых людей с вечерней активностью в японской популяции [7] и у представителей североамериканской популяции [8, 9]. Однако исследованием на британской популяции эти данные не подтверждены [10, 11]. Более того, не обнаружено данной ассоциации и с синдромом отстающей фазы сна в бразильской популяции [12], а также выявлена более низкая частота аллеля 3111С при данном синдроме в японской популяции [13].

Результаты проведенного исследования в итальянской популяции показали факт ассоциации аллеля 3111С с инсомнией только у пациентов с биполярными расстройствами [14, 15], хотя исследованиями в североамериканской [16, 17], румынской [18], австрийской [19], смешанной европейской [20], греческой [21] и корейской [22] популяциях не обнаружено ассоциации полиморфизма 3111T/С гена Clock с когнитивными расстройствами. Результаты исследования N. Antypa с соавт. [21] показали, что генотип 3111C/C в комбинации со стрессом увеличивает уязвимость к нарушению суточного ритма у женщин. Проведенное в американской популяции с участием женщин менопаузального возраста исследование по поиску ассоциации генотипов и аллелей данного полиморфизма с инсомнией показало, что

носительство хотя бы одного из аллелей З111С снижает шансы инсомнии в сравнении с носителями, гомозиготными по 3111Т-аллелю, при этом не выявлено ассоциации полиморфизма с ранними пробуждениями. Следует отметить, что группы женщин в данном исследовании не были разделены по этнической принадлежности и включали как белых американцев (более 80%), так и черных [23]. Данная научная проблема с учетом этнической принадлежности была рассмотрена в популяциях европеоидов и монголоидов Восточной Сибири. По результатам исследования оказалось, что только у представительниц европеоидной расы инсомния ассоциирована с генотипом 3111Т/Т и аллелем 3111Т. Расчет показателя относительного риска развития инсомнии у носителей аллеля 3111T гена Clock позволил определить его как прогностический в формировании сомнологической патологии у представительниц европеоидной расы [24]. Наравне с этим не было выявлено взаимосвязи между генотипами и аллелями и отдельными жалобами, такими как трудности засыпания, частые ночные пробуждения, трудности ранних утренних пробуждений [25].

В исследовании на большой выборке афроамериканцев были проанализированы связи между продолжительностью и качеством сна на 12 полиморфных маркерах гена *Clock*: rs6820119, rs3792603, rs11932595, rs17085763, rs17085780, rs2070062, rs7684048, rs7657206, rs11726609, rs6853192, rs6820823, rs17721497. Одним из основных результатов была значительная связь между более короткой продолжительностью сна и *T*-аллелем rs2070062 и номинально значимая связь с *T*-аллелем rs6853192 [26].

В исследовании на двух независимых европейских популяциях из Эстонии и Южного Тироля была продемонстрирована номинальная связь rs12649507 и rs11932595 с продолжительностью сна [27]. Повторение этих результатов в большой выборке европейских участников не подтвердило ассоциаций между анализируемыми вариантами гена *Clock* и продолжительностью сна, в том числе и по результатам полисомнографического исследования [28], что свидетельствует о необходимости проведения дополнительных исследований по изучению данного вопроса.

ЦИКЛ "СОН–БОДРСТВОВАНИЕ" И МЕЛАТОНИН

Одним из ключевых элементов циркадного механизма является гормон мелатонин, ритм секреции которого носит четко выраженный циркадный характер с повышением уровня в вечернее время, максимумом в середине ночи и прогрессивным уменьшением к утру [29]. Благодаря результатам огромного массива проведенных научных работ по выявлению взаимосвязей цикла "сон-бодрствование" и уровня мелатонина существование данных ассоциаций не вызывает сомнений [30]. Через два часа после начала синтеза эндогенного мелатонина появляется вечерняя сонливость и наступает сон [31]. Предполагается, что мелатонин не столько оказывает прямое воздействие на сомногенные структуры, сколько способствует открытию так называемых "ворот сна", создает "предрасположенность ко сну", тормозит механизмы бодрствования. При достижении концентрации мелатонина в крови, соответствующей примерно половине максимального "ночного" уровня, происходит резкий подъем "давления сна", что способствует переходу состояния бодрствования ко сну [32]. Действие ряда факторов, таких как полная слепота, удаление или функциональное разрушение эпифиза, изменение светового режима при сменной работе или трансмеридианных перелетах, приводит к десинхронизации между периодом сна и секрецией мелатонина [33].

В супрахиазматических ядрах гипоталамуса, в гиппокампе, мозжечке, коре больших полушарий и других тканях находятся MT1 и MT2 рецепторы, на которые воздействует мелатонин. Это активирует различные сигнальные системы клетки и приводит к синтезу вторичных посредников: циклического аденозинмонофосфата и изменению концентрации ионов кальция. При связывании мелатонина с цитозольным кальмодулином возможно влияние гормона на кальциевые сигналы посредством взаимодействия с такими энзимами, как аденилатциклаза и фосфодиэстераза, и структурными белками цитоскелета [34]. Экспериментами на мышах было показано увеличение продолжительности медленного сна при нокаутировании рецептора МТ1 и, наоборот, ее сокращение при нокаутировании рецептора MT2, что свидетельствует о разнонаправленных ролях рецепторов в процессе сна [35]. В ядрах гипоталамуса, в сетчатке глаза и других тканях обнаружены ядерные рецепторы RZR/ROR α и RZR/ROR β , относящиеся к подклассу семейства орфановых ядерных ретиноидных рецепторов с меньшим сродством к мелатонину. Кроме того, рецепторы мелатонина обнаружены в желудочно-кишечном тракте, однако их функция до сих пор не ясна [36]. Предполагается, что рецепторы, расположенные в супрахиазматических ядрах гипоталамуса, принимают участие в регуляции циркадного ритма, в том числе возможно влияние на экспрессию часовых генов в мозжечке. Результаты недавнего исследования на приматах по оценке экспрессии MT1, MT2 рецепторов, а также PER1, PER2 и кальцийсвязывающих белков в мозжечке показали не только локализацию PER1, PER2 иммунореактивных клеток в клетках Пуркинье мозжечка, а рецепторов МТ1 и МТ2 – в клетках Бергмана, но и высокую экспрессию PER и рецепторов мелатонина в дневное время. Вместе с тем были обнаружены дневные/ночные морфологические

изменения кальретинина и кальбиндина, обладающих функцией высвобождения нейротрансмиттеров, и изменение их плотности в коре мозжечка [37].

Результаты проведенных исследований по сравнительной оценке ритмов мелатонина у представителей разных хронотипов показали отсутствие значимых различий между группами людей с вечерней и утренней активностью в период от 0.00 ч до 7.00 ч [38] и повышение в 9.00 ч уровня сывороточного гормона в 2 раза у представителей с вечерней активностью, на основании чего утренний мелатонин предложено рассматривать как биологический маркер для определения хронотипа [39]. Результаты исследования с участием детей в возрасте 30-36 мес., у которых проводили измерение уровня мелатонина в слюне каждый час в период с 18.00 до 21.00 ч, продемонстрировали более раннее начало подъема уровня гормона у детей с утренней активностью [40]. Аналогичные результаты были получены в исследовании на мужчинах 18-45 лет [41]. Исследование взаимосвязи хронотипа и уровня мелатонина у пременопаузальных женщин показало более высокие его значения в суточной моче у представительниц хронотипа "жаворонки" по отношению к группе "сов" [42].

Циркадные ритмы мелатонина были изучены при таких нарушениях цикла "сон—бодрствование" как синдром отсроченного наступления фазы сна и инсомнические расстройства. При синдроме отсроченного наступления фазы сна показано смещение пика секреции гормона на 3–5 ч по сравнению с контролем [43]. Более того, результаты 80-часового эксперимента показали удлинение циркадных ритмов мелатонина при данном нарушении [44].

Инсомнические расстройства сопровождаются не только более низкими уровнями мелатонина [45–48], но и смещением пика секреции гормона, что было продемонстрировано в исследованиях с участием женщин климактерического периода разной этнической принадлежности [45, 47]. Показано, что смещение пика секреции мелатонина на утренние часы происходит у женщин европеоидной расы как в перименопаузе, так и в постменопаузальном периоде [45]. Задержка пика секреции гормона до утреннего времени может быть связана с наличием менопаузальной депрессии, являющейся причиной более длительной продолжительности сна в качестве компенсации инсомнии [48]. В то же время постменопаузальные женщины без инсомнических расстройств также имели пик мелатонина рано утром [46]. Аналогичные результаты были получены в исследовании по взаимосвязи циркадных ритмов мелатонина с продолжительностью сна у людей как молодого, так и пожилого возраста с отсутствием жалоб на нарушения сна. Было показано, что засыпание у пожилых участников исследования наступало раньше, чем у них был зарегистрирован пик плазменного мелатонина, а пробуждение происходило во время более высоких уровней гормона [49].

К настоящему времени на разных когортах больных проведено достаточное количество клинических испытаний по эффективности применения экзогенного мелатонина в лечении инсомнии, результаты которых являются подтверждением несомненного влияния гормона на цикл "сон-бодрствование" [50–52].

ЦИРКАДНЫЕ РИТМЫ МЕЛАТОНИНА И ГЕН *CLOCK*

Известно, что синтез мелатонина контролируется ферментом арилалкиламин-N-ацетилтрансферазой (AANAT), транскрипция которого активируется гетеродимером CLOCK:BMAL1 через связывание с E-box в промоторной области гена Aanat [53]. Результаты недавних исследований in vivo предположили критическую роль как CLOCK, так и BMAL1 в индуцированной монохроматическим зеленым светом ритмической секреции мелатонина [54, 55]. Другими экспериментальными работами показано, что нокдаун и сверхэкспрессия *Clock* не влияют на циркадные ритмы и уровни секреции гормона [56]. При этом AANAT также поддерживает очевидный циркадный ритм, но его амплитуда меняется в результате нокдауна и избыточной экспрессии Clock [57].

Недавнее исследование по вопросу функциональной роли полиморфизма 3111T/C гена Clock показало, что 3111С-аллель приводит к более высоким уровням мРНК *Clock* и высокой экспрессии Per2, являющейся транскрипционной мишенью СLОСК, по сравнению с аллелем 3111Т. Предполагается, что эти изменения могут быть обусловлены рядом различных механизмов, включая сайты связывания микроРНК-182 в 3'-нетранслируемой области гена *Clock* [58]. Данные результаты являются свидетельством возможного влияния данного полиморфизма на циркадные ритмы мелатонина, что было изучено в ходе проведения исследований в ФГБНУ "НЦ проблем здоровья семьи и репродукции человека" на выборке женщин климактерического периода европеоидной и монголоидной рас. Проведенное исследование не показало ассоциации циркадных ритмов мелатонина и изученного полиморфизма у женщин монголоидной расы, что позволило сделать вывод об отсутствии влияния 3111T/C гена Clock на формирование у них нарушений сна. В группе женщин-европеоидов 3111Т/Т-генотип был ассоциирован со смещением пика секреции мелатонина на ранние утренние часы. Исследование было проведено на территории Восточной Сибири (Иркутская область, Прибайкалье), и полученные результаты

трактовались с учетом принадлежности монголоидов к коренному населению, а европеоидов – к пришлому. Исследователями выдвинута гипотеза о процессах дизадаптации европеоидов во время смены часовых поясов при изменении территории проживания, проявляющихся сохранением циркадных ритмов, характерных для проживания в западной части, что рассматривается как смещение ритмов мелатонина в условиях настоящего проживания. Учитывая два типа эффектов воздействия окружающей среды на структуру и функции генотипов [59] было высказано предположение о развитии физиологического десинхроноза с достижением качественной адаптации с нормальными значениями мезоров ритма у европеоидов - носителей 3111Т-аллеля, у которых признаки нарушения цикла "сон-бодрствование" отсутствуют [60]. В данном случае возможна реализация первого эффекта, проявляющегося на уровне индивида в виде патологических реакций, а на популяционном уровне в виде адаптации [59].

Наравне с этим большая частота встречаемости минорного аллеля у европеоидов без нарушения цикла "сон-бодрствование" и отсутствие различий по ритмам мелатонина при носительстве данного аллеля позволили выдвинуть предположение о появлении зашитной функции у 3111С-аллеля в ходе эволюционного процесса, учитывая исторические данные о заселении территории Восточной Сибири представителями европеоидной расы [60]. В этом случае можно предположить изменения на генетическом уровне в процессе адаптации к смене часовых поясов, т.е. реализацию второго типа эффектов воздействия факторов окружающей среды на структуру и функцию генотипов [61]. Однако среди носителей минорного аллеля с предполагаемой защитной ролью от развития нарушений цикла "сон-бодрствование" встречаются женщины с нарушениями сна, что может быть рассмотрено как дизадаптационный процесс при наступлении критического периода жизни, а именно климактерия, и не связанного с циркадными ритмами мелатонина (рис. 1). Данная гипотеза представляет значимый интерес, однако для ее подтверждения необходимо проведение дополнительных крупномасштабных исследований в других популяциях мира.

Анализ литературных данных, представленных в данном обзоре, свидетельствует об актуальности дальнейшего изучения молекулярных механизмов циркадных ритмов в связи с имеющимися пробелами в вопросах их генетической регуляции. Наравне с этим большая часть работ по изучению ассоциации хронобиологических ритмов мелатонина и гена *Clock* — это эксперименты на животных с неоднозначными результатами и наличие единичных исследований по данному вопросу на человеке. Дополнительные исследования в данной области



Рис. 1. Гипотетическая схема о роли полиморфного маркера *3111T/C* гена *Clock* в формировании нарушений сна у женщин-европеоидов в климактерическом периоде [59].

открывают новые горизонты в изучении цикла "сон-бодрствование" и его нарушений.

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

- Zhang Y., Ren R., Lei F. et al. Worldwide and regional prevalence rates of co-occurrence of insomnia and insomnia symptoms with obstructive sleep apnea: a systematic review and meta-analysis // Sleep Med. Rev. 2019. V. 45. P. 1–17. https://doi.org/10.1016/j.smrv.2019.01.004
- Сомнология и медицина сна. Национальное руководство памяти А.М. Вейна и Я.И. Левина / Под ред. Полуэктова М.Г. М.: Медфорум, 2016. 664 с.
- 3. Konopka R.J., Benzer S. Clock mutants of Drosophila melanogaster // PNAS USA. 1971. V. 68. № 9. P. 2112–2116.
- Takahashi J.S. Molecular architecture of the circadian clock in mammals // A Time for Metabolism and Hormones. Cham (CH): Springer, 2016. P. 13–24.
- 5. Jagannath A., Taylor L., Wakaf Z. et al. The genetics of circadian rhythms, sleep and health // Hum. Mol.

ГЕНЕТИКА том 57 № 3 2021

Gene. 2017. V. 26. № R2. P. R128–R138. https://doi.org/10.1093/hmg/ddx240

Zhang S., Dai M., Wang X. et al. Signalling entrains the peripheral circadian clock // Cell Signal. 2020. V. 69. P. 109433.

https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109433

- Mishima K., Tozawa T., Satoh K. et al. The 3111T/C polymorphism of hClock is associated with evening preference and delayed sleep timing in a Japanese population sample // Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet. 2005. V. 133B. P. 101–104. https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30110
- Katzenberg D., Young T., Finn L. et al. A CLOCK polymorphism associated with human diurnal preference // Sleep. 1998. V. 21. № 6. P. 569–576.
- Friedman L., Zeitzer J.M., Kushida C. et al. Scheduled bright light for treatment of insomnia in older adults // J. Am. Geriatr. Soc. 2009. V. 57. № 3. P. 441–452. https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2008.02164.x
- Robilliard D.L., Archer S.N., Arendt J. et al. The 3111 Clock gene polymorphism is not associated with sleep and circadian rhythmicity in phenotypically characterized human subjects // J. Sleep Res. 2002. V. 11. P. 305–312.
- Barclay N.L., Eley T.C., Mill J. et al. Sleep quality and diurnal preference in a sample of young adults: associations with 5HTTLPR, PER3, and CLOCK 3111 // Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet. 2011. V. 156B. № 6. P. 681–690. https://doi.org/10.1002/ajmg.b.31210

- Pedrazzoli M., Louzada F.M., Pereira D.S. et al. Clock polymorphisms and circadian rhythms phenotypes in a sample of the Brazilian population // Chronobiol. Int. 2007. V. 24. P. 1–8.
- Iwase T., Kajimura N., Uchiyama M. et al. Mutation screening of the human Clock gene in circadian rhythm sleep disorders // Psychiatry Res. 2002. V. 109. P. 121– 128.
- Serretti A., Benedetti F., Mandelli L. et al. Genetic dissection of psychopathological symptoms: insomnia in mood disorders and CLOCK gene polymorphism // Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet. 2003. V. 121B. P. 35–38. https://doi.org/10.1002/ajmg.b.20053
- Benedetti F, Dallaspezia S., Fulgosi M.C. Actimetric evidence that CLOCK 3111T/C SNP influence sleep and activity patterns in patients affected by bipolar depression // Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet. 2007. V. 144B. P. 631–635.
- Desan P.H., Oren D.A., Malison R. et al. Genetic polymorphism at the CLOCK gene locus and major depression // Am. J. Med. Genet. 2000. V. 96. P. 418–421.
- Shi J., Wittke-Thompson J.K., Badner J.A. et al. Clock genes may influence bipolar disorder susceptibility and dysfunctional circadian rhythm // Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet. 2008. V. 147B. P. 1047– 1055.

https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30714

- Voinescu B., Thome J., Orasan R. The rs 1801260 CLOCK polymorphism, links to depression, insomnia and diurnal preference-preliminary findings from a Romanian sample // HVM Bioflux. 2009. V. 1. № 2. P. 67–73.
- Bailer U., Wiesegger G., Leisch F. et al. No association of clock gene T3111C polymorphism and affective disorders // Eur. Neuropsychopharmacol. 2005. V. 15. № 1. P. 51–55. https://doi.org/10.1016/i.euroneuro.2004.05.004
- Johansson C., Willeit M., Smedh C. et al. Circadian clock-related polymorphisms in seasonal affective disorder and their relevance to diurnal preference // Neuropsychopharmacology. 2003. V. 28. P. 734–739. https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300121
- Antypa N., Mandelli L., Nearchou F.A. et al. The 3111T/C polymorphism interacts with stressful life events to influence patterns of sleep in females // Chronobiol. Int. 2012. V. 29. № 7. P. 891–897. https://doi.org/10.3109/07420528.2012.699380
- Paik J.W., Lee H.J., Kang S.G. et al. CLOCK gene 3111C/T polymorphism is not associated with seasonal variations in mood and behavior in Korean college students // Psychiatry Clin. Neurosci. 2007. V. 61. P. 124– 126.

https://doi.org/10.1111/j.1440-1819.2007.01621.x

 Ziv-Gal A., Flaws J.A., Mahoney M.M. et al. Genetic polymorphisms in the aryl hydrocarbon receptor—signaling pathway and sleep disturbances in middle-aged women // Sleep Med. 2013. V. 14. № 9. P. 883–887. https://doi.org/10.1016/j.sleep.2013.04.007

- Semenova N.V., Madaeva I.M., Bairova T.A. et al. Association of the melatonin circadian rhythms with clock 3111T/C gene polymorphism in Caucasian and Asian menopausal women with insomnia // Chronobiol. Int. 2018. V. 35. № 8. P. 1066–1076. https://doi.org/10.1080/07420528.2018.1456447
- Semenova N.V., Madaeva I.M., Bairova T.I. et al. 3111T/C Clock gene polymorphism in women with insomnia // Bull. Exp. Biol. Med. 2017. V. 163. № 4. P. 461–464. https://doi.org/10.1007/s10517.017.3828.5

https://doi.org/10.1007/s10517-017-3828-5

- Riestra P., Gebreab S.Y., Xu R. et al. Circadian CLOCK gene polymorphisms in relation to sleep patterns and obesity in African Americans: findings from the Jackson heart study // BMC Genet. 2017. V. 18. P. 58. https://doi.org/10.1186/s12863-017-0522-6
- Allebrandt K.V., Teder-Laving M., Akyol M. et al. CLOCK gene variants associate with sleep duration in two independent populations // Biol. Psychiatry. 2010. V. 67. № 11. P. 1040–1047. https://doi.org/10.1016/i.biopsych.2009.12.026
- Lane J.M., Tare A., Cade B.E. et al. Common variants in CLOCK are not associated with measures of sleep duration in people of european ancestry from the sleep heart health study // Biol. Psychiatry. 2013. V. 74. № 12. P. e33–e35. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.06.006
- 29. *Zhao D., Yu Y., Shen Y. et al.* Melatonin synthesis and function: evolutionary history in animals and plants // Front. Endocrinol. (Lausanne). 2019. V. 10. P. 249. https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00249
- 30. *Pandi-Perumal S.R., Srinivasan V., Spence D.W. et al.* Role of the melatonin system in the control of sleep: therapeutic implications // CNS Drugs. 2007. V. 21. № 12. P. 995–1018.
- Zhdanova I.V., Tucci V. Melatonin, circadian rhythms, and sleep // Curr. Treat. Options Neurol. 2003. V. 5. № 3. P. 225–229.
- Lavie P. Melatonin: Role in gating nocturnal rise in sleep property // J. Biol. Rhythms. 1997. V. 12. P. 657– 665.
- Ковальзон В.М., Вейн А.М. Мелатонин и сон // Мелатонин в норме и патологии. М.: Медпрактика-М, 2004. С. 182–197.
- 34. *Каладзе Н.Н., Соболева Е.М., Скоромная Н.Н.* Итоги и перспективы изучения физиологических, патогенетических и фармакологических эффектов мелатонина // Здоровье ребенка. 2010. № 2(23). С. 156–166.
- Comai S., Ochoa-Sanchez R., Gobbi G. Sleep-wake characterization of double MT(1)/MT(2) receptor knockout mice and comparison with MT(1) and MT(2) receptor knockout mice // Behavior. Brain Research. 2013. V. 243. P. 231–238. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.01.008
- 36. Мичурина С.В., Васендин Д.В., Ищенко И.Ю. Физиологические и биологические эффекты мелатонина: некоторые итоги и перспективы изучения // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2018. Т. 104. № 3. С. 257–271.

ГЕНЕТИКА том 57 № 3 2021

- Guissoni Campos L.M., Hataka A., Vieira I.Z. et al. Circadian Clock proteins and melatonin receptors in neurons and glia of the Sapajus apella cerebellum // Front. Physiol. 2018. V. 9. P. 5. https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00005
- Gibertini M., Graham C., Cook M.R. Self-report of circadian type reflects the phase of the melatonin rhythm // Biol. Psychol. 1999. V. 50. P. 19–33.
- Morera-Fumero A.L., Abreu-Gonzalez P., Henry-Benitez M. et al. Chronotype as modulator of morning serum melatonin levels // Actas Esp. Psychiatr. 2013. V. 41. № 3. P. 149–153.
- Simpkin C.T., Jenni O.G., Carskadon M.A. et al. Chronotype is associated with the timing of the circadian clock and sleep in toddlers // J. Sleep Res. 2014. V. 23. N
 № 4. P. 397–405. https://doi.org/10.1111/jsr.12142
- Burgess H.J., Fogg L.F. Individual differences in the amount and timing of salivary melatonin secretion // PLoS One. 2008. V. 3. P. e3055.
- 42. Заводнов О.П., Закружная М.А., Боташева Т.Л., Авруцкая В.В. Особенности мелатонинового обмена у женщин с различной хронофизиологической и стереофункциональной организацией репродуктивной системы и световая депривация в профилактике климактерического синдрома // Соврем. пробл. науки и образования: электронный науч. журн. 2012. № 2. [Электронный ресурс]. URL: http://www.science-education.ru/102-5487 (дата обращения 08.11.2012).
- Micic G., Lovato N., Gradisar M. et al. Nocturnal melatonin profiles in patients with delayed sleep-wake phase disorder and control sleepers // J. Biol. Rhythms. 2015. V. 30. № 5. P. 437–448.
- Micic G., Lovato N., Gradisar M. et al. Circadian melatonin and temperature taus in delayed sleep-wake phase disorder and non-24-hour sleep-wake rhythm disorder patients: an ultradian constant routine study // J. Biol. Rhythms. 2016. V. 31. № 4. P. 387–405. https://doi.org/10.1177/0748730416650069
- 45. Madaeva I.M., Semenova N.V., Solodova E.I. et al. Circadian rhythms of melatonin secretion in peri and postmenopausal women with insomnia // Intern. J. Biomedicine. 2017. V. 7. № 2. P. 126–130. https://doi.org/10.21103/Article7(2)_OA8
- 46. *Meliska C.J., Martinez L.F., Lopez A.M. et al.* Relationship of morningness-eveningness questionnaire score to melatonin and sleep timing, body mass index and atypical depressive symptoms in peri- and post-menopausal women // Psychiatry Res. 2011. V. 188. № 1. P. 88–95.
- 47. Parry B.L., Meliska C.J., Sorenson D.L. et al. Increased melatonin and delayed offset in menopausal depression: role of years past menopause, follicle-stimulating hormone, sleep end time, and body mass index // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2008. V. 93. № 1. P. 54–60.
- Xie Z., Chen F., Li W.A. et al. A review of sleep disorders and melatonin // Neurol. Res. 2017. V. 39(6). P. 559–565. https://doi.org/10.1080/01616412.2017.1315864
 - ГЕНЕТИКА том 57 № 3 2021

- 49. *Duffy J.F., Zeitzer J.M., Rimmer D.W. et al.* Peak of circadian melatonin rhythm occurs later within the sleep of older subjects // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2002. V. 282. № 2. P. E297–E303.
- Goldman S.E., Adkins K.W., Calcutt M.W. et al. Melatonin in children with autism spectrum disorders: endogenous and pharmacokinetic profiles in relation to sleep // J. Autism Dev. Disord. 2014. V. 44. P. 2525–2535. https://doi.org/10.1007/s10803-014-2123-9
- Holvoet E., Gabriels L. Disturbed sleep in children with ADHD: is there a place for melatonin as a treatment option? // Tijdschr. Psychiatr. 2013. V. 55. P. 349–357.
- 52. Мадаева И.М., Данусевич И.Н., Жамбалова Р.М., Колесникова Л.И. Мелатонин в терапии нарушений сна при возрастном эстрогендефицитном состоянии // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2017. Т. 117. № 5. С. 81–84. https://doi.org/10.17116/jnevro20171175181-84
- Bell-Pedersen D., Cassone V.M., Earnest D.J. et al. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms // Nat. Rev. Genetics. 2005. V. 6. P. 544–556.
- Jiang N., Wang Z., Cao J. et al. Effect of monochromatic light on circadian rhythmic expression of clock genes in the hypothalamus of chick // J. Photochem. Photobiol. B. 2017. V. 173. P. 476–484. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.06.027
- 55. Cao J., Bian J., Wang Z. et al. Effect of monochromatic light on circadian rhythmic expression of clock genes and arylalkylamine N-acetyltransferase in chick retina // Chronobiol. Int. 2017. V. 34. P. 1149–1157. https://doi.org/10.1080/07420528.2017.1354013
- 56. Ma S., Wang Z., Cao J. et al. BMAL1 but not CLOCK is associated with monochromatic green light-induced circadian rhythm of melatonin in chick pinealocytes // Endocr. Connect. 2019. V. 8(1). P. 57–68. https://doi.org/10.1530/EC-18-0377
- DeBruyne J.P., Noton E., Lambert C.M. et al. A clock shock: mouse CLOCK is not required for circadian oscillator function // Neuron. 2006. V. 50. P. 465–477. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.03.041
- Ozburn A.R., Purohit K., Parekh P.K. et al. Functional implications of the CLOCK 3111T/C single-nucleotide polymorphism // Front. Psychiatry. 2016. V. 7. P. 67. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2016.00067
- 59. Бочков Н.П., Пузырев В.П., Смирнихина С.А. Клиническая генетика. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. 592 с.
- Колесникова Л.И., Колесников С.И., Мадаева И.М., Семёнова Н.В. Этногенетические и молекулярнометаболические аспекты нарушений сна в климактерическом периоде. М.: РАН, 2019. 139 с.
- Боринская С.А., Янковский Н.К. Генетика и геномика человека. Популяции и этносы в пространстве и времени: эволюционные и медицинские аспекты // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2013. Т. 17. № 4-2. С. 930–942.

СЕМЁНОВА и др.

Clock Gene, Melatonin and the Sleep-Wake Cycle

N. V. Semenova^{*a*, *}, I. M. Madaeva^{*a*}, and L. I. Kolesnikova^{*a*}

^aScientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, 664003 Russia *e-mail: natkor 84@mail.ru

The review examines the role of the *Clock* gene and melatonin as participants in human circadian rhythms. The results of studies on the association of the *Clock* gene polymorphisms and the sleep-wake cycle, as well as circadian rhythms of melatonin secretion in different chronotypes and insomnia are presented. A hypothesis about the role of the *Clock 3111T/C* gene polymorphism in the formation of insomnia in Caucasian women living in Eastern Siberia is considered.

Keywords: Clock gene, melatonin, circadian rhythms, sleep, insomnia.

ОБЗОРНЫЕ И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 575.22

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ АКТИВНОСТИ PRC2 ПРИ ОНКОЛОГИИ: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

© 2021 г. Д. А. Четверина¹, Д. В. Ломаев¹, П. Г. Георгиев¹, М. М. Ерохин^{1, *}

¹Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334 Россия *e-mail: yermaxbio@yandex.ru Поступила в релакцию 30.04.2020 г.

> После доработки 22.06.2020 г. Принята к публикации 25.06.2020 г.

PRC2 (Polycomb repressive complex 2) является консервативным белковым комплексом у многоклеточных организмов, необходимым для поддержания репрессии генов. Каталитическая субъединица PRC2 – белок EZH2 – обеспечивает метилирование гистона H3K27me1/2/3. Показано, что ряд опухолей человека ассоциирован с гиперэкспрессией субъединиц PRC2, а также с мутациями, усиливающими каталитическую активность EZH2. В то же время группа опухолей коррелирует с мутациями, ингибирующими PRC2. Был разработан ряд низкомолекулярных ингибиторов к субъединицам PRC2, прежде всего к EZH2. Один из них, таземетостат, в январе 2020 г. был одобрен для лечения эпителиоидной саркомы в США. Данный обзор посвящен роли PRC2 в развитии рака и суммирует информацию по разработанным ингибиторам к PRC2.

Ключевые слова: Polycomb, PRC2, EZH2, рак, онкология, ингибиторы PRC2, ингибиторы EZH2, прогноз.

DOI: 10.31857/S0016675821030048

Поддержание профилей экспрессии генов в разных типах клеток необходимо для развития и нормального функционирования многоклеточных организмов. Контроль транскрипции генов в ядрах многоклеточных осуществляют различные факторы, в том числе эпигенетические регуляторы группы Polycomb – специфические репрессоры транскрипции [1–5]. Данные факторы были впервые описаны у дрозофилы как регуляторы экспрессии Нох-генов [5-8]. Дальнейшие исследования показали, что мишенями белков Polycomb являются многие гены, участвующие в разных клеточных процессах [5, 6]. Polycomb-факторы крайне консервативны в процессе эволюции и обладают большим сходством у всех многоклеточных организмов [2, 4, 5, 9].

Белки Polycomb функционируют в составе мультисубъединичных комплексов, которые привлекаются на хроматин. Одним из ключевых комплексов данной группы является Polycomb repressive complex 2 (PRC2) [10–12]. Коровый комплекс PRC2 млекопитающих состоит из белков EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog 2), SUZ12 (Suppressor of Zeste 12), EED (Embryonic Ectoderm Development) [13, 14]. Ферментативный компонент комплекса — метилтрансфераза EZH2, которая катализирует моно-, ди- и триметилирование 27-го лизина третьего гистона (H3K27me1/2/3). Каталитическим участком белка EZH2 является консервативный SET-домен (Su(var)3-9, Enhancer of Zeste, Trithorax) [13–17]. Метилтрансферазная активность EZH2 требует присутствия кофакторов SUZ12 и EED [13, 14, 18–20]. EED, помимо участия в каталитической активности EZH2, специфически взаимодействует с гистонами, несущими модификацию H3K27me3, что стимулирует связывание PRC2-комплекса с хроматином [21].

Белки EZH2, EED и SUZ12 являются критичными для развития млекопитающих — эмбрионы мышей с делециями генов *EZH2, EED* и *SUZ12* нежизнеспособны и гибнут в течение постимплантационного периода [20, 22, 23].

У млекопитающих имеется гомолог фактора EZH2 – белок EZH1 (Enhancer of Zeste Homolog 1), который может замещать EZH2 в составе PRC2. EZH1-содержащий PRC2 обладает гораздо меньшей метилтрансферазной активностью [24] и нокаутные по гену *EZH1* мыши выживают и размножаются [25]. Однако EZH1 может замещать EZH2 в терминально дифференцированных миобластах, где EZH2 не экспрессируется [26], и в клетках, где экспрессия EZH2 нарушена [24, 27].

Многочисленные исследования показали, что нарушение функций PRC2-комплекса связано с высокими рисками возникновения онкологических заболеваний. Данные нарушения включают как гиперэкспрессию генов, кодирующих PRC2, так и мутации, приводящие либо к усилению каталитической активности, либо к ингибированию PRC2. Было показано, что подавление активности данного комплекса приводит к ингибированию роста ряда опухолей. Это послужило основой для создания низкомолекулярных ингибиторов, подавляющих активность PRC2, многие из которых в настоящий момент проходят клинические испытания [28, 29]. Первый такой препарат — таземетостат — в январе 2020 г. получил одобрение для применения в медицинской практике в США [30–32].

Несмотря на большой прогресс, достигнутый в последние годы в вопросах изучения белков группы Polycomb, остается еще много нерешенных вопросов. Детализация механизмов действия репрессоров данного класса поможет лучше понять принципы функционирования генома многоклеточных и даст необходимую информацию для создания новых подходов в диагностике и терапии онкологических заболеваний.

НАРУШЕНИЯ PRC2 ПРИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

В настоящее время описана как онкогенная, так и онкосупрессорная роль PRC2 [4, 33–36].

Анализ уровней экспрессии коровых компонентов комплекса PRC2, а также изменений на уровне ДНК в разных опухолях продемонстрировал гетерогенность изменений PRC2 в разных типах рака. Показано, что в зависимости от типа рака может наблюдаться как активация, так и ингибирование функций PRC2. Ряд опухолей характеризуется гиперэкспрессией компонентов PRC2, а также GOFмутациями (gain-of-function, мутация приобретения функции), приводящими к усилению каталитической активности EZH2. Такие изменения предполагают онкогенную роль PRC2 (табл. 1). В то же время ряд опухолей ассоциирован с LOF-мутациями (loss-of-function, мутация потери функции), такими как делеция гена или нарушение рамки считывания, приводящими к ингибированию активности PRC2, предполагая онкосупрессорную роль PRC2 в данных случаях (табл. 2).

Изменения, ассоциированные с усилением функции PRC2

Гиперэкспрессия EZH2

Наиболее изученным компонентом PRC2 в плане изменения транскрипции и наличия мутаций является EZH2. В норме экспрессия EZH2 контролируется RB–E2F сигнальным путем, и высокий уровень экспрессии характерен для активно делящихся клеток, снижаясь на более поздних этапах развития [24, 37]. Впервые гиперэкспрессия EZH2 была выявлена для рака простаты [71]. Дальнейшие исследования показали, что высокий уровень экспрессии EZH2 характерен для многих видов [37–70, 72– 76, 78, 80] рака (табл. 1). Гиперэкспрессия EZH2 сопровождается повышенным уровнем метилирования H3K27me3.

Высокий уровень экспрессии EZH2 в ряде образцов опухолей (мочевого пузыря, фолликулярной лимфомы, глиобластомы, рака груди, прямой кишки, желудка, гортани, легких, предстательной железы) ассоциирован с амплификацией *EZH2*-кодирующего гена [37, 40, 72] (табл. 1).

Гиперэкспрессия EZH2 связана с негативными прогнозами при мантийноклеточной лимфоме [41, 42], миеломе [44], холангиокарциноме [62], меланоме [46], раке мочевого пузыря [38], молочной железы [49–51], ЖКТ [53, 55–57], почек [59], гортани [60], легких [39, 63–65], яичника [68], предстательной железы [46, 70, 71], щитовидной железы [74], матки [46, 75] (табл. 1).

Гиперэкспрессия EED и SUZ12

Показано, что кроме EZH2 нарушения при онкологии могут затрагивать EED и SUZ12 субъединицы PRC2. Ряд клинических данных свидетельствует о связи гиперэкспрессии SUZ12 с мантийноклеточной лимфомой [78], раком мочевого пузыря [38, 77], молочной железы [79], ЖКТ [53, 80], легких [65, 81], яичников [67, 68], предстательной железы [70]. Для большинства данных онкологий показана связь гиперэкспрессии SUZ12 с негативным прогнозом. Гиперэкспрессия EED ассоциирована с раком молочной железы [52], ЖКТ [53], легких [65], яичников [67]. При раке толстой кишки избыточная экспрессия EED коррелировала с плохим прогнозом [53] (табл. 1).

GOF-мутации EZH2

Отдельным классом изменений, сопровождающихся усилением каталитической активности PRC2, являются GOF-мутации EZH2, которые были обнаружены в определенном типе неходжкинских лимфом (диффузная B-крупноклеточная лимфома (DLBCL) и фолликулярные лимфомы) [40, 82–89]. При этом наиболее часто наблюдает-ся моноаллельная мутация SET-домена в позиции Y641 \rightarrow F,N,H,S относительно изоформы C (обозначается как Y646 относительно изоформы A) [40, 82, 83, 86–89]. Встречаются также функционально сходные замены аминокислот A677 и A687 [40, 82, 85, 87, 113, 114].

Было показано, что немутированный EZH2 предпочтительно использует в качестве субстрата для метилирования H3K27me0/me1 нуклеосомы, в то время как EZH2 с заменой Y641 обладает усиленной каталитической активностью в отноше-

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ АКТИВНОСТИ PRC2

Орган/ткань	Тип рака	Прогноз			
Гиперэкспрессия EZH2					
Мочевой пузырь	Рак мочевого пузыря [37-39]; амплификация [37]	Негативный прогноз [38]			
Кровь	Фолликулярная лимфома [40]; амплификация [40]	Нет данных (НД)			
	Мантийноклеточная лимфома [41, 42]	Негативный прогноз [41, 42]			
	T/NK-клеточные лимфопролиферативные заболевания [43]	НД			
	Миелома [44]	Негативный прогноз [44]			
ЦНС	Глиобластома [37, 45]; амплификация [37]	НД			
Молочная железа	Рак молочной железы [37, 46-52]; амплификация [37]	Негативный прогноз [49—51]			
ЖКТ	Рак толстой и прямой кишки [37, 39, 53–55]; амплификация [37]	Негативный прогноз [53, 55]			
	Рак желудка [37, 56, 57]; амплификация [37]	Негативный прогноз [56, 57]			
Глаз	Ретинобластома [58]	НД			
Почки	Рак почки [37, 59]	Негативный прогноз [59]			
Гортань	Рак гортани [60]; амплификация [37]	Негативный прогноз [60]			
Печень	Гепатоцеллюлярная карцинома [61]	Нет корреляции [61]			
	Холангиокарцинома [62]	Негативный прогноз [62]			
Легкие	Рак легких [37, 39, 63–65]; амплификация [37]	Негативный прогноз [39, 63-65]			
Мышцы	Рабдомиосаркома [66]	нд			
Яичники	Рак яичников [67—69]	Негативный прогноз [68]			
Предстательная железа	Рак предстательной железы [45, 46, 70, 71]; амплификация [72]	Негативный прогноз [46, 70, 71]			
Кожа	Меланома [37, 46]	Негативный прогноз [46]			
Семенники	Рак яичка [37]; амплификация [37]	НД			
Щитовидная железа	Рак щитовидной железы [37, 73, 74]	Негативный прогноз [74]			
Матка	Рак шейки матки, карцинома эндометрия [37, 46, 75, 76]	Негативный прогноз [46, 75]			
	Гиперэкспрессия Suz12				
Мочевой пузырь	Рак мочевого пузыря [38, 77]	Негативный прогноз [38, 77]			
Кровь	Мантийноклеточная лимфома [78]	НД			
Молочная железа	Рак молочной железы [79]	НД			
ЖКТ	Рак желудка [80]	Негативный прогноз [80]			
	Рак толстой и прямой кишки [53]	Негативный прогноз [53]			
Легкие	Рак легких [65, 81]	нд			
Яичники	Рак яичников [67, 68]	Негативный прогноз [68]			
Предстательная железа	Рак предстательной железы [70]	Негативный прогноз [70]			
Гиперэкспрессия ЕЕD					
Молочная железа	Рак молочной железы [52]	НД			
ЖКТ	Рак толстой и прямой кишки [53]	Негативный прогноз [53]			
Легкие	Рак легких [65]	НД			
Яичники	Рак яичников [67]	НД			
GOF-мутации EZH2					
Кровь	Неходжкинские лимфомы (диффузная В-крупноклеточная лимфома (DLBCL) и фолликулярные лимфомы (FL)) [40, 82–89]	FL – не ассоциирован с плохим прогнозом [83]; DLBCL – позитивный прогноз [88]			
GOF-мутации EZH1					
Щитовидная железа	Аденома щитовидной железы [90]	НД			

Таблица 1. Нарушения при онкологии, ассоциированные с гиперфункцией PRC2

Орган/ткань	Тип рака	Прогноз		
	LOF-мутации EZH2			
Кровь	Т-острый лимфобластный лейкоз [91, 92]	Нет данных (НД)		
	Острый миелоидный лейкоз [93]	НД		
	Миелодиспластические/миелопролиферативные заболевания (МДС/МПЗ) [94—99]	Негативный прогноз [94–99]		
	LOF-мутации SUZ12	I		
Кровь	Т-острый лимфобластный лейкоз [91, 92]	НД		
	Острый миелоидный лейкоз [93]	НД		
	Миелодиспластические/миелопролиферативные заболевания (МДС/МПЗ) [97, 100]	нд		
ЦНС	Глиобластома [101]	НД		
Нервная система	Злокачественные опухоли оболочки периферических нервов [101–103]	нд		
Кожа	Меланома [101]	НД		
Матка	Эндометриальная стромальная саркома: JAZF1-SUZ12 слияние [104–106], MEAF6-SUZ12 слияние [107]	НД		
	LOF-мутации EED	I		
Кровь	Т-острый лимфобластный лейкоз [92]	НД		
-	Миелодиспластические/миелопролиферативные заболевания (МДС/МПЗ) [97, 100, 108]	Негативный прогноз [108]		
ЦНС	Глиобластома [101]	НД		
Нервная система	Злокачественные опухоли оболочки периферических нервов [101, 102]	нд		
Кожа	Меланома [101]	НД		
Мутации НЗК27М				
Кровь	Острый миелоидный лейкоз [109]	НД		
ЦНС	Глиобластома [110—112]	Негативный прогноз [111]		

|--|

нии H3K27me2 и сниженной в отношении H3K27me1/H3K27me0 нуклеосом. В случае гетерозиготы по Y641 нормальный аллель предоставляет субстрат для мутантной формы EZH2, что приводит к повышенному уровню триметилированных H3K27me3 нуклеосом [115, 116].

Однако несмотря на широкое распространение мутации Y641, ее наличие в лимфомах не коррелирует с негативным прогнозом в фолликулярных лимфомах [83] и ассоциировано с позитивным прогнозом для DLBCL [88].

GOF-мутации EZH1

EZH1 и EZH2 присутствуют в аналогичных комплексах PRC2 с перекрывающимися геномными мишенями, но мутации при раке более часто затрагивают EZH2. Вероятно, это связано, в том числе, с преимущественной ассоциацией EZH2 с пролиферативными тканями по сравнению с более равномерной экспрессией EZH1 в разных типах клеток [24]. Тем не менее GOF-мутации EZH1 (Q571R) были обнаружены в аденомах щитовидной железы [90]. Показано, что такая мутация приводит к увеличению количества H3K27me3.

Механизмы онкогенного влияния PRC2

Экспериментально было продемонстрировано, что гиперэкспрессия EZH2 способствует клеточной пролиферации как *in vitro* [37, 49], так и *in vivo* [117–119]. Также показана необходимость активности EZH2 для поддержания статуса стволовых раковых клеток [118]. Гиперэкспрессия EZH2 может стимулировать инвазию клеток [49] и метастазирование [120], а также влиять на репарацию повреждений ДНК [118]. Кроме того, GOF-мутации могут усиливать МҮС- и BCL-2-опосредованный лимфомагенез у мышей [117, 121]. Проведенные исследования показали, что онкогенная роль PRC2 заключается в подавлении транскрипции многих онкосупрессоров. При этом конкретный набор ингибируемых онкосупрессоров сильно зависит от типа клеток. Например, PRC2 подавляет транскрипцию онкосупрессора CDKN2A в лимфоидных новообразованиях, клетках рака простаты и эндометрия (суммировано в [34]).

Ряд исследований показал, что раковые клеточные линии зависят от активности PRC2. К примеру, нокдаун или нокаут EZH2 или других основных компонентов PRC2, а также подавление активности EZH2 с помощью низкомолекулярных ингибиторов уменьшают пролиферацию клеточных линий, полученных из различных типов рака [37, 39, 45, 71, 79, 122–124]. Инактивация PRC2 подавляет рост опухолей на различных моделях *in vivo*, что предполагает возможность использования ингибиторов PRC2 в лечении рака [45, 69, 79, 125–127].

Изменения, ассоциированные с потерей функции PRC2

LOF-мутации EZH2

Хотя амплификации и повышающие уровень метилирования H3K27 точечные мутации EZH2 широко распространены при разных видах рака, в ряде опухолей наблюдаются, напротив, изменения, инактивирующие EZH2 (LOF-мутации), что предполагает онкосупрессорную функцию EZH2 в данных новообразованиях. Данный тип мутаций представлен делециями и нонсенс-мутациями.

К примеру, LOF-мутации EZH2 были выявлены при Т-остром лимфобластном [91, 92] и остром миелоидном [93] лейкозах, при миелодиспластических/миелопролиферативных заболеваниях крови (МДС/МПЗ) [94–99]. Показано, что изменения такого типа ассоциированы с плохими клиническими прогнозами при МДС/МПЗ [94– 99] (табл. 2).

LOF-мутации SUZ12, EED

В ряде опухолей LOF-мутации обнаружены для SUZ12 и EED субъединиц PRC2. Как и в случае с EZH2, нарушения SUZ12 и EED ассоциированы с онкологическими заболеваниями крови [91–93, 97, 100, 108]. Для LOF-мутаций EED при МДС/МПЗ заболеваниях крови установлена корреляция с негативным прогнозом [108]. Кроме того, LOF-мутации SUZ12 и EED обнаружены при глиобластоме, меланоме [101] и злокачественных опухолях оболочки периферических нервов [101– 103]. При эндометриальной стромальной саркоме нарушения SUZ12 характеризуются слиянием гена *SUZ12* в одну рамку считывания с генами *JAZF1*

ГЕНЕТИКА том 57 № 3 2021

[104—106] или *MEAF6* [107] в результате хромосомных транслокаций.

Таким образом, наряду с EZH2 нарушения функций SUZ12 и EED могут играть важную роль в различных типах рака. Тем не менее систематический анализ изменений EED и SUZ12 при онкологических заболеваниях и установление их сходного влияния с EZH2 на прогноз течения заболеваний при различных видах рака требуют дополнительных исследований.

Мутации субстрата НЗК27М

Кроме нарушений в экспрессии и мутаций компонентов комплекса PRC2 при раке были обнаружены мутации в генах *H3F3A* и *HIST1H3B* (кодируют варианты гистонов H3.3 и H3.1 соответственно), приводящие к замене лизина на метионин (H3K27M) в позиции H3K27. Такие мутации были обнаружены в 80% детских глиом [110–112] и в 6% вторичных острых миелоидных лейкемий [109].

Показано, что H3K27M взаимодействует с EZH2 и ингибирует метилтрансферазную активность всего PRC2-комплекса, что приводит к снижению общего уровня H3K27me3 *in vivo* и *in vitro* [128–131]. Также было продемонстрировано, что комплекс PRC2 способен метилировать EZH2 по остаткам EZH2-K510 и EZH2-K514, что стимулирует активность PRC2 в отношении гистонов. При этом в клеточных линиях с мутациями H3K27M такое автометилирование нарушено [132].

Сходно с H3K27M действует недавно описанный фактор, ингибирующий активность PRC2 – белок EZHIP (EZH2 Inhibitory Protein). Было показано, что данный фактор гиперэкспрессирован в клетках эпендимом [133–136]. Предполагается, что участок EZHIP имитирует структуру H3K27M и ингибирует активность PRC2 сходным образом.

Механизмы онкосупрессорного влияния PRC2

В отличие от онкогенной роли повышенной активности PRC2 при раке, об эффектах инактивации PRC2 известно меньше. Однако PRC2-регулируемые гены-мишени, такие как известные онкогены HOXA9 и MYC, гиперэкспрессированы в некоторых типах опухолей [91, 97, 101, 137].

Было показано, что гипоморфные мутации по *EED* у мышей существенно ускоряют образование лимфоидных опухолей после обработки канцерогенами [128]. На примере трансгенных мышей было показано, что делеции генов *EZH2* или *EED* взаимодействуют с мутацией онкогена *NRAS*(*Q61K*), а также усиливают активацию STAT3-сигнального пути, что приводит к образованию острых миелоидных лейкозов [138]. Сходным образом, комбинация делеций генов *EZH2/RUNX1* и *EZH2/p53* на мышиных моделях приводит к образованию лимфомиелоидных лейкемий, устойчивых к лечению [139, 140]. Для другого компонента PRC2 – *SUZ12* – недавно было продемонстрировано, что CRISPR/Cas9-опосредованная инактивация данного гена взаимодействует с мутацией фактора JAK3, что приводит к развитию Т-острого лимфобластного лейкоза [141]. Также имеются данные о потере активности PRC2-комплекса и снижении уровня H3K27me3 при нарушениях других генов, как это наблюдается при инактивации гена *ASXL1* [142] или при гиперэкспрессии фактора HMGN1 [143] при лейкозах.

Кроме того, потеря EZH2 заметно способствует индуцированному мутацией RUNX1 миелодиспластическому синдрому [144]. Потеря активности SUZ12 сопряжена с мутацией гена *NF1* в опухолях периферических нервов, глиоме и меланоме [101]. Ген *NF1* кодирует ГТФазу, активирующую ген *ras*, и мутации по данному фактору запускают Ras-зависимую активацию канцерогенеза [145]. Таким образом, в зависимости от контекста опухоли, а также мутаций других генов ингибирование функции PRC2 может приводить к возникновению злокачественных трансформаций [146, 147]. При этом образование опухолей сопряжено с потерей функции EZH2, SUZ12 или EED.

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИНГИБИТОРЫ PRC2

В связи с обнаружением большого числа мутаций при онкологических заболеваниях, связанных с усилением активности комплекса PRC2, были разработаны различные низкомолекулярные ингибиторы, подавляющие активность данного комплекса.

Первым экспериментально исследованным ингибитором EZH2 стал DZNep – вещество, изначально разработанное для ингибирования активности вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Было установлено, что DZNep эффективно снижает уровень H3K27me3 в раковых клеточных линиях [148]. Однако последующие исследования показали, что DZNep блокирует общий уровень метилирования гистонов в разных аминокислотных позициях [149]. Поэтому дальнейшие усилия были направлены на поиск веществ, специфично подавляющих активность PRC2 (табл. 3).

В 2012 г. несколько независимых групп исследователей сообщили о создании специфичных ингибиторов, которые конкурируют с кофактором S-аденозилметионином (SAM) за селективное связывание с SET-доменом EZH2. Разработанные ингибиторы EPZ005687 [150], GSK126 [151] и EI1 [152] в экспериментах *in vitro* подавляли активность EZH2 в 50–150 раз эффективнее, чем активность EZH1, и были в 500–>10000 раз более специфичны к EZH2, чем к другим протестированным метилтрансферазам. При этом все разработанные вещества были способны ингибировать метилтрансферазную активность EZH2 как дикого типа, так и GOF-мутантов по позиции Y641 SET-домена. Для созданных ингибиторов было показано подавление роста ряда клеточных линий, происходящих из лимфоидных новообразований. Для ингибитора EI1 было показано, что обработка клеток данным веществом сравнима по эффекту с полной делецией гена EZH2 при оценке уровня обогащения НЗК27те3 [152]. На примере ингибитора GSK126 было подтверждено его влияние на подавление роста опухолей in vivo с применением метода ксенотрансплантации, при котором в организм мышей вводились клетки опухоли человека линии KARPAS422, несущие мутацию Y641 в SET-домене EZH2 [151].

Ингибитор EZH2 – EPZ-6438 (зарегистрированный в дальнейшем как таземетостат) также направлен на метилтрансферазный SET-домен EZH2. Активность EPZ-6438 была протестирована на примере солидных опухолей [124]. В качестве модели были использованы клетки рабдоидных опухолей (malignant rhabdoid tumors (MRTs)) с нарушением функции гена SMARCB1 – одного из компонентов хроматин-ремоделирующего комплекса SWI/SNF из группы Trithorax. Делеция гена SMARCB1 часто встречается в опухолях данного класса [160] и обусловливает высокую чувствительность клеток опухоли к подавлению активности EZH2 [161]. На данном примере было показано ингибирование роста клеток опухолей как in vitro (4 линии с мутацией SMARCB1), так и *in vivo* (с использованием ксенотрансформантов). Ингибирование активности EZH2 EPZ-6438 приводило к уменьшению общего количества H3K27me3 и реактивации транскрипции ряда репрессированных генов у ксенотрансформантных мышей. В дальнейшем аналогичный эффект ингибитора EPZ-6438 был продемонстрирован и для клеточных раковых линий, происходящих из лимфом [153].

Таким образом, разработка высокоспецифичных ингибиторов, подавляющих активность EZH2, привела к созданию ряда веществ, действие которых нацелено только на EZH2 и имеет минимальные эффекты блокирования других метилтрансфераз. Однако применение таких веществ имеет и слабую сторону: они показывают малое сродство к EZH1 – близкому паралогу EZH2. Было показано, что в ряде случаев при нарушении активности EZH2 EZH1 может замещать данный фактор в PRC2-комплексе. Данный факт привел к разработке ряда низкомолекулярных веществ, активность которых направлена либо на подавление активности обоих факторов – EZH2 и EZH1, либо на дестабилизацию всего PRC2-комплекса.

Первым разработанным ингибитором, активным в отношениях как EZH2, так и EZH1, стал

Таблица 3. Низкомолекулярные ингибиторы PRC2

Ингибитор	Механизм действия	Специфичность	Модели, на которых показано подавление роста раковых клеток	Ссылки
EPZ005687	Ингибирование метилтрансферазного SET-домена	SET-домен EZH2	In vitro: линии лимфом	[150]
GSK126	То же	То же	<i>In vitro</i> : панель из 46 линий лимфом. <i>In vivo</i> : ксенотрансфор- манты (клетки линии лимфомы KARPAS422)	[151]
EI1	»	»	In vitro: линии лимфом	[152]
ЕРZ-6438/ таземетостат	»	»	<i>In vitro</i> : панель из 10 линий лимфом, линии рабдоидных опухолей с мутацией гена <i>SMARCB1. In vivo</i> : ксенотранс- форманты (клетки линии лимфомы WSU-DLCL2, линии рабдоидных опухолей G401)	[124, 153]
UNC1999	»	SET-домен EZH2, частично SET-домен EZH1	In vitro: линия лимфомы DB	[154]
OR-S1 и OR-S2	»	SET-домены EZH2 и EZH1	<i>In vitro</i> : панель из 192 раковых линий (рак крови и солидные опухоли). <i>In vivo</i> : ксенотранс- форманты (клетки рабдоидных опухолей, рака желудка и острого миелоидного лейкоза)	[155, 156]
SAH-EZH2	Блокатор взаимодействия EED–EZH2	Участок EED, связывающий EZH2	<i>In vitro</i> : линии лимфом, линии лейкемии с транслокацией MLL-AF9	[123]
A-395	Блокатор взаимодействия EED-H3K27me3	Участок EED, связывающий H3K27me3	<i>In vitro</i> : линии лимфом и множественных миелом. <i>In vivo</i> : ксенотрансформанты (клетки линии лимфомы Pfeiffer)	[157]
EED226	То же	То же	<i>In vitro</i> : линии лимфом и множественных миелом. <i>In vivo</i> : ксенотрансформанты (клетки линии лимфомы Karpas422)	[158]
MS1943	Деградация EZH2 методом "гидрофобного тагирования"	EZH2	<i>In vitro</i> : линии лимфомы и рака молочной железы. <i>In vivo</i> : ксенотрансформанты (клетки линии тройного негативного рака молочной железы MDA-MB-468)	[159]

UNC1999. На клеточных линиях из лимфоидных новообразований была показана его способность снижать уровень H3K27me3 и подавлять рост раковых клеток [154]. В дальнейшем были созданы альтернативные ингибиторы, подавляющие активность EZH2 и EZH1 - OR-S1 и OR-S2 [155, 156]. Анализ ингибирования роста раковых клеток при обработке ингибитором OR-S2 был проведен на большом наборе клеточных линий [156]. В результате был установлен цитотоксический эффект на 33 из 68 линий, происходящих из рака крови (лейкемия, лимфома и миелома). Подобный анализ был проведен и для клеточных линий, происходящих из солидных опухолей. Здесь эффект ингибирования роста при блокировании активностей EZH1/EZH2 был продемонстрирован для 26 из 124 линий. В частности, цитотоксический эффект был показан для клеток, происходящих из рака молочной железы, легких, яичников и простаты. Цитотоксические эффекты OR-S1 и OR-S2 для раковых клеток также были подтверждены на ксенотрасформантных моделях для рака желудка, рабдоидных опухолей и острого миелоидного лейкоза [155, 156].

Определение пространственной структуры комплекса PRC2 [21, 162, 163] открыло возможность создания низкомолекулярных ингибиторов, используя несколько новаторских подходов. Вопервых, был сконструирован пептид (SAH-EZH2), имитирующий пространственную структуру участка белка EED, который отвечает за связывание с EZH2 [123]. Обработка клеток таким низкомолекулярным соединением приводит к нарушению формирования комплекса PRC2, уменьшению количества H3K27me3 и ингибированию роста клеток рака крови и ретинобластомы [123, 164].

Другой мишенью для создания ингибиторов стал участок молекулы EED, который взаимодействует с метилированным лизином в позиции H3K27 и важен для связывания PRC2 с хроматином. Были разработаны и исследованы два таких вещества – А-395 и EED226 [157, 158]. Оба ингибитора показали схожие эффекты с веществами, нацеленными на метилтрансферазный домен EZH2 (с ингибиторами EI1. EPZ-6438 и GSK126) в отношении лимфоидных раковых линий. Важно, что на примере ингибитора А-395 было показано, что он обладает высокой цитотоксичностью на клеточную линию KARPAS422, прошедшую селекцию на устойчивость к блокатору метилтрансферазной активности EZH2 – GSK126. Таким образом, сочетание ингибиторов, нацеленных на разные участки комплекса PRC2, может помочь избежать формирования лекарственной устойчивости опухолей к препаратам данного класса [157].

Также для разработки ингибитора активности PRC2 был применен метод "гидрофобного тагирования" (hydrophobic tagging, HyT). Данный метод основан на создании бифункциональной химерной молекулы, одна часть которой специфично связывается с интересующим белком-мишенью, а другая часть (гидрофобный таг) - с белковыми шаперонами, которые привлекают компоненты протеасомы, что приводит к деградации интересующего белка [165]. С помощью данного метода был разработан ингибитор MS1943, специфичный к EZH2 [159]. Обработка клеток MS1943 приводит к падению уровня EZH2 и модификации H3K27me3. Показано, что в отличие от ингибиторов метилтрансферазного SET-домена EZH2 MS1943 обладает цитотоксическим действием в отношении клеток линии тройного негативного рака молочной железы MDA-MB-468. Таким образом, блокирование метилтрансферазной активности и деградация EZH2 могут иметь разные биологические и терапевтические эффекты, что может быть использовано в медицинской практике при комбинировании различных препаратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Исследование механизмов репрессии генов и нарушения, связанные с этими процессами, открывают новые перспективы в прогнозировании и терапии многочисленных патологических состояний. На сегодняшний день понятно, что репрессоры группы Polycomb играют ключевую роль в поддержании и контроле клеточного гомеостаза. Достигнутый прогресс в изучении Polycomb-факторов привел к разработке нескольких низкомолекулярных веществ, имеющих большой потенциал в терапевтическом применении. Однако существует еще много вопросов, на которые необходимо ответить для лучшего понимания и дальнейшего использования свойств данных транскрипционных регуляторов. Каким образом PRC2 рекрутируется на хроматин в строго определенные места генома, которые при этом отличаются в разных типах клеток? Являются ли гистоновые белки главными таргетами метилтрансфераз EZH2/EZH1 или набор мишеней данных факторов гораздо шире? Почему клетки одного типа рака устойчивы к ингибиторам PRC2, а другие – крайне чувствительны? Ответы на эти вопросы позволят лучше разобраться в деталях функционирования Polycombрепрессоров и использовать полученные данные в диагностике и терапии разнообразных заболеваний.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 18-74-10091).

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. Bracken A.P., Brien G.L., Verrijzer C.P. Dangerous liaisons: interplay between SWI/SNF, NuRD, and Polycomb in chromatin regulation and cancer // Genes Dev. 2019. V. 33. № 15–16. P. 936–959. https://doi.org/10.1101/gad.326066.119
- 2. *Grossniklaus U., Paro R.* Transcriptional silencing by polycomb-group proteins // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2014. V. 6. № 11. P. a019331. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019331
- Kuroda M.I., Kang H., De S., Kassis J.A. Dynamic competition of polycomb and trithorax in transcriptional programming // Annu. Rev. Biochem. 2020. V. 89. P. 235–253.

https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-120219-103641

- 4. *Piunti A., Shilatifard A.* Epigenetic balance of gene expression by Polycomb and COMPASS families // Science. 2016. V. 352. № 6290. P. aad9780. https://doi.org/10.1126/science.aad9780
- 5. Schuettengruber B., Bourbon H.M., Di Croce L., Cavalli G. Genome regulation by polycomb and trithorax: 70 years and counting // Cell. 2017. V. 171. № 1. P. 34–57. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.002
- 6. *Chetverina D.A., Elizar'ev P.V., Lomaev D.V. et al.* Control of the gene activity by polycomb and trithorax group proteins in Drosophila // Genetika. 2017. V. 53. № 2. P. 133–154.
- 7. *Erokhin M., Georgiev P., Chetverina D.* Drosophila DNA-binding proteins in polycomb repression // Epigenomes. 2018. V. 2. № 1. P. 1. https://doi.org/10.3390/epigenomes2010001
- Kassis J.A., Kennison J.A., Tamkun J.W. Polycomb and trithorax group genes in Drosophila // Genetics. 2017. V. 206. № 4. P. 1699–1725. https://doi.org/10.1534/genetics.115.185116
- Mozgova I., Hennig L. The polycomb group protein regulatory network // Annu. Rev. Plant Biol. 2015. V. 66. P. 269–296. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-115627
- Deevy O., Bracken A.P. PRC2 functions in development and congenital disorders // Development. 2019. V. 146. № 19.
 https://doi.org/10.1242/doi/181254

https://doi.org/10.1242/dev.181354

- 11. *Kouznetsova V.L., Tchekanov A., Li X. et al.* Polycomb repressive 2 complex–molecular mechanisms of function // Protein Sci. 2019. V. 28. № 8. P. 1387–1399. https://doi.org/10.1002/pro.3647
- 12. *Yu J.R., Lee C.H., Oksuz O. et al.* PRC2 is high maintenance // Genes Dev. 2019. V. 33. № 15–16. P. 903–935.

https://doi.org/10.1101/gad.325050.119

- 13. *Czermin B., Melfi R., McCabe D. et al.* Drosophila enhancer of zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites // Cell. 2002. V. 111. № 2. P. 185–196.
- 14. *Muller J., Hart C.M., Francis N.J. et al.* Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group

ГЕНЕТИКА том 57 № 3 2021

repressor complex // Cell. 2002. V. 111. № 2. P. 197–208.

- 15. Cao R., Wang L., Wang H. et al. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing // Science. 2002. V. 298. № 5595. P. 1039–1043. https://doi.org/10.1126/science.1076997
- Ferrari K.J., Scelfo A., Jammula S. et al. Polycomb-dependent H3K27me1 and H3K27me2 regulate active transcription and enhancer fidelity // Mol. Cell. 2014. V. 53. № 1. P. 49–62. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.10.030
- 17. Kuzmichev A., Nishioka K., Erdjument-Bromage H. et al. Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the enhancer of zeste protein // Genes Dev. 2002. V. 16. № 22. P. 2893–2905. https://doi.org/10.1101/gad.1035902
- Cao R., Zhang Y. SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex // Mol. Cell. 2004. V. 15. № 1. P. 57–67. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.06.020
- Montgomery N.D., Yee D., Chen A. et al. The murine polycomb group protein Eed is required for global histone H3 lysine-27 methylation // Curr. Biol. 2005. V. 15. № 10. P. 942–947. https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.04.051
- Pasini D., Bracken A.P., Jensen M.R. et al. Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity // EMBO J. 2004. V. 23. N

 № 20. P. 4061–4071. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600402
- Margueron R., Justin N., Ohno K. et al. Role of the polycomb protein EED in the propagation of repressive histone marks // Nature. 2009. V. 461. № 7265. P. 762–767. https://doi.org/10.1038/nature08398
- 22. Faust C., Schumacher A., Holdener B., Magnuson T. The eed mutation disrupts anterior mesoderm production in mice // Development. 1995. V. 121. № 2. P. 273–285.
- O'Carroll D., Erhardt S., Pagani M. et al. The polycomb-group gene Ezh2 is required for early mouse development // Mol. Cell Biol. 2001. V. 21. № 13. P. 4330–4336. https://doi.org/10.1128/MCB.21.13.4330-4336.2001
- 24. *Margueron R., Li G., Sarma K. et al.* Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms // Mol. Cell. 2008. V. 32. № 4. P. 503–518.

https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.11.004

- 25. Ezhkova E., Lien W.H., Stokes N. et al. EZH1 and EZH2 cogovern histone H3K27 trimethylation and are essential for hair follicle homeostasis and wound repair // Genes Dev. 2011. V. 25. № 5. P. 485–498. https://doi.org/10.1101/gad.2019811
- 26. Son J., Shen S.S., Margueron R., Reinberg D. Nucleosome-binding activities within JARID2 and EZH1 regulate the function of PRC2 on chromatin // Genes Dev. 2013. V. 27. № 24. P. 2663–2677. https://doi.org/10.1101/gad.225888.113

- 27. Shen X., Liu Y., Hsu Y.J. et al. EZH1 mediates methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency // Mol. Cell. 2008. V. 32. № 4. P. 491-502. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.10.016
- 28. Genta S., Pirosa M.C., Stathis A. BET and EZH2 inhibitors: Novel approaches for targeting cancer // Curr. Oncol. Rep. 2019. V. 21. № 2. P. 13. https://doi.org/10.1007/s11912-019-0762-x
- 29. Richart L., Margueron R. Drugging histone methyltransferases in cancer // Curr. Opin. Chem. Biol. 2020. V. 56. P. 51-62. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.11.009
- 30. Hov S.M. Tazemetostat: First approval // Drugs. 2020. V. 80. № 5. P. 513–521. https://doi.org/10.1007/s40265-020-01288-x
- 31. Italiano A. Targeting epigenetics in sarcomas through EZH2 inhibition // J. Hematol. Oncol. 2020. V. 13. № 1. P. 33. https://doi.org/10.1186/s13045-020-00868-4
- 32. Rothbart S.B., Baylin S.B. Epigenetic therapy for epithelioid sarcoma // Cell. 2020. V. 181. № 2. P. 211. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.042
- 33. Comet I., Riising E.M., Leblanc B., Helin K. Maintaining cell identity: PRC2-mediated regulation of transcription and cancer // Nat. Rev. Cancer. 2016. V. 16. № 12. P. 803-810. https://doi.org/10.1038/nrc.2016.83
- 34. Kim K.H., Roberts C.W. Targeting EZH2 in cancer // Nat. Med. 2016. V. 22. № 2. P. 128–134. https://doi.org/10.1038/nm.4036
- 35. Lue J.K., Amengual J.E. Emerging EZH2 inhibitors and their application in lymphoma // Curr. Hematol. Malig. Rep. 2018. V. 13. № 5. P. 369–382. https://doi.org/10.1007/s11899-018-0466-6
- 36. Yamagishi M., Uchimaru K. Targeting EZH2 in cancer therapy // Curr. Opin. Oncol. 2017. V. 29. № 5. P. 375-381. https://doi.org/10.1097/CCO.00000000000390
- 37. Bracken A.P., Pasini D., Capra M. et al. EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer // EMBO J. 2003. V. 22. № 20. P. 5323–5335.

https://doi.org/10.1093/emboj/cdg542

- 38. Lee S.R., Roh Y.G., Kim S.K. et al. Activation of EZH2 and SUZ12 regulated by E2F1 predicts the disease progression and aggressive characteristics of bladder cancer // Clin. Cancer Res. 2015. V. 21. № 23. P. 5391-5403. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2680
- 39. Takawa M., Masuda K., Kunizaki M. et al. Validation of the histone methyltransferase EZH2 as a therapeutic target for various types of human cancer and as a prognostic marker // Cancer Sci. 2011. V. 102. № 7. P. 1298-1305.

https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.01958.x

40. Okosun J., Bodor C., Wang J. et al. Integrated genomic analysis identifies recurrent mutations and evolution patterns driving the initiation and progression of follicular lymphoma // Nat. Genet. 2014. V. 46. № 2. P. 176-181.

https://doi.org/10.1038/ng.2856

- 41. Kienle D., Katzenberger T., Ott G. et al. Quantitative gene expression deregulation in mantle-cell lymphoma: correlation with clinical and biologic factors // J. Clin. Oncol. 2007. V. 25. № 19. P. 2770-2777. https://doi.org/10.1200/JCO.2006.08.7999
- 42. Lin Y.L., Zou Z.K., Su H.Y., Huang Y.Q. Expression of MiR101 and EZH2 in patients with mantle cell lymphoma and its clinical significance // Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. 2019. V. 27. № 3. P. 820-826. https://doi.org/10.19746/j.cnki.issn.1009-2137.2019.03.029
- 43. Yan J., Ng S.B., Tay J.L. et al. EZH2 overexpression in natural killer/T-cell lymphoma confers growth advantage independently of histone methyltransferase activity // Blood. 2013. V. 121. № 22. P. 4512-4520. https://doi.org/10.1182/blood-2012-08-450494
- 44. Pawlyn C., Bright M.D., Buros A.F. et al. Overexpression of EZH2 in multiple myeloma is associated with poor prognosis and dysregulation of cell cycle control // Blood Cancer J. 2017. V. 7. № 3. P. e549. https://doi.org/10.1038/bcj.2017.27
- 45. Wilson B.G., Wang X., Shen X. et al. Epigenetic antagonism between polycomb and SWI/SNF complexes during oncogenic transformation // Cancer Cell. 2010. V. 18. № 4. P. 316-328. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.09.006
- 46. Bachmann I.M., Halvorsen O.J., Collett K. et al. EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast // J. Clin. Oncol. 2006. V. 24. № 2. P. 268-273. https://doi.org/10.1200/JCO.2005.01.5180
- 47. Collett K., Eide G.E., Arnes J. et al. Expression of enhancer of zeste homologue 2 is significantly associated with increased tumor cell proliferation and is a marker of aggressive breast cancer // Clin. Cancer Res. 2006. V. 12. № 4. P. 1168–1174. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1533
- 48. Gonzalez, M.E., Moore H.M., Li X. et al. EZH2 expands breast stem cells through activation of NOTCH1 signaling // PNAS USA. 2014. V. 111. № 8. P. 3098-3103.

https://doi.org/10.1073/pnas.1308953111

- 49. Kleer C.G., Cao Q., Varambally S. et al. EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells // PNAS USA. 2003. V. 100. № 20. P. 11606-11611. https://doi.org/10.1073/pnas.1933744100
- 50. Pietersen A.M., Horlings H.M., Hauptmann M. et al. EZH2 and BMI1 inversely correlate with prognosis and TP53 mutation in breast cancer // Breast Cancer Res. 2008. V. 10. № 6. P. R109. https://doi.org/10.1186/bcr2214
- 51. Puppe J., Drost R., Liu X. et al. BRCA1-deficient mammary tumor cells are dependent on EZH2 expression and sensitive to Polycomb Repressive Complex 2-inhibitor 3-deazaneplanocin A // Breast Cancer Res. 2009. V. 11. № 4. P. R63. https://doi.org/10.1186/bcr2354
- 52. Yu H., Simons D.L., Segall I. et al. PRC2/EED-EZH2 complex is up-regulated in breast cancer lymph node metastasis compared to primary tumor and correlates with tumor proliferation in situ // PLoS One. 2012.

ГЕНЕТИКА 2021 том 57 Nº 3

V. 7. № 12. P. e51239.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051239

- 53. *Liu Y.L., Gao X., Jiang Y. et al.* Expression and clinicopathological significance of EED, SUZ12 and EZH2 mRNA in colorectal cancer // J. Cancer Res. Clin. Oncol. 2015. V. 141. № 4. P. 661–669. https://doi.org/10.1007/s00432-014-1854-5
- 54. Ohuchi M., Sakamoto Y., Tokunaga R. et al. Increased EZH2 expression during the adenoma-carcinoma sequence in colorectal cancer // Oncol. Lett. 2018. V. 16. № 4. P. 5275–5281. https://doi.org/10.3892/ol.2018.9240
- 55. Wang C.G., Ye Y.J., Yuan J. et al. EZH2 and STAT6 expression profiles are correlated with colorectal cancer stage and prognosis // World J. Gastroenterol. 2010. V. 16. № 19. P. 2421–2427. https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i19.2421
- 56. *He L.J., Cai M.Y., Xu G.L. et al.* Prognostic significance of overexpression of EZH2 and H3k27me3 proteins in gastric cancer // Asian Pac. J. Cancer Prev. 2012. V. 13. № 7. P. 3173–3178. https://doi.org/10.7314/apjcp.2012.13.7.3173
- 57. *Pan Y.M., Wang C.G., Zhu M. et al.* STAT3 signaling drives EZH2 transcriptional activation and mediates poor prognosis in gastric cancer // Mol. Cancer. 2016. V. 15. № 1. P. 79.
 - https://doi.org/10.1186/s12943-016-0561-z
- 58. Lei Q., Shen F, Wu J. et al. MiR-101, downregulated in retinoblastoma, functions as a tumor suppressor in human retinoblastoma cells by targeting EZH2 // Oncol. Rep. 2014. V. 32. № 1. P. 261–269. https://doi.org/10.3892/or.2014.3167
- Wagener N., Macher-Goeppinger S., Pritsch M. et al. Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) expression is an independent prognostic factor in renal cell carcinoma // BMC Cancer. 2010. V. 10. P. 524. https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-524
- 60. *Zhang M.J.*, *Chen D.S.*, *Li H. et al.* Clinical significance of USP7 and EZH2 in predicting prognosis of laryngeal squamous cell carcinoma and their possible functional mechanism // Int. J. Clin. Exp. Pathol. 2019. V. 12. № 6. P. 2184–2194.
- Sudo T., Utsunomiya T., Mimori K. et al. Clinicopathological significance of EZH2 mRNA expression in patients with hepatocellular carcinoma // Br. J. Cancer. 2005. V. 92. № 9. P. 1754–1758. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602531
- Nakagawa S., Okabe H., Sakamoto Y. et al. Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) promotes progression of cholangiocarcinoma cells by regulating cell cycle and apoptosis // Ann. Surg. Oncol. 2013. V. 20. Suppl 3. P. S667–S675. https://doi.org/10.1245/s10434-013-3135-y
- 63. *Cao W., Ribeiro Rde O., Liu D. et al.* EZH2 promotes malignant behaviors via cell cycle dysregulation and its mRNA level associates with prognosis of patient with non-small cell lung cancer // PLoS One. 2012. V. 7. № 12. P. e52984.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052984

64. *Kikuchi J., Kinoshita I., Shimizu Y. et al.* Distinctive expression of the polycomb group proteins Bmil polycomb ring finger oncogene and enhancer of zeste ho-

molog 2 in nonsmall cell lung cancers and their clinical and clinicopathologic significance // Cancer. 2010. V. 116. № 12. P. 3015–3024. https://doi.org/10.1002/cncr.25128

- 65. Liu H., Li W., Yu X. et al. EZH2-mediated Puma gene repression regulates non-small cell lung cancer cell proliferation and cisplatin-induced apoptosis // Oncotarget. 2016. V. 7. № 35. P. 56338–56354. https://doi.org/10.18632/oncotarget.10841
- 66. *Ciarapica R., Russo G., Verginelli F. et al.* Deregulated expression of miR-26a and Ezh2 in rhabdomyosarcoma // Cell Cycle. 2009. V. 8. № 1. P. 172–175. https://doi.org/10.4161/cc.8.1.7292
- 67. Li H., Cai Q., Godwin A.K., Zhang R. Enhancer of zeste homolog 2 promotes the proliferation and invasion of epithelial ovarian cancer cells // Mol. Cancer Res. 2010. V. 8. № 12. P. 1610–1618. https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0398
- 68. Li H., Cai Q., Wu H. et al. SUZ12 promotes human epithelial ovarian cancer by suppressing apoptosis via silencing HRK // Mol. Cancer Res. 2012. V. 10. № 11. P. 1462–1472. https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-12-0335
- Lu C., Han H.D., Mangala L.S. et al. Regulation of tumor angiogenesis by EZH2 // Cancer Cell. 2010.
 V. 18. № 2. P. 185–197. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.06.016
- Crea F, Hurt E.M., Mathews L.A. et al. Pharmacologic disruption of Polycomb Repressive Complex 2 inhibits tumorigenicity and tumor progression in prostate cancer // Mol. Cancer. 2011. V. 10. P. 40. https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-40
- Varambally S., Dhanasekaran S.M., Zhou M. et al. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer // Nature. 2002. V. 419. № 6907. P. 624–629. https://doi.org/10.1038/nature01075
- 72. Saramaki O.R., Tammela T.L., Martikainen P.M. et al. The gene for polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) is amplified in late-stage prostate cancer // Genes Chromosomes Cancer. 2006. V. 45. № 7. P. 639–645. https://doi.org/10.1002/gcc.20327
- 73. Borbone E., Troncone G., Ferraro A. et al. Enhancer of zeste homolog 2 overexpression has a role in the development of anaplastic thyroid carcinomas // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2011. V. 96. № 4. P. 1029–1038. https://doi.org/10.1210/jc.2010-1784
- 74. Masudo K., Suganuma N., Nakayama H. et al. EZH2 overexpression as a useful prognostic marker for aggressive behaviour in thyroid cancer // In Vivo. 2018. V. 32. № 1. P. 25–31. https://doi.org/10.21873/invivo.11200
- 75. Azizmohammadi S., Azizmohammadi S., Safari A. et al. High-level expression of RIPK4 and EZH2 contributes to lymph node metastasis and predicts favorable prognosis in patients with cervical cancer // Oncol. Res. 2017. V. 25. № 4. P. 495–501. https://doi.org/10.3727/096504016X14749735594687
- 76. *Jia N., Li Q., Tao X. et al.* Enhancer of zeste homolog 2 is involved in the proliferation of endometrial carcino-

ГЕНЕТИКА том 57 № 3 2021

ma // Oncol. Lett. 2014. V. 8. № 5. P. 2049–2054. https://doi.org/10.3892/ol.2014.2437

- 77. Abudurexiti M., Xie H., Jia Z. et al. Development and external validation of a novel 12-gene signature for prediction of overall survival in muscle-invasive bladder cancer // Front. Oncol. 2019. V. 9. P. 856. https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00856
- 78. Martin-Perez D., Sanchez E., Maestre L. et al. Deregulated expression of the polycomb-group protein SUZ12 target genes characterizes mantle cell lymphoma // Am. J. Pathol. 2010. V. 177. № 2. P. 930–942. https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090769
- 79. Iliopoulos D., Lindahl-Allen M., Polytarchou C. et al. Loss of miR-200 inhibition of Suz12 leads to polycomb-mediated repression required for the formation and maintenance of cancer stem cells // Mol. Cell. 2010. V. 39. № 5. P. 761-772. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.013
- 80. Xia R., Jin F.Y., Lu K. et al. SUZ12 promotes gastric cancer cell proliferation and metastasis by regulating KLF2 and E-cadherin // Tumour Biol. 2015. V. 36. № 7. P. 5341-5351. https://doi.org/10.1007/s13277-015-3195-7
- 81. Liu C., Shi X., Wang L. et al. SUZ12 is involved in progression of non-small cell lung cancer by promoting cell proliferation and metastasis // Tumour Biol. 2014. V. 35. № 6. P. 6073–6082. https://doi.org/10.1007/s13277-014-1804-5
- 82. Bodor C., Grossmann V., Popov N. et al. EZH2 mutations are frequent and represent an early event in follicular lympĥoma // Blood. 2013. V. 122. № 18. P. 3165-3168.

https://doi.org/10.1182/blood-2013-04-496893

- 83. Bodor C., O'Riain C., Wrench D. et al. EZH2 Y641 mutations in follicular lymphoma // Leukemia. 2011. V. 25. № 4. P. 726–729. https://doi.org/10.1038/leu.2010.311
- 84. Lohr J.G., Stojanov P., Lawrence M.S. et al. Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing // PNAS USA. 2012. V. 109. № 10. P. 3879-3884.

https://doi.org/10.1073/pnas.1121343109

85. Majer C.R., Jin L., Scott M.P. et al. A687V EZH2 is a gain-of-function mutation found in lymphoma patients // FEBS Lett. 2012. V. 586. № 19. P. 3448-3451.

https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.07.066

- 86. Morin R.D., Johnson N.A., Severson T.M. et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin // Nat. Genet. 2010. V. 42. № 2. P. 181-185. https://doi.org/10.1038/ng.518
- 87. Morin R.D., Mendez-Lago M., Mungall A.J. et al. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma // Nature. 2011. V. 476. № 7360. P. 298-303. https://doi.org/10.1038/nature10351

88. Reddy A., Zhang J., Davis N.S. et al. Genetic and functional drivers of diffuse large B cell lymphoma // Cell. 2017. V. 171. № 2. P. 481-494. e415. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.027

- 89. Ryan R.J., Nitta M., Borger D. et al. EZH2 codon 641 mutations are common in BCL2-rearranged germinal center B cell lymphomas // PLoS One. 2011. V. 6. № 12. P. e28585. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028585
- 90. Calebiro D., Grassi E.S., Eszlinger M. et al. Recurrent EZH1 mutations are a second hit in autonomous thyroid adenomas // J. Clin. Invest. 2016. V. 126. № 9. P. 3383-3388. https://doi.org/10.1172/JCI84894
- 91. Ntziachristos P., Tsirigos A., Van Vlierberghe P. et al. Genetic inactivation of the polycomb repressive complex 2 in T cell acute lymphoblastic leukemia // Nat. Med. 2012. V. 18. № 2. P. 298-301. https://doi.org/10.1038/nm.2651
- 92. Zhang J., Ding L., Holmfeldt L. et al. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia // Nature, 2012, V. 481, № 7380, P. 157–163. https://doi.org/10.1038/nature10725
- 93. Puda A., Milosevic J.D., Berg T. et al. Frequent deletions of JARID2 in leukemic transformation of chronic myeloid malignancies // Am. J. Hematol. 2012. V. 87. № 3. P. 245–250. https://doi.org/10.1002/aih.22257
- 94. Bejar R., Stevenson K., Abdel-Wahab O. et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes // N. Engl. J. Med. 2011. V. 364. № 26. P. 2496-2506. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1013343
- 95. Ernst T., Chase A.J., Score J. et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders // Nat. Genet. 2010. V. 42. № 8. P. 722-726. https://doi.org/10.1038/ng.621
- 96. Guglielmelli P., Biamonte F., Score J. et al. EZH2 mutational status predicts poor survival in myelofibrosis // Blood. 2011. V. 118. № 19. P. 5227–5234. https://doi.org/10.1182/blood-2011-06-363424
- 97. Khan S.N., Jankowska A.M., Mahfouz R. et al. Multiple mechanisms deregulate EZH2 and histone H3 lysine 27 epigenetic changes in myeloid malignancies // Leukemia. 2013. V. 27. № 6. P. 1301–1309. https://doi.org/10.1038/leu.2013.80
- 98. Nikoloski G., Langemeijer S.M., Kuiper R.P. et al. Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes // Nat. Genet. 2010. V. 42. № 8. P. 665–667. https://doi.org/10.1038/ng.620
- 99. Zhang O., Han O., Zi J. et al. Mutations in EZH2 are associated with poor prognosis for patients with myeloid neoplasms // Genes Dis. 2019. V. 6. № 3. P. 276-281. https://doi.org/10.1016/j.gendis.2019.05.001
- 100. Score J., Hidalgo-Curtis C., Jones A.V. et al. Inactivation of polycomb repressive complex 2 components in myeloproliferative and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms // Blood. 2012. V. 119. № 5. P. 1208-1213.

https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-367243

101. De Raedt T., Beert E., Pasmant E. et al. PRC2 loss amplifies Ras-driven transcription and confers sensitivity to BRD4-based therapies // Nature. 2014. V. 514.

№ 7521. P. 247-251. https://doi.org/10.1038/nature13561

- 102. Lee W., Teckie S., Wiesner T. et al. PRC2 is recurrently inactivated through EED or SUZ12 loss in malignant peripheral nerve sheath tumors // Nat. Genet. 2014. V. 46. № 11. P. 1227–1232. https://doi.org/10.1038/ng.3095
- 103. Zhang M., Wang Y., Jones S. et al. Somatic mutations of SUZ12 in malignant peripheral nerve sheath tumors // Nat. Genet. 2014. V. 46. № 11. P. 1170–1172. https://doi.org/10.1038/ng.3116
- 104. Koontz J.I., Soreng A.L., Nucci M. et al. Frequent fusion of the JAZF1 and JJAZ1 genes in endometrial stromal tumors // PNAS USA. 2001. V. 98. № 11. P. 6348-6353.

https://doi.org/10.1073/pnas.101132598

- 105. Li H., Ma X., Wang J. et al. Effects of rearrangement and allelic exclusion of JJAZ1/SUZ12 on cell proliferation and survival // PNAS USA. 2007. V. 104. № 50. P. 20001-20006. https://doi.org/10.1073/pnas.0709986104
- 106. Ma X., Wang J., Wang J. et al. The JAZF1-SUZ12 fusion protein disrupts PRC2 complexes and impairs chromatin repression during human endometrial stromal tumorogenesis // Oncotarget. 2017. V. 8. № 3. P. 4062-4078. https://doi.org/10.18632/oncotarget.13270
- 107. Makise N., Sekimizu M., Kobayashi E. et al. Low-grade endometrial stromal sarcoma with a novel MEAF6-SUZ12 fusion // Virchows Arch. 2019. V. 475. № 4. P. 527-531.

https://doi.org/10.1007/s00428-019-02588-8

- 108. Ueda T., Sanada M., Matsui H. et al. EED mutants impair polycomb repressive complex 2 in myelodysplastic syndrome and related neoplasms // Leukemia. 2012. V. 26. № 12. P. 2557-2560. https://doi.org/10.1038/leu.2012.146
- 109. Boileau M., Shirinian M., Gayden T. et al. Mutant H3 histones drive human pre-leukemic hematopoietic stem cell expansion and promote leukemic aggressiveness // Nat. Commun. 2019. V. 10. № 1. P. 2891. https://doi.org/10.1038/s41467-019-10705-z
- 110. Schwartzentruber J., Korshunov A., Liu X.Y. et al. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma // Nature. 2012. V. 482. № 7384. P. 226–231. https://doi.org/10.1038/nature10833
- 111. Sturm D., Witt H., Hovestadt V. et al. Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma // Cancer Cell. 2012. V. 22. № 4. P. 425-437. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.08.024
- 112. Wu G., Broniscer A., McEachron T.A. et al. Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas // Nat. Genet. 2012. V. 44. № 3. P. 251-253. https://doi.org/10.1038/ng.1102
- 113. McCabe M.T., Graves A.P., Ganji G. et al. Mutation of A677 in histone methyltransferase EZH2 in human Bcell lymphoma promotes hypertrimethylation of histone H3 on lysine 27 (H3K27) // PNAS USA. 2012.

V. 109. № 8. P. 2989–2994. https://doi.org/10.1073/pnas.1116418109

- 114. Ott H.M., Graves A.P., Pappalardi M.B. et al. A687V EZH2 is a driver of histone H3 lysine 27 (H3K27) hypertrimethylation // Mol. Cancer Ther. 2014. V. 13. № 12. P. 3062-3073. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0876
- 115. Sneeringer C.J., Scott M.P., Kuntz K.W. et al. Coordinated activities of wild-type plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas // PNAS USA. 2010. V. 107. № 49. P. 20980-20985. https://doi.org/10.1073/pnas.1012525107
- 116. Yap D.B., Chu J., Berg T. et al. Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation // Blood. 2011. V. 117. № 8. P. 2451-2459. https://doi.org/10.1182/blood-2010-11-321208
- 117. Beguelin W., Popovic R., Teater M. et al. EZH2 is required for germinal center formation and somatic EZH2 mutations promote lymphoid transformation // Cancer Cell. 2013. V. 23. № 5. P. 677–692. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.04.011
- 118. Chang C.J., Yang J.Y., Xia W. et al. EZH2 promotes expansion of breast tumor initiating cells through activation of RAF1-beta-catenin signaling // Cancer Cell. 2011. V. 19. № 1. P. 86-100. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.10.035
- 119. Herrera-Merchan A., Arranz L., Ligos J.M. et al. Ectopic expression of the histone methyltransferase Ezh2 in haematopoietic stem cells causes myeloproliferative disease // Nat. Commun. 2012. V. 3. P. 623. https://doi.org/10.1038/ncomms1623
- 120. Min J., Zaslavsky A., Fedele G. et al. An oncogene-tumor suppressor cascade drives metastatic prostate cancer by coordinately activating Ras and nuclear factorkappaB // Nat. Med. 2010. V. 16. № 3. P. 286–294. https://doi.org/10.1038/nm.2100
- 121. Berg T., Thoene S., Yap D. et al. A transgenic mouse model demonstrating the oncogenic role of mutations in the polycomb-group gene EZH2 in lymphomagenesis // Blood. 2014. V. 123. № 25. P. 3914-3924. https://doi.org/10.1182/blood-2012-12-473439
- 122. Amatangelo M.D., Garipov A., Li H. et al. Three-dimensional culture sensitizes epithelial ovarian cancer cells to EZH2 methyltransferase inhibition // Cell Cycle. 2013. V. 12. № 13. P. 2113–2119. https://doi.org/10.4161/cc.25163
- 123. Kim W., Bird G.H., Neff T. et al. Targeted disruption of the EZH2-EED complex inhibits EZH2-dependent cancer // Nat. Chem. Biol. 2013. V. 9. № 10. P. 643-650.

https://doi.org/10.1038/nchembio.1331

124. Knutson S.K., Warholic N.M., Wigle T.J. et al. Durable tumor regression in genetically altered malignant rhabdoid tumors by inhibition of methyltransferase EZH2 // PNAS USA. 2013. V. 110. № 19. P. 7922-7927.

https://doi.org/10.1073/pnas.1303800110

125. Neff T., Sinha A.U., Kluk M.J. et al. Polycomb repressive complex 2 is required for MLL-AF9 leukemia //

ГЕНЕТИКА том 57 Nº 3 2021 PNAS USA. 2012. V. 109. № 13. P. 5028-5033. https://doi.org/10.1073/pnas.1202258109

- 126. Shi J., Wang E., Zuber J. et al. The Polycomb complex PRC2 supports aberrant self-renewal in a mouse model of MLL-AF9;Nras(G12D) acute myeloid leukemia // Oncogene. 2013. V. 32. № 7. P. 930–938. https://doi.org/10.1038/onc.2012.110
- 127. Tanaka S., Mivagi S., Sashida G. et al. Ezh2 augments leukemogenicity by reinforcing differentiation blockage in acute myeloid leukemia // Blood. 2012. V. 120. № 5. P. 1107–1117. https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-394932
- 128. Bender S., Tang Y., Lindroth A.M. et al. Reduced H3K27me3 and DNA hypomethylation are major drivers of gene expression in K27M mutant pediatric high-grade gliomas // Cancer Cell. 2013. V. 24. № 5. P. 660-672.

https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.10.006

- 129. Chan K.M., Fang D., Gan H. et al. The histone H3.3K27M mutation in pediatric glioma reprograms H3K27 methylation and gene expression // Genes Dev. 2013. V. 27. № 9. P. 985–990. https://doi.org/10.1101/gad.217778.113
- 130. Justin N., Zhang Y., Tarricone C. et al. Structural basis of oncogenic histone H3K27M inhibition of human polycomb repressive complex 2 // Nat. Commun. 2016. V. 7. P. 11316. https://doi.org/10.1038/ncomms11316
- 131. Lewis P.W., Muller M.M., Koletsky M.S. et al. Inhibition of PRC2 activity by a gain-of-function H3 mutation found in pediatric glioblastoma // Science. 2013. V. 340. № 6134. P. 857-861. https://doi.org/10.1126/science.1232245
- 132. Lee C.H., Yu J.R., Granat J. et al. Automethylation of PRC2 promotes H3K27 methylation and is impaired in H3K27M pediatric glioma // Genes Dev. 2019. V. 33. № 19-20. P. 1428-1440. https://doi.org/10.1101/gad.328773.119
- 133. Hubner J.M., Muller T., Papageorgiou D.N. et al. EZHIP/CXorf67 mimics K27M mutated oncohistones and functions as an intrinsic inhibitor of PRC2 function in aggressive posterior fossa ependymoma // Neuro. Oncol. 2019. V. 21. № 7. P. 878-889. https://doi.org/10.1093/neuonc/noz058
- 134. Jain S.U., Do T.J., Lund P.J. et al. PFA ependymomaassociated protein EZHIP inhibits PRC2 activity through a H3 K27M-like mechanism // Nat. Commun. 2019. V. 10. № 1. P. 2146. https://doi.org/10.1038/s41467-019-09981-6
- 135. Piunti A., Smith E.R., Morgan M.A.J. et al. CATACOMB: An endogenous inducible gene that antagonizes H3K27 methylation activity of Polycomb repressive complex 2 via an H3K27M-like mechanism // Sci. Adv. 2019. V. 5. № 7. P. eaax2887. https://doi.org/10.1126/sciadv.aax2887
- 136. Ragazzini R., Perez-Palacios R., Baymaz I.H. et al. EZHIP constrains Polycomb Repressive Complex 2 activity in germ cells // Nat. Commun. 2019. V. 10. № 1. P. 3858.

https://doi.org/10.1038/s41467-019-11800-x

137. Abdel-Wahab O., Dey A. The ASXL-BAP1 axis: New factors in myelopoiesis, cancer and epigenetics //

Leukemia. 2013. V. 27. № 1. P. 10-15. https://doi.org/10.1038/leu.2012.288

138. Danis E., Yamauchi T., Echanique K. et al. Ezh2 controls an early hematopoietic program and growth and survival signaling in early T cell precursor acute lymphoblastic leukemia // Cell Rep. 2016. V. 14. № 8. P. 1953–1965. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.064

- 139. Booth C.A.G., Barkas N., Neo W.H. et al. Ezh2 and Runx1 mutations collaborate to initiate lympho-myeloid leukemia in early thymic progenitors // Cancer Cell. 2018. V. 33. № 2. P. 274-291 e278. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.01.006
- 140. Wang C., Oshima M., Sato D. et al. Ezh2 loss propagates hypermethylation at T cell differentiation-regulating genes to promote leukemic transformation // J. Clin. Invest. 2018. V. 128. № 9. P. 3872-3886. https://doi.org/10.1172/JCI94645
- 141. Broux M., Prieto C., Demeyer S. et al. Suz12 inactivation cooperates with JAK3 mutant signaling in the development of T-cell acute lymphoblastic leukemia // Blood. 2019. V. 134. № 16. P. 1323–1336. https://doi.org/10.1182/blood.2019000015
- 142. Abdel-Wahab O., Adli M., LaFave L.M. et al. ASXL1 mutations promote myeloid transformation through loss of PRC2-mediated gene repression // Cancer Cell. 2012. V. 22. № 2. P. 180–193. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.06.032
- 143. Lane A.A., Chapuy B., Lin C.Y. et al. Triplication of a 21q22 region contributes to B cell transformation through HMGN1 overexpression and loss of histone H3 Lys27 trimethylation // Nat. Genet. 2014. V. 46. № 6. P. 618–623. https://doi.org/10.1038/ng.2949
- 144. Sashida G., Harada H., Matsui H. et al. Ezh2 loss promotes development of myelodysplastic syndrome but attenuates its predisposition to leukaemic transformation // Nat. Commun. 2014. V. 5. P. 4177. https://doi.org/10.1038/ncomms5177
- 145. Maertens O., Cichowski K. An expanding role for RAS GTPase activating proteins (RAS GAPs) in cancer // Adv. Biol. Regul. 2014. V. 55. P. 1–14. https://doi.org/10.1016/j.jbior.2014.04.002
- 146. Simon C., Chagraoui J., Krosl J. et al. A key role for EZH2 and associated genes in mouse and human adult T-cell acute leukemia // Genes Dev. 2012. V. 26. № 7. P. 651-656. https://doi.org/10.1101/gad.186411.111
- 147. Souroullas G.P., Jeck W.R., Parker J.S. et al. An oncogenic Ezh2 mutation induces tumors through global redistribution of histone 3 lysine 27 trimethylation // Nat. Med. 2016. V. 22. № 6. P. 632–640. https://doi.org/10.1038/nm.4092
- 148. Tan J., Yang X., Zhuang L. et al. Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells // Genes Dev. 2007. V. 21. № 9. P. 1050–1063. https://doi.org/10.1101/gad.1524107
- 149. Miranda T.B., Cortez C.C., Yoo C.B. et al. DZNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation // Mol. Cancer Ther. 2009. V. 8. № 6. P. 1579-1588

https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-0013

ГЕНЕТИКА 2021 том 57 Nº 3

268

- 150. Knutson S.K., Wigle T.J., Warholic N.M. et al. A selective inhibitor of EZH2 blocks H3K27 methylation and kills mutant lymphoma cells // Nat. Chem. Biol. 2012. V. 8. № 11. P. 890-896. https://doi.org/10.1038/nchembio.1084
- 151. McCabe M.T., Ott H.M., Ganji G. et al. EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations // Nature. 2012. V. 492. № 7427. P. 108-112. https://doi.org/10.1038/nature11606
- 152. Oi W., Chan H., Teng L. et al. Selective inhibition of Ezh2 by a small molecule inhibitor blocks tumor cells proliferation // PNAS USA. 2012. V. 109. № 52. P. 21360-21365. https://doi.org/10.1073/pnas.1210371110
- 153. Knutson S.K., Kawano S., Minoshima Y. et al. Selective inhibition of EZH2 by EPZ-6438 leads to potent antitumor activity in EZH2-mutant non-Hodgkin lymphoma // Mol. Cancer Ther. 2014. V. 13. № 4. P. 842-854.

https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0773

- 154. Konze K.D., Ma A., Li F. et al. An orally bioavailable chemical probe of the Lysine Methyltransferases EZH2 and EZH1 // ACS Chem. Biol. 2013. V. 8. № 6. P. 1324-1334. https://doi.org/10.1021/cb400133j
- 155. Fuiita S., Honma D., Adachi N. et al. Dual inhibition of EZH1/2 breaks the quiescence of leukemia stem cells in acute myeloid leukemia // Leukemia. 2018. V. 32. № 4. P. 855-864.

https://doi.org/10.1038/leu.2017.300

- 156. Honma D., Kanno O., Watanabe J. et al. Novel orally bioavailable EZH1/2 dual inhibitors with greater antitumor efficacy than an EZH2 selective inhibitor // Cancer Sci. 2017. V. 108. № 10. P. 2069–2078. https://doi.org/10.1111/cas.13326
- 157. He Y., Selvaraju S., Curtin M.L. et al. The EED protein-protein interaction inhibitor A-395 inactivates the

PRC2 complex // Nat. Chem. Biol. 2017. V. 13. № 4. P. 389-395. https://doi.org/10.1038/nchembio.2306

- 158. Qi W., Zhao K., Gu J. et al. An allosteric PRC2 inhibitor targeting the H3K27me3 binding pocket of EED // Nat. Chem. Biol. 2017. V. 13. № 4. P. 381–388. https://doi.org/10.1038/nchembio.2304
- 159. Ma A., Stratikopoulos E., Park K.S. et al. Discovery of a first-in-class EZH2 selective degrader // Nat. Chem. Biol. 2020. V. 16. № 2. P. 214–222. https://doi.org/10.1038/s41589-019-0421-4
- 160. Versteege I., Sevenet N., Lange J. et al. Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer // Nature. 1998. V. 394. № 6689. P. 203–206. https://doi.org/10.1038/28212
- 161. Kohashi K., Oda Y. Oncogenic roles of SMARCB1/INI1 and its deficient tumors // Cancer Sci. 2017. V. 108. № 4. P. 547-552. https://doi.org/10.1111/cas.13173
- 162. Jiao L., Liu X. Structural basis of histone H3K27 trimethylation by an active polycomb repressive complex 2 // Science. 2015. V. 350. № 6258. P. aac4383. https://doi.org/10.1126/science.aac4383
- 163. Kasinath V., Faini M., Poepsel S. et al. Structures of human PRC2 with its cofactors AEBP2 and JARID2 // Science. 2018. V. 359. № 6378. P. 940-944. https://doi.org/10.1126/science.aar5700
- 164. Khan M., Walters L.L., Li Q. et al. Characterization and pharmacologic targeting of EZH2, a fetal retinal protein and epigenetic regulator, in human retinoblastoma // Lab. Invest. 2015. V. 95. № 11. P. 1278-1290. https://doi.org/10.1038/labinvest.2015.104
- 165. Lai A.C., Crews C.M. Induced protein degradation: an emerging drug discovery paradigm // Nat. Rev. Drug. Discov. 2017. V. 16. № 2. P. 101–114. https://doi.org/10.1038/nrd.2016.211

Genetic Disorders of PRC2 Activity in Oncology: Problems and Prospects

D. A. Chetverina^a, D. V. Lomaev^a, P. G. Georgiev^a, and M. M. Erokhin^{a, *}

^aInstitute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

*e-mail: vermaxbio@vandex.ru

PRC2 (Polycomb repressive complex 2) is a conserved protein complex required for maintaining gene repression in multicellular organisms. The catalytic subunit of PRC2, the EZH2 protein, provides methylation of the histone H3K27me1/2/3. It has been shown that a number of human tumors are associated with overexpression of PRC2 subunits, as well as with mutations that enhance the catalytic activity of EZH2. At the same time, the group of tumors correlates with mutations that inhibit PRC2. A number of small molecule inhibitors have been developed for PRC2 subunits, primarily for EZH2 protein. One of them, tazemetostat, was approved in January 2020 for the treatment of malignant epithelioid sarcoma in the United States. This review focuses on the role of PRC2 in cancer development and summarizes information about the PRC2 inhibitors.

Keywords: Polycomb, PRC2, EZH2, cancer, oncology, PRC2 inhibitors, EZH2 inhibitors, prognosis.

ГЕНЕТИКА том 57 Nº 3 2021

ОБЗОРНЫЕ И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 575.155

РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В ОРГАНИЗАЦИИ И РЕГУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ ЭНДОКРИННЫХ ТКАНЕЙ in vivo II in vitro

© 2021 г. Д. В. Голиусова^{1, *}, Н. В. Клементьева², А. В. Панова^{1, 2}, Н. Г. Мокрышева², С. Л. Киселев^{1, **}

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия ²Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии, Москва, 117036 Россия

*e-mail: daria.goliusova@mail.ru **e-mail: sl_kiselev@yahoo.com Поступила в редакцию 30.04.2020 г. После доработки 13.06.2020 г. Принята к публикации 16.06.2020 г.

Эндокринные клетки могут успешно функционировать при гетеротопической трансплантации в организм млекопитающего, что делает их перспективным инструментом регенеративной медицины. Однако на сегодняшний день клеточная терапия эндокринных заболеваний ограничена невозможностью эффективно и стабильно получать эндокринные клетки в лабораторных условиях. В данном обзоре рассматриваются современные представления о молекулярно-генетических механизмах эмбрионального развития эндокринных тканей мыши и человека, а также ключевые генетические факторы, регулирующие дифференцировку плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) в эндокринном направлении *in vitro*, на примере паратиреоидных клеток. Приведенные данные позволяют предложить альтернативный подход к дифференцировке ПСК в паратиреоидном направлении, основанный на генетическом программировании клеток путем индукции эндогенной экспрессии ключевых факторов дифференцировки.

Ключевые слова: гены, генетика развития, эндокринные ткани, дефинитивная энтодерма, паратиреоидные клетки, дифференцировка *in vitro*.

DOI: 10.31857/S0016675821030085

Ежегодно доля пациентов с эндокринными патологиями. вызванными нарушением секреции и метаболизма различных гормонов, увеличивается во всем мире. Одним из перспективных подходов к лечению гормональных заболеваний является применение регенеративной медицины. Это обусловлено рядом особенностей секреторных клеток эндокринной системы, позволяющих использовать их как контролируемые биореакторы гормонов in vivo. В первую очередь в связи с тем, что в организме существует как гландулярная, так и диффузная эндокринная система, экскреция гормонов в зрелых эндокринных клетках в основном не зависит от их местоположения в организме. Кроме того, для функционирования трансплантата из эндокринных клеток не требуется его иннервация. По этим причинам эндокринные клетки могут быть трансплантированы гетеротопически в легко доступные в организме человека места, например подкожно или в мышцу, независимо от расположения самой железы. Такой подход успешно используется уже несколько десятилетий для изучения эндокринных заболеваний у мышей, когда гормон-продуцирующие клетки трансплантируют животным под капсулу почки. В случае других типов клеток (кардиомиоцитов, гепатоцитов, нейронов и др.) гетеротопическая трансплантация затруднена или невозможна.

В настоящее время большой интерес представляет разработка способов *in vitro* дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) человека, таких как эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), в гормон-продуцирующие клетки эндокринного ряда для заместительной клеточной терапии различных эндокринных патологий и длительной коррекции гормонального дисбаланса у пациентов с эндокринными нарушениями. Применение аутологичных эндокринных клеток, полученных из ПСК пациентов in vitro, является перспективным подходом, поскольку трансплантация таких клеток, во-первых, освобождает пациентов от постоянных инъекций дорогостоящих лекарственных препаратов, особенно с учетом длительности течения эндокринных заболеваний

и значительного снижения общего качества жизни, и, во-вторых, безопасна ввиду отсутствия реакции хозяина против трансплантата и отторжения ткани. Однако до сих пор не существует эффективных и хорошо воспроизводимых протоколов дифференцировки ПСК человека в эндокринном направлении, в частности в зрелые островковые клетки поджелудочной железы и клетки паращитовидных желез. Во многом это обусловлено ограничениями эмпирического подбора условий дифференцировки с помощью ростовых факторов и/или химических молекул, активирующих и/или ингибирующих требуемые сигнальные пути в соответствии с данными о формировании эндокринных желез in vivo. Действие подобранных факторов *in vitro* в большинстве случаев плейотропно, а использование реагентов от различных производителей или животного происхождения приводит к слабой воспроизводимости результатов. Поскольку основной задачей дифференцировки клеток *in vitro* является повторение и реализация генетической программы эмбрионального развития, возможен и альтернативный подход к дифференцировке путем прямого генетического программирования ПСК на основе имеющихся знаний по эмбриологии эндокринных желез. Генетическое программирование ПСК позволяет специфически активировать работу конкретных генов, а не целых регуляторных сетей. Целевые гены могут быть индуцированы с помощью таких методов, как оверэкспрессия или CRISPR/Cas9 Synergistic Activation Mediator (SAM). Технология CRISPR/Cas9 SAM позволяет целенаправленно активировать промотор интересующего гена, инициируя таким образом его транскрипцию [1]. В 2018 г. с помощью повышенной экспрессии транскрипционных факторов поджелудочной железы удалось трансдифференцировать α-клетки в β-клетки *in vivo* [2]. Разработка подхода, который позволит программировать дифференцировку ПСК в требуемом направлении, предполагает использование знаний о транскрипционных факторах, регулирующих эмбриональное развитие каждой из тканей. В связи с этим понимание генетических аспектов организации и регуляции раннего развития эндокринных тканей необходимо для разработки протоколов генетически программируемой дифференцировки ПСК в эндокринном направлении.

МОРФОГЕНЕЗ ЭНДОКРИННЫХ ЖЕЛЕЗ ЭНТОДЕРМАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Эндокринные железы закладываются в первые месяцы эмбрионального развития из клеток дефинитивной (зародышевой) энтодермы (ДЭ). Дефинитивная энтодерма формируется из клеток эпибласта на 3-й нед. развития и дает начало кишечной трубке зародыша, от которой отпочковываются все органы энтодермального происхождения [3]. В на-

чале 3-й нед. развития в заднем отделе зародыша на поверхности эпибласта появляется так называемая первичная полоска, или борозда, вдоль которой начинают мигрировать клетки эпибласта. Двигаясь вперед, клетки претерпевают эпителиально-мезенхимальный переход, теряют плюрипотентность, приобретают вытянутую форму и проскальзывают под первичную полоску. Такие клеточные движения называют ингрессией, а миграцию клеток в подлежащие слои – инвагинацией. Часть инвагинирующих клеток замещает клетки подлежащего слоя (гипобласта) и дает начало ДЭ зародыша. Клетки, мигрирующие в область между эпибластом и сформированной ДЭ, образуют мезодерму. Клетки, остающиеся в эпибласте. формируют эктодерму. К концу 3-й нед. развития в трехслойном зародышевом диске одновременно начинаются процессы формирования нервной трубки из эктодермы и кишечной трубки из ДЭ путем сворачивания клеточных пластов по передне-задней оси зародыша. К концу 4-й нед. кишечная трубка представляет собой замкнутую первичную кишку, разделенную градиентами морфогенов на четыре части вдоль антерио-постериорной (передне-задней) оси: 1) переднюю (антериорную) часть передней кишки, 2) заднюю (постериорную) часть передней кишки, 3) среднюю кишку и 4) заднюю кишку. Энтодерма первичной кишки образует эпителиальную выстилку кишечного тракта и дает начало секреторным клеткам различных желез. Клетки среднего и заднего отделов первичной кишки формируют клеткипредшественники всех отделов кишечного тракта. Клетки заднего отдела передней кишки дают начало поджелудочной железе и печени. Клетки переднего отдела передней кишки формируют глоточный аппарат, состоящий из четырех пар глоточных мешков, разделенных четырьмя парами глоточных дуг. В результате сегментации и дальнейшего развития глоточного аппарата формируются структуры головы и шеи, в частности щитовидная, паращитовидные железы и тимус [4]. В область глоточных дуг активно мигрируют эктодермальные клетки нервного гребня, которые участвуют в формировании мезенхимы и сегментации энтодермы глоточных мешков, а также в развитии тимуса, паращитовидных желез и дифференцировке парафолликулярных клеток (С-клеток) щитовидной железы [5].

Раньше всех среди эндокринных желез человека начинает формироваться щитовидная железа. Она закладывается примерно на 24-й день эмбрионального развития в виде выпячивания из энтодермальных и мезодермальных клеток на дне глотки [6]. Клетки начинают мигрировать в заднем направлении, и к концу 7-й нед. зачаток щитовидной железы достигает своего окончательного положения в глотке. Клетки нижней части четвертой пары глоточных мешков дают начало предшественникам С-клеток

щитовидной железы, секретирующих кальцитонин. К концу 3-го мес. в щитовидной железе обнаруживаются первые фолликулы, содержащие коллоид – источник тироксина и трийодтиронина, синтезируемый фолликулярными клетками [7]. Паращитовидные железы формируются в период с 5-й по 15-ю нед. эмбрионального развития из эпителия третьей и четвертой пары глоточных мешков. Нижняя пара паращитовидных желез формируется из общего зачатка с тимусом, верхняя пара – из общего зачатка с щитовидной железой. На 7-й нед. развития оба зачатка теряют связь со стенкой глотки и мигрируют вниз в заднем направлении, при этом зачатки паращитовидных желез занимают свое окончательное положение на дорсальной поверхности шитовидной железы [8]. Поджелудочная железа закладывается в конце 1-го мес. развития примерно на 26-й день в виде двух отростков зачатка двенадцатиперстной кишки, сформированных клетками заднего отдела передней кишки [9]. Эндокринная часть поджелудочной железы формируется на 3-м мес. развития из паренхиматозной панкреатической ткани, рассеянной по железе. Секреция инсулина начинается примерно на 5-м мес. развития [10].

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ДЕФИНИТИВНОЙ ЭНТОДЕРМЫ *in vivo*

Формирование и дифференцировка клеток ДЭ обеспечиваются взаимодействием компонентов регуляторной сети, контролирующей пространственно-временную регуляцию экспрессии ключевых энтодермальных генов в развивающемся зародыше. С началом гаструляции в клетках эпибласта детектируется экспрессия эволюционно консервативных транскрипционных факторов BRACHYURY, SOX17 и FOXA2. Среди них BRACHYURY играет важную роль в спецификации клеток мезодермы, SOX17 и FOXA2 - в спецификации клеток ДЭ [11, 12]. Эволюционно формирование энтодермы и мезодермы взаимосвязано, тем не менее вопрос о существовании бипотентных "мезендодермальных" предшественников в эмбриональном развитии млекопитающих до сих пор остается спорным [13, 14]. Экспрессия факторов BRACHYURY, SOX17 и FOXA2 регулируется концентрацией цитокина NODAL, который является ключевым участником TGFβ/Activin/Nodal-опосредованного сигнального пути, определяющего сульбу энтодермальных и мезодермальных предшественников [15, 16]. Фактор NODAL секретируется клетками наружной внезародышевой энтодермы и обеспечивает индукцию "мезендодермальных" генов через фосфорилирование цитоплазматических белков семейства SMAD (SMAD2, SMAD3, SMAD4), которые активируют работу различных транскрипционных факторов, в частности фактор FOXH1 [17, 18]. Судьба "мезендодермальных" предшественников определяется градиентом концентрации NODAL, формируемым взаимным антагонизмом регуляторных сетей NODAL и FGF/BMP [19, 20]. Высокий уровень NODAL вызывает индукцию фактора SOX17 и дифференцировку клеток в энтодермальном направлении, а ингибирование NODAL факторами семейств FGF и ВМР приводит к индукции мезодермальной дифференцировки [21]. Спецификацию и дифференцировку энтодермальных предшественников поддерживает также ауторегуляторная петля экспрессии фактора NODAL [22, 23]. В настоящее время считается, что преобладающая роль в индукции клеток ДЭ принадлежит фактору SOX17. На моделях нокаутных мышей было показано, что при нарушении гена Sox17 у эмбрионов не формируется ДЭ, поскольку клетки эпибласта теряют способность к миграции во время гаструляции. Возникающие дефекты приводят к остановке развития и внутриутробной гибели на стадии E10.5 [24]. Нарушения *Foxa2* не приводят к эмбриональной летали, однако наблюдаются дефекты передней части первичной кишки, общая задержка роста и неспособность формировать срединные структуры [25, 26].

Вслед за гаструляцией из плоского клеточного пласта ДЭ формируется объемная, слепо замкнутая кишечная трубка, в которой происходит установление передне-задней и спинно-брюшной полярностей. На данном этапе клетки ДЭ еще не коммитированы и обладают высокой степенью пластичности [27]. Ключевую роль в специализации энтодермы играют реципрокные эпителиальномезенхимальные взаимодействия между клеткам ДЭ и мезодермы по всей длине кишечной трубки. Спецификация ДЭ вдоль передне-задней оси зародыша обеспечивается градиентом концентрации морфогенов семейств WNT, BMP, FGF, а также их антагонистов: SFRP-1, -2, -3, -5, CRESCENT, DKK1 (антагонисты WNT) и CHORDIN, NOGGIN (антагонисты ВМР). В области высоких концентраций WNT, BMP и FGF формируется задний отдел кишки зародыша, в области низких концентраций – передний [28, 29]. Основным маркером передней кишки является экспрессия транскрипционного фактора SOX2, задней кишки – экспрессия транскрипционного фактора CDX2 [30]. В регионализации экспрессии различных транскрипционных факторов по длине первичной кишки важную роль играет ретиноевая кислота (РК) – производное витамина А. синтезируемое клетками мезодермы [31]. Градиент концентраций РК распределяется вдоль передне-задней оси всего зародыша, от будущей глотки, в которой практически или полностью отсутствует РК, до области средней и задней кишки, в которой детектируется высокая концентрация РК [32]. У мышей с нарушением синтеза РК не происходит компартментализации передней кишки [33]. На более поздних стадиях развития при закладке зачатков органов в области глоточного аппарата концентрация РК контролирует положение границ формирующихся органов. Так, повышение концентрации РК в передней части глоточных дуг индуцирует закладку более отдаленных структур [34]. Значительную роль в реципрокных эпителиально-мезенхимальных взаимодействиях играет высококонсервативный морфоген SHH, секретируемый клетками энтодермы по всей длине кишечной трубки [35]. SHH активирует в мезенхимальных клетках экспрессию фактора ВМР-4 и гомеобокс-содержащих транскрипционных факторов, колируемых консервативными Нох-генами. которые контролируют регионализацию первичной кишки. В частности, Hoxa3 и Hoxb4 специфически экспрессируются в передней кишке, *Hoxc5* и *Hoxa13* – в области средней и задней кишки [36].

Установление дорсо-вентральной (спиннобрюшной) полярности передней кишки предшествует формированию глоточного аппарата и сегрегации легочных почек, пищевода и трахеи из клеток вентральной ДЭ первичной кишки. Дорсо-вентральная полярность передней кишки устанавливается в ответ на действие сигналов WNT, BMP и FGF от клеток подлежащей мезодермы. Факторы WNT2, WNT2B активируют экспрессию транскрипционных факторов NKX2.1, NKX2.5 и PAX1 в вентральной части передней кишки [37]. Экспрессия Nkx2.1 в вентральной области поддерживается в результате ВМР4-опосредованного ингибирования экспрессии транскрипционного фактора Sox2, маркирующего дорсальные структуры передней кишки. Также клетки мезодермы экспрессируют фактор NOGGIN, являюшийся антагонистом ВМР4. в результате чего в подлежащих энтодермальных клетках не блокируется экспрессия Sox2 и происходит дальнейшее разделение структур на спинные и брюшные отделы. Кроме того, секреция WNT клетками дорсальной мезодермы ингибирует экспрессию транскрипционного фактора Nkx2.1 в спинной части передней кишки. Дифференциальная экспрессия и взаимное ингибирование NKX2.1 и SOX2 также участвуют в формировании спинно-брюшной полярности кишки [38-40].

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ПАРАЩИТОВИДНЫХ ЖЕЛЕЗ *in vivo*

Паращитовидные железы формируются из энтодермы глоточных мешков зародыша. Наиболее важным фактором в формировании всего глоточного аппарата является консервативный транскрипционный фактор TBX1. Нарушения гена *Tbx1* могут приводить к развитию синдрома делеции 22-й

ГЕНЕТИКА том 57 № 3 2021

хромосомы (синдром Ди Джорджи) [41]. Нокаутные по *Tbx1* мыши не имеют тимуса и паращитовидных желез и погибают после рождения в результате дефектов развития сердца, скелета и мускулатуры лица [42, 43]. Показано, что экспрессия *Tbx1* в глоточном аппарате регулируется фактором SHH, однако механизм такой регуляции остается неизвестным [44]. Экспрессия Tbx1 в энтодерме активирует экспрессию факторов WNT11R и FGF8A в подлежащих клетках мезодермы, которые, в свою очередь, способствуют морфогенезу энтодермы глоточных мешков [45]. Закладка зачатков паращитовидных желез контролируется факторами семейства FGF (FGF8, FRS2 α), BMP (BMP4), SHH, а также *Hox*-генами [46, 47]. Клетки переднего дорсального эпителия 3-го глоточного мешка, экспрессирующие факторы FGF8 и РАХ1, дают начало общему зачатку тимуса и нижней пары паращитовидных желез, который подразделяется на паратиреоидный и тимусный домены. Такое разделение обеспечивается реципрокным взаимодействием сигнальных путей SHH, BMP2/4 и FGF8/10, индуцирующих формирование паращитовидных желез и тимуса [48]. Основным маркером тимусного домена является транскрипционный фактор FOXN1. В паратиреоидном домене экспрессируется транскрипционный фактор GCM2, который является исключительным маркером как предшественников, так и зрелых паратиреоидных клеток и необходим для их дифференцировки и выживания [49, 50]. Потеря GCM2 приводит к апоптозу паратиреоидных предшественников [51]. Мутации Gcm2 являются одной из причин развития семейных форм изолированного гипопаратиреоза и гиперпаратиреоза [52, 53]. В некоторых работах продемонстрировано изменение уровня экспрессии Gcm2 в аденомах паращитовидных желез [54].

Раннюю дифференцировку паратиреоидных клеток направляет SHH. У Shh-/Shh- мышей не формируется зачаток паращитовидных желез и полностью отсутствует экспрессия Gcm2 [55]. Кандидатным фактором, опосредующим влияние SHH на органогенез третьего и четвертого глоточных мешков, является ТВХ1 [56, 57]. Предполагается, что регуляторный путь Shh-Tbx1-Gcm2 отвечает за первичную детерминацию паратиреоидной судьбы клеток. Кроме того, ТВХ1 взаимодействует с транскрипционным фактором FOXI3, участвующим в развитии глоточного аппарата и формировании тимуса и паращитовидных желез из энтодермы третьей пары глоточных мешков. Foxi3 экспрессируется в энтодерме глоточных мешков и эктодерме глоточного аппарата мыши примерно в то же время, что и Tbx1 [58]. Инактивация Foxi3 в TBX1-домене глоточных мешков приводит к аплазии тимуса и паращитовидных желез [59]. Foxi3⁻/Foxi3⁻ мыши нежизнеспособны и погибают внутриутробно или вскоре после рождения в результате нарушения формирования и сегменташии глоточного аппарата и, как следствие, развития тяжелых дефектов строения черепа и лица [60]. Формирование общего зачатка тимуса и нижней пары паращитовидных желез контролируется регуляторной сетью консервативных транскрипционных факторов HOXA3. PBX1. EYA1. SIX1/SIX4. РАХ1/РАХ9, нарушение которых приводит к гипоплазии или аплазии тимуса и паращитовидных желез. У *Ноха3⁻/Ноха3⁻* мышей полностью отсутствует зачаток паращитовидных желез и тимуса [61]. У *Pbx1⁻/Pbx1⁻* мышей наблюдается гипоплазия паращитовидных желез и тимуса и снижение экспрессии Tbx1 и Gcm2 [62]. У Eya1-/Eya1- мышей нет тимуса и паращитовидных желез. У гомозиготных мышей с нокаутом гена Six1 отсутствует только тимус, поскольку экспрессия Gcm2 инициируется, но при этом не поддерживается далее в ходе развития [63]. Экспрессия транскрипционного фактора РАХ1 в третьем глоточном мешке зависит от экспрессии Eya1 и Six1. У Pax1⁻/Pax1⁻ мышей снижен уровень экспрессии Gcm2 и наблюдается гипоплазия паращитовидных желез [61]. Отделение общего зачатка паращитовидных желез и тимуса от стенок глоточного мешка происходит в результате апоптоза клеток под действием FGF, BMP4 и других сигналов, поступающих из подлежащей мезенхимы [64-66].

Важную роль в сегрегации и миграции паратиреоидных предшественников играет транскрипционный фактор MAFB. У гетерозиготных по MafB мышей паращитовидные железы ошибочно располагаются между тимусом и щитовидной железой, а у гомозигот по MafB паратиреоидные клетки не мигрируют и остаются связанными с тимусом [67]. Экспрессия *MafB* и дальнейшая дифференцировка и созревание паратиреоидных клеток регулируются взаимосвязанным каскадом факторов GATA3 и GCM2 [68]. Наиболее ранним фактором является GATA3, за ним следует GCM2 и после MAFB. Нокаут *Gata3* у мышей приводит к нарушению формирования паращитовидных желез и значительным дефектам развития; у гетерозиготных по Gata3 мышей паращитовидные железы формируются, но наблюдается их частичная дисфункция [69]. GCM2 инициирует экспрессию основных маркеров зрелых паратиреоидных клеток, таких как паратиреоидный гормон (ПТГ, РТН) РТН и кальций-чувствительный рецептор (CASR) [70]. Показано, что мутации генов Gcm2, Gata3 и Tbx1 у мыши и человека приводят к развитию гипопаратиреоидизма [71, 72]. Экспрессия Gata3, Gcm2 и MafB в паратиреоидных клетках наблюдается и после завершения морфогенеза [67, 73]. В постнатальном периоде данные факторы физически взаимодействуют друг с другом, вызывая синергичную активацию промотора гена *Pth* в зрелых паратиреоидных клетках [74].

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ПСК В ПАРАТИРЕОИДНОМ НАПРАВЛЕНИИ *in vitro*

Дифференцировка ПСК в паратиреоидном направлении *in vitro*, в соответствии с развитием *in vivo*, предполагает поэтапное получение клеток ДЭ, их дифференцировку в клетки антериорной части передней кишки, далее в клетки вентрального отдела и затем в предшественники паратиреоидных клеток (пре-ПТК) с последующим размножением и созреванием.

Протоколы получения клеток ДЭ в настоящее время хорошо отработаны. Большинство из них основаны на активации сигнальных путей WNT и ТGFβ с помощью Activin A, выполняющего роль эмбрионального фактора NODAL, и ингибиторов GSK3β (CHIR99021 и др.) соответственно [75]. Уже доступны коммерческие наборы для эффективной лифференцировки ПСК в клетки ЛЭ. такие как STEMdiff Definitive Endoderm Kit (StemCell Technologies), PSC Definitive Endoderm Induction Kit (Thermo Fisher Scientific), StemXVivo Endoderm Kit (R&D Systems) и др. В качестве основных маркеров дифференцировки в полученных клетках ДЭ оценивают экспрессию генов Sox17, Foxa2, Cxcr4, c-Kit, EpCAM, Mixl1 (рис. 1). В настоящее время существуют стратегии по отбору ИПСК с наибольшим энтодермальным дифференцировочным потенциалом в связи с клональными различиями ИПСК человека в предрасположенности к дифференцировке in vitro [76, 77]. Кроме того, недавно с помощью полногеномного CRISPR-скрининга было обнаружено, что ингибирование сигнального пути JNK-JUN, опосредованно влияющего на выход ПСК из плюрипотентного состояния, значительно повышает эффективность получения ДЭ и ее производных [78]. На сегодняшний день также разработан ряд протоколов по получению клеток вентрального отдела энтодермы передней кишки [79-81]. Тем не менее эффективность такой дифференцировки варьирует среди линий ИПСК в зависимости от генетических и эпигенетических особенностей, а также способа репрограммирования [82].

Что касается дальнейшей дифференцировки коммитированных энтодермальных клеток в паратиреоидном направлении, в настоящее время отсутствуют эффективные и воспроизводимые способы получения паратгормон-продуцирующих клеток из ПСК человека. Опубликовано несколько протоколов получения паратиреоидных клеток, основанных на индукции экспрессии генов *Gcm2*, *Casr* и *Pth* в коммитированных энтодермальных клетках с помощью факторов Activin A, FGF8 и SHH. Первый опубликованный протокол паратиреоидной дифференцировки основан на получении ПТГ-секретирующих клеток через стадию ДЭ из ЭСК человека с помощью одного фактора Activin A

ГЕНЕТИКА том 57 № 3 2021



Рис. 1. Пример успешной дифференцировки ИПСК человека в клетки ДЭ. Иммуноцитохимическое окрашивание клеток ДЭ на энтодермальные маркеры CXCR4 (зеленый канал) и FOXA2 (красный канал). Визуализация ядер с помощью красителя DAPI (синий канал). Масштабная линейка – 100 мкм.



Рис. 2. Основные этапы дифференцировки ПСК человека в паратиреоидном направлении путем индукции экспрессии генов *Gata3, Tbx1, Shh* и *Gcm2* в коммитированных энтодермальных клетках. Внизу указаны основные гены-маркеры соответствующих стадий дифференцировки. ПСК – плюрипотентные стволовые клетки, пре-ПТК – предшественники паратиреоидных клеток, ПТК – паратиреоидные клетки.

в присутствии низких концентраций эмбриональной телячьей сыворотки [83]. В дальнейшем протокол был модифицирован той же группой авторов путем добавления фактора SHH, и оценена индукция экспрессии *Pth* в дифференцированных клетках [84]. Основными недостатками предложенного подхода являются плохая воспроизводимость протокола и использование ЭСК, культивируемых на фидере. В 2011 г. другая группа показала, что ингибирование BMP и TGF-β-сигнальных путей при дифференцировке ПСК в энтодермальном направлении увеличивает эффективность дифференцировки в клетки антериорной энтодермы передней кишки, которые могут служить источником клеток паратиреоидного ряда. Однако предложенная схема с использованием дополнительных факторов SHH и/или FGF8 для индукции паратиреоидной дифференцировки обеспечивала лишь незначительное повышение экспрессии Gcm2 по сравнению с контролем [85].

Таким образом, на сегодняшний день актуальной задачей является разработка воспроизводимых и эффективных методов получения ПТГ-секретирующих клеток из ПСК *in vitro*. Для получения клеток паратиреоидного ряда может быть применен подход с использованием технологии CRISPR/Cas9 SAM, предполагающий специфическую контролируемую активацию ключевых регуляторных генов паратиреоидной дифференцировки в коммитированных энтодермальных клетках-предшественниках (рис. 2). Поскольку получение клеток ДЭ и более поздних стадий развития переднего отдела первичной кишки в настоящее время не представляет значительных трудностей, основными мишенями генетически программируемой паратиреоидной дифференцировки могут стать гены *Gata3*, *Shh*, *Tbx1* и *Gcm2*, являющиеся ключевыми индукторами паратиреоидной дифференцировки *in vivo*.

Работа выполнена в рамках научного проекта РФФИ № 19-015-00209-А.

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.

ГЕНЕТИКА том 57 № 3 2021

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Zhang Y., Yin C., Zhang T. et al.* CRISPR/gRNA-directed synergistic activation mediator (SAM) induces specific, persistent and robust reactivation of the HIV-1 latent reservoirs // Sci. Reports. 2015. V. 5. № 1. Article number 16277. https://doi.org/10.1038/srep16277

2. Xiao X., Guo P., Shiota C. et al. Endogenous reprogram-

- ming of alpha cells into beta cells, induced by viral gene therapy, reverses autoimmune diabetes // Cell Stem Cell. 2018. V. 22. № 1. P. 78–90. https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.11.020
- 3. *Nowotschin S., Hadjantonakis A.-K., Campbell K.* The endoderm: a divergent cell lineage with many commonalities // Development. 2019. V. 146. № 11. dev150920. https://doi.org/10.1242/dev.150920
- 4. *Barresi M.G.F., Gilbert S.F.* Developmental Biology. 12th ed. Oxford: Univ. Press, 2019. 888 p.
- Adams M.S., Bronner-Fraser M. Review: The role of neural crest cells in the endocrine system // Endocrine Pathol. 2009. V. 20. № 2. P. 92–100. https://doi.org/10.1007/s12022-009-9070-6
- 6. De Felice M., Di Lauro R. Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms // Endocrine Rev. 2004. V. 25. № 5. P. 722–746. https://doi.org/10.1210/er.2003-0028
- 7. *Nilsson M., Fagman H.* Development of the thyroid gland // Development. 2017. V. 144. № 12. P. 2123–2140.

https://doi.org/10.1242/dev.145615

- 8. *Sadler T.W.* Langman's Medical Embryology. 14th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2018. 456 p.
- 9. *Pan F.C., Brissova M.* Pancreas development in humans // Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity. 2014. V. 21. № 2. P. 77–82. https://doi.org/10.1097/MED.00000000000047
- Jennings R.E., Berry A.A., Strutt J.P. et al. Human pancreas development // Development. 2015. V. 142. № 18. P. 3126–3137. https://doi.org/10.1242/dev.120063
- 11. Wilkinson D.G., Bhatt S., Herrmann B.G. Expression pattern of the mouse T gene and its role in mesoderm formation // Nature. 1990. V. 343. № 6259. P. 657–659.

https://doi.org/10.1038/343657a0

 Viotti M., Nowotschin S., Hadjantonakis A.-K. SOX17 links gut endoderm morphogenesis and germ layer segregation // Nat. Cell Biol. 2014. V. 16. № 12. P. 1146– 1156.

https://doi.org/10.1038/ncb3070

- Lickert H., Kutsch S., Kanzler B. et al. Formation of multiple hearts in mice following deletion of beta-catenin in the embryonic endoderm // Developmental Cell. 2002. V. 3. № 2. P. 171–181. https://doi.org/10.1016/s1534-5807(02)00206-x
- 14. *Tada S., Era T., Furusawa C. et al.* Characterization of mesendoderm: a diverging point of the definitive endoderm and mesoderm in embryonic stem cell differenti-

ation culture // Development. 2005. V. 132. № 19. P. 4363–4374. https://doi.org/10.1242/dev.02005

https://doi.org/10.1242/dev.02005

- David N.B., Rosa F.M. Cell autonomous commitment to an endodermal fate and behaviour by activation of Nodal signaling // Development. 2001. V. 128. № 20. P. 3937–3947.
- Lowe L.A., Yamada S., Kuehn M.R. Genetic dissection of nodal function in patterning the mouse embryo // Development. 2001. V. 128. № 10. P. 1831–1843.
- 17. *Shen M.M.* Nodal signaling: developmental roles and regulation // Development. 2007. V. 134. № 6. P. 1023–1034. https://doi.org/10.1242/dev.000166

 Charney R.M., Forouzmand E., Cho J.S. et al. Foxh1 occupies cis-regulatory modules prior to dynamic transcription factor interactions controlling the mesendoderm gene program // Developmental Cell. 2017. V. 40. № 6. P. 595–607. E4.

https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.02.017

- 19. Yang Y.-P., Anderson R.M., Klingensmith J. BMP antagonism protects Nodal signaling in the gastrula to promote the tissue interactions underlying mammalian forebrain and craniofacial patterning // Hum. Mol. Genet. 2010. V. 19. № 15. P. 3030–3042. https://doi.org/10.1093/hmg/ddq208
- 20. Loh K.M., Ang L.T., Zhang J. et al. Efficient endoderm induction from human pluripotent stem cells by logically directing signals controlling lineage bifurcations // Cell Stem Cell. 2014. V. 14. № 2. P. 237–252. https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.12.007
- Vincent S.D., Dunn N.R., Hayashi S. et al. Cell fate decisions within the mouse organizer are governed by graded Nodal signals // Genes & Development. 2003. V. 17. № 13. P. 1646–1662. https://doi.org/10.1101/gad.1100503
- 22. Lenhart K.F., Holtzman N.G., Williams J.R. et al. Integration of nodal and BMP signals in the heart requires FoxH1 to create left-right differences in cell migration rates that direct cardiac asymmetry // PLoS Genet. 2013. V. 9. № 1. P. e1003109. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003109
- 23. *Kiecker C., Bates T., Bell E.* Molecular specification of germ layers in vertebrate embryos // Cell. Mol. Life Sci.: CMLS. 2016. V. 73. № 5. P. 923–947. https://doi.org/10.1007/s00018-015-2092-y
- 24. *Kanai-Azuma M., Kanai Y., Gad J.M. et al.* Depletion of definitive gut endoderm in Sox17-null mutant mice // Development. 2002. V. 129. № 10. P. 2367–2379.
- 25. Viotti M., Niu L., Shi S.-H. et al. Role of the gut endoderm in relaying left-right patterning in mice // PLoS Biol. 2012. V. 10. № 3. P. e1001276. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001276
- 26. McKnight K.D., Hou J., Hoodless P.A. Foxh1 and Foxa2 are not required for formation of the midgut and hind-gut definitive endoderm // Developmental Biol. 2010. V. 337. № 2. P. 471–481. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.10.040
- 27. Davenport C., Diekmann U., Budde I. et al. Anteriorposterior patterning of definitive endoderm generated from human embryonic stem cells depends on the differential signaling of retinoic acid, Wnt-, and BMP-sig-

naling // Stem Cells. 2016. V. 34. № 11. P. 2635-2647. https://doi.org/10.1002/stem.2428

- 28. Zorn A.M., Wells J.M. Vertebrate endoderm development and organ formation // Annual Rev. Cell and Developmental Biol. 2009. V. 25. P. 221-251. https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113344
- 29. Gordillo M., Evans T., Gouon-Evans V. Orchestrating liver development // Development. 2015. V. 142. № 12. P. 2094-2108. https://doi.org/10.1242/dev.114215
- 30. Sherwood R.I., Chen T.-Y.A., Melton D.A. Transcriptional dynamics of endodermal organ formation // Developmental Dynamics: An Official Publ. Am. Association of Anatomists. 2009. V. 238. № 1. P. 29-42. https://doi.org/10.1002/dvdy.21810
- 31. Mark M., Ghyselinck N.B., Chambon P. Function of retinoic acid receptors during embryonic development // Nucl. Receptor Signaling, 2009, V. 7. P. e002. https://doi.org/10.1621/nrs.07002
- 32. Bayha E., Jørgensen M.C., Serup P. et al. Retinoic acid signaling organizes endodermal organ specification along the entire antero-posterior axis // PLoS One. 2009. V. 4. № 6. P. e5845. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005845
- 33. Wang Z., Dollé P., Cardoso W.V. et al. Retinoic acid regulates morphogenesis and patterning of posterior foregut derivatives // Developmental Biol. 2006. V. 297. № 2. P. 433–445.
 - https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.05.019
- 34. Wendling O., Dennefeld C., Chambon P. et al. Retinoid signaling is essential for patterning the endoderm of the third and fourth pharyngeal arches // Development. 2000. V. 127. № 8. P. 1553-1562.
- 35. Roberts D.J., Johnson R.L., Burke A.C. et al. Sonic hedgehog is an endodermal signal inducing Bmp-4 and Hox genes during induction and regionalization of the chick hindgut // Development. 1995. V. 121. № 10. P. 3163-3174.
- 36. Faure S., de Santa Barbara P. Molecular embryology of the foregut // J. Pediatric Gastroenterol. and Nutrition. 2011. V. 52. P. S2–S3. https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3182105a1a
- 37. Goss A.M., Tian Y., Tsukiyama T. et al. Wnt2/2b and beta-catenin signaling are necessary and sufficient to specify lung progenitors in the foregut // Developmental Cell. 2009. V. 17. № 2. P. 290–298. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.005
- 38. Domyan E.T., Ferretti E., Throckmorton K. et al. Signaling through BMP receptors promotes respiratory identity in the foregut via repression of Sox2 // Development. 2011. V. 138. № 5. P. 971-981. https://doi.org/10.1242/dev.053694
- 39. Billmyre K.K., Hutson M., Klingensmith J. One shall become two: separation of the esophagus and trachea from the common foregut tube // Developmental Dynamics: An Official Publ. Am. Association of Anatomists. 2015. V. 244. № 3. P. 277-288. https://doi.org/10.1002/dvdy.24219
- 40. Minoo P., Su G., Drum H. et al. Defects in tracheoesophageal and lung morphogenesis in Nkx2.1(-/-) mouse embryos // Developmental Biol. 1999. V. 209. № 1. P. 60-71. https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9234

- 41. Lindsay E.A., Vitelli F., Su H. et al. Tbx1 haploinsufficiency in the DiGeorge syndrome region causes aortic arch defects in mice // Nature. 2001. V. 410. № 6824. P. 97-101 https://doi.org/10.1038/35065105
- 42. Kelly R.G., Jerome-Majewska L.A., Papaioannou V.E. The del22q11.2 candidate gene Tbx1 regulates branchiomeric myogenesis // Hum. Mol. Genet. 2004. V. 13. № 22. P. 2829–2840. https://doi.org/10.1093/hmg/ddh304
- 43. Zhang Z., Huynh T., Baldini A. Mesodermal expression of Tbx1 is necessary and sufficient for pharyngeal arch and cardiac outflow tract development // Development. 2006. V. 133. № 18. P. 3587-3595. https://doi.org/10.1242/dev.02539
- 44. Garg V., Yamagishi C., Hu T. et al. Tbx1, a DiGeorge syndrome candidate gene, is regulated by Sonic Hedgehog during pharyngeal arch development // Developmental Biol. 2001. V. 235. № 1. P. 62-73. https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0283
- 45. Choe C.P., Crump J.G. Tbx1 controls the morphogenesis of pharvngeal pouch epithelia through mesodermal Wnt11r and Fgf8a // Development. 2014. V. 141. № 18. P. 3583-3593. https://doi.org/10.1242/dev.111740
- 46. Kameda Y., Ito M., Nishimaki T. et al. FRS2alpha is required for the separation, migration, and survival of pharyngeal-endoderm derived organs including thyroid, ultimobranchial body, parathyroid, and thymus // Developmental Dynamics: An Official Publ. Am. Association of Anatomists. 2009. V. 238. № 3. P. 503–513. https://doi.org/10.1002/dvdy.21867
- 47. Grevellec A., Tucker A.S. The pharyngeal pouches and clefts: development, evolution, structure and derivatives // Seminars in Cell & Developmental Biol. 2010. V. 21. № 3. P. 325–332. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2010.01.022
- 48. Gordon J., Manley N.R. Mechanisms of thymus organogenesis and morphogenesis // Development. 2011. V. 138. № 18. P. 3865–3878. https://doi.org/10.1242/dev.059998
- 49. Gordon J., Bennett A.R., Blackburn C.C. et al. Gcm2 and Foxn1 mark early parathyroid- and thymus-specific domains in the developing third pharyngeal pouch // Mechanisms of Development. 2001. V. 103. № 1-2. P. 141-143. https://doi.org/10.1016/s0925-4773(01)00333-1
- 50. Kebebew E., Peng M., Wong M.G. et al. GCMB gene, a master regulator of parathyroid gland development, expression, and regulation in hyperparathyroidism // Surgery. 2004. V. 136. № 6. P. 1261-1266. https://doi.org/10.1016/j.surg.2004.06.056
- 51. Manley N.R. Embryology of the parathyroid glands // Hypoparathyroidism. Springer-Verlag Italia, 2015. P. 11-18.

https://doi.org/10.1007/978-88-470-5376-2 2

Maret A., Ding C., Kornfield S.L. et al. Analysis of the 52. GCM2 gene in isolated hypoparathyroidism: a molecular and biochemical study // The J. Clin. Endocrinol. and Metabolism. 2008. V. 93. № 4. P. 1426-1432. https://doi.org/10.1210/jc.2007-1783

277

ГЕНЕТИКА том 57 Nº 3 2021 53. Guan B., Welch J.M., Sapp J.C. et al. GCM2-activating mutations in familial isolated hyperparathyroidism // The Am. J. Hum. Genet. 2016. V. 99. № 5. P. 1034– 1044.

https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.08.018

54. *Correa P., Akerström G., Westin G.* Underexpression of Gcm2, a master regulatory gene of parathyroid gland development, in adenomas of primary hyperparathyroidism // Clin. Endocrinol. 2002. V. 57. № 4. P. 501–505.

https://doi.org/10.1046/j.1365-2265.2002.01627.x

- 55. *Grevellec A., Graham A., Tucker A.S.* Shh signalling restricts the expression of Gcm2 and controls the position of the developing parathyroids // Developmental Biol. 2011. V. 353. № 2. P. 194–205. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.02.012
- 56. Yamagishi H. Tbx1 is regulated by tissue-specific forkhead proteins through a common Sonic hedgehog-responsive enhancer // Genes & Development. 2003. V. 17. № 2. P. 269–281. https://doi.org/10.1101/gad.1048903
- 57. Bain V.E., Gordon J., O'Neil J.D. et al. Tissue-specific roles for sonic hedgehog signaling in establishing thymus and parathyroid organ fate // Development. 2016. V. 143. № 21. P. 4027–4037. https://doi.org/10.1242/dev.141903
- 58. *Ohyama T., Groves A.K.* Expression of mouse Foxi class genes in early craniofacial development // Developmental Dynamics. 2004. V. 231. № 3. P. 640–646. https://doi.org/10.1002/dvdy.20160
- 59. Hasten E., Morrow B.E. Tbx1 and Foxi3 genetically interact in the pharyngeal pouch endoderm in a mouse model for 22q11.2 deletion syndrome // PLoS Genet. 2019. V. 15. № 8. P. e1008301. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008301
- 60. *Edlund R.K., Ohyama T., Kantarci H. et al.* Foxi transcription factors promote pharyngeal arch development by regulating formation of FGF signaling centers // Developmental Biol. 2014. V. 390. № 1. P. 1–13. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.03.004
- 61. Su D., Ellis S., Napier A. et al. Hoxa3 and Pax1 regulate epithelial cell death and proliferation during thymus and parathyroid organogenesis // Developmental Biol. 2001. V. 236. № 2. P. 316–329. https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0342
- 62. *Manley N.R., Selleri L., Brendolan A. et al.* Abnormalities of caudal pharyngeal pouch development in Pbx1 knockout mice mimic loss of Hox3 paralogs // Developmental Biol. 2004. V. 276. № 2. P. 301–312. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.08.030
- 63. Zou D., Silvius D., Davenport J. et al. Patterning of the third pharyngeal pouch into thymus/parathyroid by Six and Eya1 // Developmental Biol. 2006. V. 293. № 2. P. 499–512. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.12.015

64. *Gordon J., Wilson V.A., Blair N.F. et al.* Functional evidence for a single endodermal origin for the thymic ep-

- ithelium // Nat. Immunology. 2004. V. 5. № 5. P. 546– 553. https://doi.org/10.1038/ni1064
- 65. Gardiner J.R., Jackson A.L., Gordon J. et al. Localised inhibition of FGF signalling in the third pharyngeal

pouch is required for normal thymus and parathyroid organogenesis // Development. 2012. V. 139. № 18. P. 3456–3466.

https://doi.org/10.1242/dev.079400

- 66. *Gordon J., Patel S.R., Mishina Y. et al.* Evidence for an early role for BMP4 signaling in thymus and parathyroid morphogenesis // Developmental Biol. 2010. V. 339. № 1. P. 141–154. https://doi.org/10.1016/j.vdbio.2009.12.026
- 67. *Kamitani-Kawamoto A., Hamada M., Moriguchi T. et al.* MafB interacts with Gcm2 and regulates parathyroid hormone expression and parathyroid development // J. Bone and Mineral Research: The Official J. Am. Society for Bone and Mineral Research. 2011. V. 10. № 26. P. 2463–2472. https://doi.org/10.1002/jbmr.458
- 68. *Naveh-Many T., Silver J.* Transcription factors that determine parathyroid development power PTH expression // Kidney Internat. 2018. V. 93. № 1. P. 7–9. https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.08.026
- 69. Grigorieva I.V., Mirczuk S., Gaynor K.U. et al. Gata3deficient mice develop parathyroid abnormalities due to dysregulation of the parathyroid-specific transcription factor Gcm2 // J. Clin. Investigation. 2010. V. 120. № 6. P. 2144–2155. https://doi.org/10.1172/JCI42021
- 70. Peissig K., Condie B.G., Manley N.R. Embryology of the parathyroid glands // Endocrinology and Metabolism Clinics of North America. 2018. V. 47. № 4. P. 733– 742. https://doi.org/10.1016/j.ecl.2018.07.002
- 71. Van Esch H., Groenen P., Nesbit M.A. et al. GATA3 haplo-insufficiency causes human HDR syndrome // Nature. 2000. V. 406. № 6794. P. 419–422. https://doi.org/10.1038/35019088
- 72. *Grigorieva I.V., Thakker R.V.* Transcription factors in parathyroid development: lessons from hypoparathyroid disorders // Annals N.Y. Acad. Sci. 2011. V. 1237. № 1. P. 24–38. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06221.x
- 73. Ordóñez N.G. Value of GATA3 immunostaining in tumor diagnosis: a review // Adv. Anatomic Pathol. 2013.
 V. 20. № 5. P. 352–360. https://doi.org/10.1097/PAP.0b013e3182a28a68
- 74. Han S.-I., Tsunekage Y., Kataoka K. Gata3 cooperates with Gcm2 and MafB to activate parathyroid hormone gene expression by interacting with SP1 // Mol. Cell. Endocrinol. 2015. V. 411. P. 113–120. https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.04.018
- 75. *Yiangou L., Ross A.D.B., Goh K.J. et al.* Human pluripotent stem cell-derived endoderm for modeling development and clinical applications // Cell Stem Cell. 2018. V. 22. № 4. P. 485–499. https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.03.016
- 76. *Cahan P., Daley G.Q.* Origins and implications of pluripotent stem cell variability and heterogeneity // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2013. V. 14. № 6. P. 357–368. https://doi.org/10.1038/nrm3584
- 77. *Siller R., Naumovska E., Mathapati S. et al.* Development of a rapid screen for the endodermal differentiation potential of human pluripotent stem cell lines //

ГЕНЕТИКА том 57 № 3 2021

278

Sci. Reports. 2016. V. 6. Article number 37178. https://doi.org/10.1038/srep37178

- Li Q.V., Dixon G., Verma N. et al. Genome-scale screens identify JNK-JUN signaling as a barrier for pluripotency exit and endoderm differentiation // Nat. Genet. 2019. V. 51. P. 999–1010. https://doi.org/10.1038/s41588-019-0408-9
- 79. *Mou H., Zhao R., Sherwood R. et al.* Generation of multipotent lung and airway progenitors from mouse ESCs and patient-specific cystic fibrosis iPSCs // Cell Stem Cell. 2012. V. 10. № 5. P. 385–397. https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.01.018
- 80. Wong A.P., Bear C.E., Chin S. et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into mature airway epithelia expressing functional CFTR protein // Nat. Biotechnol. 2012. V. 30. № 9. P. 876–882. https://doi.org/10.1038/nbt.2328
- Kearns N.A., Genga R.M., Ziller M. et al. Generation of organized anterior foregut epithelia from pluripotent stem cells using small molecules // Stem Cell Res. 2013. V. 11. № 3. P. 1003–1012. https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.06.007

- 83. Bingham E.L., Cheng S.-P., Woods Ignatoski K.M. et al. Differentiation of human embryonic stem cells to a parathyroid-like phenotype // Stem Cells and Development. 2009. V. 18. № 7. P. 1071–1080. https://doi.org/10.1089/scd.2008.0337
- Woods Ignatoski K.M., Bingham E.L., Frome L.K. et al. Differentiation of precursors into parathyroid-like cells for treatment of hypoparathyroidism // Surgery. 2010. V. 148. № 6. P. 1186–1189. Discussion 1189–1190. https://doi.org/10.1016/j.surg.2010.09.021
- 85. Green M.D., Chen A., Nostro M.-C. et al. Generation of anterior foregut endoderm from human embryonic and induced pluripotent stem cells // Nat. Biotechnol. 2011. V. 29. № 3. P. 267–272. https://doi.org/10.1038/nbt.1788

The Role of Genetic Factors in Organization and Regulation of Endocrine Tissues Development *in vivo* and *in vitro*

D. V. Goliusova^{a, *}, N. V. Klementieva^b, A. V. Panova^{a, b}, N. G. Mokrysheva^b, and S. L. Kiselev^{a, **}

^aVavilov Institute of General Genetic, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia ^bEndocrinology Research Centre, Moscow, 117036 Russia *e-mail: daria.goliusova@mail.ru **e-mail: sl_kiselev@yahoo.com

Endocrine cells can be fully functional after heterotopic transplantation into mammals that makes them a powerful tool for regenerative medicine. However, the shortage of reliable and efficient approaches to obtain endocrine cells *in vitro* limits the possibility of cell-based therapy of endocrine disorders. Here, we discuss current data on genetic and molecular mechanisms of mouse and human endocrine tissues embryonic development, as well as key genetic factors which regulate differentiation of pluripotent stem cells (PSC) in endodermal lineage *in vitro* into endocrine parathyroid cells. Data presented allow us to suggest an alternative approach for parathyroid differentiation of PSC based on genetic programming by induction of key endogenic differentiation factors expression.

Keywords: genes, developmental genetics, endocrine tissues, definitive endoderm, parathyroid cells, differentiation *in vitro*.

ГЕНЕТИКА РАСТЕНИЙ

УДК 577.21:575.113.12

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ И ЭКСПРЕССИЯ ПАРАЛОГОВ ФИТОИНСИНТАЗЫ (PSY) У ВИДОВ ПЕРЦА КЛАДЫ Annuum

© 2021 г. М. А. Филюшин^{1, *}, Е. А. Дьяченко¹, Г. И. Ефремов¹, Е. З. Кочиева¹, А. В. Щенникова¹

¹Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

> *e-mail: michel7753@mail.ru Поступила в редакцию 08.04.2020 г. После доработки 04.06.2020 г. Принята к публикации 08.07.2020 г.

В настоящем исследовании у пяти образцов трех видов перца (*Capsicum annuum*, *C. chinense* и *C. frute-scens*), различающихся паттерном пигментации плода, идентифицированы гомологи генов *PSY1* и *PSY2*, кодирующих ключевой фермент каротиногенеза — фитоинсинтазу. Внутри исследуемой группы перцев определена вариабельность геномных последовательностей *PSY1* и *PSY2* и кДНК. Последовательности белков PSY1 и PSY2 были сходны (82%) и различались N- и C-концевыми инделями NAGLRYSD и KLTSSSL, а также консервативными мотивами, характерными для групп гомологов PSY2 и PSY1. Экспрессия генов *PSY1* и *PSY2* проанализирована в листьях, чашелистиках, лепестках, завязи, а также в кожице и мякоти плодов в процессе созревания у анализируемых образцов перца. Показан максимальный уровень экспрессии *PSY1* в лепестках, а также в перикарпе зрелых плодов образцов *C. annuum* и *C. frutescens*. У образца *C. chinense* Pimenta da Neyde ген *PSY1* экспрессировался только в листьях. Транскрипты *PSY2* обнаружены во всех анализируемых органах образцов перца, максимальный уровень – в листьях, минимальный – в перикарпе плодов. Полученные данные предполагают сохранение у видов перца гомологами *PSY1* и *PSY2* консервативных ключевых функций в синтезе каротиноидов в плодах (PSY1) и фотосинтезирующих тканях (PSY2).

Ключевые слова: фитоинсинтаза, PSY1, PSY2, *Capsicum*, виды перца, окраска плода. **DOI:** 10.31857/S0016675821020041

Растения, за редким исключением, являются фотосинтезирующими организмами и для поглощения и преобразования световой энергии используют пигменты — хлорофиллы и каротиноиды, при этом каротиноиды задействованы также для защиты молекул хлорофилла от фотоокисления [1]. Более того, каротиноиды являются предшественниками фитогормонов (абсцизовой кислоты и стриголактонов), а их производные могут действовать как сигнальные молекулы в процессах развития растений и в ответ на воздействия окружающей среды [2–4]. Также растения используют каротиноиды как оптические сигналы при взаимодействии с насекомыми и другими животными, пигментируя цветковые органы и/или плоды [4].

Механизм биосинтеза каротиноидов консервативен, однако по мере эволюции растений к общей специализации данных пигментов добавлялись новые функции. Так, увеличение фотосинтезирующей поверхности при образовании плоского листа из радиально-симметричного стебля повысило необходимость фотозащиты [1]. Появление репродуктивных органов добавило необходимость окраски лепестков и тычинок для привлечения опылителей [5]. Преобразование сухого плода в сочный и окрашенный сделало его привлекательным для животных, что дало растениям большие возможности в распространении семян [6]. Такая многофункциональность продуктов каротиногенеза является следствием эволюционной дупликациии последующей диверсификации генов биосинтеза каротиноидов. Прежде всего это касается гена-предшественника фитоинсинтаз *PSY* (phytoene synthase), чьи продукты играют ключевую роль в инициации синтеза каротиноидов в различных органах растения [7, 8].

Фитоинсинтаза PSY локализуется в строме пластид и катализирует образование 15-*цис*-изомера фитоина, предшественника всех каротиноидов [7, 9]. Несколько последующих стадий приводят к синтезу ликопина, который в дальнейшем используется для синтеза α -каротина и β -каротина (оранжевый пигмент). В свою очередь, α -каротин и β -каротин могут превращаться в желтые пигменты лютеин и ксантофиллы [9, 10].

У растений описано от одного до трех паралогов *PSY*. Геном злаковых (Poaceae) и некоторых других видов однодольных содержит три гена *PSY*
[11]. Двудольные виды в этом плане более разнообразны. К примеру, в геноме *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. присутствует только один ген *PSY* [12]. Для других двудольных описано, как минимум, два гена фитоинсинтазы. В то же время геном люцерны и томата содержит три гена *PSY*[3, 13].

Первый идентифицированный ген фитоинсинтазы растений, PSY1, специфичен в основном для хромопластов и задействован в пигментации сочного плода при его созревании [14]. При отсутствии транскрипции PSY1 не происходит синтеза каротиноидов в плодах, а суперэкспрессия PSY1 значительно увеличивает каротиногенез в запасающих органах (клубнях картофеля, плодах томата и т.д.) [15, 16]. Второй ген PSY2 специфичен, прежде всего, для хлоропластов и его экспрессия максимальна в фотосинтезирующей ткани [17]. Третий паралог, *PSY3*, идентифицирован не у всех видов. У томата, люцерны и зерновых PSY3 активен в корнях в ответ на стресс, индуцирует синтез апокаротиноидов (окисленных производных каротиноидов), участвующих в формировании симбиотических и паразитарных отношений, а также в адаптации к дефициту некоторых пищевых элементов [3, 18].

Белки PSY1 и PSY2 высоко гомологичны, однако различаются по биохимическим свойствам [7, 19]. Тем не менее нельзя говорить об их строгой тканеспецифичности: оба гена транскрибируются в одинаковых тканях, но значительно различаются (до 100 раз) уровнями транскрипции [3]. Это обусловлено тем, что эффективность PSY1 в каротиногенезе ниже, чем PSY2, поэтому для синтеза большого количества каротиноидов в плодах необходим более высокий уровень транскрипции *PSY1* [20].

Наиболее удобной и изученной моделью для исследования созревания сочных плодов, включая синтез вторичных метаболитов и вероятную эволюцию соответствующих генетических механизмов, считаются виды и сорта томата (секция Lycopersicon рода Solanum) [21]. Виды томата формируют цветки с желтыми лепестками, но различаются окраской зрелых плодов [22]. У томата овощного S. lycopersicum L. оба гена, PSY1 и PSY2, задействованы в определении окраски лепестков [7]. Это свидетельствует об изначально общей роли *PSY1* и *PSY2* в окраске лепестков и о более раннем происхождении PSY2 по отношению к PSY1, с приобретением PSY1 позднее новой функции – пигментация плодов [23]. Теоретически полученные знания могут быть применены к другим формирующим сочные плоды культурам.

Род *Capsicum* (Solanaceae) включает более 35 видов, объединенных по морфофизиологическим признакам в несколько филогенетических клад. Виды *C. annuum* L., *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L. (клада Annuum) и *C. baccatum* L. (клада Baccatum)

ГЕНЕТИКА том 57 № 3 2021

были доместицированы [24, 25]. Перец формирует сочный плод, окраска которого различается у видов и сортов [26]. Как и у томата, перикарп плодов перца по мере созревания проходит стадию замещения хлоропластов хромопластами, в которых и накапливаются синтезируемые каротиноиды [27]. На сегодняшний день у *С. аппиит* L. обнаружено два паралога гена фитоинсинтазы – *PSY1* и *PSY2* [28]. В отличие от томата, формирующего цветки с желтыми лепестками, цветки видов Capsicum имеют белую или антоциановую пигментацию, акаротиноидный путь в плодах Capsicum идет дальше синтеза ликопина и каротинов (обычных для плодов томата) и доходит до ксантофиллов β-каротинового пути, из которых под действием специфичного для видов *Capsicum* фермента капсантинкапсорубинсинтазы (CCS) образуются красные пигменты капсантин и капсорубин [26]. Состав каротиноидов в плодах перца значительно отличается от такового у томата и представлен в основном капсантином и капсорубином, а также В-каротином, β-криптоксантином, лютеином, зеаксантином, антраксантином и виолаксантином, различное сочетание и соотношение которых определяет многообразие оттенков окраски плодов [29]. Суммарное содержание каротиноидов в плодах перца значительно превышает их количество в плодах томата [26, 30]. Учитывая вышесказанное, можно предположить, что прямой перенос данных по каротиногенезу у видов томата на другие виды с сочными плодами, в частности перец, не совсем корректен и необходимы дополнительные уточняющие исследования.

Целью настоящей работы стала оценка вариабельности паралогов фитоинсинтазы у видов *Capsicum* клады Annuum. Для этого гены, гомологичные *PSY1* и *PSY2*, были идентифицированы у видов перца *Capsicum annuum* L. (сорта Сибиряк, Сиреневый куб и Отелло), *C. frutescens* L. (сорт Самоцвет) и *C. chinense* Jacq. (сорт Pimenta da Neyde). Была охарактеризована структура и филогения идентифицированных генов и определен профиль их экспрессии в листьях, чашелистиках, лепестках, завязи, а также в кожице и мякоти плодав процессе созревания, а также возможные корреляции уровня экспрессии *PSY1* и *PSY2* с содержанием каротиноидов в плоде в процессе созревания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. В работе были использованы образцы трех родственных видов перца, формирующих кладу Annuum: *С. аппиит* (сорта Сибиряк, Сиреневый куб и Отелло), *С. frutescens* (сорт Самоцвет) и *С. chinense* (сорт Pimenta da Neyde) (рис. 1). Растения были выращены в пленочной теплице в Федеральном научном центре овощеводства (Московская область). Набор тканевых препаратов для каждого анализируемого образца



Рис. 1. Плоды анализируемых сортов перца: *a* – Сибиряк (*C. annuum*), *б* – Сиреневый куб (*C. annuum*), *в* – Отелло (*C. annuum*), *e* – Самоцвет (*C. frutescens*), *∂* – Pimenta da Neyde (*C. chinense*). Цифрами обозначены стадии созревания плодов: 1 – незрелый плод финального размера (MF, mature fruit); 2 – бланжевый плод (IR, intermediate ripe; соответствует переходу к зрелости с постепенной сменой окраски); 3 – плод биологической спелости (RF, ripe fruit). Масштабная линия равна 1 см.

включал молодые листья, чашелистики, лепестки, завязь, а также кожицу и мякоть плода на трех стадиях созревания: незрелый плод финального размера (MF, mature fruit); бланжевый плод (IR, intermediate ripe; соответствует переходу к зрелости с постепенной сменой окраски); плод биологической спелости (RF, ripe fruit). Выбранные для работы сорта представляют два основных паттерна изменения окраски плода в процессе созревания у видов перца комплекса Annuum. Для сорта Сибиряк (С. аппиит) последовательность изменения окраски следующая: зеленая (стадия MF), мозаичная зелено-красная (стадия IR), глубокая красная (стадия RF). Для сортов Отелло и Сиреневый куб (С. аппиит) — это фиолетовая (стадия MF), красная/фиолетово-красная (стадия IR), глубокая красная (стадия RF). Для вида C. frutescens (Самоцвет): фиолетовая (стадия MF), бледно-желтая (стадия IR) и красная (стадия RF). Образец C. chinense (Pimenta da Neyde) формировал плоды фиолетовые на всех стадиях развития, при этом стадия биологической спелости (RF) у данного сорта не выражена, поэтому были взяты только плоды стадий MF и IR (рис. 1). Индивидуальные ткани растений каждого образца собирали одновременно, измельчали в жидком азоте и хранили при −80°С.

Таким образом, для характеристики межвидовой вариабельности генов фитоинсинтазы были взяты образцы перца с типичными для перцев паттернами пигментации плода и один сорт (Pimenta da Neyde) с аномальной каротиноидной пигментацией.

Биохимический анализ тканей анализируемых образцов перца. Содержание суммы каротиноидов в плодах исследуемых образцов перца определяли методом спектрофотометрии в хлороформ-метанольных экстрактах, согласно [31, 32], в двух биологических и трех технических повторах.

Идентификация гомологов генов PSY1 и PSY2. Из ткани листа каждого из пяти анализируемых образцов перца выделяли геномную ДНК методом СТАВ [33] и использовали (100 нг) в качестве матрицы для амплификации ДНК-последовательностей, гомологичных PSY1 и PSY2. Праймеры для амплификации и секвенирования фрагментов полноразмерных генов разрабатывали на основе доступных в базе данных NCBI полногеномных последовательностей C. annuum PSY1 (LOC107868281 bifunctional 15-cis-phytoene synthase, chromoplastic, Gene ID: 107868281) и PSY2 (LOC107859651 phytoene synthase 2, chloroplastic, Gene ID: 107859651) (табл. 1). Использовали праймеры CaPSYF/R и следующие условия ПЦР: исходная денатурация (94°С 10 мин); 36 циклов денатурации (94°С 40 с), отжига (56°С 40 с) и синтеза (65°С 4 мин); финальное достраивание фрагментов (65°С 7 мин). Гены амплифицировали с исполь-

Ген	Праймер	Последовательность (5' \rightarrow 3')	Назначение
	CaPSY1F	TCAGAATGTCTGTTGCCTTG	Амплификация,
	CaPSY1ex3F	ATGGTGCAGGAGAACAGAC	секвенирование
	CaPSY1ex3R	AACTGTGTCGGACAAAGCAG	
PSY1	CaPSY1ex5R	CATCTACTAGCTGCGCTCAA	
	CaPSY1ex5F	TTAGCACAGGCAGGTCTATC	
	CaPSY1R	TCCTGATTTCATGTTCTTGTAGA	
	CaPSY1ex1R	ACATCATATACCATCYGTTC	
	CaPSY2F	AGCATGTCTGTTGCTTTGTTG	
	CaPSY2ex3F	CTGATGAGCTTGTTGATGGC	
	CaPSY2ex3R	AATCTGGAAACGGTATCGG	
PSY2	CaPSY2ex4F	CTCTATTGTTACTATGTCGCTG	
	CaPSY2ex5R	AATCCTCCACTTATCAGTCAC	
	CaPSY2R	CTTCATTCATGTCTTTGYTAGTG	
	CaPSY2ex1R	CAACACCACATCATACACC	
PSV1	PSY1-F	GTGAAGAGACAGCTGAGATCG	РВ-ПЦР
1511	PSY1-R	TCTCCGGAGTCATTAGCATCG	
PSV2	PSY2-F	AAGGAGTCGCAGAACTGAGC	
1312	PSY2-R	GTCGTTCGCTTCAATCTCATCTAA	
Actin7	Actin 7-F	CATTGTGCTCAGTGGTGGTTC	
	Actin 7-R	TCTGCTGGAAGGTGCTAAGTG	

Таблица 1. Список использованных в работе праймеров

зованием полимеразы LongAmp[®] Hot Start Taq DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA, США) и термоциклера C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, США). ПЦР-продукты ожидаемой длины очищали с помощью QIAEX[®] II Gel Extractionkit (QIAGEN, Hilden, Германия), клонировали в вектор pGEM[®]-T Easy (Promega, Madison, WI, США) и секвенировали (2–4 клона для каждого образца) на ABI Prism 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Waltham, MA, США).

Структурный анализ гомологов генов PSY1 и PSY2 и кодируемых ими белков. Анализ и выравнивание полученных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы MEGA 7.0 (https://www.megasoftware.net/) в сравнении с известными последовательностями *C. annuum PSY1* (Gene ID: 107868281) и PSY2 (Gene ID: 107859651), а также с S. lycopersicum PSY1 (Gene ID: 543988) и PSY2 (Gene ID: 543964). Кроме того, был проведен биоинформационный поиск гомологичных генов в секвенированных геномах видов перца C. baccatum и C. chinense, обнаруженные последовательности были использованы в сравнительном структурном анализе. Положение нуклеотидных и аминокислотных замен определяли внутри группы Сар*sicum* и относительно *S. lycopersicum PSY1* и *PSY2*. Консервативные домены и мотивы в кодируемых

ГЕНЕТИКА том 57 № 3 2021

белках определяли с помощью программ NCBI-CDD (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi) и MEME 5.1.1 (http://memesuite.org/tools/meme). Влияние аминокислотных замен на структуру и функции белков предсказыпомощью программы PROVEAN вали с (http://provean.jcvi.org/index.php). Структуру белков анализировали с использованием программы (http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/ht-Phyre2 ml/page.cgi?id=index). Молекулярную массу и значение изоэлектрической точки (pI) определяли с помощью программы Isoelectric Point Calculator (http://isoelectric.org/).

Филогения генов PSY1 и PSY2. Для филогенетического анализа эволюционных отношений, как идентифицированных генов, так и видов перца, использовали известные последовательности генов, кДНК и белков PSY томата S. lycopersicum (PSY1, Gene ID: 543988; CDS ID: EU021055.1 (cv. Red Setter) и EF157835.1; PSY2, Gene ID: 107859651; CDS ID: EU021055.1 (cv. Red Setter)) и видов перца С. annuum cv. Zunla-1 (PSY1, NC_029980.1:c205334820-205328571: PSY2. NC_029978.1:142877052-142881261), C. annuum cv. Valencia (PSY1, GU085273.1), C. baccatum isolate CM008446.1:19444825-19449400; PBC81 (*PSY1*, PSY2, CM008444.1:141318038—141337266) и C. chinense isolate PI159236 (PSY1, CM008434.1:12099868-12105776; PSY2, CM008432.1:150147614-150156089).

ФИЛЮШИН и др.

Образец перца	Ген	NCBI ID	т	Длин	на экзона	/интрона	, пн У	УЛ	Ген, пн	кДНК, пн	Белок,	MW/pI
			I	11	111	IV	V	VI		IIII	u.o.	
С. аппиит сорт	PSY1	MT313932	448/96	51/261	173/328	236/250	193/649	159	2844	1260	419	47.140/8.25
Сибиряк	PSY2	MT313937	466/101	51/744	173/193	236/219	193/429	180	2985	1299	432	48.535/8.53
С. аппиит сорт	PSY1	MT313933	448/96	51/261	173/328	236/291	193/649	159	2885	1260	419	47.066/8.14
Сиреневый куб	PSY2	MT313938	466/101	51/744	173/193	236/219	193/429	180	2985	1299	432	48.430/8.60
C. annuum copt	PSY1	MT313934	448/96	51/261	173/328	236/250	193/649	159	2844	1260	419	47.094/8.25
Отелло	PSY2	MT313939	466/101	51/744	173/193	236/219	193/429	180	2985	1299	432	48.405/8.43
C. frutescens copt	PSY1	MT313935	448/96	51/261	173/328	236/250	193/649	159	2844	1260	419	47.126/8.25
Самоцвет	PSY2	MT313940	466/101	51/744	173/193	236/219	193/429	180	2985	1299	432	48.434/8.60
С. chinense сорт	PSY1	MT313936	448/96	51/261	173/328	236/291	193/649	159	2885	1260	419	47.052/8.14
Pimenta da Neyde	PSY2	MT313941	466/101	51/753	173/193	236/219	193/433	180	2998	1299	432	48.362/8.43
S. lycopersicum	PSY1	EF534740.1	412/120	51/423	173/313	236/518	193/689	174	3302	1239	413	46.615/8.10
сорт Red Setter*	PSY2	EU021055.1	484/107	51/710	173/267	242/227	193/398	180	3032	1317	438	49.326/8.05

Таблица 2. Характеристики гомологов генов PSY1 и PSY2 у видов и сортов Capsicum в сравнении с S. lycopersicum

Примечение. МW – молекулярная масса белков, кДа; pI – изоэлектрическая точка. * Последовательности из базы NCBI.

Анализ проводили с помощью метода ближайших соседей (NJ; модель подбирали в программе Modeltest) пакета программ MEGA 7.0.

Профиль ко-экспрессии гомологов генов PSY1 и PSY2. Препараты суммарной PHK выделяли из отобранного растительного материала, очищали от примесей ДНК и использовали для синтеза первой цепи кДНК (наборы RNeasy Plant Mini Kit и RNase free DNasy set; QIAGEN, Германия; GoScript[™] Reverse Transcription System (Promega, США).

Профиль экспрессии *PSY1* и *PSY2* опрелеляли методом количественной ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР) с использованием набора "Реакционная смесь для проведения PB-ПЦР в присутствии SYBR GreenI и ROX" (ООО "Синтол", Россия) и термо-циклера CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США). Праймеры для РВ-ПЦР были разработаны ранее, на основе доступных в базе данных NCBI последовательностей мРНК С. аппиит PSY1 (X68017) и PSY2 (ХМ 016704726.1) [34] (табл. 1). Для нормализации уровня транскрипции генов использовали экспрессию референсного гена Actin7 [35]. Реакции проводили в трех технических повторах в следующих условиях: 95°С - 5 мин; 40 циклов $(95^{\circ}C - 15 c, 62^{\circ}C - 50 c)$. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Graph Pad Prism v. 7.02 (https://www.graphpad.com).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Идентификация и анализ структуры гомологов PSY1 и PSY2 у образцов трех видов перца

У образцов видов перца *С. аппиит* (сорта Сибиряк, Сиреневый куб и Отелло), *С. frutescens* (сорт Самоцвет) и *С. chinense* (сорт Pimenta da Neyde) были определены геномные последовательности генов *PSY1* и *PSY2*, гомологичные известным генам *PSY1* и *PSY2 С. аппиит* (NC_029980.1; NC_029978.1). Последовательности были идентифицированы, начиная с ATG-кодона, без нетранслируемых областей 5'- и 3'-UTR, где у *PSY1* и *PSY2 S. lycopersicum* находятся нетранслируемые экзоны. Основные характеристики полученных генов приведены в табл. 2.

Длина генов *PSY1*, содержащих шесть экзонов, составила 2844 пн (*C. annuum* сv. Сибиряк и Отелло; *C. frutescens* сv. Самоцвет) и 2885 пн (*C. chinense* сv. Pimenta da Neyde; *C. annuum* сv. Сиреневый куб) (табл. 2). Разница в размере генов была обусловлена присутствием вставки 41 пн в интроне IV. Интересно, что в отличие от Pimenta da Neyde в известной последовательности *PSY1* образца *C. chinense* (CM008434.1:12099868–12105776) такой вставки нет. Последовательность *PSY1* у *C. baccatum* (CM008446.1:19444825–19449400) имела длину 2846 пн, а у *S. lycopersicum* (EF157835.1) – 3302 пн (от АТG до стоп-кодона).

Длина гомологов *PSY2* у исследуемых видов/сортов перца составила 2985 пн, за исключением *C. chinense* сv. Pimenta da Neyde (2998 пн, за счет двух вставок – 9 и 4 пн в интронах II и V). У вида *C. baccatum* длина гена *PSY2* составляла 2994 пн (CM008444.1:141318038–141337266), а у *S. lycopersicum* – 3032 пн (EU021055.1). Аналогично *PSY1* ген *PSY2* содержит шесть экзонов, размеры которых идентичны у анализируемых образцов перца.

В сравнении с *PSY1* и *PSY2 S. lycopersicum* в последовательностях *PSY1* и *PSY2* исследуемых образцов *Capsicum* было обнаружено 955 и 847 мононуклеотидных вариабельных сайтов SNPs (28.24 и 27.09% от выровненных длин), из которых только 128 (13.40%) и 97 (11.45%) были локализованы в кодирующей последовательности. Между собой геномные последовательности *PSY1/PSY2* образцов перца различались числом SNPs: 75 (2.60%)/51 (1.70%), больше трети которых находились в кДНК (24 (32.00%)/19 (37.25%)). При этом большая часть SNPs была локализована в экзоне I: 16 (66.70% всех экзонных замен) у *PSY1* и 14 (73.70%) у *PSY2*.

Размер кДНК *PSY1* и *PSY2* у всех исследуемых образцов перца составил 1260 и 1299 пн соответственно (табл. 2). Различие в размере кДНК двух паралогов *PSY* обусловлено большей длиной экзонов I и VI гена *PSY2*.

Длина белков PSY1 и PSY2 была инвариантна у всех исследуемых образцов клады Annuum и составила 419 и 432 а.о. соответственно (табл. 2; рис. 1 и 2 в Приложении) и отличалась от последовательностей генов фитоинсинтазы C. baccatum (клада Baccatum) четырьмя (D194G, R91Q, С/Y59W, G/A40V – PSY1) и одним (V15F – PSY2) замещениями а.о. (рис. 2), которые, тем не менее, имели нейтральный характер (согласно PROVEAN). В последовательности PSY1 сорта Отелло обнаружено всего одно замещение а.о., которое внутри группы анализируемых образцов может иметь радикальный характер (согласно PROVEAN) – M207V. В последовательности PSY2 сортов Сиреневый куб и Pimenta da Nevde также было обнаружено по одному предположительно радикальному замещению a.o. – S136I и N186T соответственно.

В сравнении с PSY1 томата все идентифицированные гомологи PSY1 *Capsicum* имели вставку R53InsQ64 (RWSFGSCLGGAQ) и делецию на C-конце A408_R412del (ASLQR). В последовательности PSY2 *Capsicum*, в сравнении с гомологичным белком *S. lycopersicum*, выявлена делеция L32_F37del (LESSRF) (рис. 2). Анализ инделей в программе PROVEAN показал, что они носят нейтральный характер и не должны существенно изменить конформацию и функцию белка.

Несколько радикальных замещений а.о. было обнаружены при сравнении PSY1 и PSY2 перца с соответствующими белками *S. lycopersicum* (*S. lycopersicum* vs. *Capsicum* spp.): Q79R, P106K, G125S, M195V и W357L – для PSY1 и G71D/G, S142I, N192T и D335G – для PSY2 (рис. 2).

В целом идентифицированные последовательности перца PSY1 и PSY2 были высоко гомологичны (идентичность 82%). Главным отличием PSY2 от PSY1 стало присутствие вставок на N-и C-конце белка: NAGLRYSD (в положении 58–65 а.о.) и KLTSSSL (в положении 423–429 а.о.).

Дополнительно с использованием MEME 5.1.1 был проведен анализ возможных консервативных мотивов, специфичных для белков PSY1 и PSY2 (рис. 3). Всего было выявлено 14 достоверных мотивов, 11 из которых были общими для всех последовательностей. Были выявлены мотивы 10 и 13, характерные для клады PSY2, и мотив 11, ха-

ГЕНЕТИКА том 57 № 3 2021

рактерный для клады PSY1. Отсутствие мотива 11 в последовательности PSY1 *S. lycopersicum* было обусловлено отсутствием специфичной для *Capsicum* вставки R53InsQ64, о которой упоминалось выше.

Согласно результатам анализа в программе NCBI-CDD все анализируемые белки перца PSY1 (с 75 по 405 а.о.) и PSY2 (с 92 по 430 а.о.) содержат консервативный домен фитоинсинтазы. Это подтверждает принадлежность идентифицированных гомологов PSY1 и PSY2 к ферментам биосинтеза изопреноидов (Isoprenoid Biosynthesis enzymes, Class 1), входящим в суперсемейство синтаз и терпеновых циклаз (trans-isoprenyl diphosphate synthases IPPS and class I terpene cyclases).

Проведенный анализ структуры гомологов PSY1 и PSY2 в программе Phyre2 позволил предсказать возможную трехмерную структуру данных белков. С достоверностью >90% моделированы 68% (PSY1) и 67% (PSY2) аминокислотных остатков с использованием четырех структурных матриц: c4hd1A (129-390/135-396 a.o., 62/60%ное покрытие; squalene synthase HpnC, Alicyclobacillus acidocaldarius); c5iysA_ (126-412/132-419 a.o., 68/66%; phytoene synthase, Enterococcus hirae dehydrosqualene synthase); c3we9A_(126-405/131-411 a.o., 66/64%; YisP, Bacillus subtilis); c2zcpA (3W7F; 126-411/132-418 a.o., 68/66%; c(30) carotenoid dehydrosqualene synthase CrtM, *Staphylococcus aureus*) [36]. Оставшиеся 143 а.о. (в основном на N-конце) были моделированы ab initio. Было выявлено, что фолдинг PSY-белков имеет преимущественно спиральный характер (60-63%), 2% последовательности приходится на β-складки, а структура 26% неупорядочена. Гомологи обоих фитоинсинтаз имели большую центральную полость, наблюдаемую и в других изопреноидных синтазах, использующих данную полость для пристраивания туда продукта [36]. Единичные случаи обнаруженных нами радикальных миссенс-мутаций (PSY1, Отелло; PSY2, Сиреневый куб и Pimenta da Neyde) никак не влияли на фолдинг и активные центры белков.

Филогенетический анализ

Для оценки филогении исследуемых сортов и видов перца был проведен кластерный анализ и построены дендрограммы на основе полногеномных, кодирующих и белковых последовательностей идентифицированных гомологов *PSY1* и *PSY2*. Для сравнения в анализе были использованы известные последовательности гомологов *PSY1* и *PSY2* томата *S. lycopersicum*, а также гомологичные последовательности видов перца *C. аппиит, C. chinense* и *C. baccatum* из базы данных NCBI.

00 -10 -11 -10 <th>R G C K R W S F G S C L G G A D G S C A M S R R S C A M S R R S R R R R R R R R R R R R R R R</th> <th>КАСКЯЖУГ 6 УС Г 6 6 А 0 6 У А М У К 0 К А С К Я У У Г 6 7 А 0 6 У А М У К 0</th> <th>R A C K R W S F G S Y L G G A Q G S V A M S R D</th> <th>П А С К Л К О П С О С Г С С А О С О С А М О С И С И С О С О С И С О С О С О С О С</th> <th></th> <th>H < S N</th> <th>36 40 41 46 54 55 66 70 73 76 79 100</th> <th>201 207 210 218 243 303 344 362 369 369 373 377 399 416 418 420 421 422 423 424</th> <th></th> <th>S V A K R D Q A W L L R P S R *</th> <th>0 M A K R D Q A & L L R P 0 R *</th> <th>S M A K R E Q A W L L R P S R *</th> <th>8 M A K R D Q A W L L R P S R *</th> <th></th> <th></th> <th>N M G N K D H S F W V K S P K A S L Q R</th> <th>: 189 195 198 206 231 291 332 350 354 357 361 365 387 404 406 408 409 410 411 412</th> <th>33 39 42 43 44 51 56 60 65 68 72 75 78 101 113 115 120 121 136 158 18</th> <th> 0 M E R – R 0 0 0 0 0 0 N L E 0 L Z</th> <th> G M E R I R S G D G G S A D Q R L K I L N</th> <th> G M E R R & G D G R & A D Q R L E & L Z</th> <th> G M E R I R S G D G G S A D Q R L K S L N</th> <th> G T E R I R S G D G G S A D Q R L E S L T</th> <th></th> <th> G Т Е R I R S G D G G S A D Q R L E S L N</th> <th> 0 M E R - R 0 0 0 0 0 1 H R L E 0 L S</th> <th>S R F S M G G F G F D C R E R S E H I I Q S M N 35 36 37 39 45 48 49 50 57 62 66 71 74 78 81 84 107 119 121 126 127 142 164 19</th> <th>1 426 428 430</th> <th>ω ν</th> <th>0 0 A F C C C F F C C F F F F F F F F F F F</th> <th></th> <th>v c v c</th> <th></th> <th></th> <th></th> <th>< 0</th>	R G C K R W S F G S C L G G A D G S C A M S R R S C A M S R R S R R R R R R R R R R R R R R R	КАСКЯЖУГ 6 УС Г 6 6 А 0 6 У А М У К 0 К А С К Я У У Г 6 7 А 0 6 У А М У К 0	R A C K R W S F G S Y L G G A Q G S V A M S R D	П А С К Л К О П С О С Г С С А О С О С А М О С И С И С О С О С И С О С О С О С О С		H < S N	36 40 41 46 54 55 66 70 73 76 79 100	201 207 210 218 243 303 344 362 369 369 373 377 399 416 418 420 421 422 423 424		S V A K R D Q A W L L R P S R *	0 M A K R D Q A & L L R P 0 R *	S M A K R E Q A W L L R P S R *	8 M A K R D Q A W L L R P S R *			N M G N K D H S F W V K S P K A S L Q R	: 189 195 198 206 231 291 332 350 354 357 361 365 387 404 406 408 409 410 411 412	33 39 42 43 44 51 56 60 65 68 72 75 78 101 113 115 120 121 136 158 18	0 M E R – R 0 0 0 0 0 0 N L E 0 L Z	G M E R I R S G D G G S A D Q R L K I L N	G M E R R & G D G R & A D Q R L E & L Z	G M E R I R S G D G G S A D Q R L K S L N	G T E R I R S G D G G S A D Q R L E S L T		G Т Е R I R S G D G G S A D Q R L E S L N	0 M E R - R 0 0 0 0 0 1 H R L E 0 L S	S R F S M G G F G F D C R E R S E H I I Q S M N 35 36 37 39 45 48 49 50 57 62 66 71 74 78 81 84 107 119 121 126 127 142 164 19	1 426 428 430	ω ν	0 0 A F C C C F F C C F F F F F F F F F F F		v c v c				< 0
	00	0 0	G	00	ט פ	Ľ	0 35	3 194							ט כ -) z	1 182		,	1	•	1		•	•	•	3 34 s	4 424	 _	 	 ~ ^	- L	 			и Г
 			- >			ш	22 3	60 is	- 1 - 1	. I	х т	Υ	х : т :	с 1 с 1		.≻ ⊻ 22	48 17		ļ						ļ		L E 32 3.	158 36	ð	α (` ⊲ 3 (3 C	9 C	3 0		Ĺ
ч. Ч. – .			_	- L		Σ	21	148	- >	· >	≻	≻	≻ :	≻ >	- >	z	136 1	31	>	>	>	>	>	>	>	>	U	336 2	К	<u>د</u> د	ב ם	<u>:</u> œ	c œ	c m	Ľ	2
300	00	თ თ	U	<u>თ</u> დ	ט פ	s	19	13/	n u	s S	s	s	s o	n u	n u	0	125	17	z	z	z	z	z	z	z	z	≻	329	ں 0	თ ძ	9 C	ა თ) C	0 0	C	(
; D (۵	οı	υО		13	125		· -	⊢	⊢	⊢ I	- +	- +	z	113	15	>	>	>	>	>	>	>	ш	>	315	_						_	2
frutescens cv. Samocvet	chinense cv. Pimenta_da_Neyde annuum cv. Otello	annuum cv. Sirenevyj cub annuum cv. Sibiryak	annum cv. Valencia	annum cv. Zunla-1	cninense haccatum	lycopersicum cv. Red Setter		furtacione ou Comoculat	chinense cv. Bimenta da Nevde	annum cv. Otello	annuum cv. Sirenevyj cub	annum cv. Sibiryak	annum cv. Valencia	annuum CV. Zuma-1 chinanca	baccatum	lycopersicum cv. Red Setter			annuum cv. Otello	annuum cv. Sirenevyj cub	annuum cv. Sibiryak	frutescens cv. Samocvet	chinense cv. Pimenta_da_Neyde	annuum cv. Zunla-1	chinense	baccatum	lycopersicum cv. Red Setter		annum cv. Otello	annum cv. Sirenevyj cuo	unnum ev. Siuliyan	rhinencens vv. Jamovvu vhinence cv Pimenta da Nevde	annum ev Zunla-1	unnum VV. Zuma-1 chinense	baccatum	









Рис. 4. Филогенетический анализ полногеномных последовательностей гомологов *PSY1* и *PSY2* томата *S. lycopersicum* и видов перца *C. baccatum, C. annuum, C. frutescens* и *C. chinense* (MEGA7.0, метод NJ, Tajima-Nei model, bootstrap 1000). Значения bootstrap для 1000 выборок показаны в основании ветви.

Все три полученные дендрограммы были конгруэнтны и группировали образцы в два больших кластера, объединяющих последовательности гомологов PSY1 и PSY2 (рис. 4). Внутри каждого кластера последовательности *S. lycopersicum* формировали сестринскую ветвь кладе *Capsicum*. Клады PSY1 и PSY2 *Capsicum* организовывались сходным образом: последовательности *C. annuит, C. chinense* и *C. frutescens* формировали группу, сестринскую ветвь к которой образовывал образец *C. baccatum* (рис. 4).

Профиль ко-экспрессии генов PSY1 и PSY2

Экспрессия генов *PSY1* и *PSY2* была впервые проанализирована в листьях, чашелистиках, лепестках, завязи, а также в кожице и мякоти плодов на трех стадиях (MF, IR, RF) созревания у образцов трех видов перца (рис. 5).

У сортов Сибиряк, Отелло, Сиреневый куб (*C. annuum*) и Самоцвет (*C. frutescens*) транскрипты *PSY1* были обнаружены во всех анализируемых органах, при этом уровни транскрипции значительно варьировали между разными органами одного образца и однотипными тканями разных образцов. Максимальные уровни экспрессии *PSY1* были выявлены в лепестках (на сходном уровне), а также в перикарпе зрелых плодов (стадия 3, RF). И кожица, и мякоть плода данных сортов содержали лишь следовые количества транскриптов *PSY1* на стадии 1 незрелого плода (MF) и характеризовались их резким ростом в зреющих плодах (стадии 2 и 3, IR и RF). Мякоть зрелого плода сорта Отелло имела самый высокий уровень транскрипции *PSY1* (в 10 раз выше, чем у остальных образцов), однако в кожице уровень экспрессии *PSY1* был сопоставим с таковой у других образцов перца (рис. 5).

В листьях анализируемых образцов перца экспрессия *PSY1* была на уровне либо следовых количеств (у сортов Отелло и Сиреневый куб), либо достигала 0.06–0.08 (у сортов Самоцвет, Сибиряк и Pimenta da Neyde). В отличие от остальных образцов перца у сорта Pimenta da Neyde (*C. chin*-



Рис. 5. Относительная экспрессия гена *PSY1* (*a*) и *PSY2* (*b*) в листьях (Л), чашелистиках (Ч), лепестках (ЛЕ), завязи (З), кожице (К) и мякоти (М) плодов на трех стадиях созревания (1 – незрелый плод финального размера (МF), 2 – бланжевый плод (IR), 3 – плод биологической спелости (RF)) образцов перца *C. annuum* (Сибиряк, Сиреневый куб, Отелло), *C. frutescens* (Самоцвет) и *C. chinense* (Pimenta da Neyde). Значения, не имеющие достоверного отличия (*P*_{value} > > 0.05): *PSY1* – ЛЕ vs. М3 (Сибиряк, Сиреневый куб), К1 vs. М1 (Отелло); *PSY2* – К2 vs. М2 и К2 vs. М3 (Сибиряк), М1 vs. К3, М1 vs. М3 и К3 vs. М3 (Сиреневый куб), М1 vs. М3 (Отелло), Л vs. 3 (Самоцвет).



Рис. 6. Содержание суммы каротиноидов (мкг/г сырой массы) в кожице (К) и мякоти (М) плодов анализируемых сортов перца на трех стадиях созревания (1 – незрелый плод финального размера (MF), 2 – бланжевый плод (IR), 3 – плод биологической спелости (RF)).

ense) экспрессия *PSY1* выявлена исключительно в листьях (рис. 5).

Экспрессия гена *PSY2* была выявлена во всех анализируемых органах всех пяти сортов перца (рис. 5). Как ожидалось, максимальный уровень транскрипции был выявлен в листьях и несколько ниже — в чашелистиках и завязи, а в кожице и мякоти плодов уровень экспрессии *PSY2* был минимален. У сортов Сиреневый куб, Самоцвет и Pimenta da Neyde значительные количества транскриптов *PSY2* были детектированы в лепестках, при этом у первых двух сортов уровни транскрипции были сопоставимы (0.017 и 0.019), а у сорта Pimenta da Neyde — ниже в 2 раза (0.009).

Следует отметить, что анализируемые образцы значительно различались по уровню экспрессии PSY2 в листьях. Так, самый высокий уровень транскрипции PSY2 в листьях был показан для сорта Сибиряк, тогда как остальные сорта имели в 2–4 раза меньшее количество транскриптов PSY2. В целом экспрессия PSY2 в листьях сортов *C. annuum* была выше, чем у *C. chinense* и *C. frutescens* (рис. 5). Интересно, что в чашелистиках (другой фотосинтезирующий орган) и завязи уровни экспрессии PSY2 также различались, но при этом не коррелировали с уровнями экспрессии в листьях (рис. 5).

Содержание пигментов в перикарпе плодов анализируемых образцов видов Capsicum; взаимосвязь содержания суммы каротиноидов и уровня экспрессии PSY

Содержание суммы каротиноидов было определено в перикарпе (кожице и мякоти) плодов в процессе созревания (три стадии: незрелый плод; бланжевая спелость; биологическая спелость) пяти образцов исследуемых видов перца (рис. 6).

Спелый плод образцов перца, за исключением сорта Pimenta da Neyde, характеризовался высоким содержанием каротиноидов в кожице (236-514 мкг/г сырой массы) и мякоти (121-723 мкг/г) (рис. 6). В спелых плодах Pimenta da Nevde были обнаружены только следовые количества каротиноидов (менее 2 мкг/г). Можно предположить, что красный спелый плод четырех анализируемых сортов содержит типичные для перцев красные пигменты — каротиноиды капсантин и капсорубин [8, 26], при этом принадлежность к определенному виду Capsicum (C. annuum или C. frutescence) никак не связана с количеством накапливаемых каротиноидов. В зрелом плоде сорта Pimenta da Neyde (C. chinense) пигментация исключает каротиноиды и формируется за счет антоцианов [37].

Полученные результаты сравнивали с профилем экспрессии гомологов гена *PSY1*, экспрессия которого характерна преимущественно для созревающих плодов. Было показано, что увеличение уровней транскрипции *PSY1* в перикарпе плодов перца сопровождается увеличением содержания каротиноидов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Образцы перца, исследуемые в настоящей работе, представляют три близкородственных вида – *С. аппиит, С. chinense* и *С. frutescens*, которые вместе составляют кладу Annuum [24, 25]. Самыми близкими к Annuum являются виды клады Вассаtum, объединяющей *С. baccatum, С. baccatum* var. *praetermissum* (Heiser & P.G. Sm.) Нипг. и *С. chacoense* Hunz. [24]. Геном *С. baccatum* секвенирован, что дало нам возможность использовать в сравнительном структурном анализе последовательности *PSY1* и *PSY2 С. baccatum* в качестве представителя другой клады перцев.

Для видов комплекса Annuum, кроме красной финальной окраски плода, характерны два паттерна изменения окраски плода в процессе созревания: от зеленого к красному (основной паттерн); от фиолетового к красному [24, 25]. Из взятых в анализ сортов первый паттерн характерен для сорта Сибиряк (*С. аппиит*). Второй паттерн наблюдается у сортов Отелло и Сиреневый куб (C. annuum), Camoцвет (C. frutescens). У сорта Ріmenta da Neyde окраска зрелого плода не меняется и остается фиолетовой (рис. 1), так как в кожице и мякоти не происходит накопления окрашенных каротиноидов. В результате в анализ были взяты четыре сорта с типичным для видов перца комплекса Annuum каротиноидным паттерном пигментации плода и один сорт с аномальной каротиноидной пигментацией.

Нами были идентифицированы гены *PSY1* и PSY2 у пяти сортов перца видов клады Annuum. Сравнительный анализ выявил низкий уровень нуклеотидной вариабельности для гомологов каждого гена. Необычным оказалось то, что большая часть (>30%) выявленных SNPs была сконцентрирована в экзонах. Однако при этом какиелибо критичные структурные различия гомологов как между видами Annuum, так и в сравнении с C. baccatum отсутствовали. Последовательности генов не содержали никаких нонсенс-мутаций. При этом единичные случаи радикальных миссенс-мутаций (PSY1, Отелло; PSY2, Сиреневый куб и Pimente da Neyde) не влияли на фолдинг и активные центры белков (согласно Phyre2) и не входили в список мутаций, выявленных ранее при анализе 94 образцов перца и присутствие которых могло бы изменить активность фитоинсинтаз [38].

В целом идентифицированные последовательности перца PSY1 и PSY2 были высоко гомологичны (идентичность 82%), и основным отличием PSY1 от PSY2 стало отсутствие на его N- и C14-конце вставок 8 и 7 а.о. соответственно. Подобные различия характерны и для PSY-белков других видов растений. Так, ранее для фитоинсинтаз злаковых

было предположено, что отсутствие/наличие таких вставок может коррелировать с локализацией белков в пластидах конкретного типа [18]. С другой стороны, данное мнение частично опровергается тем фактом, что *PSY2* может компенсировать отсутствие *PSY1* в плоде перца и, следовательно, *PSY2* может работать не только в хлоропластах, но и в хромопластах [38, 39].

Выявленное высокое структурное сходство белков PSY1 и PSY2 у видов перца, в том числе у видов разных клад, предполагает, что и функции гомологов данных белков высоко консервативны среди сортов/видов перца. С достаточной степенью уверенности можно сказать, что по аналогии с тканеспецифичным каротиногенезом у томата *S. lycopersicum* идентифицированные нами гены перца могут определять биосинтез каротиноидов в созревающих плодах (гомологи *PSY1*), фотосинтезирующих тканях (гомологи *PSY2*) и лепестках (*PSY1* и *PSY2* совместно).

Различные сорта *Capsicum* классифицируются в основном по морфологическим характеристикам плода, в частности по его окраске, определяемой пигментами, главным образом присутствием и соотношением различных каротиноидов [29]. Динамика изменения окраски меняется по мере созревания плода, при этом синтез каротиноидов идет постоянно. До стадии MF окраска плода либо зеленая (хлоропласты преобладают и хлорофиллы маскируют присутствие каротиноидов), либо фиолетовая (помимо хлоропластов с хлорофиллом и каротиноидами в вакуолях накапливаются антоцианы). По мере созревания (стадии IR, RF) в образующихся хромопластах накапливается сложная смесь каротиноидов, от состава которой зависит окончательная окраска зрелого плода – зелено-коричневая, желтая, оранжевая, красная и/или темно-красная [29, 40].

Среди сортов, взятых в настоящее исследование, Сибиряк (*C. аппиит*) формирует зеленый МF плод, а четыре остальных сорта – фиолетовый. По мере созревания плод сорта Сибиряк меняет окраску с зелено-красной (IR-плод) на темно-красную (RF-плод). Исходно фиолетовые плоды сортов Отелло, Сиреневый куб (оба – *C. аппиит*) и Самоцвет (*C. frutescens*) меняют окраску с красного/оранжевого оттенка (IR) на красный (RF). Окраска плода у сорта Pimenta da Neyde (*C. chinense*) – фиолетовая на всех стадиях созревания.

Изменение окраски плода по мере его созревания может определяться различной активностью фитоинсинтазы *PSY1*. Однако у всех пяти анализируемых образцов, вне зависимости от паттерна пигментации плода и видовой принадлежности, какие-либо радикальные структурные различия между идентифицированными *PSY1* отсутствуют. Это предполагает, что разный уровень биосинтеза каротиноидов в плодах данных образцов зависит не от активности фермента PSY1, а от уровня транскрипции кодирующего его гена. И действительно, уровень экспрессии гомологов гена *PSY1*

в плодах анализируемых сортов перца прямо коррелировал с содержанием каротиноидов и приобретаемой ими по мере созревания окраской. Так, отсутствие транскриптов *PSY1* и крайне низкая экспрессия *PSY2* в плодах Pimenta da Neyde (*C. chinense*) коррелирует с зеленой окраской мякоти плода и следовыми количествами каротиноидов. В то же время наиболее высокий уровень экспрессии *PSY1* в перикарпе плода сорта Отелло (*C. annuum*) соответствует темно-красной окраске зрелого плода, по-видимому, за счет более активного синтеза и накопления красных каротиноидов.

Считается, что *PSY1* является хромопласт-специфичной фитоинсинтазой [14]. Однако в нашем случае существенная экспрессия *PSY1* наблюдалась в листьях и чашелистиках у ряда образцов (Сибиряк, Самоцвет и Pimenta da Neyde). При этом образцы различались по уровню экспрессии гена (рис. 5). Полученные результаты на перцах совпадают с данными по томату и люцерне, где также была показана транскрипция *PSY1* в фотосинтезирующих органах [3]. С учетом сказанного, а также принимая во внимание способность *PSY2* компенсировать *PSY1* [39], можно предположить аналогичные возможности *PSY1* по отношению к *PSY2* и говорить о влиянии совокупного уровня экспрессии *PSY2* и *PSY1*.

Интересно, что полученные нами паттерны экспрессии PSY1 в тканях перца в целом повторяют профиль транскрипции PSY1 S. lycopersicum [7], чего нельзя сказать о PSY2 (рис. 5). Максимальное число транскриптов *PSY2* присутствует в лепестках томата, при этом в листьях, чашелистиках и завязи данный ген экспрессируется заметно слабее [7]. У перца же наибольший уровень транскрипции PSY2 был обнаружен нами в листьях (рис. 5). Мы полагаем, что подобные различия лежат в основе разной пигментации лепестков цветка томата (желтые) и перца клады Аппиит (белые/фиолетовые) [23, 29]. Дополнительным тому подтверждением является то, что подавление экспрессии генов PSY1 и PSY2 приводит к почти белой окраске лепестков цветка томата [41].

Таким образом, в настоящем исследовании у пяти образцов трех видов перца клады Annuum идентифицированы и охарактеризованы гомологи генов фитоинсинтаз PSY1 и PSY2, определен профиль ко-экспрессии этих генов в вегетативных и репродуктивных органах и проведена оценка его корреляции с содержанием каротиноидов в плодах. Высокое структурное сходство гомологов между собой свидетельствует о сохранении ими консервативных ключевых функций фитоинсинтаз в синтезе каротиноидов. Отсутствие замещений в функционально значимых участках анализируемых гомологов PSY свидетельствует о корректном транспорте, фолдинге и активности этих ферментов. Показана экспрессия *PSY1* не только в плодах, но также и в фотосинтезирующих органах. Предполагается, что изменения в экспрессии PSY1 и PSY2 связаны с полиморфизмом регуляторных областей. Сделано предположение о существовании взаимной функциональной компенсации ферментами PSY1 и PSY2 функций друг друга. Подтверждена прямая корреляция между уровнем экспрессии гена *PSY1* и содержанием каротиноидов и, как следствие, с каротиноидной пигментацией плода в процессе созревания.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 19-16-00016, с использованием экспериментальной установки искусственного климата (ЭУИК, ФИЦ Биотехнологии РАН).

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. *Hashimoto H., Uragami C., Cogdell R.J.* Carotenoids and photosynthesis // In Carotenoids in Nature / Ed. Stange C. Basel, Switzerland: Springer, 2016. P. 111–139.
- Nambara E., Marion-Poll A. Abscisic acid biosynthesis and catabolism // Annu. Rev. Plant Biol. 2005. V. 56. P. 165–185.
- Stauder R., Welsch R., Camagna M. et al. Strigolactone levels in dicot roots are determined by an ancestral symbiosis-regulated clade of the *PHYTOENE SYNTHASE* gene family // Front Plant Sci. 2018. V. 9. Article 255. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00255
- Sun T., Li L. Toward the 'golden' era: The status in uncovering the regulatory control of carotenoid accumulation in plants // Plant Sci. 2020. V. 290. Article 110331. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110331

5. *Rudall P.J.* Colourful cones: how did flower colour first

- evolve? // J. Exp. Bot. 2020. V. 71. № 3. P. 759–767. https://doi.org/10.1093/jxb/erz479
- Dardick C., Callahan A.M. Evolution of the fruit endocarp: Molecular mechanisms underlying adaptations in seed protection and dispersal strategies // Front Plant Sci. 2014. V. 5. Article 284. https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00284
- Giorio G., Stigliani A.L., D'Ambrosio C. Phytoene synthase genes in tomato (Solanum lycopersicum L.) new data on the structures, the deduced amino acid sequences and the expression patterns // FEBS J. 2008. V. 275. № 3. P. 527–535. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06219.x
- Rodriguez-Uribe L., Guzman I., Rajapakse W. et al. Carotenoid accumulation in orange-pigmented Capsicum annuum fruit, regulated at multiple levels // J. Exp. Bot. 2012. V. 63. № 1. P. 517–526. https://doi.org/10.1093/jxb/err302
- Liu L., Shao Z., Zhang M., Wang Q. Regulation of carotenoid metabolism in tomato // Mol. Plant. 2015. V. 8. P. 28–39.

https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.11.006

10. Yoo H.J., Park W.J., Lee G.M. et al. Inferring the genetic determinants of fruit colors in tomato by carotenoid

profiling // Molecules. 2017. V. 22. № 5. Article E764. https://doi.org/10.3390/molecules22050764

- 11. Ahrazem O., Diretto G., Argandoña Picazo J. et al. The specialized roles in carotenogenesis and apocarotenogenesis of the phytoene synthase gene family in saffron // Front Plant Sci. 2019. V. 10. Article 249. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00249
- Zhou X., Welsch R., Yang Y. et al. Arabidopsis OR proteins are the major posttranscriptional regulators of phytoene synthase in controlling carotenoid biosynthesis // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2015. V. 112. № 11. P. 3558–3563. https://doi.org/10.1072/mags.1420821112
 - https://doi.org/10.1073/pnas.1420831112
- Tomato Genome Consortium (*Sato S., Tabata S., Hi-rakawa H. et al.*). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution // Nature. 2012. V. 485. P. 635–641.
- 14. *Bartley G.E., Viitanen P.V., Bacot K.O., Scolnik P.A.* A tomato gene expressed during fruit ripening encodes an enzyme of the carotenoid biosynthesis pathway // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 5036–5039.
- Ducreux L.J., Morris W.L., Hedley P.E. et al. Metabolic engineering of high carotenoid potato tubers containing enhanced levels of b-carotene and lutein // J. Exp. Bot. 2005. V. 56. P. 81–89.
- Fraser P.D., Enfissi E.M., Halket J.M. et al. Manipulation of phytoene levels in tomato fruit: effects on isoprenoids, plastids, and intermediary metabolism // Plant Cell. 2007. V. 19. P. 3194–3211.
- Bartley G.E., Scolnik P.A. cDNA cloning, expression during development, and genome mapping of *PSY2*, a second tomato gene encoding phytoene synthase // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 25718–25721.
- Gallagher C.E., Matthews P.D., Li F., Wurtzel E.T. Gene duplication in the carotenoid biosynthetic pathway preceded evolution of the grasses // Plant Physiol. 2004. V. 135. №3. P. 1776–1783.
- Fraser P.D., Schuch W., Bramley P.M. Phytoene synthase from tomato (*Lycopersicon esculentum*) chloroplasts – partial purification and biochemical properties // Planta. 2000. V. 211. P. 361–369.
- 20. *Cao H., Luo H., Yuan H. et al.* A neighboring aromaticaromatic amino acid combination governs activity divergence between tomato phytoene synthases // Plant Physiol. 2019. V. 180. № 4. P. 1988–2003. https://doi.org/10.1104/pp.19.00384
- Giovannoni J., Nguyen C., Ampofo B. et al. The epigenome and transcriptional dynamics of fruit ripening // Annu. Rev. Plant Biol. 2017. V. 68. P. 61–84. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-040906
- Peralta I.E., Spooner D.M. History, origin and early cultivation of tomato (Solanaceae) // Genetic Improvement of Solanaceous Crops. V. 2: Tomato / Eds Razdan M.K., Mattoo A.K. Science Publ. Enfield. CT, 2007. P. 1–27.
- Galpaz N., Ronen G., Khalfa Z. et al. A chromoplastspecific carotenoid biosynthesis pathway is revealed by cloning of the tomato white flower locus // Plant Cell. 2006. V. 18. P. 1947–1960.
- 24. Carrizo García C., Barfuss M.H., Sehr E.M. et al. Phylogenetic relationships, diversification and expansion of chili peppers (*Capsicum*, Solanaceae) // Ann. Bot. 2016. V. 118. № 1. P. 35–51. https://doi.org/10.1093/aob/mcw079
- 25. Barboza G.E., Carrizo García C., Leiva González S. et al. Four new species of Capsicum (Solanaceae) from the tropical Andes and an update on the phylogeny of the

genus // PLoS One. 2019. V. 14. Article e0209792. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209792

- 26. Berry H.M., Rickett D.V., Baxter C.J. et al. Carotenoid biosynthesis and sequestration in red chilli pepper fruit and its impact on colour intensity traits // J. Exp. Bot. 2019. V. 70. № 10. P. 2637–2650. https://doi.org/10.1093/jxb/erz086
- 27. *Deruère J., Römer S., d'Harlingue A. et al.* Fibril assembly and carotenoid overaccumulation in chromoplasts: a model for supramolecular lipoprotein structures // Plant Cell. 1994. V. 6. P. 119–133.
- Kilcrease J., Rodriguez-Uribe L., Richins R.D. et al. Correlations of carotenoid content and transcript abundances for fibrillin and carotenogenic enzymes in *Capsicum annum* fruit pericarp // Plant Sci. 2015. V. 232. P. 57–66.

https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.12.014

- 29. Mohd Hassan N., Yusof N.A., Yahaya A.F. et al. Carotenoids of Capsicum fruits: Pigment profile and healthpromoting functional attributes // Antioxidants (Basel). 2019. V. 8. № 10. Article E469. https://doi.org/10.3390/antiox8100469
- 30. Fraser P.D., Truesdale M.R., Bird C.R. et al. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development (evidence for tissue-specific gene expression) // Plant Physiol. 1994. V. 105. № 1. P. 405–413. https://doi.org/10.1104/pp.105.1.405
- Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes // Methods Enzymol. 1987. V. 148. P. 350–382. https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1
- 32. Solovchenko A.E., Chivkunova O.B., Merzlyak M.N., Reshetnikova I.V. A spectrophotometric analysis of pigments in apples // Rus. J. Plant Phys. 2001. V. 48. № 5. P. 693–700.
- Puchooa D. A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from lychee (*Litchi chinen*sis Sonn.) // Afr. J. Biotech. 2004. V. 3. P. 253–255.
- 34. Филюшин М.А., Джос Е.А., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Зависимость окраски плодов перца от соотношения основных пигментов и профиля экспрессии генов биосинтеза каротиноидов и антоцианов // Физиол. растений. 2020. Т. 67. № 6. С. 644–653.
- 35. *Bemer M., Karlova R., Ballester A.R. et al.* The Tomato *FRUITFULL* homologs *TDR4/FUL1* and *MBP7/FUL2* regulate ethylene-independent aspects of fruit ripening // Plant Cell. 2012. V. 24. P. 4437. https://doi.org/10.1105/tpc.112.103283
- Liu C.I., Liu G.Y., Song Y. et al. A cholesterol biosynthesis inhibitor blocks *Staphylococcus aureus* virulence // Science. 2008. V. 319. P. 1391–1394.
- 37. Филюшин М.А., Джос Е.А., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Особенности экспрессии гена фактора транскрипции anthocyanin2 и его влияния на содержание антоцианов у образцов Capsicum chinense Jacq. с различной окраской плода // Генетика. 2020. Т. 56. № 10. С. 1161–1170.
- Jeong H.B., Kang M.Y., Jung A. et al. Single-molecule real-time sequencing reveals diverse allelic variations in carotenoid biosynthetic genes in pepper (*Capsicum* spp.) // Plant Biotechnol. J. 2019. V. 17. № 6. P. 1081–1093. https://doi.org/10.1111/pbi.13039
- 39. Jang S.J., Jeong H.B., Jung A. et al. Phytoene synthase 2 can compensate for the absence of *Psy1* in *Capsicum* fruit // J. Exp. Bot. 2020. Article eraa155. https://doi.org/10.1093/jxb/eraa155

ФИЛЮШИН и др.

- 40. Liu Y., Lv J., Liu Z. et al. Integrative analysis of metabolome and transcriptome reveals the mechanism of color formation in pepper fruit (*Capsicum annuum* L.) // Food Chem. 2020. V. 306. Article 125629. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125629
- 41. *Fray R.G., Grierson D.* Identification and genetic analysis of normal and mutant phytoene synthase genes of tomato by sequencing, complementation and co-suppression // Plant Mol. Biol. 1993. V. 22. P. 589–602.



Рис. S1. Аминокислотные последовательности PSY1 анализируемых сортов перца и сорта Zunla-1 (*C. annuum*; NP_013111896.1).



Рис. S2. Аминокислотные последовательности PSY2 анализируемых сортов перца и сорта Zunla-1 (*C. annuum*; XP_016560212.1).

Variability and Expression Pattern of Phytoene Synthase (PSY) Paralogs in Pepper Species

M. A. Filyushin^{a, *}, E. A. Dyachenko^a, G. I. Efremov^a, E. Z. Kochieva^a, and A. V. Shchennikova^a

^aInstitute of Bioengineering, Research Centre of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia *e-mail: michel7753@mail.ru

In this study, the *PSY1* and *PSY2* homologous genes were identified in five accessions of three pepper species *Capsicum annuum*, *Capsicum chinense* and *Capsicum frutescens*, differing in fruit pigmentation pattern. Within the studied pepper accessions, in the *PSY1/PSY2* genomic sequence variability was determined. The PSY1 and PSY2 sequences were 82% similar and differed in the N- and C-terminal NAGLRYSD and KLTSSSL indels, as well as in the conserved motifs characteristic of the PSY2 and PSY1 homologs. The *PSY1* and *PSY2* expression was analyzed in leaves, sepals, petals, ovaries, as well as in the peel and pulp of the fruits at the three stages of ripening in all five analyzed accessions. The maximum level of *PSY1* expression was shown in the petals, and in the pericarp of mature fruits of *C. annuum* and *C. frutescens* accessions. In the *C. chinense* accession; the maximum level was in the leaves, and the minimum level was in the fruit pericarp. The obtained data suggest that the PSY1 and PSY2 homologs of pepper species retained conserved key functions in the carotenoid synthesis in fruits (PSY1) and photosynthetic tissues (PSY2).

Keywords: phytoene synthase, PSY1, PSY2, Capsicum, pepper species, fruit colour.

ГЕНЕТИКА РАСТЕНИЙ

УДК 630*46:575.174.015.3:582.47

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ В ПОПУЛЯЦИЯХ Pinus sylvestris, Picea obovata, Abies sibirica И НА ВЫРУБКАХ В ЮЖНОЙ ТАЙГЕ СРЕДНЕЙ СИБИРИ

© 2021 г. И. В. Тихонова^{1, *}, А. К. Экарт², А. Н. Кравченко², Н. А. Тихонова²

¹Западно-Сибирское отделение Института леса им. В.Н. Сукачева, Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630082 Россия ²Институт леса им. В.Н. Сукачева, Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук, Красноярск, 660036 Россия

> *e-mail: selection@ksc.krasn.ru Поступила в редакцию 30.04.2020 г. После доработки 05.10.2020 г. Принята к публикации 19.10.2020 г.

Исследована изменчивость полиморфных ферментных локусов у 1180 особей подроста в четырех популяциях Pinus sylvestris L., Picea obovata Ledeb. и Abies sibirica Ledeb., произрастающих в условиях южной тайги Средней Сибири, на участках, пройденных рубками разной интенсивности, и в контроле (в том числе, в 15 выборках сосны обыкновенной, 13 выборках ели сибирской и 16 выборках пихты сибирской). Результаты сравнительного анализа данных подтверждают существенное сокращение генетического разнообразия у молодого поколения деревьев трех хвойных видов на месте сплошных широколесосечных и выборочных вырубок высокой интенсивности (на 8-30% – по числу аллелей и уровню полиморфности, на 14-75% – по числу редких аллелей). Отмечено, что генофонды популяций темнохвойных видов более чувствительны к антропогенным воздействиям по сравнению со светлохвойным (сосной обыкновенной). Особенности генетической изменчивости изоферментов в популяциях пихты сибирской свидетельствуют о значительной утрате видом внутривидового аллельного разнообразия ферментных локусов, что требует особого подхода к анализу влияния лесопользования на популяции данного вида и сохранению его генетического разнообразия. Из использованных показателей генетической изменчивости наиболее информативны для целей генетического мониторинга хвойных лесов редкие аллели полиморфных локусов в целом и особенно аллели низкополиморфных локусов.

Ключевые слова: генетическое разнообразие, хвойные виды, сплошные и выборочные рубки, южная тайга.

DOI: 10.31857/S0016675821030139

В России за последние 200 лет вследствие нерационального лесопользования произошло значительное сокрашение плошали хвойных лесов – основного средо- и лесообразующего компонента бореальной зоны Евразии [1]. В настоящее время наиболее интенсивной эксплуатации подвержены леса Сибири и Европейского севера, после вырубки и пожаров хвойные леса там нередко сменяются менее ценными мелколиственными лесами и безлесыми пространствами [2, 3]. Поэтому обеспечение естественного возобновления нарушенных хвойных лесов и сохранение оставшихся (23% обшей плошали) является первостепенной залачей лесного хозяйства страны, прежде всего для сохранения популяционных генофондов хвойных видов. Средняя и южная тайга во многих районах Сибири пройдена рубками на 50-80%, оставшиеся насаждения пока составляют экологическую и

генетическую основу для восстановления популяционной структуры видов.

Следует отметить, что при таких быстрых темпах сокращения ресурсного и экологического потенциала лесов России многие фундаментальные научные проблемы лесопользования остаются нерешенными и мало изученными. Совершенно недостаточно знаний о влиянии разных способов рубки на генетическое разнообразие популяций хвойных видов. Не исследованы пределы допустимого сокрашения и темпы восстановления генетического разнообразия популяций, достаточные для полноценного воспроизводства и адаптации хвойных видов к меняющимся условиям среды. Эти знания должны послужить основой для рационального неистощимого лесопользования [4] и разработки правил рубок, при которых первостепенной задачей ставится необходимость сохранения внутрипопуляционного генетического разнообразия видов. Недостаточно изучено влияние других антропогенных и природных факторов на показатели генетического разнообразия популяций видов. Более того, до сих пор нет методики мониторинга генетического разнообразия лесных древесных видов [5], которая, по мнению многих российских исследователей [6–15], должна учитывать видовую (родовую, по обоснованной аргументации Ф.Д. Аврова [16]) специфику их популяционно-генетической структуры.

Из используемых современной генетикой методов изучения генетического разнообразия наиболее востребованы молекулярные методы анализа фрагментов ядерной и цитоплазматической ДНК. Однако за прошедшие три десятилетия была накоплена большая база данных по генетической изменчивости изоферментов хвойных видов Евразии (кодируемых одиночными белок-кодирующими генами, кодоминантно проявляемых [17], мало зависящих от онтогенеза и коррелируемых с адаптивными физиолого-биохимическими характеристиками деревьев [18]), которая могла бы быть использована для решения прикладных задач. Цель данного исследования – оценить генетическую изменчивость и аллельное разнообразие полиморфных ферментных локусов у подроста на вырубках разной интенсивности и площади в популяциях трех хвойных видов (сосны обыкновенной (Pinus sylvestris L.), ели сибирской (Picea obovata Ledeb.) и пихты сибирской (Abies sibirica Ledeb.)) южной тайги Средней Сибири, отличающейся наибольшим ростом и продуктивностью древесного яруса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Всего было отобрано 44 выборки подроста (1180 особей), имевшегося до рубки или появившегося после нее, и рядом на нетронутых рубками контрольных участках: 15 выборок сосны (*Pinus sylvestris* L.), 13 – ели (*Picea obovata* Ledeb.) и 16 – пихты (*Abies sibirica* Ledeb.).

Образцы отбирали на участках сплошной узколесосечной (СУР) "Сухая" и широколесосечной вырубок "М. Кемчуг" (СШР-1), "Зеледеево" (СШР-2), "Погорелка" (СШР-3Ку), "Ачинск" (СШР-4), "Кедровый" (СШР-6), "Тарутино" (СШР-7), "Старая Козулька" (СШР-8), а также выборочной рубки интенсивностью 45, 55, 65 и 75% по густоте – "Погорелка" (ВР45-3, ВР55-3), "Усть-Тунгуска" (ВР65-9), "Большая Мурта" ВР75-5) соответственно (табл. 1). Год проведения рубки уточнялся с использованием базы данных космических снимков Landsat 1984–2018 гг. "Google Earth Engine" [21]. Подробнее опишем несколько участков: на сплошных вырубках "М. Кемчуг" 1990 г. и "Зеледеево" 1981 г. – наибольших по площади (352 и 142 га, наименьшая

ГЕНЕТИКА том 57 № 3 2021

ширина участков 1 км), расположенных вблизи г. Красноярска, не было оставлено семенных деревьев для возобновления; кроме того, в 1998 г. с 80-90% этих площадей был полностью удален и вывезен верхний слой почвы и напочвенный покров вместе с подростом (он остался только по краям участков – подрост пихты и ели отбирали именно там). Спустя, соответственно, 28 и 37 лет на момент сбора материала на обоих участках наблюдалась глубокая эрозия глинистого подстилающего слоя на большей части площади, остальная часть заросла вейником, появился единичный подрост сосны – не более 50 шт./га (для полноценного восстановления необходимо не менее 3.0 тыс. шт./га) [2]. Еще один участок после сплошной вырубки "Погорелка" (СШР-3Ку) 1975 г. был искусственно восстановлен посадкой культур сосны, их возраст около 40 лет. На участке "Тарутино" (СШР-7) после вырубки проведено выжигание и высажены культуры сосны, их возраст 25 лет. На участках выборочной рубки "Погорелка" BP45-3 и BP55-3 за десять лет до рубки 2009 г. прошел низовой пожар, который активизировал процесс естественного возобновления сосны - в среднем там появилось 28 тыс. шт. подроста на 1 га.

Так как все исследованные популяции в разное время подвергались антропогенному воздействию, для сравнительного анализа мы использовали два контроля: местный (**MK**) – в нетронутой недавней рубкой или пожаром части популяции и региональный (**PK**) – в малонарушенной популяции с самыми высокими показателями генетического разнообразия. Рядом с СШР-1 не было ненарушенных насаждений с участием пихты сибирской, поэтому местным контролем для нее послужила примыкающая к вырубке старая 80–100-летняя вырубка площадью около 6 га, первоначально заросшая березой и осиной, под ее пологом выросла пихта (возраст деревьев 50–70 лет).

Для исследования использовали вегетативные почки. Экстракцию ферментов, электрофоретический анализ и гистохимическое окрашивание проводили в соответствии с общепринятыми методиками, подробно описанными нами ранее [19, 20]. В образцах сосны обыкновенной проанализировано 20 локусов (табл. 2), включая 16 полиморфных. В выборках ели сибирской проанализировано 20 локусов, из них 17 полиморфных. В выборках пихты сибирской, отличающейся низким уровнем генетического полиморфизма, было проанализировано также 20 локусов, шесть из которых полиморфны.

Основные показатели генетической изменчивости, оценку соответствия распределения генотипов уравнению Харди–Вайнберга с использованием критерия χ^2 , дистанции Неи [22], индексы фиксации Райта $F_{\rm IT}$, $F_{\rm IS}$, $F_{\rm ST}$ вычисляли в

ТИХОНОВА и др.

Таблица 1. Краткая характеристика и географические координаты популяций

Популяция: площадь, давность	Возрастная	n	Состав	Возраст,	Густота подроста,	Географ коорд	оические инаты
рубки	ipyina		древоетоя	5101	тыс. шт./га	с.ш.	в.д.
		Сосна	а обыкновенная			<u> </u>	I
М. Кемчуг: МК-1	В	35	7С2Б1Л	70-120	1.0	56°00′	92°45′
СУР, 1 га, 22 л.	П	30	6Б4Сед.Е	10-13	48.0	56°13′	92°58′
СШР-1.350 га, 28 л.	П	25	6Ос3Б1СедЕП	5-8	0.1	56°12′	92°27′
Погорелка: МК-3 (РК)	В	28	10C	50-120	1.0	56°22′	92°58′
	П	30	10C	5-18	2.5		
СШР-3Ку, 41 га, 40 л.	В	29	10C	35	1.8	56°23′	92°59′
ВР45-3, 1 га, 9 л.	П	30	10C	5-10	28.0	56°22′	92°59′
ВР55-3, 1 га, 9 л.	П	29	10C	5-8	7.2		
Ачинск: МК-4	В	29	10C	80-150	0.7	56°18′	90°30′
	П	30	7С2Б1Е	7-14	2.0	56°14′	90°33′
СШР-4, 9 га, 5 л.	В	30	6С4Б	50-60	0.1	56°16′	90°33′
	П	30	6Б3C1Oc	5-10	0.5		
Б. Мурта: МК-5	В	30	8С2Б	40-100	0.8	56°53′	93°12′
	П	30	10C	6-15	3.0		
ВР75-5, 32 га, 8 л.	П	30	8C2E	5-7	1.0	56°53′	93°05′
	L	Ел	ь сибирская		I		-
М. Кемчуг: МК-1	В	30	7E2C1П	80-120	0.8	56°08′	92°32′
СШР-1, 352 га, 18 л.	П	15	6Ос3Б1СедЕП	6-10	0.02	56°13′	91°58′
Б. Мурта: МК-5 (РК)	В	26	6C3E1П	90-110	0.7	56°53′	93°06′
	П	30	7Е2П1С	15-20	1.5		
ВР75-5, 32 га, 8 л.	П	16	5С4Е1БедП	8-15	2.0	56°53′	93°05′
Козулька: МК-6	В	30	7П3ЕедОс	90-130	1.0	56°10′	91°30′
	П	22	6П3Е1К	5-20	2.7		
СШР-6, 20 га, 6 л.	П	20	8П2Е	7-15	0.3	56°16′	91°31′
СШР-7, 25 л.	П	25	7С3Е ед. П	5-25	1.0	56°19′	90°53′
У-Тунгуска: МК-9	В	30	5ЕЗП2С	70–90	1.3	58°02′	92°56′
	П	27	6П2Е2К ед. С	10-25	5.0	58°06′	92°56′
ВР65-9, 77 га, 10 л.	В	25	7П2С1Е	120-160	0.15	58°03′	92°56′
	П	22	8П1К1Е	10-15	7.0		
		Пих	хта сибирская				
М. Кемчуг: МК-1	В	26	6П2Е1Ос1Б	70-90	1.3	56°15′	92°50′
	П	28	4П2К2Е1С	5-16	9.0		
СШР-1, 350 га, 18 л.	В	11	6Ос3Б1СедЕП	25-30	0.01	56°13′	91°58′
	П	29	7П2Е1С	5-12	0.02		
СШР-2, 142 га, 5 л.	В	26	5О3Б2Пед Е	70-100	0.05	56°07′	91°54′
	П	29	4П3Е3С	13-20	0.04		
Козулька: МК-6/8	В	30	7П1Л1Б1К	70–90	0.8	56°08′	91°28′
СШР-6, 20 га, 6 л.	П	30	8П2Е	10-20	0.2	56°16′	91°31′
СШР-8, 48 га, 13 л.	В	40	6Б2П2Ос	120-200	0.1	56°13′	91°18′
	П	7	7 Ос 2П1Кед Е	8-23	2.7		

Популяция: площадь, давность	Возрастная	п	Состав	Возраст,	Густота подроста,	Географ коорд	оические инаты
руоки	rpyma		древостоя	5101	тыс. шт./га	с.ш.	в.д.
У-Тунгуска: МК-9	В	25	7П2С1Е	120-160	1.2	58°06′	92°56′
	П	29	8П1K1E	10-15	6.0		
ВР65-9, 77 га, 10 л.	В	28	7П1Е1Б1Ос	80-120	0.25	58°03′	92°56′
	П	28	8П2Е ед. К	6-15	7.0		
Нарым: МК-10 (РК)	В	29	5П2С2ЕедЛц	50-70	0.6	55°56′	92°44′
	П	23		7-15	2.8		

Таблица 1. Окончание

Примечание. *n* – объем выборки, П – подрост, В – взрослые деревья, Ку – культуры, л. – лет, С – сосна, Л – лиственница, Е – ель, П – пихта, К – кедр сибирский, Б – береза, Ос – осина, ед – единичные деревья.

программах GenAlex 6 [23] и Genepop [24]. Дополнительно вычисляли долю редких аллелей в выборках h_{μ} [18], достоверность различий по редким аллелям оценивали с использованием точного критерия Фишера *F* [18, 25].

РЕЗУЛЬТАТЫ

На исследуемой территории протяженностью 200 км с запада на восток и 250 км с юга на север основные показатели генетической изменчивости популяций хвойных видов, не нарушенных рубками за предшествующие 80-100 лет, варьировали в пределах: P = 70-85%, $N_{\rm A} = 2.46$ (2.25–2.65), $N_{\rm E} = 1.39$ (1.36–1.43), $H_{\rm O} = 0.23$ (0.20–0.25); $H_{\rm E} = 0.22$ (0.21–0.24), $F_{\rm IS} = -0.002$ (-0.069–0.072) в четырех популяциях Pinus sylvestris; P = 65 - 80%, $N_{\rm A} = 2.15 \ (1.90 - 2.35), N_{\rm E} = 1.26 \ (1.23 - 1.28), H_{\rm O} = 0.17 \ (0.15 - 0.18); H_{\rm E} = 0.17 \ (0.16 - 0.18), F_{\rm IS} = 0.034$ (-0.053-0.103) в четырех популяциях Picea obova $ta; P = 30\%, N_{\rm A} = 1.41 (1.40 - 1.45), N_{\rm E} = 1.20 (1.20 - 1.45)$ 1.22), $H_0 = 0.10$ (0.10-0.11); $H_E = 0.10$ (0.10-0.11), $F_{IS} = -0.009$ (-0.027-0.025) в четырех популяциях *Abies sibirica*. Межпопуляционные различия (F_{sT}) составили 1.7% генотипической изменчивости в наборе популяций сосны обыкновенной, 1.0% – ели сибирской и 2.0% – пихты сибирской. После включения в них выборок с вырубок уровень межпопуляционных различий увеличился до 2.3% для сосны обыкновенной и до 3.0% для пихты сибирской и ели сибирской. В более широких географических пределах всей сибирской части ареала различия между популяциями по аналогичному набору локусов составляют 4.5% для сосны обыкновенной [20], 2.5% для ели сибирской и 5.2% для пихты сибирской [19, 26]. В границах, охватывающих еще большие части ареалов видов, частично по другим наборам локусов, дифференциация популяций составляет 2.9-4.7% у сосны обыкновенной [9, 27], 4.9–5.0% у ели сибирской [27, 28], 9.3% у пихты сибирской [29]. К сожалению,

ГЕНЕТИКА том 57 № 3 2021

в наиболее объемной по широте и детальности охвата ареала *Pinus sylvestris* работе [30] приведены только генетические дистанции между популяциями и нет стандартных характеристик генетической изменчивости всего объема выборок, что не позволяет оценить уровень межпопуляционной дифференциации вида по всему его ареалу.

Как видно из табл. 3, наибольшие различия межлу участками, пройденными рубками, и контролем наблюдаются по среднему числу аллелей на локус ($N_{\rm A}$), информационному индексу генотипического разнообразия Шеннона (І) и доле редких аллелей (*h*_µ). Значения этих показателей уменьшаются на всех вырубках интенсивностью выше 45% для Pinus sylvestris и Picea obovata. Для популяций Abies sibirica они оказались мало информативными, кроме h_{μ} . Почти не отличался от контроля (МК-3/РК) подрост после выборочной рубки ВР45-3 "Погорелка", на втором месте после него был подрост после сплошной узколесосечной рубки СУР. Общей для популяций трех видов тенденцией на вырубках является более низкое генетическое разнообразие у взрослых деревьев по сравнению с подростом: на нетронутых участках большинства популяций взрослые деревья отличаются более высоким средним числом аллелей на локус и числом генотипов, особенно в мало нарушенных популяциях; наоборот, на вырубках соотношение меняется в пользу подроста. Такое соотношение наблюдалось в пяти из девяти сравнений подроста со взрослыми деревьями в контроле (в четырех случаях различия не выявлены), а также в трех из шести сравнений подроста и взрослых деревьев на вырубках (в одном случае обратная пропорция и в двух нет различий). Это непосредственно отражается и на величинах возрастной и пространственной генетической дифференциации внутри популяций: генетические дистанции Неи [22] между выборками внутри популяций варьировали в пределах 0.001-0.006 в контроле и от 0.002 до 0.017 на вырубках (рис. 1);

ТИХОНОВА и др.

Таблица 2. Список используемых ферментных локусов для исследования генетической изменчивости н	знутри по-
пуляций хвойных видов	

Формонтное онотомо	Показа		Вид	
Ферментная система	локус	Pinus sylvestris	Picea obovata	Abies sibirica
Малатдегидрогеназа (MDH, EC 1.1.1.37)	Mdh-1 Mdh-2 Mdh-3 Mdh-4	m p p p	m p p 	m m p —
Глутаматоксалоацетаттрансаминаза (GOT, EC 2.6.1.1)	Got-1 Got-2 Got-3	p p p	p p p	m m m
Шикиматдегидрогеназа (SkDH, EC 1.1.1.25)	Skdh-1 Skdh-2	p p	p p	p m
Алкогольдегидрогеназа (ADH, EC 1.1.1.1)	Adh-1 Adh-2	p p	_	
Лейцинаминопептидаза (LAP, EC 3.4.11.1)	Lap-1 Lap-2	m p	p p	m m
6-Фосфоглюконатдегидрогеназа (6-PGD, EC 1.1.1.44)	6-Pgd-1 6-Pgd-2 6-Pgd-3	p 	— p m	р т —
Глутаматдегидрогеназа (GDH, EC 1.4.2.3)	Gdh	Р	р	m
Фосфоглюкомутаза (PGM, EC 2.7.5.1)	Pgm-1 Pgm-2	p m	p p	m p
Формиатдегидрогеназа (FDH, EC 1.2.1.2)	Fdh	Р	Р	m
Флуоресцентная эстераза (FEST, EC 3.1.1.2)	Fe-2	р	_	m
Супероксиддисмутаза (SOD, 1.15.1.1)	Sod-1 Sod-2		m p	m _
Изоцитратдегидрогеназа (IDH, 1.1.1.42)	Idh-2	m	Р	_
Фосфоглюкоизомераза (PGI, 5.3.1.9)	Pgi-2	_	Р	_
Гексокиназа (НК 2.7.1.1)	Hk	—	_	р
Аконитаза или аконитатгидратаза (ACO, 4.2.1.3)	Aco	_	_	р

Примечание. р – полиморфные локусы, т – мономорфные.



Рис. 1. Дистанции М. Неи [Nei, 1972] между выборками взрослых деревьев и подроста в популяциях, нарушенных вырубками и в контроле (столбцы – средние популяционные значения, интервалы – максимальные и минимальные значения между выборками внутри популяций).

между выборками двух поколений деревьев на всех СШР они увеличились по сравнению с контролем в 1.2–3 раза. При этом различия между вырубками и контролем в отдельных популяциях сосны обыкновенной были сопоставимы с различиями между популяциями из разных регионов [20, 31]. Существенные различия по другим генетическим характеристикам выявлены только на отдельных участках, например, снижение уровня наблюдаемой гетерозиготности (H_0) и повышение индекса фиксации Райта (F_{IS}) отмечено у подроста сосны обыкновенной на участках СШР-1 и СШР-4, ели сибирской (СШР-7) и у взрослых деревьев пихты сибирской на участках СШР-1, СШР-2.

Сравнительный анализ числа выявленных аллелей показал, что у сосны обыкновенной в Сибири за все время исследований, включая данную работу, для аналогичного набора 20-ти локусов было обнаружено 74 аллеля, в исследуемых популяциях всего определено 63 аллеля, число аллелей в популяциях варьировало в пределах 48-60, во внутрипопуляционных выборках 44-50 (рис. 2). Число редких из них (с частотой ≤5%) в популяциях варьировало от 7 до 17, очень редких (к ним мы относили аллели, встречающиеся в 1-2 выборках с частотой ≤1-2%, для обнаружения которых требуются достаточно большие выборки) от 0 до 7; внутри популяций, соответственно 0-6 и 0-3. Каждое дерево было носителем 21-28 аллелей (редких $-\bar{0}-2$). У ели сибирской из 57 аллелей в отдельных популяциях их число составило 40-49, а внутри популяций 35-42. Из 23 редких (в их числе 15 встречались только в 1-2 выборках), в популяциях обнаруживалось от 6 до 14 аллелей, внутри популяций от 3 до 8 соответственно очень редких – 3–7 и 1–4. У пихты сибирской различия по аллельному разнообразию ферментов на трех уровнях обобщения данных были небольшими (в популяциях по 28-29, в выборках по 25-29 аллелей, редких 0-3).

Наиболее заметные различия при сравнении выборок обнаруживаются по числу и доле редких аллелей h_{μ} . Был проведен сравнительный анализ аллелей, присутствующих с частотой менее 5% (жирным шрифтом выделены наиболее редкие аллели). У сосны обыкновенной это $Mdh-2^{83}$, $Mdh-4^{90}$, $Got-1^{107}$, $Got-3^{32}$, ⁴², ³¹⁰, $Skdh-1^{85}$, ⁹⁰, ¹⁰³, ¹⁰⁷, $Skdh-2^{86}$,



Рис. 2. Суммарное число аллелей в 20 локусах (*N*), число редких аллелей (*N*p) и число очень редких аллелей (*N*op), выявленных в Сибири по результатам предыдущих наших исследований (1), в районе исследования (2), в отдельных популяциях (3), в выборках внутри популяций (4) трех хвойных видов. Светлыми линиями показаны пределы между минимальными и максимальными значениями.

Популяция: выбор возрастная групп	ка, а	Р	N _A	$N_{\rm E}$	Ι	h_{μ}	H _O	$H_{\rm E}$	F
				Сосна обы	кновенная				
М. Кемчуг:		80	2.650	1.365	0.389	0.330	0.214	0.220	0.015
2			± 0.284	±0.081	± 0.070	± 0.035	±0.041	± 0.042	± 0.017
MK-1	В	80	2.400	1.364	0.384	0.275	0.229	0.220	-0.035
СУР	П	75	2.350	1.376	0.384	0.254	0.204	0.220	0.027
СШР-1	П	75	2.250	1.352	0.364	0.241	0.203	0.208	0.041
Погорелка (РК):		85	3.000	1.388	0.406	0.381	0.219	0.228	0.021
			± 0.363	±0.086	±0.075	± 0.028	±0.042	± 0.044	±0.013
MK-3 (PK)	В	80	2.500	1.418	0.416	0.268	0.231	0.239	0.028
MK-3 (PK)	П	75	2.300	1.359	0.381	0.253	0.205	0.212	0.011
СШР-3 Ку	В	80	2.350	1.361	0.383	0.260	0.216	0.217	-0.020
BP45-3	П	80	2.450	1.378	0.396	0.271	0.215	0.226	0.031
BP55-3	П	70	2.200	1.406	0.385	0.213	0.231	0.228	-0.024
Ачинск:		80	2.750	1.363	0.393	0.344	0.205	0.219	0.035
			± 0.354	± 0.081	± 0.070	±0.031	± 0.038	± 0.042	± 0.020
MK-4	В	75	2.450	1.390	0.391	0.272	0.215	0.223	0.012
MK-4	П	70	2.300	1.396	0.390	0.257	0.217	0.223	0.017
СШР-4	В	75	2.200	1.288	0.334	0.231	0.197	0.191	-0.020
СШР-4	П	75	2.250	1.357	0.370	0.246	0.195	0.216	0.064
Б. Мурта:		70	2.400	1.398	0.391	0.257	0.233	0.225	-0.029
			± 0.320	±0.095	± 0.080	± 0.033	± 0.050	± 0.047	± 0.018
MK-5	В	70	2.300	1.382	0.408	0.227	0.233	0.214	-0.075
MK-5	П	70	2.350	1.434	0.419	0.223	0.235	0.243	0.030
BP75-5	Π	70	2.100	1.373	0.365	0.223	0.229	0.213	-0.064
				Ель сиб	бирская				
М. Кемчуг:		70	2.000	1.263	0.298	0.212	0.174	0.176	0.040
MK 1	R	65	1 900	1 278	0.304	0.224	0.175	0.182	0.041
CIIIP-1	П	65	1.900	1.270	0.267	0.224	0.175	0.152	-0.074
Б. Мурта (РК) [.]		80	2.450	1.268	0.315	0.354	0.181	0.178	0.000
2			±0.246	±0.061	±0.059	±0.039	±0.039	±0.037	±0.026
MK-5	В	68	2.050	1.286	0.317	0.253	0.183	0.184	0.058
MK-5	П	79	2.100	1.262	0.302	0.291	0.173	0.175	-0.010
BP75-5	П	68	1.850	1.250	0.285	0.217	0.194	0.169	-0.116
Козулька:	В	75	2.350	1.244	0.294	0.346	0.165	0.166	-0.012
			± 0.274	±0.059	± 0.055	± 0.034	± 0.033	± 0.035	±0.013
MK-6		84	2.000	1.253	0.291	0.250	0.166	0.167	-0.016
MK-6	П	63	1.950	1.258	0.291	0.259	0.187	0.171	-0.085

Таблица 3. Основные характеристики генетической изменчивости внутри популяций сосны обыкновенной, ели сибирской и пихты сибирской в контроле (МК, РК) и на вырубках (СШР, СУР, ВР)

Таблица 3. Окончание

Популяция: выборк возрастная группа	ia,	Р	N _A	$N_{\rm E}$	Ι	h_{μ}	H _O	H_{E}	F
СШР-6	П	70	1.950	1.270	0.307	0.234	0.185	0.179	-0.034
СШР-7	П	70	1.750	1.201	0.230	0.211	0.122	0.136	0.065
У-Тунгуска:		80	2.350	1.236	0.290	0.335	0.157	0.162	0.021
			±0.233	± 0.056	± 0.054	± 0.033	± 0.033	± 0.034	±0.022
MK-9	В	84	2.150	1.246	0.290	0.316	0.146	0.167	0.066
MK-9	П	68	1.950	1.249	0.285	0.250	0.181	0.165	-0.093
BP65-9	В	63	1.850	1.229	0.265	0.230	0.145	0.154	0.029
BP65-9	П	63	1.800	1.213	0.256	0.223	0.159	0.148	-0.058
				Пихта си	ибирская				
М. Кемчуг:		30	1.400	1.201	0.166	0.148	0.098	0.102	0.055
			±0.152	± 0.097	± 0.070	±0.021	±0.043	±0.043	±0.025
MK-1*	В	30	1.400	1.204	0.162	0.154	0.099	0.098	0.008
MK-1	П	25	1.350	1.194	0.159	0.102	0.102	0.096	-0.041
СШР-1	В	20	1.300	1.194	0.145	0.077	0.089	0.091	0.012
СШР-1	П	30	1.400	1.182	0.158	0.149	0.094	0.095	0.023
СШР-2	В	25	1.350	1.208	0.170	0.098	0.095	0.111	0.175
СШР-2	П	25	1.350	1.184	0.164	0.104	0.104	0.103	-0.006
Козулька:		30	1.400	1.202	0.164	0.156	0.098	0.102	0.028
			±0.152	± 0.097	±0.069	± 0.029	± 0.042	± 0.044	±0.015
MK-6	В	30	1.400	1.203	0.166	0.159	0.103	0.101	-0.027
СШР-6	П	25	1.350	1.206	0.164	0.102	0.096	0.104	0.084
СШР-8	В	30	1.400	1.189	0.161	0.146	0.093	0.099	0.025
СШР-8	Π	20	1.250	1.182	0.140	0.040	0.105	0.092	-0.458
У-Тунгуска:		30	1.400	1.202	0.167	0.146	0.102	0.103	0.000
		30	±0.152	±0.096	± 0.070	± 0.024	± 0.044	± 0.044	± 0.022
MK-9	В	30	1.400	1.197	0.168	0.146	0.106	0.104	-0.034
MK-9	П	30	1.400	1.196	0.160	0.162	0.102	0.099	-0.033
BP65-9	В	25	1.350	1.201	0.158	0.117	0.106	0.100	-0.047
BP65-9	П	30	1.400	1.196	0.168	0.141	0.095	0.103	0.054
Нарым (РК):		30	1.450	1.224	0.180	0.174	0.112	0.113	-0.019
			±0.170	±0.102	± 0.072	±0.037	± 0.044	± 0.046	±0.019
PK-10	В	30	1.450	1.237	0.186	0.212	0.118	0.117	-0.031
PK-10	П	30	1.400	1.200	0.168	0.157	0.101	0.105	-0.008

Примечание. * – старая вырубка, В – взрослые деревья, П – подрост; *P* – доля полиморфных локусов (%), *N*_A – среднее число аллелей на локус, *N*_E – эффективное число аллелей, *I* – индекс информации (энтропии) Шеннона, *h*_µ – доля редких аллелей, *H*_O, *H*_E – наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность, *F* – индекс фиксации Райта.

Lap-1¹⁰³, *Lap*-2^{98, 102, 105}, *Fdh*^{45, 206}, *Pgm*-1^{93, 95, 103}, *Adh*-2⁵⁹, *Fe*-2^{85, 113}. В данных популяциях не обнаружено следующих десяти аллелей, редко встречаемых в сибирской части ареала: *Got*-1⁸⁸, *Got*-2¹⁴⁸, *Got*-3⁵⁰⁵, *Skdh*-1^{93, 98}, 6-Pgd-2^{67, 91}, *Adh*-1^{112, 116}, *Idh*⁷⁴. У ели сибирской: *Got*-1¹⁰⁶, *Got*-2^{00, 106}, *Got*-3¹⁰⁹, *Lap*-1^{00, 98, 103}, *Lap*-2¹⁰⁷, *Skdh*-1^{00, 79}, *Skdh*-2⁹⁴, *Mdh*-2^{72, 104}, *Mdh*-3^{62, 147},

Idh-2^{59, 81, 115}, Gdh¹⁰⁹, Pgm-1⁹⁴, Pgm-2^{97, 102}, 6-Pgd-2⁵⁸. В выборках ели отсутствовали следующие редкие аллели: *Got-1⁸⁶, Got-2⁹³, Skdh-1¹¹², Mdh-3⁸⁴, Fdh³⁰⁰, Pgi-2^{84, 128}.* У пихты сибирской всего выявлено пять редких аллелей, в том числе три в исследуемых популяциях *Mdh-3^{78, 131}, Aco⁹⁵, аллели Got-1⁹³, Got-2⁰⁰* в них не обнаружены.

Предварительный анализ всех 15 выборок сосны обыкновенной показал достоверные различия между ними по частотам аллелей всех локусов (p < 0.0000), а при полокусном анализе — по восьми локусам: Mdh-3, Got-2, Skdh-1, Lap-2, 6Pgd-2, Pgm-1, Adh-1, Adh-2 (при сравнении ненарушенных рубкой участков – только по трем). Наиболее дифференцированы по частотам аллелей выборки со сплошных вырубок и контрольных участков в популяциях "Ачинск" ($\chi^2 = 57.26$, d.f. 22, p < 0.00006) и "М. Кемчуг" ($\chi^2 = 98.45$, d.f. 22, p < 0.00000), в меньшей степени и недостоверно в популяциях "Погорелка" ($\chi^2 = 34.91$, d.f. 24, p < 0.069) и "Б. Мурта" ($\chi^2 = 17.25$, d.f. 22, p < 0.750). Наиболее обедненная по аллельному разнообразию ферментов популяция "Б. Мурта" существенно отличалась от всех популяций при попарном сравнении по 2-8 в общем наборе локусов ($\chi^2 = 58.71 - 112.34$, d.f. 32–34, *p* < 0.0027–0.00000). Достоверное сокращение частоты встречаемости редких аллелей у подроста на вырубках по сравнению с местным контролем выявлено для вариантов ВР55-3 "Погорелка", ВР75-5 "Б. Мурта", СШР-1 "М. Кемчуг" и СШР-4 "Ачинск", т.е. на вырубках интен-сивностью выше, чем "умеренно высокая" 30– 40%, больше всего на сплошной вырубке "М. Кемчуг", где был полностью уничтожен почвенный покров с подростом (рис. 3). Достоверно также различались между собой два варианта выборочной рубки интенсивностью 45 и 55% ("Погорелка"). Отметим, что оба этих участка после рубки были пройдены низовым пожаром, но на втором был сильнее нарушен почвенный и напочвенный покров и оставлено недостаточное число семенных деревьев, неравномерно распределенных на площади. Наибольшие достоверные различия по частотам редких аллелей получены для всех выборок подроста с вырубок и для части с МК по сравнению с РК. Эти различия в целом характеризуют степень нарушенности популяций, подверженных разным видам антропогенной нагрузки в течение длительного периода времени (вырубкам, пожарам, рекреации). Достоверное сокращение генетического разнообразия выявлено также в культурах после СШР (рис. 3,a).

В трех популяциях ели сибирской выборки на вырубках также достоверно отличались от контрольных (МК, РК) по частоте всех нередких аллелей ($\chi^2 = 51.24-138.92$, d.f. 30, p < 0.0092-0.00000), в популяции "Б. Мурта" различия были недостоверными ($\chi^2 = 28.11-32.0$, d.f. 30, p < 0.37-0.56). Различия по числу редких аллелей (по критерию Фишера *F*) были достоверны во всех популяциях как относительно местного (p < 0.035-0.0023), так и регионального контроля (p < 0.0097-0.00002) (рис. 3,*б*), также и по доле редких аллелей h_{μ} (p << 0.0026-0.0003). Не отличалась от местного контроля только выборка подроста, оставшегося от предварительного возобновления на узком участке сплошной рубки СШР-1, примыкающем к стене леса (так как на остальной площади вырубки с удаленным почвенным покровом подроста не обнаружено).

В популяциях пихты сибирской различия между вырубками и контролем достоверны в относительных показателях, но невелики в численном выражении в виду низкого полиморфизма локусов и числа редких аллелей в выборках в целом (3 аллеля) (рис. 3,*в*), что отмечалось всеми исследователями вида ранее [26, 29, 45, 46].

ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из приведенного фактического материала, следствием интенсивных рубок является существенное сокращение доли редких аллелей в выборках подроста хвойных видов. В результате сравнения выборок из нарушенных наиболее интенсивными сплошными и выборочными (выше 45%) рубками популяций с мало нарушенными популяциями получены более низкие значения доли полиморфных локусов и аллельного разнообразия (доли редких аллелей): у сосны обыкновенной соответственно, на 9-12% (33-75% редких аллелей); у ели сибирской - на 12-30% (14-58% редких); у пихты сибирской – на 8–29% (50–100% редких). Не выявлено сокращения разнообразия изоферментов у сосны обыкновенной после выборочной рубки интенсивностью 45%, проведенной через десять лет после слабого низового пожара, стимулировавшего активное возобновление. Таким образом проведенное нами исследование в южной тайге Средней Сибири в целом подтверждает существенное влияние лесохозяйственной деятельности человека на генетическое разнообразие популяций хвойных видов, даже после однократного приема рубок, не рассматривая проблему лесопользования и обеднения генофондов древесных видов в историческом аспекте (в литературе отмечается неуклонное сокращение площади лесов России за последние 200-500 лет). Оно согласуется с выводами других авторов, установивших неполное воспроизводство генетического разнообразия в лесах после рубок вследствие фрагментации ареалов, сокращения численности популяций, искусственного восстановления и селекции [12-14, 32-40]. Причем даже проведение постепенной выборочной рубки и рубок ухода не гарантирует сохранения редких аллелей [35, 41, 421. В то же время, не во всех случаях обнаруживается влияние хозяйственной деятельности человека на генетическое разнообразие древесных растений [11, 43, 44], так как согласно перечисленным исследованиям оценки лесохозяйственной практики зависят от различий между объектами исследования (био-экологическими особенностями видов и истории генофондов разных



Рис. 3. Уменьшение числа редких аллелей (в %) на вырубках по сравнению с местным (МК) и региональным (РК) контролем; *, **, *** соответствует P < 0.05, 0.01, 0.001 уровням достоверности различий по критерию Фишера относительно МК (в скобках – относительно РК), н/д – недостоверно; в популяциях сосны обыкновенной – a, ели сибирской – δ , пихты сибирской – e.

видов и их популяций, от выбора генетических маркеров); а также, согласно полученных нами данных, — от различий в размерах популяций, площади вырубок, геометрической форме этой площади (квадрат — узкий прямоугольник), размерах окружающей рубку малонарушенной территории;

возможного воздействия пожаров до и после рубки, наличия факторов, препятствующих восстановлению лесов, либо способствующих ему (например уничтожение напочвенного покрова после рубки или проведение рубки в годы с высоким урожаем семян). В частности, меньшее сокращение числа редких аллелей наблюдалось на сплошных вырубках небольшой площади в популяциях сосны обыкновенной (СУР) и ели сибирской (СШР-6).

Поскольку на вырубках оставшиеся взрослые деревья характеризуются меньшим аллельным разнообразием по сравнению с подростом, то уменьшается число носителей редких аллелей репродуктивного возраста в целом и увеличивается время, необходимое для полноценного его воспроизводства до достижения подростом возраста, как минимум, 60-80 лет. Это повышает риски дальнейшего снижения разнообразия в связи с участившимися пожарами (часто антропогенного происхождения) в сосновых лесах, от которых в первую очередь гибнет подрост и сокрашением времени возраста рубки со 120 до 100, а теперь в ряде случаев до 80 лет. На вырубках увеличиваются различия между поколениями взрослых деревьев и подроста, а также между ценопопуляциями (или субпопуляциями) в пространстве по частоте встречаемости одноименных релких аллелей. Однако, как было показано выше, на вырубках могут сохраняться носители очень редких для популяции аллелей, поэтому после включения в анализ подроста сосны с вырубок их число в популяционных выборках увеличилось в популяциях "Погорелка" с 11 до 19, "М. Кемчуг" – с 9 до 12, "Ачинск" – с 12 до 15, в том числе, возможно за счет увеличения выборки с 30-60 до 90-150 особей. Поэтому для более надежного сохранения генетического разнообразия популяций хвойных видов желательно увеличить возраст рубки до 120–150 лет на участках, уже пройденных рубками.

Примечательно, что популяции пихты сибирской отличаются значительно меньшим полиморфизмом локусов, меньшей долей редких аллелей (7-10% от их общего числа), у сосны обыкновенной и ели сибирской их, соответственно, 32-40 и 16-26% от общего числа. У пихты сибирской ниже число эффективных мигрантов на поколение (Nm = 2.4) по сравнению с сосной и елью (Nm = 4.8-5.3). Если при этом сравнить одноименные ферментные системы у трех хвойных видов, можно также заметить в несколько раз большее число мономорфных локусов и целых ферментных систем v пихты сибирской (табл. 2). Например, у сосны обыкновенной мономорфны локусы Mdh-1, Idh, Pgm-2, Sod-2; у ели сибирской мономорфны *Mdh-1*, 6-*Pgd-3*, Sod-1; у пихты сибирской мономорфны или мало изменчивы локусы *Pgm-1*, 6-*Pgd-2*, *Skdh-2* и локусы ферментных систем Got, Mdh, Adh, Fe, Lap, Fdh, ldh, Pgi, Sod [29, 45, 46]. Такие низкие показатели генетической

изменчивости в целом не характерны для видов с широкими ареалами (как у пихты сибирской), но часто наблюдаются у видов с очень ограниченным распространением, эндемиков [17, 47]. Перечисленные особенности генетической изменчивости аллозимов в популяциях пихты сибирской подтверждают, что история вида может иметь не меньшее значение, чем его географическое распространение. Результаты исследования свидетельствуют о значительной утрате видом внутривидового аллельного разнообразия ферментных локусов относительно других видов пихты, особенно близкородственных видов пихты Abies sachalinensis (F. Schmidt) Mast и Abies nephrolepis (Trautv.) Maxim. (наиболее близких пихте сибирской, с генетическими дистанциями, соответствующими уровню подвидов [29]), а также относительно других хвойных видов, произрастающих в Северной Евразии. Это указывает на необходимость более подробного изучения генетической изменчивости вида на всем его ареале, особого подхода к анализу влияния лесопользования на популяции данного вида, использования других более изменчивых маркеров, а также разработки методов сохранения его генетического разнообразия и, возможно, восстановления утраченного разнообразия с использованием семян из неисследованных малонарушенных лесов северной тайги и горных территорий. Необходимы исследования по интродукции пихт сахалинской и белокорой и гибридизации с пихтой сибирской в ботсадах. Как отмечает С.А. Семерикова [29], с запада на восток – от южного и среднего Урала и Западной Сибири к Восточному Саяну и северному Уралу наблюдается увеличение генетической изменчивости в популяциях пихты сибирской, что объясняется контактами между популяциями с Северного Урала и юга Восточной Сибири в историческом прошлом. Отмеченная закономерность, на наш взгляд, также может быть следствием меньшей нарушенности лесов в районах Уральского севера и гор Восточной Сибири. Причем эта особенность зафиксирована не только для евразийских видов пихты, но и для видов пихты, произрастающих в Северной Америке [47]. Актуальность данной проблемы особенно высока в связи с фактами наибольшего среди других темнохвойных видов усыхания пихтовых лесов в России (10%) [48] и их большей чувствительности к изменениям условий среды [15], а также участием вида на заключительных стадиях восстановительно-возрастных сукцессий (более редких в условиях эксплуатации лесов).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из полученных нами данных на основе изоферментных маркеров, можно сделать следующие выводы относительно влияния рубок на генетическую изменчивость молодого поколения деревьев в популяциях хвойных видов в южной тайге Средней Сибири. Установлено достоверное сокращение показателей генетической изменчивости у подроста хвойных видов после рубок умеренно высокой и высокой интенсивности (выше 30–40%), в первую очередь снижение частоты встречаемости редких аллелей в выборках. Наибольший негативный эффект, в этой связи, наблюдался после сплошных широколесосечных рубок на большой площади и особенно на участках с полностью удаленным (вывезенным) напочвенным и почвенным покровом.

Результаты исследования позволяют сделать вывод о большей устойчивости генофондов популяций светлохвойной сосны обыкновенной к повреждающим воздействиям (вырубкам невысокой интенсивности и низовым пожарам) по сравнению с темнохвойными видами. О существенной нарушенности еловых лесов южной тайги в Средней Сибири могут свидетельствовать достоверно более низкие оценки генетического разнообразия в выборках местных контролей по сравнению с региональным. Отмечено очень низкое аллельное разнообразие изоферментных локусов у пихты сибирской, на что обращали внимание и другие исследователи. Наиболее вероятной причиной этого феномена на наш взглял является не естественная (изначальная) особенность вида, а утрата им значительной части внутривидового аллельного разнообразия ферментных локусов относительно других видов пихты в прошлом, особенно близкородственных видов (возможно, подвидов пихты сибирской) пихты сахалинской и пихты белокорой, а также относительно других хвойных видов, произрастающих в Сибири. Чтобы разобраться в этом вопросе необходимо более подробное изучение генетической изменчивости вида на всем его ареале для разработки способов сохранения (или восстановления) генетического разнообразия вида.

Высокие показатели разнообразия у подроста сосны обыкновенной после выборочной рубки "умеренно высокой" интенсивности (30-40%) позволяют предварительно рекомендовать придерживаться этой предельной величины вырубки (и ниже). Та же величина приводится по результатам исследования влияния прореживающих рубок интенсивностью менее 30% в сосняках на показатели генетического разнообразия сосны [49]. Из сплошных рубок, на наш взгляд, наиболее предпочтительны узколесосечные рубки полосами шириной 25-50 м (около 30 м при использовании харвестера) и рубки на небольшой плошали. Необходимо отказаться от сплошных вырубок площадью свыше 20 га и желательно – от постепенных "равномерно-выборочных" рубок, при которых лесозаготовители несколько раз нарушают почвенно-травяной покров с подростом, хотя этот способ в настоящее время считается щадящим. На наш взгляд более предпочтительны однократные

выборочные рубки, комбинированные со сплошными узколесосечными. Мы предлагаем на определенной площади спелых насаждений выделять небольшие участки под сплошную рубку, суммарная площадь которых будет соответствовать величине выборочной рубки (20-30%), либо немного большей интенсивности (30-40%), но с условием оставления достаточного числа групп семенных деревьев [50]. Следующую рубку в половине оставшихся нетронутыми спелых насаждений можно проводить не ранее формирования взрослого древостоя на участках, пройденных первой рубкой. Следствием такого лесопользования будет формирование характерной для восточносибирских популяций сосны обыкновенной группово-разновозрастной структуры древостоев (в данном случае трех преобладающих возрастов).

После установления пространственной популяционной структуры хвойных и в условиях высокой интенсивности эксплуатации естественных лесов для сохранения их генетического разнообразия желательно, на наш взгляд, выделять генетические резерваты во всех популяциях, особенно на границах ареалов видов. Однако по мнению Ф.Д. Аврова [16] они не только не решат проблему сохранения генофондов, но и усугубят ее, т.к. границы популяций нестабильны и для сохранения единства генофонда нужна непрерывная изменчивость через множество переходных форм, с чем мы согласны. Такого же мнения придерживаются и другие исследователи [52, 53]. Имеются также определенные проблемы поддержания генетических резерватов в нормальном состоянии [54], поэтому ввиду нерешенности данной проблемы предварительно можно рекомендовать создание системы временных (динамичных в пространстве) генетических резерватов (ГР), особенно в окрестностях крупных населенных пунктов, на расстоянии не более 100–150 км друг от друга на основе существующих естественных популяций хвойных видов. При такой широкой их системе достаточно будет установить запрет на рубки внутри ГР, своевременного проведения рубок обновления и переформирования на площади по периметру вокруг ГР (в три приема узкими лесосеками), а после формирования полноценных взрослых насаждений в буферной зоне провести аналогичную рубку внутри ГР.

Работа выполнена в рамках бюджетного проекта ФГБНУ ЗСО ИЛ СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН (проект № 0356-2019-0024) и при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда науки в рамках научного проекта № 18-44-240002 "Изучение генетического разнообразия популяций основных лесообразующих хвойных видов в пригородных лесах крупных промышленных центров Сибири".

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. Исаев А.С., Коровин Г.Н. Лес как национальное достояние России // Лесоведение. 2013. № 5. С. 5–12. https://doi.org/10.1134/S1995425513070056
- Побединский А.В. Рубки и возобновление в таежных лесах СССР. М.: Лесная промышленность, 1973. 200 с.
- Бузыкин А.И., Пшеничникова Л.С. Ресурсно-экологический потенциал лесов Красноярского края // Хвойные бореальной зоны. 2008. Т. 25. № 3–4. С. 327–332.
- Алтухов Ю.П. Динамика генофондов при антропогенных воздействиях // Вестник ВОГиС. 2004. Т. 8. № 2. С. 40–59.
- Fussi B., Westergren M., Aravanopoulos F. et al. Forest genetic monitoring: an overview of concepts and definitions // Envir. Monit. Assess. 2016. 188: 493. 12 p. https://doi.org/10.1007/s10661-016-5489-7
- 6. *Мамаев С.А., Семериков Л.Ф., Махнёв А.К.* О популяционном подходе в лесоводстве // Лесоведение. 1988. № 1. С. 3–9.
- Ирошников А.И., Мамаев С.А., Некрасов В.И. Генетический фонд лесных древесных пород в СССР (дифференциация, использование, охрана, мониторинг) // Лесная генетика, селекция и физиология древесных растений: Матер. междунар. симпоз. (25– 30 сент. 1989 г., Воронеж). М.: ЦНИИЛГиС, 1989. С. 9–16.
- Алтухов Ю.П. Внутривидовое генетическое разнообразие: мониторинг и принципы сохранения // Генетика. 1995. Т. 31. № 10. С. 1331–1357.
- 9. Гончаренко Г.Г., Дробышевская В.В., Силин А.Е. и др. Генетические ресурсы сосен России и сопредельных государств // Докл. РАН. 1996. Т. 346. № 3. С. 419–423.
- Авров Ф.Д. Генетическая устойчивость лесов // Лесное хоз-во. 2001. № 3. С. 46–47.
- 11. *Милютин Л.И*. Генетико-эволюционные основы устойчивости лесных экосистем // Лесоведение. 2003. № 1. С. 16-20.
- Политов Д.В. Генетика популяций и эволюционные взаимоотношения видов сосновых (сем. Pinaceae) Северной Евразии: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М.: Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 2007. 47 с.
- 13. Видякин А.И. Фенетика, популяционная структура и сохранение генетического фонда сосны обыкно-

венной (*Pinus sylvestris* L.) // Хвойные бореал. зоны. 2007. № 2–3. С. 159–166.

- 14. *Тараканов В.В.* Достижения и ошибки в области сохранения и рационального использования лесных генетических ресурсов Сибири // Лесное хоз-во. 2009. № 5. С. 10–12.
- 15. Тихонова И.В., Корец М.А. Изучение адаптивной нормы реакции популяций основных лесообразующих видов хвойных в Средней Сибири на основе косвенных данных // Журн. общей биологии. 2019. Т. 80. № 1. С. 68–80. https://doi.org/10.1134/S0044459619010068
- 16. Авров Ф.Д. Эколого-генетические основы устойчивости популяций и плантационного выращивания лиственницы в Сибири: Автореф. дис. ... докт. с.-х. наук. Красноярск: Ин-т экологии природных комплексов, 1998. 36 с.
- Hamrick J.L., Godt M.J.W. Allozyme diversity in plant species // Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources. Sunderland. Mass: Sinauer, 1990. P. 43–63.
- 18. *Животовский Л.А.* Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991. 271 с.
- Кравченко А.Н., Ларионова А.Я., Экарт А.К. Генетический полиморфизм популяций ели сибирской (*Picea obovata* Ledeb.) в азиатской части ареала // Вестник СВНЦ ДВО РАН. 2013. № 2. С. 74–95.
- 20. Экарт А.К., Ларионова А.Я., Зацепина К.Г. и др. Генетическое разнообразие и дифференциация сосны обыкновенной в Южной Сибири и Монголии // Сиб. экол. журн. 2014. № 1. С. 69–78. https://doi.org/10.1134/S1995425514010041
- Gorelick N., Hancher M., Dixonet et al. Google Earth Engine: Planetary-scale geospatial analysis for everyone // Remote Sensing of Environment. 2017. V. 202. P. 18–27. https://earthengine.google.com/timelapse/.
- 22. *Nei M*. Genetic distance between populations // Am. Naturalist. 1972. V. 106. P. 283–292.
- 23. *Peakall R., Smouse P.E.* GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Mol. Ecol. Notes. 2006. № 6. P. 288–295. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x
- 24. *Rousset F.* Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux // Mol. Ecol. Res. 2008. V. 8. № 1. P. 103–106. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x
- 25. *Хедрик* Ф. Генетика популяций. М.: Техносфера, 2003. 592 с.
- 26. Ларионова А.Я., Кравченко А.Н., Экарт А.К., Орешкова Н.В. Генетическое разнообразие и дифференциация популяций лесообразующих видов хвойных в Средней Сибири // Хвойные бореал. зоны. 2007. Т. 24. № 2–3. С. 235–242.
- Потенко В.В. Полиморфизм изоферментов и филогенетические взаимоотношения хвойных видов Дальнего Востока России: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Владивосток: БПИ ДВО РАН, 2004. 38 с.
- 28. *Krutovskii K.V., Bergmann F.* Introgressive hybridization and phylogenetic relationships between Norway *Picea abies* (L.) Karst. and Siberian *Picea obovate* Ledeb.

spruce species studied by isozyme loci // Heredity. 1995. V. 74. P. 464–480. https://doi.org/10.1038/hdy.1995.67

- Семерикова С.А. Популяционно-таксономическая структура видов пихт (*Abies* Mill., Pinaceae) северовостока Евразии: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Екатеринбург: ИЭРиЖ УрО РАН, 2008. 24 с.
- Санников С.Н., Петрова И.В. Филогеногеография и генотаксономия популяций вида Pinus sylvestris L. // Экология. 2012. № 4. С. 252–260. https://doi.org/10.1134/S1067413612040145
- 31. Тихонова И.В., Семериков В.Л., Шишикин А.С., Тараканов В.В. О необходимости особого режима хозяйствования и охраны в рефугиумных (реликтовых) популяциях видов хвойных в Сибири // Лесное хоз-во. 2011. № 3. С. 41–42.
- Ledig F. T. Human impacts on genetic diversity in forest ecosystems // Oikos. 1992. V. 63. P. 87–108. https://doi.org/10.2307/3545518
- Young A., Boyle T., Brown T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants // Trends Ecol. Evol. 1996. V. 11. P. 413–418. https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)10045-8
- 34. Buchert G.P., Rajora O.P., Hood J.V., Dancik B.P. Effects of harvesting on genetic diversity in old-growth eastern white pine (*Pinus strobes* L.) in Ontario, Canada // Conserv. Biol. 1997. № 11. P. 747–758. https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1997.96074.x
- Adams W.T., Zuo J., J Shimizu.Y., Tappeiner J.C. Impact of alternative regeneration methods on genetic diversity in coastal Douglas-Air[c1] // For. Sci. 1998. V. 44. № 3. P. 390–396.
- 36. Rajora O.P. Genetic biodiversity impacts of silvicultural practices and phenotypic selection in white spruce // Theor. Appl. Genet. 1999. V. 99. P. 954–961. https://doi.org/10.1007/s001220051402
- Lise Y., Kaya Z., Isik F. et al. The impact of overexploitation on the genetic structure of Turkish red pine (*Pinus brutia* Ten.) populations determined by RAPD markers // Silva Fenn. 2007. V. 41. P. 211–220.
- Marquard P.E., Echt C.S., Epperson B.K., Pubanz D.M. Genetic structure, diversity, and inbreeding of eastern white pine under different management conditions // Can. J. For. Res. 2007. V. 37. P. 2652–2662. https://doi.org/10.1139/X07-114
- Падутов В.Е., Хотылева Л.В., Баранов О.Ю., Ивановская С.И. Генетические эффекты трансформации лесных экосистем // Экол. генетика. 2008. Т. 6. № 1. С. 3–11.
- Ortego J., Bonal R.L., Munoz A. Genetic consequences of habitat fragmentation in long-lived tree species: The case of the Mediterranean Holm Oak (*Quercus ilex* L.) // Heredity. 2010. V. 101. P. 717–726. https://doi.org/10.1093/jhered/esq081
- Nale D.B. Genetic implications of shelterwood regeneration of Douglas-fir in southwest Oregon // For. Sci. 1985. V. 31. № 4. P. 995–1005.
- 42. *El-Kassaby Y.A., Benowicz A.* Effects of commercial thinning on genetic, plant species and structural diversity in second-growth Douglas-fir (*Pseudotsuga men-*

ziesii (Mirb.) Franco) stands // For. Genet. 2000. V. 7. P. 193–203.

- 43. Ильинов А.А., Политов Д.В., Раевский Б.В. Влияние способов лесовозобновления на генетическую структуру популяций ели финской *Picea* × *fennica* (Regel) Kom // Уч. зап. Петрозаводского гос. ун-та. 2010. Т. 109. № 4. С. 50–55.
- 44. *Ratnam W., Rajora Om P., Finkeldey R. et al.* Genetic effects of forest management practices: Global synthesis and perspectives // For. Ecol. and Manag. 2014. 14 p. https://doi.org/10.1016/j.foreco.2014.06.008
- 45. Ларионова А.Я., Экарт А.К. Генетическая структура и дифференциация разновысотных популяций пихты сибирской в Западном Саяне // Экол. генетика. 2005. Т. 3. № 2. С. 22–27.
- 46. Ларионова А.Я., Экарт А.К. Генетическая структура и дифференциация популяций пихты сибирской в Томской области // Вестн. Томского гос. ун-та. 2012. № 354. С. 187–191.
- 47. Aguirre-Planter E., Glenn G.R., Eguiarte L.E. Low levels of genetic variation within and high levels of genetic differentiation among populations of species of *Abies* from southern Mexico and Guatemala // Am. J. Bot. 2000. V. 87. № 3. P. 362–371. https://doi.org/10.2307/2656632
- 48. Замолодчиков Д.Г. Оценка климатогенных изменений разнообразия древесных пород по данным учетов лесного фонда // Успехи совр. биологии. 2011. Т. 131. № 4. С. 382–392.
- Danusevicius D., Kerpauskaite V., Kavaliauskas D. et al. The effect of tending and commercial thinning on the genetic diversity of Scots pine stands // Europ. J. For. Res. 2016. V. 135. P. 1159–1174. https://doi.org/10.1007/s10342-016-1002-7
- 50. Санников С.Н., Санников Д.С. Система рубок и возобновления сосновых лесов на эколого-геногеографической основе // Сибирский лесн. журн. 2015. № 6. С. 3–16. https://doi.org/10.15372/SJFS20150601
- Rajora O.P., Rahman M.H., Buchert G.P., Dancik B.P. Microsatellite DNA analysis of genetic effects of harvesting in old-growth eastern white pine (*Pinus strobus*) in Ontario // Mol. Ecol. 2000. V. 9. P. 339–348. https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.00886.x
- 52. *Amundson R*. The Changing Role of the Embryo in Evolutionary thought Roots of Evo–Devo. Cambridge, New York: Cambridge Univer. Press, 2005. 280 p. https://doi.org/10.1017/CBO9781139164856
- Wagner G.P. The developmental genetics of homology // Nat. Rev. Genet. 2007. V. 8. P. 473–479. https://doi.org/10.1038/nrg2099
- 54. Тараканов В.В., Дубовик Д.С., Роговцев Р.В. и др. Состояние и перспективы развития генетико-селекционного комплекса хвойных пород в Сибири (на примере Новосибирской области) // Вестн. Поволжского гос. технол. ун-та. Сер. Лес. Экол. Природопольз. 2019. № 3(43). С. 5–24. https://doi.org/10.25686/2306-2827.2019.3.5

Genetic Variability in the Populations of *Pinus sylvestris, Picea obovata, Abies sibirica*, and in Cuttings in the Southern Taiga of Central Siberia

I. V. Tikhonova^a, *, A. K. Ekart^b, A. N. Kravchenko^b, and N. A. Tikhonova^b

^aWest-Siberian Department of the Sukachev Institute of Forest, Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630082 Russia ^bSukachev Institute of Forest Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, 660036 Russia

*e-mail: selection@ksc.krasn.ru

We studied the variability of polymorphic isozyme loci in 1180 individuals of undergrowth in 4 populations of Scots pine (Pinus sylvestris L.), Siberian spruce (Picea obovata Ledeb.) and Siberian fir (Abies sibirica Ledeb.), growing in the southern taiga of Central Siberia, on the sites passed by logging of different intensities and in the control. In total, 15 samples of Scots pine, 13 samples of Siberian spruce, and 16 samples of Siberian fir were studied within the populations. A comparative analysis of the data confirms a significant reduction in genetic diversity of young generation of trees of three coniferous species (by 8-30% in the number of alleles and the level of polymorphism of loci, by 14-75% in the number of rare alleles) in the place of clear large-scale cuttings and selective cuttings of high intensity. It was noted that the gene pools of populations of dark coniferous species are more sensitive to anthropogenic impacts compared with light coniferous (Scots pine). Features of the genetic variation of allozymes in Siberian fir populations indicate a significant loss by the species of the intraspecific allelic diversity of the enzyme loci, therefore it is necessary to use another markers and approach to the analysis of the impact of forest management on the population of this species as well as greater care for the conservation of its genetic diversity. Of the used indicators of genetic variation the most informative for the genetic monitoring of coniferous forests are rare alleles of polymorphic loci in general, and especially rare alleles of loci characterized by a low level of polymorphism. Of the used indicators of genetic variability, the most informative for the purposes of genetic monitoring of coniferous forests are rare alleles of polymorphic loci in general, and especially alleles of low polymorphic loci.

Keywords: genetic diversity, coniferous species, clear and selective felling, southern taiga.

ГЕНЕТИКА РАСТЕНИЙ

УДК 577.21:575.113.12

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ГДФ-L-ГАЛАКТОЗОФОСФОРИЛАЗЫ (*ApGGP1*) У СОРТОВ ЛУКА-ПОРЕЯ

© 2021 г. О. К. Анисимова¹, А. В. Щенникова¹, Е. З. Кочиева¹, М. А. Филюшин^{1, *}

¹Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук, Москва, 119071 Россия *e-mail: michel7753@mail.ru

Поступила в редакцию 01.05.2020 г. После доработки 02.06.2020 г. Принята к публикации 25.08.2020 г.

У широкой выборки сортов лука-порея Allium porrum L., различающихся содержанием витамина C, идентифицированы и охарактеризованы кодирующие последовательности гена ApGGP1, продукт которого – ГДФ-L-галактозофосфорилаза – является ключевым ферментом L-галактозного пути биосинтеза витамина C. Определен аллельный полиморфизм кДНК гена ApGGP1 у 35 сортов лука-порея, выявлено 29 аллельных вариантов, соответствующих 11 вариантам белка ApGGP1. В последовательностях ApGGP1 у лука-порея и других видов Allium выявлен родоспецифичный C-концевой мотив (50 а. о.). Определен профиль экспрессии гена ApGGP1 в различных органах и тканях (корень, донце, отбеленная часть ложного стебля и зеленый лист (молодой и зрелый)) лука-порея. Транскрипты ApGGP1 присутствуют во всех анализируемых тканях. Максимальный уровень экспрессии гена наблюдается в листьях, минимальный – в донце. При этом в корнях (нефотосинтези-рующая ткань) уровень экспрессии гена достаточно высок и сопоставим с таковым в молодых листьях.

Ключевые слова: лук-порей, *Allium porrum*, ГДФ-L-галактозофосфорилаза, полиморфизм гена, профиль экспрессии.

DOI: 10.31857/S0016675821030036

L-аскорбиновая кислота (**AK**, аскорбат, витамин C) является важным элементом неферментативной антиоксидантной системы эукариот растений и животных [1, 2]. Также AK вовлечена в процессы клеточного роста и деления и является субстратом для синтеза других соединений и кофактором некоторых ферментов [1, 3]. При этом ряд животных, включая приматов, не способны синтезировать AK, так как потеряли функциональный ген, кодирующий последний фермент в пути биосинтеза AK, и получают необходимые количества витамина C с пищей [1].

В растениях витамин С был обнаружен во всех клеточных структурах, включая митохондрии, где происходит последняя стадия биосинтеза АК [1]. Содержание АК значительно варьируется в разных тканях и наибольшее количество характерно для фотосинтезирующих листьев, меристем, цветков и незрелых плодов, а наименьшее — для стеблей и корней [1, 4].

К настоящему времени описаны четыре основных пути биосинтеза АК — L-галактозный, L-гулозный, галактуроновый и мио-инозитоловый [1, 5]. Основным в растениях считается L-галактозный путь Смирнова—Уилера (Smirnoff-Wheeler), который начинается с образования ГДФ-D-маннозы, поэтапно преобразуемой в производные L-галактозы вплоть до синтеза конечного продукта — L-аскорбиновой кислоты [1, 6]. Ключевым ферментом L-галактозного пути является ГДФ-L-галактозофосфорилаза (GDP-L-galactose phosphorylase, GGP; EC 2.7.7.69), катализирующая второй этап биосинтеза — превращение ГДФ-L-галактозы в L-галактозу-1-P [1, 7].

ГДФ-L-галактозофосфорилаза кодируется геном *GGP*, последовательности которого идентифицированы у многих видов растений [5, 6, 8, 9]. При этом геном растений может содержать несколько паралогичных генов, кодирующих изоформы данного фермента. Например, у *Arabidopsis thaliana* идентифицировано два гена ГДФ-L-галактозофосфорилазы – *VITAMIN C (VTC) 2* и VTC5, однако вклад этих генов в процесс биосинтеза AK значительно различается: VTC2 играет преобладающую роль, а VTC5 – дополняющую [8, 9]. У Triticum aestivum в каждом из трех субгеномов найдено по два гена ГДФ-L-галактозофосфорилазы (TaGGP1-A/B/D и TaGGP2-A/B/D), профили экспрессии которых сильно различаются, что может означать участие отдельных изоформ (с преобладающим влиянием TaGGP1) в биосинтезе AK в конкретных тканях и органах мягкой пшеницы [6].

Лук-порей (Allium porrum L.) является популярной овощной культурой в Западной Европе и Азии, а в последнее время и в РФ. В пищу пригодно практически все растение – отбеленный ложный стебель и зеленые листья. Аскорбиновая кислота вносит значительный вклад в антиоксидантную активность лука-порея, причем в зеленых листьях содержание АК значительно больше, чем в отбеленной части, и может достигать 8.5 мг/г сухой массы [10]. На видах и сортах *Allium* регулярно проводятся сравнительные исследования, касающиеся анализа антиоксидантной активности и содержания АК [10]. Несмотря на это, ни генные сети, ни отдельные гены пути биосинтеза АК до сих пор не охарактеризованы ни у лука-порея, ни у других представителей рода Allium.

Целью данной работы стала идентификация у лука-порея кодирующей последовательности, гомологичной гену *GGP1*, исследование ее межсортовой вариабельности и аллельного полиморфизма и определение профиля экспрессии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для работы были отобраны 35 сортов лука-порея зарубежной и отечественной селекции из коллекции Федерального научного центра овощеводства (ФНЦО) (табл. в Приложении). Из зеленых листьев этих сортов была выделена суммарная РНК с очисткой от примесей ДНК (наборы RNeasy Plant Mini Kit и RNase free DNasy set; QIAGEN), синтезированы препараты кДНК (набор GoScript[™] Reverse Transcription System, Promega).

С целью амплификации GGP1-последовательностей у анализируемых образцов лука-порея были разработаны специфичные праймеры. В базе транскриптомных данных (NCBI TSA) у представителей рода Allium был проведен поиск последовательностей, гомологичных кДНК гена GGP1 Asparagus officinalis (XM_020388507.1). Были найдены гомологичные транскрипты у A. ampeloprasum (GFAR01020967.1), A. cepa (GBGJ01076064.1) и A. sativum (GFAP01091649.1),

на основе которых разработаны праймеры (ApVTC2F 5'-GTTCTCCTTCCGATTTGCT-3' и ApVTC2R 5'-ATTCCATARATACTGACTTCAG-3') для амплификации полноразмерной кодирующей последовательности (включая 70–100 пн 5'- и 3'-UTR) гомолога гена *GGP1* у образцов *A. porrum*.

С помошью разработанных праймеров на препаратах кДНК амплифицировали последовательности гомолога гена GGP1. ПШР-продукты ожидаемой длины были очищены с помощью QIAEX® II Gel Extraction kit (QIAGEN, Германия) и секвенированы с использованием тех же праймеров на ABI Prism 3700 DNA Analyzer (ЦКП Биоинженерия, ФИЦ Биотехнологии РАН). Выравнивание и анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей был проведен с помощью программы MEGA 7.0 (https://www.megasoftware.net/). Консервативные домены и мотивы в белках были определены с помощью NCBI-CDD (http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi) И MEME 5.1.1 (http://meme-suite.org/tools/meme). Влияние аминокислотных замен на структуру и функции белков было предсказано с помощью программы PROVEAN (http://provean.jcvi.org/index.php).

Профиль экспрессии гена GGP1 был определен методом ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР) в корнях, донце, зеленых листьях (молодой и зрелый) и отбеленной части ложного стебля (поперечный срез шириной 0.5 см в 2 см от донца) растений лука-порея сорта Премьер (собраны в августе 2019 г. на стадии активного формирования отбеленного ложного стебля). Для РВ-ПЦР были разработаны специфичные праймеры rtVTC2F 5'-GGTGTCAAGCGTGTGTGTATCTG-3'и rtVTC2R 5'-TTCCCAAACAGCGGGATTGAC-3'. Относительный уровень экспрессии GGP1 был определен по референсным генам GAPDH [11] и UBQ [12]. Для РВ-ПЦР был использован набор "Реакционная смесь для проведения РВ-ПЦР в присутствии SYBR GreenI и ROX" (ООО "Синтол", Россия) и термоциклер CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США). Реакции проводили в двух биологических и трех технических повторах в следующих условиях: 95°С - 5 мин; 40 циклов (95°С – 15 с, 62°С – 50 с). Для статистической обработки результатов использовали программу GraphPad Prism v. 8 (https://www.graphpad.com).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кодирующие последовательности гомолога гена *GGP1* были амплифицированы и секвенированы у 35 сортов лука-порея. Полученные после-

Сорт	64	109	167	171	213	234	351	390	597	648	774	807	858	982	987	1023	1026	1059	1077	1093	1110	1191	1216	1243	1249	Аллель
Lyon	G	С	С	G	С	С	Т	G	Т	С	С	Α	С	Т	С	Т	С	Т	С	G	С	Т	С	G	G	
American flag	G	С	С	G	С	С	Т	G	Т	С	С	Α	С	Т	С	Т	С	Т	С	G	С	Т	С	G	G	A 1
Prazal	G	С	С	G	С	С	Т	G	Т	С	С	Α	С	Т	С	Т	С	Т	С	G	С	Т	С	G	G	AI
Praza 2	G	С	С	G	С	С	Т	G	Т	С	С	Α	С	Т	С	Т	С	Т	С	G	С	Т	С	G	G	
Agria	G	С	G	G	С	С	Т	G	Т	С	С	Α	С	Т	С	Т	С	Т	С	G	С	Т	С	G	G	12
Monstruoso-2	G	С	G	G	С	С	Т	G	Т	C	C	Α	С	Т	C	Т	C	Т	С	G	С	Т	С	G	G	AZ
Элефант	G	С	G	G	С	С	Т	G	Т	С	С	Α	С	С	С	Т	С	Т	С	G	С	Т	С	G	G	4.2
Летний бриз	G	С	G	G	С	С	Т	G	Т	С	С	А	С	С	С	Т	С	Т	С	G	С	Т	С	G	G	AS
Herfstreuzen	G	С	С	Α	С	С	Т	G	Т	С	С	Α	С	Т	С	Т	С	Т	С	G	С	Т	С	G	G	
Amarillo	G	С	С	Α	С	С	Т	G	Т	С	С	Α	С	Т	С	Т	С	Т	С	G	С	Т	С	G	G	A4
Monstruoso-1	G	С	G	G	С	С	Т	Α	Т	С	С	Α	С	С	С	Т	С	А	С	G	С	С	С	G	G	A5
Olifant-Exelsior	G	С	С	G	С	С	Т	G	Т	С	Т	Α	С	С	С	Т	С	Т	С	G	С	Т	С	G	G	A6
Long d'hiver	G	С	С	G	С	С	Т	G	Т	С	С	Α	С	Т	С	Т	С	Α	С	G	С	С	С	G	G	A7
Poireau	G	С	С	G	С	С	Т	G	Т	С	С	Α	С	Т	С	Т	С	Т	С	G	С	С	С	G	G	A8
Giant anelioro	G	С	С	Α	С	С	Т	Α	Т	С	С	Α	С	Т	С	Т	С	Т	С	G	С	Т	С	G	G	A9
Musselburgh	G	С	G	G	С	Α	Т	G	Т	С	С	Α	С	Т	С	Т	С	Α	С	G	С	С	С	G	G	A10
Empire	А	С	С	Α	С	С	Т	G	Т	С	С	Α	С	Т	С	Т	С	Т	С	G	С	Т	С	G	G	A11
Itation gent	G	С	G	G	С	С	Т	Α	Т	Α	С	G	С	Т	С	С	Т	Α	С	G	С	Т	С	G	G	A12
Blauwgroene Winter	G	С	С	Α	С	С	С	Α	Т	С	С	Α	С	Т	С	Т	С	А	С	G	С	Т	С	G	G	A13
Коламбус	G	С	G	G	С	С	С	G	Т	С	С	Α	С	С	С	Т	С	Α	С	С	С	Т	А	G	Т	A14
Голиаф	G	С	G	G	С	С	Т	G	Т	С	С	Α	С	Т	С	Т	С	Α	С	G	С	Т	С	G	G	A15
Жираф	G	С	G	G	С	С	Т	G	Т	С	С	Α	С	Т	Α	Т	С	Α	С	G	С	С	Α	G	G	A16
Казимир	G	С	С	G	С	С	Т	G	Т	С	С	Α	С	С	С	Т	С	А	С	G	С	Т	С	G	G	A17
Слон	А	С	G	G	С	С	Т	G	Т	С	С	Α	С	С	С	Т	С	Т	С	G	С	Т	С	G	Т	A18
Хобот слона	G	С	С	G	С	С	Т	G	Т	С	С	Α	С	С	С	Т	С	Α	С	G	С	С	С	G	G	A19
Добрый молодец	G	С	С	Α	С	С	Т	G	Т	С	С	Α	С	С	Α	Т	С	Α	Т	G	С	С	С	G	Т	A20
Карантанский	G	С	С	G	С	С	Т	G	Т	С	С	Α	С	С	С	Т	С	Т	С	G	С	Т	С	G	G	A21
Porree dicker	G	С	С	G	С	С	С	G	Т	С	С	Α	С	Т	С	Т	С	Т	С	G	С	Т	С	Т	Т	A22
Прас	G	С	С	G	С	С	Т	G	Т	С	С	Α	С	Т	С	Т	С	Α	С	G	С	Т	С	G	G	A23
Otina	G	G	С	Α	Т	С	С	Α	С	С	С	Α	С	Т	С	Т	С	Α	С	G	С	Т	С	G	G	A24
Pandora	G	С	С	Α	С	С	Т	G	Т	С	С	Α	С	С	С	Т	С	Α	С	G	С	С	С	G	G	A25
Веста	G	С	С	G	С	С	Т	G	Т	С	С	Α	С	С	С	Т	С	Т	С	G	С	Т	С	G	Т	A26
Аллигатор	G	С	G	G	С	С	Т	G	Т	С	С	Α	С	Т	С	С	Т	Α	С	G	С	Т	С	G	Т	A27
Премьер	G	С	С	Α	С	С	Т	G	Т	С	С	Α	Α	Т	С	Т	С	Α	С	С	С	Т	С	G	G	A28
XXL	G	С	С	G	С	С	Т	G	Т	С	С	Α	С	С	С	Т	С	Т	С	G	Т	С	С	G	G	A29

Таблица 1. Аллельный полиморфизм кодирующих последовательностей гена *GGP1* у анализируемых сортов лука-порея. Положение SNP на кДНК определено от старт-кодона

довательности были депонированы в NCBI (МТ479049–МТ479083).

Размер кДНК *АрGGP1* у всех образцов *А. porrum* был инвариантен и составил 1275 пн, как и у других видов *Allium* (*A. ampeloprasum*, *A. sativum* и *A. cepa*). В сравнении с *GGP1 A. sativum* и *A. cepa* в последовательностях *ApGGP1* образцов лука-порея было выявлено 23 и 57 SNPs соответственно. Последовательности *GGP1 A. ampeloprasum* и образцов *А. porrum* различались всего одной нуклеотидной заменой (A675T), что было ожидаемо, так как *А. porrum* согласно ряду таксономических классификаций считается подвидом *А. ampeloprasum* [13].

Размер кДНК *GGP1* аспарагуса *A. officinalis* (1320 пн) оказался больше размера кодирующей последовательности *GGP1 A. porrum*, а гомология составила 79.8%. Поскольку структурное сход-

ство высоко, то вероятно, что подобно *GGP1 A. officinalis* полногеномная последовательность *GGP1 A. porrum* также содержит шесть экзонов.

В идентифицированных последовательностях кДНК *GGP1* сортов лука-порея было выявлено 25 вариабельных сайтов (1.96% от общей длины кДНК). Почти половина SNPs (12) находятся на 3'-конце кДНК (предположительно экзон VI). Для анализируемой выборки 11 SNPs – образецспецифичны: C109G, C213T и T597C (сорт Otina), C234A (Musselburgh), C648A и A807G (Itation gent), C774T (Olifant-Exelsior), C858A (Премьер), C1077T (Добрый молодец), C1110T (XXL), G1243T (Роггее dicker). Остальные нуклеотидные замены встречаются у двух и более сортов лука-порея (табл. 1).

Проведенный анализ позволил выявить 29 аллельных вариантов *GGP1*, различающихся комбина-

циями SNPs у анализируемых сортов лука-порея (табл. 1). Аллельный вариант A1 идентифицирован у четырех сортов лука-порея, аллели A2, A3 и A4 встречаются у пар сортов — Agria/Monstruoso-2, Элефант/Летний бриз и Herfstreuzen/Amarillo соответственно (табл. 1). Остальные аллельные варианты сортоспецифичны для данной выборки. Наибольшее количество нуклеотидных замен по сравнению с аллелем A1 обнаружено у вариантов A12 (сорт Itation gent), A20 (Добрый молодец) и A24 (Otina).

Так как взятые в анализ сорта лука-порея различались содержанием витамина С (табл. в Приложении), была проведена оценка возможных ассоциаций между содержанием АК и выявленными нуклеотидными заменами. Для этого сравнивали SNPs, общие для групп сортов с высоким (>35 мг/100 г) или низким (<30 мг/100 г) содержанием витамина С. Однако каких-либо корреляций выявлено не было.

Полученные нуклеотидные последовательности были транслированы. Размер белка GGP1 был инвариантным (424 а. о.) у всех исследуемых сортов лука-порея. Идентифицированные в кДНК несинонимичные замены приводят к семи замещениям а. о. (Е22К, Р37А, S56С, А365Р, R406S, A415S и A417S), анализ которых в программе PROVEAN предсказал их нейтральный характер. Замещение S56C присутствует у 12 сортов выборки, а замещения E22K, A365P, R406S и A417S характерны для меньшего числа сортов (табл. 2). Два замещения были сортоспецифичными: P37A (сорт Otina) и A415S (Porree dicker). Всего у анализируемых сортов лука-порея было выявлено 11 вариантов белка ApGGP1, характеризующихся различными комбинациями замещений а. о. (табл. 2). Вариант белка Р1 присутствует у 17 сортов лука-порея (48.5%), P2 – у восьми (22.8%), Р3 – у двух (5.7%), а Р4–Р11 – у отдельных сортов.

Анализ последовательностей с помощью NCBI-CDD показал, что все они содержат консервативный домен ГДФ-L-галактозогексозо-1фосфат-гуанилтрансферазы (PLN03103) в положении 1—393 а. о. Последовательности домена у GGP1 лука-порея оказались высоко гомологичны таковым у других видов растений, например аспарагуса *A. officinalis* (идентичность 80%) или томата *Solanum lycopersicum* (73%). В домене PLN03103 GGP1 анализируемых образцов *A. porrum* было выявлено четыре нейтральных замещения а. о. (E22K, P37A, S56C и A365P) (табл. 2).

ГДФ-L-галактозофосфорилаза относится к суперсемейству белков HINT (histidine triad nu-

cleotide protein), которые характеризуются схожей структурой и наличием гистидиновой триады His-X-His-X-His-X-X, являющейся каталитическим центром фермента [14]. Как было показано ранее, у растений в белках ГДФ-L-галактозофосфорилазы отсутствует третий остаток гистидина [8, 15]. В анализируемых последовательностях белков ApGGP1 был выявлен мотив HLHFQ (233-237 а. о.). Такой же мотив содержат белки GGPs A. thaliana, томата S. lycopersicum, пшеницы Т. aestivum и других видов растений [6, 15, 16]. Ранее было показано, что у A. thaliana и томата S. lycopersicum белки GGP локализуются в цитоплазме и ядре и предположительно имеют двойную функцию, ферментативную и регуляторную [17, 18]. Сигнал ядерной локализации КККР, найденный в белках GGP других видов растений [6], также был обнаружен и в последовательностях белков GGP1 анализируемых образцов лука-порея. Это позволяет предположить, что GGP1 у лукапорея также может иметь двойную функцию.

Идентифицированные варианты аминокислотных последовательностей ApGGP1 анализируемых сортов лука-порея были использованы для кластерного анализа. На построенной дендрограмме все выявленные варианты белка Р1-Р11 формируют единую группу с A. ampeloprasum (бутстреп-поддержка 89%). Базальные ветви образуют другие виды Allium (А. сера и А. sativum) и спаржа A. officinalis. Таким образом, все взятые в анализ виды порядка Asparagales формируют общий субкластер (бутстреп-поддержка 99%). Другие виды однодольных растений, рис Oryza sativa и ананас Ananas comosus (порядок Poales) формируют ветви к субкластеру видов Asparagales. Виды двудольных растений ожидаемо образуют субкластеры, генетически отдаленные (*p*-distance 0.30-(0.35) от группы видов Asparagales (рис. 1,a).

С помощью программы МЕМЕ 5.1.1 в последовательностях ApGGP1 были достоверно идентифицированы 14 консервативных мотивов, десять из которых присутствовали в белках GGP1 всех взятых в анализ видов растений (рис. 1,б). Мотив 11 был выявлен в последовательностях белков GGP1 только у представителей порядка Asparagales: лука-порея A. porrum (55-69 a. o.), других видов Allium (55-69 a. o.) и аспарагуса A. officinalis (62-76 a. o.). С-концевой мотив 7 (375-424 a. o.) был специфичным только для GGP1 видов Allium (рис. 1,б). Интересно, что все три С-концевых замещения а. о., обнаруженных в ApGGP1 анализируемых сортов лука-порея, локализованы именно в мотиве 7. Другие замещения а. о., находящиеся в функциональном домене PLN03103, локализова-

	38	амещени	я амино	кислотны	ых остатк	ЮВ		
Сорт	E22K	P37A	S56C	A365P	R406S	A415S	A417S	Вариант белка
		Домен Р	LN03103	1				-
Lyon	E	Р	S	Α	R	Α	Α	
American flag	E	Р	S	A	R	A	A	
Olifant-Exelsior	E	Р	S	A	R	A	A	
Long d'hiver	E	Р	S	A	R	A	A	
Poireau	E	Р	S	A	R	A	A	
Giant anelioro	E	Р	S	A	R	A	A	
Praza1	E	Р	S	A	R	A	A	
Plaza 2	E	Р	S	A	R	A	A	
Herfstreuzen	E	Р	S	A	R	A	A	P1
Amarillo	E	Р	S	A	R	A	A	
Blauwgroene Winter	E	Р	S	A	R	A	A	
Казимир	E	Р	S	A	R	A	Α	
Хобот слона	E	Р	S	A	R	A	Α	
Добрый молодец	E	Р	S	A	R	A	A	
Прас	E	Р	S	A	R	A	A	
Pandora	E	Р	S	A	R	A	Α	
XXL	E	Р	S	A	R	A	Α	
Monstruoso-1	E	Р	С	Α	R	A	Α	
Monstruoso-2	E	Р	С	Α	R	A	Α	
Musselburgh	E	Р	С	Α	R	A	Α	
Itation gent	Е	Р	С	Α	R	A	A	
Agria	E	Р	С	Α	R	A	Α	P2
Голиаф	E	Р	С	Α	R	A	Α	
Летний бриз	E	Р	С	Α	R	A	Α	
Элефант	E	Р	С	Α	R	A	Α	
Карантанский	E	Р	S	Α	R	A	S	Da
Веста	E	Р	S	A	R	A	S	P3
Жираф	E	Р	С	Α	S	A	Α	P4
Коламбус	E	Р	С	Р	S	А	S	P5
Аллигатор	E	Р	С	Α	R	А	S	P6
Премьер	E	Р	S	Р	R	А	А	P7
Porree dicker	E	Р	S	Α	R	S	S	P8
Otina	E	Α	S	Α	R	Α	А	P9
Empire	K	Р	S	Α	R	А	А	P10
Слон	К	Р	С	А	R	А	S	P11

Таблица 2. Вариабельность аминокислотных последовательностей GGP1 у анализируемых 35 сортов лука-порея





ГЕНЕТИКА

том 57

2021

Nº 3
ны в мотивах 2 (А365Р), 6 (Р37А) и 11 (S56С), а замещение E22К – между мотивами 9 и 6.

С учетом того, что гены изоформ GGP могут обладать органо- и тканеспецифичной транскрипцией [5, 6], был проведен анализ профиля экспрессии гена *ApGGP1* в различных органах (корень, донце, зеленый лист (молодой и зрелый) и отбеленная часть ложного стебля) лука-порея отечественного сорта Премьер (рис. 1, в). Транскрипты ApGGP1 присутствовали во всех анализируемых тканях. Максимальный уровень экспрессии *АрGGP1* наблюдается в зрелых зеленых листьях лука-порея, тогда как в молодых листьях уровень транскрипции данного гена ниже в 1.5 раза (рис. 1, в). Полученные данные согласуются с результатами других исследований, где наиболее высокая экспрессия GGP1 также детектируется в фотосинтезирующих тканях [17, 19]. Считается, что это может быть связано с наличием в промоторе гена GGP1, как и в промоторах некоторых других генов L-галактозного пути биосинтеза АК, светочувствительных cis-элементов [20, 21].

Что касается нефотосинтезирующих тканей лука-порея, то в донце (уплощенный стебель видоизмененного побега) был выявлен минимальный уровень транскрипции *АрGGP1*, в 14.6 раз ниже, чем в зрелых зеленых листьях, а в отбеленной части ложного стебля – в 1.5 и 2 раза ниже, чем в молодых и зрелых листьях соответственно. Можно предположить, что транскрипция гена GGP1 в нефотосинтезирующих тканях связана с необходимостью синтеза в них витамина С для инактивации возникающих в процессе метаболизма активных форм кислорода [2]. Ранее считалось, что транскрипция гена GGP1 активируется наличием света, поэтому максимальные уровни экспрессии наблюдаются в активно фотосинтезирующих органах [20]. Полученные данные соответствуют результатам других исследований, где, как и в случае анализируемых нами сортов лука-порея, нефотосинтезирующим тканям соответствуют минимальные уровни экспрессии GGP1 [6, 17]. Например, в корнях A. thaliana уровень экспрессии гена VTC2 (гомолог *GGP1*) в 18 раз ниже, чем в листьях [17]. У баклажана (Solanum melongena) в корнях уровень транскрипции GGP1 также минимальный [22].

Интересно, однако, что в нашем исследовании в корнях лука-порея уровень транскрипции *ApGGP1* сопоставим с таковым в молодом зеленом листе (рис. 1,*a*). Это подтверждает возможность участия АК в ответе корней растений на различные абиотические стрессы. Так, ранее было показано, что в ответ на солевой стресс в корнях *O. sativa* индуцируется биосинтез АК, что сопровождается ростом экспрессии одного из ключевых генов биосинтеза AK (*OsVTC1-3*), а подавление экспрессии этого гена значительно нарушает устойчивость риса к солевому стрессу [23].

Выявленный у сортов лука-порея высокий нуклеотидный полиморфизм гена *ApGGP1* может быть следствием высокого уровня внутривидового геномного полиморфизма, характерного для *A. porrum* [24, 25]. Однако значительное структурное сходство белковых последовательностей ApGGP1 у сортов лука-порея и отсутствие радикальных замен, в особенности в домене PLN03103 и каталитическом центре, позволяют предположить, что гомологи GGP1 сохраняют функцию и уровень ферментативной активности в биосинтезе AK у анализируемых образцов *A. porrum*, косвенно подтверждая значимость витамина С для развития растения и реакции на стрессы [7].

Поскольку исследуемый ген GGP1 кодирует ключевой фермент L-галактозного пути биосинтеза АК, мы предполагали возможность существования корреляций между вариабельностью *АрGGP1* и содержанием витамина С в тканях лука-порея. Однако таких корреляций обнаружено не было. По всей видимости, при оценке подобных зависимостей, кроме скорости катаболизма АК, растущей под влиянием окислительного стресса, следует учитывать также возможность транспортировки АК по флоэме из фотосинтезирующих тканей в запасающие [1], в нашем случае в отбеленную часть ложного стебля. Таким образом, регуляция метаболизма аскорбиновой кислоты у вида A. porrum зависит не только от уровня экспрессии считающегося ключевым гена ГДФ-L-галактозофосфорилазы, но является более сложным процессом и требует дальнейших исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (№ 19-016-00054) и частично Министерства науки и высшего образования РФ (А.В. Щенникова, Е.З. Кочиева), с использованием экспериментальной установки искусственного климата (ЭУИК, ФИЦ Биотехнологии РАН).

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.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Сорт	Номер по кат. ФНЦО/ВИР/Госсортреестр (при наличии)	Происхождение	Содержание витамина С в белой части, мг/100 г сырой массы*
Monstruoso-1	K-1/2114	Аргентина	40
Lyon	K-2/2159	Великобритания	33
American flag	K-3/2191	Дания	36
Olifant-Exelsior	K-4/2196	Нидерланды	26
Long d'hiver	K-5/2212	Франция	37
Poireau	K-6/2231	Франция	25
Giant anelioro	K-7/2238	Нидерланды	27
Praza1	K-8/2244	Турция	33
Praza 2	K-9/2245	Италия	40
Monstruoso-2	K-10/2248	Великобритания	27
Musselburgh	K-11/2253	Нидерланды	24
Herfstreuzen	K-12/2270	Нидерланды	36
Amarillo	K-13/2307	Франция	29
Empire	K-14/2350	Дания	35
Itation gent	K-15/2353	Дания	34
Agria	K-16/2398	Нидерланды	35
Blauwgroene Winter	K-17/2403	Германия	44
Коламбус	K-26	Нидерланды	24
Голиаф	K-28	Россия	26
Жираф	K-29	Россия	н/а
Казимир	K-31	Германия	35
Летний бриз	K-33	Россия	26
Слон	K-36	Россия	30
Хобот слона	K-37	Россия	32
Добрый молодец	K-39	Россия	32
Карантанский	K-40/2001	Россия	26
Porree dicker	K-41/2017	Германия	26
Прас	K-42/2038	Россия	24
Otina	K-89	Нидерланды	н/а
Pandora	K-101	Нидерланды	н/а
Веста	9102094	Россия	36
Аллигатор	9154083	Россия	н/а
Премьер	9705521	Россия	н/а
Элефант МС	9550224	Чехия	33
XXL		Россия	н/а

Использованные в работе сорта лука-порея А. porrum

Примечание. * – по данным ФНЦО; н/а – не анализировалось.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Smirnoff N. Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals // Free Radical Biol. Med. 2018. V. 22. P. 116–129. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.033
- 2. Bilska K., Wojciechowska N., Alipour S., Kalemba E.M. Ascorbic acid-the little-known antioxidant in woody plants // Antioxidants (Basel). 2019. V. 8. Article 645. https://doi.org/10.3390/antiox8120645
- 3. Conklin P.L., Barth C. Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to

ozone, pathogens, and the onset of senescence // Plant Cell Environ. 2004. V. 27. P. 959-970.

- 4. Gest N., Gautier H., Stevens R. Ascorbate as seen through plant evolution: The rise of a successful molecule? // J. Exp. Bot. 2013. V. 64. P. 33-53.
- 5. Broad R.C., Bonneau J.P., Hellens R.P., Johnson A.A.T. Manipulation of ascorbate biosynthetic, recycling, and regulatory pathways for improved abiotic stress tolerance in plants // Intern. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. Article 1790.
 - https://doi.org/10.3390/ijms21051790
- 6. Broad R.C., Bonneau J.P., Beasley J.T. et al. Genomewide identification and characterization of the GDP-Lgalactose phosphorylase gene family in bread wheat // BMC Plant Biol. 2019. V. 19. № 1. Article 515. https://doi.org/10.1186/s12870-019-2123-1
- 7. Linster C.L., Clarke S.G. L-Ascorbate biosynthesis in higher plants: The role of VTC2 // Trends Plant Sci. 2008. V. 13. P. 567-573. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.08.005
- 8. Dowdle J., Ishikawa T., Gatzek S. et al. Two genes in Arabidopsis thaliana encoding GDP-L-galactose phosphorvlase are required for ascorbate biosynthesis and seedling // Plant J. 2007. V. 52. P. 673-689.
- 9. Gao Y., Badejo A.A., Shibata H. et al. Expression analysis of the VTC2 and VTC5 genes encoding GDP-l-galactose phosphorylase, an enzyme involved in ascorbate biosynthesis, in Arabidopsis thaliana // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2011. V. 75. P. 1783-1788.
- 10. Bernaert N., De Paepe D., Bouten C. et al. Antioxidant capacity, total phenolic and ascorbate content as a function of the genetic diversity of leek (Allium ampeloprasum var. porrum) // Food Chem. 2012. V. 134. P. 669-677.

https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.159

- 11. Liu M., Wu Z., Jiang F. Selection and validation of garlic reference genes for quantitative real-time PCR normalization // Plant Cell Tiss Organ Cult. 2015. V. 122. P. 435-444. https://doi.org/10.1007/s11240-015-0780-9
- 12. Schwinn K.E., Ngo H., Kenel F. et al. The onion (Allium cepa L.) R2R3-MYB gene MYB1 regulates anthocyanin biosynthesis // Front Plant Sci. 2016. V. 7. Article 1865. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01865
- 13. Hirschegger P., Jakse J., Trontelj P., Bohanec B. Origins of Allium ampeloprasum horticultural groups and a molecular phylogeny of the section Allium (Allium: Alliaceae) // Mol. Phylogenet. Evol. 2010. V. 54. № 2. P. 488-497.

https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.08.030

- 14. Brenner C. Hint, Fhit, and GalT: function, structure, evolution, and mechanism of three branches of the histidine triad superfamily of nucleotide hydrolases and transferases // Biochemistry. 2002. V. 41. № 29. P. 9003-9014.
- 15. Hou H.M., Li H.E., Gao M. et al. Expression of a GDP-L-galactose phosphorylase-like gene in a chinese wild Vitis species induces responses to erysiphe necator and defense signaling molecules // Genet. Mol. Res. 2013.

V. 12. №3. P. 3830-3844. https://doi.org/10.4238/2013.September.23.1

- 16. Тяпкина Д.Ю., Кочиева Е.З., Слугина М.А. Идентификация и анализ вариабельности генов-гомологов биосинтеза L-аскорбиновой кислоты VTC2 у видов томата (Solanum секция Lycopersicon) // ДАН. 2018. Т. 483. С. 682-686. https://doi.org/10.31857/S086956520003457-5
- 17. Müller-Moulé P. An expression analysis of the ascorbate biosynthesis enzyme VTC2 // Plant Mol. Biol. 2008. V. 68. P. 31-41. https://doi.org/10.1007/s11103-008-9350-4
- 18. Wang L., Meng X., Yang D. et al. Overexpression of tomato GDP-L-galactose phosphorylase gene in tobacco improves tolerance to chilling stress // Plant Cell Rep. 2014. V. 33. P. 1441-1451.
- 19. Huang M., Xu Q., Deng X.-X. L-Ascorbic acid metabolism during fruit development in an ascorbate-rich fruit crop chestnut rose (Rosa roxburghii Tratt) // J. Plant Physiol. 2014. V. 171. P. 1205-1216. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.03.010
- 20. Fukunaga K., Fujikawa Y., Esaka M. Light regulation of ascorbic acid biosynthesis in rice via light responsive cis-elements in genes encoding ascorbic acid biosynthetic enzymes // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2010. V. 74. P. 888-891. https://doi.org/10.1271/bbb.90929
- 21. Li J., Liang D., Li M., Ma F. Light and abiotic stresses regulate the expression of GDP-L-galactose phosphorylase and levels of ascorbic acid in two kiwifruit genotypes via light-responsive and stress-inducible cis-elements in their promoters // Planta. 2013. V. 238. P. 535-547. https://doi.org/10.1007/s00425-013-1915-z
- 22. Jiang M., Liu Y., Ren L. et al. Light regulates ascorbic acid accumulation and ascorbic acid-related genes expression in the peel of eggplant // South African J. Bot. 2018. V. 114. P. 20-28. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.10.012
- 23. Wang Y., Zhao H., Qin H. et al. The synthesis of ascorbic acid in rice roots plays an important role in the salt tolerance of rice by scavenging ROS // Intern. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. № 11. Article E3347. https://doi.org/10.3390/ijms19113347
- 24. Дьяченко Е.А., Середин Т.М., Филюшин М.А. Сравнительная оценка вариабельности ядерного и хлоропластного генома лука-порея (Allium porrum L.) // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2019. Т. 23. № 7. C. 902-909. https://doi.org/10.18699/VJ19.565
- 25. Филюшин М.А., Холда О.А., Кочиева Е.З., Рыжова Н.Н. AFLP маркирование генотипов сортов лука-порея (Allium porrum) // Генетика. 2011. Т. 47. № 4. С. 560-565.

ГЕНЕТИКА том 57 Nº 3 2021

Identification and Variability of the GDP-L-Galactose Phosphosphorylase Gene *ApGGP1* in Leek Cultivars

O. K. Anisimova^a, A. V. Shchennikova^a, E. Z. Kochieva^a, and M. A. Filyushin^a, *

^aFederal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia *e-mail: michel7753@mail.ru

The ApGGP1 coding sequences, encoding GDP-L-galactose phosphorylase, the key enzyme of the L-galactose pathway of vitamin C biosynthesis, have been identified and characterized in a wide range of leek (*Allium porrum* L.) cultivars, differing in vitamin C content. Analysis of ApGGP1 polymorphism in 35 leeks cultivars revealed 29 allelic variants, corresponding to 11 variants of the ApGGP1 protein. It was found that leek and other *Allium* species ApGGP1 sequences contain specific C-terminal motif (50 aa). The *ApGGP1* expression pattern was determined in various leek organs and tissues (roots, white shaft bottoms, light-green shafts, and green leaves (young and mature)). *ApGGP1* transcripts were detected in all analyzed tissues. The maximum expression level was observed in leaves, and the minimum – in white shaft bottoms. The level of gene expression in roots (non-photosynthetic tissue) was quite high and comparable with that in young green leaves.

Keywords: leek, Allium porrum, GDP-L-galactose phosphorylase, gene polymorphism, expression pattern.

ГЕНЕТИКА РАСТЕНИЙ

УДК 575.117.2:577.216

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ЧУЖЕРОДНЫХ ГЕНОВ В СЛОЖНООРГАНИЗОВАННЫХ ИНСЕРЦИЯХ У ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА С МОЗАИЧНЫМ ХАРАКТЕРОМ ПРОЯВЛЕНИЯ ГЕНА *npt*II

© 2021 г. Т. В. Маренкова^{1, *}, В. В. Кузнецов¹, Е. В. Дейнеко¹

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

*e-mail: marenkova@bionet.nsc.ru Поступила в редакцию 01.05.2020 г. После доработки 23.07.2020 г. Принята к публикации 25.08.2020 г.

Исследованы особенности мозаичного характера экспрессии селективного гена *npt*II, обеспечивающего устойчивость растений к антибиотику канамицину, и целевого гена секреторной эндонуклеазы *Serratia marcescens* под управлением двунаправленного *MAS* промотора гена маннопинсинтазы Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens* в эпиаллельных линиях трансгенных растений табака (Nu5 и Nu6). Оба гена входят в состав сложноорганизованной инсерции, представленной двумя полноразмерными копиями T-ДНК и одной усеченной, расположенной между ними в обратной ориентации. Трансгенные линии табака контрастно различаются по фенотипическому проявлению гена *npt*II (низкая частота мозаиков в линии Nu5 и высокая – в Nu6). Установлено, что при переходе трансгенных растений из геми- в гомозиготное состояние происходит снижение уровня экспрессии селективного гена и оно наиболее выражено для эпиаллеля Nu6. Показано, что в трансгенных линиях происходит синтез аберрантных смысловых и антисмысловых транскриптов в области усеченной копии T-ДНК. Именно эти транскрипты могут выступать в роли триггеров и запускать инактивацию экспрессии селективного гена *npt*II.

Ключевые слова: трансгенные растения *Nicotiana tabacum* L., ген *npt*II, инактивация гена, аберрантная PHK, мозаичный характер экспрессии гена.

DOI: 10.31857/S0016675821030103

Современные технологии генетической модификации растительных геномов позволяют успешно переносить гены различного гетерологичного происхождения с целью улучшения хозяйственно ценных признаков у важных сельскохозяйственных культур. Традиционные подходы генетической модификации (агробактериальная трансформация, биобаллистика, электропорация и др.) связаны со случайным распределением по геному последовательностей экзогенной ДНК, тогда как новые технологии геномного редактирования с использованием системы CRISPR/Cas9 позволяют исследователям интегрировать чужеродные гены в заранее выбранные районы-мишени генома. Успешность генетической модификации генома растения во многом определяется высоким и стабильным уровнем экспрессии перенесенных целевых генов.

На основании обширного экспериментального материала по созданию генетически модифицированных растений, накопленного в течение последних двух десятилетий, становится очевидным, что уровень экспрессии трансгенов значительно варьирует между независимо полученными исходными трансформантами и их потомками [1-3] и определяется многими факторами, среди которых наиболее важными являются число копий и место встраивания в геном чужеродной инсерции [3, 4]. Так, например, дальнейшая "судьба" трансгена, интегрированного в гиперметилированный район растительного генома, с большой долей вероятности будет связана с его инактивацией при передаче потомкам [3–5]. Встраивание нескольких копий экзогенной ДНК в один район генома с образованием сложноорганизованных инсерций, включающих перестройки в виде инвертированных последовательностей, сопровождается снижением либо полной потерей экспрессии целевых генов [5-7].

Образование спонтанных сложноорганизованных инсерций при генетической трансформации растительного генома несомненно представляет большой интерес для исследователей, поскольку большая часть генома растений эволюционно сформировалась в виде кластеров генов и генных семейств. При улучшении хозяйственно ценных признаков у растений события интеграции в растительный геном в виде тандемных инсерций элиминируются исследователями из-за нестабильности экспрессии и замолкания целевого гена. Однако такие растения представляют большой интерес в качестве моделей для выявления причин и механизмов, запускающих процессы инактивации чужеродных генов.

Известны два основных механизма, приводящих к замолканию трансгена в геноме генетически модифицированного растения: нарушение считывания целевого транскрипта и деградация уже синтезированной мРНК в ядре/цитоплазме [8, 9]. Ключевым фактором и триггером в данном процессе выступают малые интерферирующие РНК, которые образуются при разрезании комплексом ферментов двухцепочечных аберрантных РНК-транскриптов, считываемых с последовательностей генетической конструкции [10-13]. Нарушения в стабильности экспрессии трансгенов в растениях ведет к снижению уровня их экспрессии и полной потере, а также к мозаичному характеру экспрессии на уровне клеток соматической ткани [14].

Созданные нами ранее две эпиаллельные линии (Nu5 и Nu6) трансгенных растений табака N. tabacum L., различающиеся между собой по частоте образования потомков с мозаичным проявлением селективного гена неомицинфосфотрансферазы II (*npt*II) E. coli, являются удобной моделью для выявления причин и механизмов мозаичного характера экспрессии на уровне соматических тканей. Обе линии были получены в результате направленного отбора в течение трех последовательных поколений среди потомков от самоопыления исходного трансформанта табака Nu21, в геном которого случайным образом была интегрирована сложноорганизованная Т-ДНК-инсерция, включающая две полноразмерные копии Т-ДНК и одну усеченную, расположенную в обратной ориентации. При создании линии Nu5 отбор проводился на снижение частоты мозаицизма по гену nptII на уровне фенотипа, тогда как при создании линии Nu6, напротив, на ее повышение [7, 15]. По результатам гибридологического анализа установлены статистически значимые различия в стабильности экспрессии и проявления гена *npt*II между эпиаллелями, несмотря на встройку в один и тот же район растительного генома и соответственно одинаковый состав нуклеотидной последовательности, прилежащей к области Т-ДНК. Гибриды и потомки от самоопыления линии Nu5 были относительно стабильны по экспрессии селективного гена на фоне невысоких частот выявления мозаиков среди потомков, тогда как в линии

Nu6 наблюдались усиление инактивации гена и высокая частота появления мозаичных растений (до 100%) [16]. Различия по проявлению мозаичного характера экспрессии *прt*II-гена коррелировали с разным уровнем его метилирования в области промотора и транскрибируемой части селективного гена [17]. Различия между линиями сохранялись и при переводе их на тетраплоидный уровень [18].

Цель данной работы — выявление особенностей экспрессии целевого и селективного генов, входящих в состав сложноорганизованной инсерции двух линий трансгенных растений табака (Nu5 и Nu6), контрастно различающихся между собой по мозаичному проявлению гена *прt*II, и установление триггеров (аберрантных PHK), участвующих в его инактивации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исходный материал

В качестве модели для выявления особенностей экспрессии трансгенов в составе сложноорганизованной инсерции послужили Т₃-потомки двух линий трансгенных растений табака Nu5 и Nu6, контрастно различающихся по проявлению селективного гена *npt*II, полученных в результате последовательного отбора по мозаицизму среди самоопыленных потомков исходного трансгенного растения Nu21 [15]. Схема сложноорганизованной инсерции, включающей три копии Т-ДНК, одна из которых инвертирована по отношению к двум другим с делецией большей части гена nptII (усеченная копия Т-ДНК), представлена на рис. 1. Трансгенное растение *Nicotiana tabacum* L. Nu21 было получено методом агробактериальной трансформации генетической конструкцией pC27-nuclS с геном nptII, обеспечивающим устойчивость pacтений табака к антибиотику канамицину, и геном секреторной эндонуклеазы Serratia marcescens под управлением двунаправленного MAS промотора гена маннопинсинтазы Ti-плазмиды A. tumefaciens [15]. Отличительной особенностью потомков растения Nu21 являлось фенотипически нестабильное проявление гена nptII, выражающееся как чередование по поверхности листа зеленых (канамицинустойчивых) и белых (канамицин-неустойчивых) участков. Для сравнительного анализа экспрессии гена *npt*II у двух контрастно различающихся по проявлению мозаицизма линий, а также выявлению считывания аберрантных транскриптов в области генетической конструкции использовали геми- и гомозиготные по встройке Т-ДНК растения третьего поколения от самоопыления. Гомозиготность потомков определяли по отсутствию расщепления в следующем поколении при самоопылении (все потомки канамицин-устойчивые), гемизиготность - по наличию расщепления



nuclS-RT

 пртП
 nuclS

 >

 1-2
 1-1

 1-1
 1RT

 nuclS-1
 nuclS-2

Puc. 1. Схема T-ДНК инсерции в геноме растения Nu21. nuclS – ген секреторной эндонуклеазы S. marcescens; nptII – rен неомицинфосфотрансферазы II E. coli; PMAS – двунаправленный промотор гена маннопинсинтазы Ti-плазмиды A. tumefaciens; LB, RB – повторы, ограничивающие T-область Ti-плазмиды A. tumefaciens; фигурные стрелки показывают ориентацию копий в T-ДНК инсерции, стрелками обозначены праймеры и их направление; 1RT, 2RT, nuclS-RT – праймеры для проведения обратной транскрипции; 1-1, 1-2, 2-1, 2-2, nuclS-1, nuclS-2 – праймеры для проведения ОT-ПЦР на кДНК.

PMAS

2-2 €

RB

3 : 1 (канамицин-устойчивые : канамицин-неустойчивые).

2RT

LB

nuclS

Анализ экспрессии трансгенов (nptII и nuclS)

Для анализа экспрессии трансгенов использовали листья пяти месячных растений табака. Суммарную PHK выделяли с помощью набора реактивов RNAeasy® Plant Mini Kit (Quiagen), PHK обрабатывали DNase I и 4 мкг PHK брали для синтеза кДНК (Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit).

Анализ экспрессии гена *прt*II проводили при помощи ПЦР в реальном времени на амплификаторе CFX96 (Вio-Rad, США). Праймеры подобраны на центральную область гена *прt*II в полноразмерных копиях T-ДНК (табл. 1). Программа амплификации: 95° C – 3 мин; далее пять циклов без детекции: 95° C – 10 c, 61° C – 20 c, 72° C – 5 c; затем 40 циклов с детекцией на стадии отжига (канал FAM): 95° C – 10 c, 61° C – 20 c, 72° C – 5 c. Уровень экспрессии оценивали при помощи ПО "Bio-Rad CFX Manager 2.1". Каждый образец анализировали в трех повторах, нормирование данных проводили по хозяйскому гену GSP (glutaminesynthetase) [19], который анализировался в той же пробирке.

Анализ экспрессии гена секреторной эндонуклеазы *Serratia marcescens* выполняли методом полуколичественной ОТ-ПЦР. Праймеры указаны в табл. 1. Программа амплификации кДНК: 1 цикл 94°С – 3 мин, 58°С – 30 с, 72°С – 1 мин; далее 34 цикла: 94°С – 1 мин, 60°С – 30 с, 72°С – 1 мин. В качестве контроля использовали праймеры на ген актина.

ГЕНЕТИКА том 57 № 3 2021

Эксперименты повторяли 2 раза в двух повторностях.

Выявление аберрантных РНК

Расположение праймеров, использованных для выявления смысловых аберрантных РНК, считываемых с MAS промотора усеченной копии гена *npt*II, и антисмысловых аберрантных РНК, считываемых с предполагаемых промоторов в области спейсерной последовательности усеченной копии гена *npt*II приведено на рис. 1, последовательности праймеров представлены в табл. 1. Программа амплификации кДНК: 1 цикл 94°С – 3 мин, 58°С – 30 с, 72°С – 1 мин; далее 34 цикла: 94°С – 1 мин, 60°С – 30 с, 72°С – 1 мин. В качестве контроля использовали праймеры на ген актина.

Анализ встраивания векторных ДНК

ДНК выделяли с помощью набора реактивов GenElute[©] Plant Genomic kit (Sigma). Анализ на наличие встройки векторной ДНК в растительный геном проводился ПЦР с праймерами TiL_U и pTi_p2_L для анализа левого, прилежащего к встройке района из плазмиды pC27-*nuclS*, и с праймерами npt_p3_R и TiR_L для анализа правого прилежащего района (табл. 1). Режим амплификации: 1 цикл: $95^\circ - 3$ мин, $58^\circ - 30$ с, $72^\circ - 1$ мин; 32 цикла: $95^\circ - 30$ с, $60^\circ - 30$ с, $72^\circ - 1$ мин;

Вид эксперимента	Обозначения праймеров	Последовательность	Размер ПЦР-продукта, пн
ПЦР в реальном	Прямой	5'-CTCGACGTTGTCCCTGAAG-3'	
времени, анализ	Обратный	5'-TCAGCCATGATGGATACTTTC-3'	
экспрессии гена npt	Зонд	5'-FAM-CTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCG-BHQ1-3'	
Проведение	1RT	5'-GCACAACAGACAAATCGGCTG-3'	
обратной	2RT	5'-CACCTTCACCTACGATGGGG-3'	
транскрипции	nuclS RT	5'-CACGCTCGAATCCATCGACA-3'	
Проведение	1-1	5'-TCCGCTCTACCGAAAGTTACG-3'	366
ОТ-ПЦР	1-2	5'-CCCAGTCAGCATCATCACACCA-3'	
	2-1	5'-ACGGCTAAGAGCGAATTTGG-3'	311
	2-2	5'-GACGGCCACAAGAAAAAACC-3'	
	actin-1	5'-CTATTCTCCGCTTTGGACTTGGCA-3'	261
	actin-2	5'-AGGACCTCAGGACAACGGAAACG-3'	
	nuclS-1	5-'ATCGAACAGGAAAGCGGCATAG-3'	488
	nuclS-2	5'-CATTGAACAACAACAGCACCAC-3'	
Анализ встраивания	TiL_U	5'-AAGTCCCATGTGGATCACTC-3'	573
векторных ДНК	pTi_p2_L	5'-GATCCATGTAGATTTCCCGG-3'	
	npt_p3_R	5'-TGCCCCGAGAATTATGC-3'	541
	TiR_L	5'-CCTGATGAATGCTCATCCG-3'	

Таблица 1. Структура праймеров

Статистический анализ

Для сравнения уровня экспрессии у гомо- и гемизиготных групп трансгенных растений использовали непараметрический дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса (программный пакет Statistica 5.5) с учетом множественного попарного сравнения критерием Данна ($Q_{\rm kp}$ ($k = 4, \alpha = 0.05$) = 2.639), где k – число сравниваемых выборок (гемизиготы и гомозиготы линий Nu5 и Nu6), α – уровень значимости [20].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессия гена nptII и гена секреторной эндонуклеазы S. marcescens у геми- и гомозиготных растений табака Nu5 и Nu6

Результаты сравнительного анализа по экспрессии гена *npt*II двух линий табака (Nu5 и Nu6), контрастно различающихся по частоте выявления мозаицизма, представлены на рис. 2. Наблюдается широкая вариабельность по количеству транскриптов мРНК, синтезируемых как с одной (у гемизигот), так и с двух (у гомозигот) ДНКматриц. Анализируя относительные значения представленности транскриптов гена *npt*II у гемизиготных трансгенных растений табака линий Nu5 и Nu6 (рис. 2,*a*) следует отметить отсутствие статистически достоверных различий в уровне экспрессии селективного гена (Q = 1.715).

Также у гомозиготных растений линии Nu5 отмечается уровень экспрессии, не отличающийся от уровня экспрессии гемизиготных растений (рис. 2, δ) (Q = 0.857), что позволяет предположить снижение уровня экспрессии селективного гена при переходе из геми- в гомозиготное состояние. При этом у гомозиготных растений линии Nu6 наблюдается значительное достоверное снижение экспрессии гена *npt*II (Q = 2.939). Только у двух растений из шести проанализированных был детектирован низкий уровень экспрессии трансгена, у остальных потомков экспрессия гена не определялась, что указывает на инактивацию экспрессии селективного гена.

Ранее нами было установлено, что у линии Nu5 отмечается статистически значимо более низкая частота появления потомков с мозаичным характером экспрессии гена *npt*II, по сравнению с линией Nu6. В то время как для гомозиготных растений Nu6 характерна высокая частота мозаиков (до 100%), резко угнетенный рост и гибель на селективной среде [16].

Результаты количественной оценки транскрипционной активности гена *npt*II у двух различающихся по мозаицизму линий трансгенных растений табака подтвердили установленные ра-



Рис. 2. Уровень экспрессии гена *npt*II у гемизиготных (*a*) и гомозиготных (δ) трансгенных растений табака с низким (Nu5) и высоким (Nu6) уровнем появления мозаичных потомков. Растения линии Nu5 – столбцы черного цвета, линия Nu6 – серого цвета. По оси ординат указан уровень экспрессии, нормализованный по хозяйскому гену *GSP*; по оси абсцисс указаны номера трансгенных растений табака. Показана стандартная ошибка среднего.

нее существенные различия, свидетельствующие о том, что более высокие значения транскрипционной активности гена *npt*II коррелируют с низкой частотой его инактивации на уровне соматической ткани (линия Nu5) и, наоборот, снижение уровня экспрессии *npt*II-гена связано с высокой частотой инактивации и появлением мозаичных потомков (линия Nu6).

Таким образом, между исследуемыми линиями трансгенных растений табака Nu5 и Nu6 отмечаются статистически значимые различия в уровне экспрессии селективного гена между гомозиготными растениями. Наблюдается общая тенденция снижения транскрипционной активности гена nptII при его переходе из геми- в гомозиготное состояние, что соответствует частотным характеристикам инактивирования анализируемого гена, установленным ранее по его фенотипическому проявлению. Для растений линии Nu6 снижение активности гена *npt*II более выражено, поскольку именно в этой линии среди потомков для получения следующего поколения отбирали генотипы с максимальным проявлением мозаичности. В связи с этим представляло интерес оценить уровень экспрессии другого гена, входящего в состав кассеты экспрессии в качестве целевого, - гена секреторной эндонуклеазы S. marcescens (рис. 1). Получение таких данных позволит судить о том,

ГЕНЕТИКА том 57 № 3 2021

происходит ли координированная инактивация другого гена, входящего в состав сложноорганизованной инсерции.

На рис. 3 представлены результаты ОТ-ПЦР на геми- и гомозиготных растениях линий Nu5 и Nu6. У растений линии Nu5 транскрипты эндонуклеазы регистрируются у всех проанализированных растений (геми- и гомозиготных) на уровне экспрессии гена актина. Для линии Nu6 транскрипт выявляется только для ряда гемизиготных растений (рис. 3, а, номера 6/3, 6/10, 6/21) и их уровень экспрессии ниже, чем уровень экспрессии гена актина, и полностью отсутствует у всех проанализированных гомозиготных потомков (данные не представлены). Следовательно, инактивация экспрессии трансгенов в линии Nu6 у гомозиготных потомков может происходить по всей инсерции Т-ДНК, т.е. захватывать все копии гена nptII и гена секреторной эндонуклеазы S. marcescens. Как правило, в растения переносят генетические конструкции, несущие в своем составе несколько генов (маркерный/селективный ген, целевой ген). В работах ряда исследователей показано, что нарушение экспрессии одного из генов может коррелировать с инактивацией рядом расположенных генов [21, 22] либо не влиять на стабильность их экспрессии [23, 24].



Рис. 3. Электрофореграмма ПЦР-продуктов после обратной транскрипции суммарной РНК трансгенных растений линий Nu5 и Nu6 с праймерами на ген секреторной эндонуклеазы *S. marcescens* и актин. a – гемизиготные растения, δ – гомозиготные растения. М – маркер молекулярного веса ДНК.

Снижение уровня экспрессии генов, входящих в состав многокопийной инсерции, при переходе из гемизиготного в гомозиготное состояние отмечается во многих работах. Данное явление называют эффектом дозы генов, при этом подавление экспрессии гена происходит при нахождении гомологичных последовательностей как в аллельной (у гомозиготных потомков), так и неаллельной позиции (при скрещивании трансформантов) [25, 26]. Одним из наиболее изученных триггеров при запуске замолкания генов на транскрипционном или посттранскрипционном уровнях является считывание антисмысловых и аберрантных PHK [12, 13].

Антисмысловые и аберрантные РНК, считываемые в области усеченной инвертированной копии гена прt II

Встройка Т-ДНК в трансгенных линиях Nu5 и Nu6 имеет сложную тандемную структуру, поэтому велика вероятность для считывания аберрантных транскриптов с MAS промотора усеченной



Рис. 4. Электрофореграмма ПЦР-продуктов после обратной транскрипции суммарной РНК гомозиготных трансгенных растений линий Nu5 и Nu6 с праймерами на антисмысловую аберрантную РНК и актин. М – маркер молекулярного веса ДНК.

инвертированной копии гена, где произошла делеция большей части гена nptII (95 пн вместо 794 пн в полной копии), и с потенциальных промоторных областей в области спейсерной последовательности, прилежащей к делетированному гену. Поскольку в данной копии Т-ДНК отсутствует терминатор транскрипции, возможна транскрипция смысловых и антисмысловых РНК, включающих в свой состав неполную кодирующую последовательность гена nptII, а также последовательности некодирующей прилежащей ДНК. На рис. 4 представлены данные ОТ-ПЦР после реакции обратной транскрипции суммарной РНК гомозиготных трансгенных растений линий Nu5 и Nu6 с праймерами, захватывающими кодирующую последовательность усеченной копии гена *npt*II и рядом pacположенную спейсерную последовательность, уникальную для всей трансгенной инсерции, что позволяет регистрировать РНК, считываемую только с усеченной копии (рис. 1, табл. 1, праймер 1RT использован для проведения обратной транскрипции, праймеры 1-1 и 1-2 – для ОТ-ПЦР). Наличие ПЦР-продукта размером 366 пн указывает на синтез антисмысловой аберрантной РНК, которая регистрируется у растений Nu5 только у потомков с высоким уровнем экспрессии трансгена (5-10, 5-16, 5-21, рис. 2), у растений с более низким уровнем экспрессии антисмысловая аберрантная РНК не регистрируется данным методом. У гомозиготных растений линии Nu6 полностью отсутствует ПЦР-продукт антисмысловой аберрантной РНК.

На рис. 5,*а* показана электрофореграмма ПЦР-продуктов после обратной транскрипции

ГЕНЕТИКА том 57 № 3 2021

суммарной РНК гемизиготных трансгенных растений линий Nu5 и Nu6 с праймерами на смысловую аберрантную РНК, считываемую в области уникальной спейсерной последовательности, усеченной копии гена *npt*II и спейсерной последовательности между геном *npt*II и промотором *MAS* (рис. 1, праймеры 2RT для проведения обратной транскрипции, 2-1 и 2-2 для ОТ-ПЦР). Целевой продукт амплификации 311 пн выявляется у всех проанализированных растений линии Nu5, для линии Nu6 транскрипт выявляется только для отдельных потомков (6-19, 6-21, 6-67) в виде слабого сигнала, по сравнению с контролем (геном актина).

В случае гомозиготных трансгенных растений линий Nu5 и Nu6 смысловая аберрантная PHK не была обнаружена при проведении стандартной процедуры полуколичественной ПЦР (данные не представлены), но при увеличении времени реакции обратной транскрипции в 2 раза или реамплификации ОТ-ПЦР для линии Nu5 было выявлено наличие транскрипции (рис. 5,б). Следовательно, у гомозиготных трансгенных растений линий Nu5 аберрантная РНК синтезируется в небольших количествах. Для гомозиготной линии Nu6 даже после реамплификации транскрипт не был обнаружен, что свидетельствует об его отсутствии (данные не представлены). Таким образом, прослеживается корреляция координированного снижения или инактивации экспрессии гена nptII во всех копиях Т-ДНК, как полноразмерных, так и усеченной у гомозиготных потомков линий Nu5 и Nu6.



Рис. 5. Электрофореграмма ПЦР-продуктов после обратной транскрипции суммарной РНК трансгенных растений линий Nu5 и Nu6 с праймерами на смысловую аберрантную РНК и актин. *а* – гемизиготные растения, *б* – гомозиготные растения, *м* – маркер молекулярного веса ДНК.

Поскольку в области инвертированной усеченной копии гена *npt*II происходит синтез смысловых и антисмысловых аберрантных РНК, они могут образовывать двуцепочечные, частично комплементарные РНК как между собой, так и с транскриптами, считываемыми с полных копий гена *npt*II в Т-ДНК 1 и Т-ДНК 2. Образовавшаяся двуцепочечная РНК с большой вероятностью может быть ответственна за активацию механизмов РНК-опосредованного сайленсинга генов на транскрипционном уровне.

Связь между синтезом аберрантной РНК и инактивацией трансгена *Lpt2-gus* показана для трансгенных растений риса. Исследователями были получены линии с мозаичной экспрессией гена *gus* в алейроновом слое семян риса. Мозаичный характер экспрессии репортерного гена насле-

довался в ряду поколений. Исследование одной из этих линий показало, что из двух копий Т-ДНК в этих растениях одна является усеченной и обратно ориентированной, что приводит к образованию антисмысловых аберрантных РНК [10].

В работах на трансгенных растениях Arabidopsis thaliana показано, что генетические конструкции без терминатора транскрипции или неполные копии генов также эффективно запускают процесс инактивации экспрессии гомологичных генов в хозяйском геноме [12, 27]. Высокую частоту инактивации обеспечивают генетические конструкции, которые включают ген/фрагмент гена между противоположно направленными промоторами. При этом образуются короткие неполиаденилированные РНК разного размера [11]. У 65% трансформированных клеточных линий табака ВУ-2 исследователи обнаружили, что внутренние, лишенные промоторов районы Т-ДНК часто транскрибируются. Такая спонтанная транскрипция запускает инактивацию генов при наличии инвертированных повторов в составе инсерции. Авторы объясняют данный феномен встраиванием Т-ДНК в транскрипционно активные районы растительного генома и особенностями структуры хроматина [13].

Геномное окружение, в котором оказались перенесенные гетерологичные гены, безусловно оказывает влияние на стабильность их экспрессии. Так, моделирование ситуации, когда трансгены попадают в район высокоповторяющихся последовательностей путем внесения в состав генетической конструкции повторенных последовательностей из генома *Petunia hybrida*, привело к инактивации и мозаичной экспрессии маркерного гена [28]. В ряде работ показано, что аберрантные транскрипты могут иметь место инициации синтеза с промоторов в последовательностях, прилежащих к T-ДНК, и направлять сайленсинг трансгенов [13, 29].

Известно, что вместе с Т-ДНК при агробактериальной трансформации в геном растения возможно встраивание участков плазмидной ДНК, прилежащих к области Т-ДНК. Наличие таких участков, имеющих большое количество повторов, может служить дополнительным фактором для проявления РНК-интерференции. Вероятность интеграции фрагментов векторных ДНК при агробактериальной трансформации в значительной степени зависит от типа плазмиды и условий трансформации, для *Nicotiana tabacum* эта вероятность составляет порядка 1.3%, но в отдельных случаях доходит и до 70% [30]. Для линии Nu21 мы проверили эту гипотезу и показали отсутствие последовательностей из плазмиды pC27-nuclS, прилежащих к правой/левой границам Т-ДНК (данные не представлены).

Интересно отметить, что даже встраивание одной копии гена *uidA* в один и тот же район хозяйского генома системой *Cre*/lox рекомбинации, привело к существенным различиям в уровне экспрессии между трансформантами и появлению растений с наследуемым мозаичным характером экспрессии трансгена [31]. Мозаицизм возникает и в межвидовых гибридах или при хромосомных перестройках, приводящих к нестабильному состоянию генов. У кукурузы встройки в энхансере и наличие уникальных копий в повторах аллеля *P1-mm* по сравнению с аллелем *P1-wr* ассоциировались с мозаично окрашенным перикарпом. Все это может служить предпосылками для образования аберрантных РНК и активации механизмов сайленсинга [32]. Мозаичная окраска венчика у Petunia hybrida связана с наличием в геноме двух тандемно расположенных копий гена *CHS-A* [33]. Следовательно, как геномное окружение, так и внутренние особенности в структуре чужеродной инсерции могут оказывать существенное влияние на стабильность проявления чужеродных генов.

Таким образом, у трансгенных растений табака линий Nu5 и Nu6, контрастно различающихся по мозаичному характеру экспрессии селективного гена nptII, наиболее вероятным триггером, запускаюшим инактивирование генов в составе сложноорганизованной инсерции, является образование смысловых и антисмысловых аберрантных неполных транскриптов РНК, считываемых с усеченной инвертированной копии гена *npt*II. Различия между линиями в эффективности запускания данного механизма скорее всего лежат за пределами сложноорганизованной инсерции и связаны с особенностями геномного окружения района интеграции исследуемой Т-ДНК инсерции, что подтверждается эффективностью отбора на снижение/повышение мозаичности среди потомков последующих поколений. Данные линии трансгенных растений табака представляют несомненный интерес для дальнейшего изучения причин и механизмов нестабильности экспрессии и наследования чужеродных генов, связанных с действием эпигенетических механизмов.

Работа поддержана бюджетным проектом 0259-2021-0010 "Изучение систем контроля метаболизма живых систем в условиях взаимодействия с окружающей средой, в том числе после генетической модификации".

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

- Hobbs S.L.A., Kpodar P., DeLong C.M.O. The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants // Plant Mol. Biol. 1990. V. 15. P. 851–864.
- Peach C., Velten J. Transgene expression variability (position effect) of CAT and GUS reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters // Plant Mol. Biol. 1991. V. 17. P. 49–60.
- Kim S.I., Veena, Gelvin S.B. Genome-wide analysis of Agrobacterium T-DNA integration sites in the Arabidopsis genome generated under non-selective conditions // Plant J. 2007. V. 51. № 5. P. 779–791. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03183.x
- 4. *Iglesias V.A., Moscone E.A., Papp I. et al.* Molecular and cytogenetic analyses of stably and unstably expressed transgene loci in tobacco // Plant Cell. 1997. V. 9. P. 1251–1264.
- 5. Domínguez A., Fagoaga C., Navarro L. et al. Regeneration of transgenic citrus plants under non selective con-

ditions results in high-frequency recovery of plants with silenced transgenes // Mol. Genet. Genomics. 2002. V. 267. № 4. P. 544–556. https://doi.org/10.1007/s00438-002-0688-z

- Neuhuber F., Park Y.D., Matzke A.J., Matzke M.A. Susceptibility of transgene loci to homology-dependent gene silencing // Mol. Gen. Genet. 1994. V. 244. P. 230–241.
- Логинова Д.Б., Шумный В.К., Дейнеко Е.В. Особенности организации Т-ДНК-встройки у трансгенных растений табака линии Nu21 // Вестник ВОГИС. 2010. Т. 14. С. 659–665.
- 8. *Маренкова Т.В., Дейнеко Е.В.* Инактивирование генов у растений на уровне транскрипции // Генетика. 2010. Т. 46. № 5. С. 581–592.
- Csorba T., Pantaleo V., Burgyán J. RNA silencing: an antiviral mechanism // Adv. Virus Res. 2009. V. 75. P. 35–71.
 - https://doi.org/10.1016/S0065-3527(09)07502-2
- 10. *Morino K., Olsen O., Shimamoto K.* Silencing of an aleurone-specific gene in transgenic rice is caused by a rearranged transgene // The Plant J. 1999. V. 17. № 3. P. 275–285.
- 11. Yan H., Chretien R., Ye J., Rommens C.M. New construct approaches for efficient gene silencing in plants // Plant Physiol. 2006. V. 141. № 4. P. 1508–1518. https://doi.org/10.1104/pp.106.082271
- 12. Nicholson S.J., Srivastava V. Transgene constructs lacking transcription termination signal induce efficient silencing of endogenous targets in Arabidopsis // Mol. Genet. Genomics. 2009. V. 282. № 3. P. 319–328. https://doi.org/10.1007/s00438-009-0467-1
- Čermák V., Fischer L. Pervasive read-through transcription of T-DNAs is frequent in tobacco BY-2 cells and can effectively induce silencing // BMC Plant Biol. 2018. V. 18. № 1. P. 252. https://doi.org/10.1186/s12870-018-1482-3
- Маренкова Т.В., Логинова Д.Б., Дейнеко Е.В. Мозаичный характер экспрессии трансгенов у растений // Генетика. 2012. Т. 48. № 3. С. 293–306.
- 15. Маренкова (Новоселя) Т.В., Дейнеко Е.В., Шумный В.К. Мозаичный характер проявления гена nptII у трансгенных растений табака Nu21 // Генетика. 2007. Т. 43. № 7. С. 943–954.
- Маренкова Т.В., Дейнеко Е.В. Гибридологический анализ наследования мозаичного характера экспрессии *прt*II-гена у трансгенных растений табака // Генетика. 2016. Т. 52. № 6. С. 641–649.
- 17. Логинова Д.Б., Меньшанов П.Н., Дейнеко Е.В. Анализ мозаичного проявления прtП-гена у контрастных по мозаицизму линий трансгенных растений табака // Генетика. 2012. Т. 48. № 11. С. 1280–1286.
- 18. Маренкова Т.В., Сидорчук Ю.В., Кузнецов В.В., Дейнеко Е.В. Влияние изменения плоидности генома на мозаичный характер экспрессии гена *npt*II в эпиаллелях трансгенной линии табака Nu21 // Генетика. 2020. Т. 56. № 2. С. 201–201. https://doi.org/10.31857/S0016675820020083
- 19. *Bubner B., Gase K., Baldwin I.T.* Two-fold differences are the detection limit for determining transgene copy numbers in plants by real-time PCR // BMC Biotech-

nol. 2004. V. 4:14.

https://doi.org/10.1186/1472-6750-4-14

- 20. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1998. 459 с.
- Nocarova E., Opatrny Z., Fischer L. Successive silencing of tandem reporter genes in potato (Solanum tuberosum) over 5 years of vegetative propagation // Ann. Bot. 2010. V. 106. № 4. P. 565–572. https://doi.org/10.1093/aob/mcq153
- 22. Vain P, James V.A., Worland B., Snape J.W. Transgene behavior across two generations in a large random population of transgenic rice plants produced by particle bombardment // Theor. Appl. Genet. 2002. V. 105. P. 878–889.
- Gong Z., Morales-Ruiz T., Ariza R.R. et al. ROS1, a repressor of transcriptional gene silencing in Arabidopsis, encodes a DNA glycosylase/lyase // Cell. 2002. V. 111. P. 803–814. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01133-9
- 24. Sallaud C., Meynard D., van Boxtel J. et al. Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics // Theor. Appl. Genet. 2003. V. 106. P. 1396–1408. https://doi.org/10.1007/s00122-002-1184-x
- 25. De Wilde C., Podevin N., Windels P., Depicker A. Silencing of antibody genes in plants with single-copy transgene inserts as a result of gene dosage effects // Mol. Genet. Genomics. 2001. V. 265. P. 647–653. https://doi.org/10.1007/s004380100458
- 26. *Qin H., Dong Y., von Arnim A.G.* Epigenetic interactions between Arabidopsis transgenes: characterization in light of transgene integration sites // Plant Mol. Biol. 2003.V. 52. № 1. P. 217–231. https://doi.org/10.1023/a:1023941123149
- 27. Luo Z., Chen Z. Improperly terminated, unpolyadenylated mRNA of sense transgenes is targeted by RDR6-mediated RNA silencing in Arabidopsis // Plant Cell. 2007. V. 19. № 3. P. 943–958. https://doi.org/10.1105/tpc.106.045724
- Lohuis M. ten, Muller A., Heidmann I. et al. A repetitive DNA fragment carrying a hot spot for de novo DNA methylation enhances expression variegation in tobacco and petunia // The Plant J. 1995. V. 8. P. 919–932.
- Eike M.C., Mercy I.S., Aalen R.B. Transgene silencing may be mediated by aberrant sense promoter sequence transcripts generated from cryptic promoters // Cell. Mol. Life Sci. 2005. V. 62. P. 3080–3091. https://doi.org/10.1007/s00018-005-5301-2
- 30. Пермякова Н.В., Шумный В.К., Дейнеко Е.В. Агробактериальная трансформация растений: перенос фрагментов векторной ДНК в растительный геном // Генетика. 2009. Т. 45. № 3. С. 305–317.
- Day C.D. Transgene integration into the same chromosome location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced // Genes and Development. 2000. V.14. № 22. P. 2869–2880.

https://doi.org/10.1101/gad.849600

32. *Robbins M.L., Wang P.H., Sekhon R.J., Chopra S.* Gene structure induced epigenetic modifications of pericarp color1 alleles of maize result in tissue-specific mosa-

icism // PLoS One. 2009. V. 4. e8231. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008231

33. Morita Y., Saito R., Ban Y. et al. Tandemly arranged chalcone synthase A genes contribute to the spatially

regulated expression of siRNA and the natural bicolor floral phenotype in *Petunia hybrida* // The Plant J. 2012. V. 70. № 5. P. 739–749. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.04908.x

Features of Expression of Foreign Genes in Complex Insertions in Transgenic Tobacco Plants with a Mosaic Pattern of the *npt*II gene

T. V. Marenkova^{*a*, *}, V. V. Kusnetsov^{*a*}, and E. V. Deineko^{*a*}

^a Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia *e-mail: marenkova@bionet.nsc.ru

Features of the mosaic pattern of the expression of the *npt*II marker gene, which provides plant resistance to the antibiotic kanamycin, and the target gene of the secretory endonuclease *Serratia marcescens* under the bidirectional MAS promoter of the gene of mannopinsyntase of the Ti plasmid *Agrobacterium tumefaciens* in the epiallelic lines of transgenic tobacco plants Nu6 and Nu5, were studied. Both genes are part of a complexly organized insertion, represented by two full-size copies of T-DNA and one truncated, located between them in reverse orientation. Transgenic lines of tobacco contrast in the phenotypic manifestation of the marker gene *npt*II (low frequency of mosaics in the Nu5 line and high in Nu6). It has been established that, when the transgenic plants transition from the hemi to the homozygous state, the expression level of the marker gene decreases and it is most pronounced for the Nu6 epiallele. It was shown that transgenic lines synthesize aberrant sense and antisense transcripts in the region of a truncated copy of T-DNA. Exactly these transcripts can act as triggers and trigger the inactivation of marker gene expression, which is coordinated spreads to the target gene as part of a tandem organized insertion.

Keywords: transgenic plants of *Nicotiana tabacum* L., *npt*II gene, gene silencing, aberrant RNA, mosaic character of gene expression.

2021

Nº 3

том 57

ГЕНЕТИКА

ГЕНЕТИКА РАСТЕНИЙ

УДК 575.174.015.3:633.111

ГЕНЫ ЯРОВИЗАЦИИ (*VRN*) И ФОТОПЕРИОДА (*PPD*) У СТАРОМЕСТНЫХ ЯРОВЫХ СОРТОВ ГЕКСАПЛОИДНОЙ ПШЕНИЦЫ

© 2021 г. А. Ю. Драгович^{1, *}, А. В. Фисенко², А. А. Янковская¹

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия ²Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук, Москва, 127276 Россия *e-mail: dragova@mail.ru

> Поступила в редакцию 24.06.2020 г. После доработки 23.07.2020 г. Принята к публикации 25.08.2020 г.

У злаковых растений система генов VRN (vernalization response) и PPD (photoperiod response) опрелеляет их переход от вегетативной к генеративной стадии развития. Использование диагностических ДНК-маркеров позволило проанализировать распределение аллельных комбинаций генов VRN-A1, VRN-B1, VRN-D1 и PPD-D1 в староместных сортах семи гексаплоидных видов пшеницы в различных районах Евразии. Выявлена вариабельность механизмов детерминации ярового образа жизни: у 55.3% образцов яровость контролировалась моногенно (одним из генов VRN), у 30.3% образцов – комбинацией двух доминантных генов VRN, у 2.6% образцов – тригенно. Показано почти полное отсутствие доминантного аллеля *Ppd-D1a* у староместных сортов (только 2.6%), позволяющее предположить вторичность этого аллеля по отношению к рецессивному аллелю ppd-D1b и увеличение его частоты в недавний период "зеленой революции". Для видов T. aestivum, T. compactum, T. petropavlovskyi, T. tibetanum показано увеличение частоты встречаемости аллеля Vrn-Dla по направлению на восток ареала и его максимальная концентрация в районах Афганистана, Индии и Китая. У видов с компактным колосом (T. antiquorum, T. sphaerococcum, азиатские формы T. compactum) яровой тип развития определяется единственным аллелем Vrn-Bla, что предполагает возможность их первоначального распространения в составе единого генетического пула. Европейский и азиатский подвиды T. spelta, несмотря на чрезвычайно разорванный ареал, характеризуются одинаковыми аллелями Vrn-Alb и Vrn-Blc, что генетически объединяет оба подвида. Фактически единый набор аллелей генов VRN у староместных и современных сортов обеспечивает достаточную адаптивность пшеницы к разнообразным условиям внешней среды на протяжении длительного времени ее культивирования. Выявленные неизвестные ранее ДНК-фрагменты по локусам VRN-D1 и *PPD-D1*, вероятно, маркирующие новые аллели, представляют интерес для дальнейшего изучения и возможности их использования в селекционных программах.

Ключевые слова: гексаплоидная пшеница, яровизация, фотопериод, староместные сорта, яровой тип развития, геногеография.

DOI: 10.31857/S0016675821030061

Пшеница — одна из наиболее широко распространенных в мире сельскохозяйственных культур. Ее производственные посевы занимают различные природно-климатические зоны от 40° ю.ш. до 60° с.ш. Разнообразие экологических условий, в которых выращивается пшеница, предполагает наличие широкого спектра генетического разнообразия, в том числе генетических механизмов, определяющих скорость роста и развития. Переход к цветению у злаков определяется сложным взаимодействием генетических факторов, важнейшими из которых являются гены яровизации (*VRN* — vernalization response) и фотопериода (*PPD* — photoperiod response) [1, 2]. Система генов яровизации детерминирует отзывчивость растений на низкие температуры, воздействие которых необходимо для индукции процесса цветения. Показано, что белки, контролируемые генами VRN-1, играют центральную роль в контроле активности и детерминированности цветочных меристем и специализации колосковых меристем [3, 4]. Потребность в яровизации и ее продолжительность — важнейшая характеристика, влияющая на адаптивность растений к определенным природно-климатическим условиям и определяющая деление пшеницы на яровую и озимую [5].

Необходимость в яровизации контролируется аллелями трех гомеологичных локусов VRN-1 –

VRN-A1, VRN-B1 и *VRN-D1*, которые локализованы на хромосомах 5A, 5B, 5D соответственно [6, 7]. Известно еще два независимо наследуемых локуса: *VRN-D4*, имеющий ограниченное локальное распространение и представляющий собой копию гена *VRN-A1*, перемещенную на хромосому 5D [8], и локус *VRN-3*, расположенный на коротком плече хромосомы 7B [9], характеризующийся низкой генетической изменчивостью.

Для озимой пшеницы, которую высевают осенью, необходимо длительное воздействие низких температур для перехода к цветению. Такой тип развития контролируется рецессивными аллелями по всем трем локусам VRN-1 - vrn-A1, vrn-B1 и vrn-D1. Наличие хотя бы олного ломинантного аллеля гена VRN-1 приводит к яровому типу развития. Доминантными являются аллели, которые связаны с мутациями в основных регуляторных областях генов VRN-1 – промоторе и первом интроне. Изменчивость этих регионов VRN-1 ассоциируется с уменьшением или полным отсутствием необходимости в яровизации и относительно быстрой положительной регуляцией уровня транскрипции VRN-1 как в апексе, так и в листьях растений, не прошедших яровизацию [7, 10]. Доминантный VRN-A1 обеспечивает полную нечувствительность к яровизирующим температурам, кроме того, он является эпистатичным по отношению к локусам VRN-B1 и VRN-D1. Доминантные аллели локусов VRN-B1 и VRN-D1 также детерминируют яровой тип развития, однако в комбинации с рецессивными аллелями по локусу VRN-A1 требуют некоторого периода воздействия пониженных температур для быстрого перехода к цветению [11–13].

Широко распространенные виды гексаплоидной пшеницы, а именно мягкая *Triticum aestivum* L., компактная *T. compactum* Host. и спельта *T. spelta* L., представлены как яровыми, так и озимыми формами. Локальные виды *T. sphaerococcum* Perciv. и *T. petropavlovskyi* Udacz. et Migusch. состоят только из яровых, а *T. macha* Dekapr. et Men. и *T. vavilovii* (Thaum.) Jakubz. – только из озимых сортов [14].

По реакции на продолжительность и интенсивность освещения в течение суток пшеница подразделяется на фотопериодически чувствительную, когда растениям для перехода к цветению требуется длинный световой день – признак контролируется рецессивными аллелями *PPD*-генов, и фотопериодически нейтральную (нечувствительную) — переход к цветению происходит независимо от длины дня. для чего хотя бы один из PPD-генов должен находиться в доминантном состоянии. Реакция на продолжительность периода освещенности контролируется тремя гомеологичными генами: РРД-А1, РРД-В1 и РРД-Д1, локализованными на хромосомах 2-й группы [2, 15]. Эти гены также оказывают существенное влияние на сроки колошения. Основным геном,

ГЕНЕТИКА том 57 № 3 2021

определяющим фотопериодическую реакцию, является *PPD-D1*. Аллельные эффекты двух других генов, *PPD-B1* и *PPD-A1*, слабее и имеют незначительное распространение [2, 16, 17].

Сочетание в генотипе различных комбинаций генов VRN и PPD позволяет растениям пшеницы хорошо адаптироваться к разнообразным природно-климатическим условиям. Исследования, проведенные преимущественно с использованием коммерческих сортов, показывают, что в результате селекционного процесса в каждом регионе складывается свой, специфичный для комплекса определенных агроэкологических условий набор генов VRN и PPD [18-22]. Однако исследование только коммерческих сортов не позволяет в полной мере оценить селекционную ценность тех или иных аллелей генов яровизации и фотопериода. Вопервых, из-за того, что коммерческими сортами представлен только один вид гексаплоидной пшеницы – пшеница мягкая (*T. aestivum*), другие виды в производстве практически отсутствуют; во-вторых, современные сорта мягкой пшеницы в значительной степени характеризуются существенным уменьшением генетического разнообразия [23, 24].

В то же время староместные сорта, которые были продолжительное время подвержены действию естественного отбора, лучше приспособлены к локальным условиям произрастания и обладают оптимальной для данной местности длиной вегетационного периода. Их вытеснение из производственных посевов обедняет местный генофонд и меняет генетическую структуру популяции, в том числе по наличию и частоте встречаемости генов VRN [25]. Изучение аборигенных (староместных) сортов, таким образом, необходимо для решения вопроса об экотипе сорта пшеницы, наиболее адаптированном к определенным природно-климатическим условиям местности и с оптимальной для этих условий комбинацией генов яровости и фотопериода.

Цель работы — определение аллельного разнообразия генов VRN и PPD у староместных (аборигенных) сортов семи видов гексаплоидной пшеницы из разных географических регионов и определение экотипов, наиболее адаптированных к местным условиям регионов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе изучено 76 образцов яровой пшеницы, относящихся к семи видам: *T. aestivum* L., *T. compactum* Host, *T. spelta* L., *T. tibetanum* Shao, *T. sphaerococcum* Perciv., *T. petropavlovskyi* Udacz. et Migusch. и *T. antiquorum* Heer ex Udacz. Изучаемые образцы охватывают основные центры разнообразия культурных растений на территории Евразии, значительная часть происходит с территории

Идентифицируемый аллель	Аллель-специфичные	Ожидаемый размер	Литературный
	праймеры	ДНК-фрагмента	источник
Vrn-A1a Vrn-A1b vrn-A1	VRNA1F//VRN-INT1R	965 + 876 714 734	[7]
Vrn-B1a	INTR1//INTR1/B/R3	1124	[13]
Vrn-B1c	INTR1//INTR1/B/R3	737	[10]
vrn-B1	INTR1/B/F//INTR1/B/R4	1149	[10]
Vrn-D1a	INTR1/D/F//INTR1/D/R3	1671	[10]
vrn-D1	INTR1/D/F//INTR1/D/R4	997	[10]
Ppd-D1a	Ppd1_F//Ppd1_R1/R2	288	[29]
ppd-D1b	Ppd1_F//Ppd1_R1/R2	414	[29]

Таблица 1. Идентифицируемые аллели, последовательности праймеров и ожидаемый размер ПЦР-продукта

"Плодородного полумесяца" – древнейшего очага земледелия и предполагаемой "прародины" гексаплоидных пшениц. Семена исследуемых сортов преимущественно предоставлены Отделом генетических ресурсов пшениц Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР). Отдельные образцы были также любезно предоставлены Е.Д. Бадаевой (ИОГен им. Н.И. Вавилова): TRI-21459, TRI-24113, TRI-24144, TRI-26019 (сборы Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Германия); Н.П. Гончаровым (Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск): k-56398 T. antiquorum; Л.А. Житеневым (НОУ "Колос", Телеханы, Беларусь): № 72, № 701 (сборы Института генетики и селекции АН Азербайджана), *Т. tibetanum*. Образцы предварительно изучались на предмет соответствия описанному морфотипу при весеннем посеве (посевы проводились в 2015-2018 гг. на полях Отдела отдаленной гибридизации Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина в Истринском районе Московской области).

Идентификация аллельного состава генов VRN и PPD проводилась в Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН. В качестве стандартов для идентификации генов VRN и PPD использовались сорта мягкой пшеницы с известными аллелями — Афина: vrn-A1 vrn-B1 Ppd-D1a [26]; Полюшко: Vrn-A1a Vrn-B1c ppd-D1b; Алтайская 70: Vrn-A1a vrn-B1 ppd-D1b; Омская 36: Vrn-A1a Vrn-B1a ppd-D1b [19]; Gabo: Vrn-A1b Vrn-B1a ppd-D1b [27].

Геномную ДНК выделяли из 3-дневных этиолированных проростков модифицированным СТАВ методом [28]. Для установления аллельного состава использовали аллель-специфичные праймеры к локусам: *VRN-A1* – AF//Int1R; *VRN-B1* – Intr1// BR3/BR4; *Vrn-D1a* – Intr1D/F//R3/R4; *PPD-D1* – F//R1/R2 (табл. 1). Амплификацию проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл. Реакционная смесь содержала 2 мкл ПЦР-буфера, 1.5 мМ MgCl₂, 2 мМ смеси dNTP, 1 нг каждого праймера, 1 ед. *Таq*-полимеразы и 100 нг геномной ДНК. Состав реакционной смеси и условия проведения ПЦР стандартные [26]. ПЦР осуществляли на термоциклере BioRad T-100 Termal Cycler (BioRad, США). ПЦР-продукт анализировали в 2%-ном агарозном геле с добавлением бромистого этидия в 1× ТВЕ буфере. Фиксацию результатов осуществляли фотокамерой в ультрафиолетовом свете.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование образцов староместных пшениц при полевом посеве показало, что некоторые из них являются сортами-популяциями, состоящими из двух ботанических разновидностей, например сорта к-12390 и к-12596 (из Афганистана); k-14335 (из Ирана); k-52546, k-55569 (из Таджикистана). Семена с колосьев, относящихся к разным разновидностям, изучались раздельно как отдельные образцы. Кроме того, в составе ряда сортов присутствовали как яровые, так и озимые растения, совсем не выколосившиеся при весеннем посеве. Это может быть связано с широким распространением еще в XIX в. сортов-двуручек [30], а также с отмечавшейся для некоторых стран Ближнего Востока практикой посева биологически яровых сортов с осени, в результате чего мог происходить как отбор генотипов с озимым типом развития, так и засорение семенами других сортов пшеницы.

Результаты по исследованию аллельного состава генов VRN-1 и PPD-D1 показаны в табл. 2.

Triticum aestivum L. Мягкая пшеница

При анализе распространения изучаемых генов у вида *T. aestivum* была обнаружена приуроченность определенных аллелей к тем или иным регионам.

Афганистан. Среди семи изученных образцов мягкой пшеницы не обнаружено доминантных

ГЕНЫ ЯРОВИЗАЦИИ (VRN) И ФОТОПЕРИОДА (PPD)

Таблица 2. Аллельный состав Vrn-1 и Ppd-D1 генов у исследованных образцов

N⁰	Вил	Образен	Страна Аллели исследуеми		едуемых ген	к генов	
п/п	Бид	Образец	происхождения	Vrn-A1	Vrn-B1	Vrn-D1	Ppd-D1
1	T. aestivum	k-12390 (hostianum)	Афганистан	vrn-A1	vrn-B1	a	b
2	T. aestivum	k-12390 (iranicum)	Афганистан	vrn-A1	vrn-B1	а	b
3	T. aestivum	k-12596 (erythrosp.)	Афганистан	vrn-A1	С	а	b
4	T. aestivum	k-12596 (ferrug.)	Афганистан	vrn-A1	vrn-B1	vrn-D1	b
5	T. aestivum	k-12597	Афганистан	vrn-A1	vrn-B1	а	b
6	T. aestivum	k-12599	Афганистан	vrn-A1	vrn-B1	vrn-D1	b
7	T. aestivum	k-12646	Афганистан	vrn-A1	vrn-B1	а	b
8	T. aestivum	№ 701	Азербайджан	vrn-A1	vrn-B1	vrn-D1	b
9	T. aestivum	k-17417	Иордания	a	vrn-B1	vrn-D1	a + b
10	T. aestivum	k-10678	Иран	a	а	а	b
11	T. aestivum	k-13493	Иран	b	а	vrn-D1	b
12	T. aestivum	k-14333	Иран	vrn-A1	а	а	b
13	T. aestivum	k-22497	Иран	vrn-A1	vrn-B1	а	Новый фрагмент
14	T. aestivum	k-23111	Иран	a	a	vrn-D1	франтени h
15	T. aestivum	k-14335 (graec.)	Иран	a	a	vrn-D1	b
16	T. aestivum	k-14335 (ferrug.)	Иран	vrn-A1	vrn-B1	a	b
17	T. aestivum	k-14317	Иран	a	vrn-B1	vrn-D1	b
18	T. aestivum	k-20646	Испания	vrn-A1	a	vrn-D1	b
19	T. aestivum	TRI-21459	Йемен	a + vrn - A1	vrn-B1	a + vrn - D1	b
20	T. aestivum	TRI-24113	Йемен	а	а	vrn-D1	b
21	T. aestivum	TRI-24144	Йемен	b	a	vrn-D1	b
22	T. aestivum	TRI-26019	Йемен	vrn-A1	vrn-B1	a	b
23	T. aestivum	k-39273	Киргизия	a	vrn-B1	a	b
24	T. aestivum	k-28677	Китай	vrn-A1	vrn-B1	а	b
25	T. aestivum	k-28752	Китай	vrn-A1	vrn-B1	a	b
26	T. aestivum	k-28775	Китай	vrn-A1	vrn-B1	a	b
27	T. aestivum	k-44129	Китай	vrn-A1	vrn-B1	а	b
28	T. aestivum	k-7985	Монголия	vrn-A1	a	а	b
29	T. aestivum	k-33380	Непал	a + vrn - A1	vrn-B1	а	b
30	T. aestivum	k-30614	Пакистан	vrn-A1	vrn-B1	а	b
31	T. aestivum	k-30620	Пакистан	vrn-A1	vrn-B1	vrn-D1	b
32	T. aestivum	k-15810	Палестина	b	a	vrn-D1	b
33	T. aestivum	k-17298	Палестина	vrn-A1	а	а	Новый фрагмент
34	T. aestivum	k-17299	Палестина	h	a	vrn-D1	н h
35	T. aestivum	k-17379	Палестина	b	vrn-B1	vrn-D1	b
36	T. aestivum	k-17382	Палестина	b	a	vrn-D1	b
37	T. aestivum	k-17383	Палестина	vrn-A1	a	vrn-D1	b
38	T. aestivum	k-17365	Палестина	b	a	vrn-D1	b
39	T. aestivum	k-35798	Таджикистан	vrn-A1	vrn-B1	a	b
40	T. aestivum	k-52519	Таджикистан	vrn-A1	a	vrn-D1	b
41	T. aestivum	k-52546 (ferrug.)	Таджикистан	a	a	vrn-D1	b
42	T. aestivum	k-52546 (subafghan.)	Таджикистан	a	a	vrn-D1	b

Таблица 2. Окончание

Nº	Dera	Ofmanay	Страна	Аллели исследуемых гено		ОВ	
п/п	БИД	Ооразец	происхождения	Vrn-A1	Vrn-B1	Vrn-D1	Ppd-D1
43	T. aestivum	k-55569 (murgabic.)	Таджикистан	a + vrn-	vrn-B1	a + vrn - D1	b
	-		_	A1			
44	T. aestivum	k-55569 (pamiricum)	Таджикистан	vrn-Al	vrn-B1	а	b
45	T. aestivum	k-55581	Таджикистан	vrn-A1	vrn-B1	а	b
46	T. aestivum	k-29635	Таджикистан	vrn-A1	а	vrn-D1	b
47	T. aestivum	k-35445	Узбекистан	а	а	a	а
48	T. aestivum	k-10442	РФ, Якутия	а	а	vrn-D1	b
49	T. compactum	k-30055	Армения	vrn-A1	а	vrn-D1	b
50	T. compactum	k-30058	Армения	vrn-A1	а	vrn-D1	b
51	T. compactum	k-12790	Афганистан	b	vrn-B1	vrn-D1	b
52	T. compactum	k-13524	Израиль	vrn-A1	a	vrn-D1	b
53	T. compactum	k-17385	Израиль	vrn-A1	а	vrn-D1	?
54	T. compactum	k-43683	Китай	vrn-A1	a	а	b
55	T. compactum	k-44063	Китай	vrn-A1	a	a	b
56	T. compactum	k-56557	Таджикистан	vrn-A1	a	vrn-D1	b
57	T. compactum	k-14426	Турция	vrn-A1	a	vrn-D1	b
58	T. compactum	k-20901	Турция	vrn-A1	а	vrn-D1	b
59	T. compactum	k-30048	Турция	vrn-A1	а	vrn-D1	b
60	T. compactum	k-6027	Франция	а	vrn-B1	vrn-D1	b
61	T. petropav-	k-51764	Китай	vrn-A1	vrn-B1	а	?
	lovskyi						
62	T. spelta	k-45364	Азербайджан	a	vrn-B1	vrn-D1	b
63	T. spelta	k-45366	Азербайджан	vrn-A1	а	vrn-D1	?
64	T. spelta	k-45368	Азербайджан	b	a	vrn-D1	b
65	T. spelta	№ 72	Азербайджан	a	vrn-B1	vrn-D1	b
66	T. spelta	k-1727	Германия	vrn-A1	с	vrn-D1	b
67	T. spelta	k-39760	Германия	b	с	vrn-D1	b
68	T. spelta	k-45750	Иран	а	vrn-B1	vrn-D1	b
69	T. spelta	k-45818	Иран	а	vrn-B1	a	b
70	T. spelta	k-20538	Испания	vrn-A1	vrn-B1	Новый	b
	-					фрагмент	
71	T. spelta	k-20539	Испания	vrn-A1	vrn-B1	Новый	b
						фрагмент	
72	T. spelta	k-53660	Таджикистан	b	vrn-B1	a	b
73	T. tibetanum	_	Китай	vrn-A1	vrn-B1	a	b
74	T. antiquorum	k-56398	Таджикистан	vrn-A1	а	vrn-D1	b
75	T. sphaerococcum	k-23890	Пакистан	vrn-A1	vrn-B1	vrn-D1	b
76	T. sphaerococcum	k-13177	Индия	vrn-A1	vrn-B1	vrn-D1	b

Примечание. vrn-A1, vrn-B1, vrn-D1 — рецессивные аллели, детерминирующие озимый тип развития; *a*, *b* (кроме последней графы), *c* — различные доминантные аллели, детерминирующие яровой тип развития по соответствующим генам Vrn; Ppd-D1b — рецессивный аллель локуса Ppd-D1, определяющий чувствительность к фотопериоду; Ppd-D1a — доминантный аллель локуса Ppd-D1, определяющий фотонейтральность.



Рис. 1. Аллели *Ppd-D1a* (288 пн), *ppd-D1b* (414 пн) и новый аллель по локусу *PPD-D1* (указан стрелкой) у староместных сортов *T. aestivum*: 93 – k-17383, Палестина; 94 – k-17298, Палестина; 95 – k-23111, Иран; 96 – Лютесценс 62, Россия; 97 – k-20646, Испания; 98 – k-22497, Иран; 99 – k-14317, Иран; 100 – k-17417, Иордания.

генов VRN-A1. Только у морфологически гетерогенного сорта k-12596, среди разновидности erythrospermum, присутствует доминантный аллель Vrn-Blc. Яровой образ жизни v афганских образцов детерминирует, как правило, доминантный аллель *Vrn-D1a* – он присутствует у пяти изученных образцов из семи, что составляет 71.4%. Интересно, что у двух образцов (k-12599 и k-12596, разновидность *ferrugineum*) вообще не обнаружено доминантных аллелей по изученным генам яровости, хотя при весеннем посеве они нормально выколашиваются. Наличие ярового типа развития при отсутствии доминантных аллелей *Vrn-1* позволяет предположить у них наличие других генетических систем, определяющих переход к яровизации. Все изученные образцы имели рецессивные аллели по гену реакции на фотопериод – *Ppd-D1b*. Преобладание *Vrn-D1a* среди мягких пшениц региона в целом соответствует литературным данным о широком распространении этого гена в сортах Юго-Восточной и Средней Азии [31].

Иран. Восемь образцов мягкой пшеницы из Ирана характеризуются значительным разнообразием. По локусу *VRN-A1* у четырех сортов обна-

ружен аллель Vrn-A1a (50%), у одного сорта – Vrn-A1b (12.5%), у трех — рецессивная форма vrn-A1 (37.5%). Доминантный аллель Vrn-Bla обнаружен у пяти исследованных сортов (62.5%). Доминантный ген Vrn-D1a присутствует у четырех образцов (50%). Характерной особенностью иранских сортов по сравнению с афганскими является детерминация ярового образа жизни преимущественно доминантным геном Vrn-A1 или комбинацией *Vrn-A1 Vrn-B1* (у четырех образцов, 50%), реже геном Vrn-D1 или комбинацией Vrn-B1 Vrn-D1 (три образца, 37.5%), у одного образца (к-10678) присутствуют все три гена яровости в доминантной форме. Почти все образцы имеют рецессивные аллели по гену реакции на фотопериод – *Ppd-D1b*, кроме к-22497, у которого выявлен ДНК-фрагмент, контролируемый не идентифицированным ранее аллелем. ДНК-фрагмент у этого образца имеет размер около 330 пн, т.е. занимает промежуточное положение между ДНК-фрагментами 218 и 414 пн, соответствующими аллелям Ppd-D1a и Ppd-D1b (рис. 1). Можно предположить, что образец k-22497 несет новый аллель, механизм воздействия которого на фотопериод пока остается под вопросом.

Палестина, Иордания. Среди семи образцов мягкой пшеницы выявлено пять образцов с доминантным геном Vrn-A1b (71.4%), шесть — с геном Vrn-B1a (85.7%) и один образец k-17298 с геном Vrn-D1a (табл. 2). Почти у всех образцов яровой образ жизни детерминируется комбинацией двух доминантных генов Vrn-Alb Vrn-Bla и в одном случае — комбинацией Vrn-B1a Vrn-D1a (k-17298). Такой результат не вполне соответствует ранее опубликованным данным, что у большинства стародавних сортов яровой тип развития контролируется только одним доминантным геном VRN-1[25], однако может указывать на специфику природно-климатических и хозяйственных условий региона, в которых дигенное наследование яровости определяет высокую адаптивность местных генотипов. По генам реакции на фотопериод большинство генотипов имеют стандартный рецессивный аллель *Ppd-D1b*. Из этого ряда вновь выделяется образец из Иордании (k-17417) — он имеет гетерогенную природу Ppd-D1a + b. Кроме того, палестинский образец мягкой пшеницы k-17298 имеет "нетипичный" ДНК-фрагмент по локусу РРД-Д1 с длиной около 330 пн, аналогичный образцу к-22497 из Ирана (рис. 1), что подтверждает вывод о возможности существования нового аллельного варианта по гену *РРД-D1*.

Азербайджан. Яровой образец мягкой пшеницы № 701 из Азербайджана характеризуется отсутствием доминантных аллелей по изучаемым генам. Как и в случае с образцами k-12599 и k-12596 из Афганистана, несущими только рецессивные аллели, здесь можно предположить наличие другого механизма, отвечающего за невосприимчивость к

яровизирующим температурам. Например, показано, что мутантные аллели генов VRN-2 – важных компонентов времени колошения [32] определяют отсутствие потребности в яровизации. Из-за их рецессивности необходимо, чтобы все три гена были представлены мутантными формами. Такие генотипы у мягкой пшеницы не выявлены, однако искусственно полученные линии с тремя рецессивными мутантными генами VRN-2 переходили к колошению на 100 дней раньше, чем линии хотя бы с одним интактным геном VRN-2, обеспечивая, таким образом, развитие по яровому типу [33]. На экспрессию VRN-2 может влиять также продолжительность фотопериода – для некоторых сортов яровизация может быть замещена временным (до шести недель) перемещением в условия короткого светового дня [34]. Это явление связано с подавлением активности репрессора цветения, гена VRN-2. Анализ последовательностей промоторов VRN-1 генов пшеницы позволил выявить сайт Vrn-box, мутации в котором связаны с изменениями потребности в яровизациии и времени колошения [35], сайт связывания белка MyoD-like [36], а также сайт распознавания HMG1, возможного модулятора структуры хроматина [37]. Это позволяет предположить, что эпигенетические изменения в промоторе генов также могут влиять на чувствительность пшеницы к яровизации.

Таджикистан, Киргизия, Узбекистан. Среди исследованных сортов мягкой пшеницы из Средней Азии (в выборке преимущественно представлены образцы из Таджикистана – восемь, Киргизия и Узбекистан — по одному сорту) выявлены доминантные гены Vrn-Ala (у пяти образцов, 50%), Vrn-B1a (также у пяти образцов, 50%), Vrn-D1a (у шести образцов, 50%). Яровой тип развития определяется разнообразными комбинациями этих генов: присутствием всех трех генов в доминантной форме (k-35445 из Узбекистана); дигенным наследованием Vrn-Ala Vrn-Bla (оба морфотипа сорта к-52546, Афганистан) или Vrn-A1a Vrn-D1a (k-39273, Киргизия); моногенно за счет доминантного гена Vrn-B1a (k-29635, k-52519) или Vrn-D1a (k-35798, k-55569, k-55581). Образец k-55569 (разновидность murgabicum) оказался гетерогенным сразу по двум генам яровости: Vrn-Ala + vrn-Al Vrn-Dla + vrn-Dl (табл. 2). Столь большое число вариантов взаимодействия генов можно связать с разнообразием природных и агроэкологических условий региона: наличием как богарных, так и поливных посевов пшеницы, размещенных в широком диапазоне высотной зональности — от речных долин бассейнов Амударьи и Сырдарьи до высокогорий Горного Бадахшана [14].

Китай, Монголия. Все четыре образца яровой мягкой пшеницы из Китая имеют один доминантный ген — Vrn-D1a, что соответствует литературным данным о преимущественном распростра-

нении этого гена среди китайских староместных сортов [25]. Образец из Монголии k-7985 имеет комбинацию аллелей Vrn-B1a Vrn-D1a. Подобная комбинация аллелей, с одной стороны, сближает его с образцами из Китая и Средней Азии (за счет доминантного гена Vrn-D1a), с другой, свидетельствует о влиянии на местный генофонд сортов из Сибири и Алтая, где доминантный ген Vrn-B1 имеет широкое распространение [19, 25]. Изученные образцы имеют рецессивные аллели по гену фотопериодической реакции – ppd-D1b.

Иемен. Староместные сорта мягкой пшеницы с юга Аравийского полуострова, как правило, очень скороспелые и отличаются исключительным разнообразием по составу генов VRN. По локусу VRN-A1 обнаружены аллели: Vrn-A1a у двух образцов (50%), Vrn-A1b у одного образца (25%) и рецессивная форма vrn-A1 у двух образцов, причем образец TRI-21459 оказался гетерогенным сразу по двум генам отзывчивости на яровизацию: Vrn-A1a + + vrn-A1 Vrn-D1a + vrn-D1 (табл. 2). Доминантный (Vrn-B1a) и рецессивный (vrn-B1) аллели встречались у йеменских сортов в равном соотношении. По локусу Vrn-D1 также отмечена дифференциация: два образца несли рецессивный, один – доминантный аллели, один образец был гетерогенным. Детерминация ярового образа жизни определяется различными комбинациями аллелей всех трех локусов VRN-1. Все образцы имеют рецессивные аллели по гену реакции на фотопериод — ppd-D1b. Столь большое разнообразие йеменских сортов по генам VRN-1, возможно, обусловлено тем, что в формировании местного генофонда могли принимать участие как пшеницы Месопотамии и Средиземноморья при контактах племен Южной Аравии в III–II тыс. до н. э. с Египтом и Шумером [38], так и пшеницы Индии и Афганистана по пути миграции в Эфиопию [39].

Т. compactum Host. Пшеница карликовая

Исследование карликовой пшеницы показало, что внутривидовое разнообразие этого вида по генам VRN-1 и PPD-D1 меньше, чем у мягкой пшеницы – генетическая гетерогенность по Нею только 0.212 (у мягкой пшеницы соответственно 0.432) (табл. 3). Восемь образцов из 12 (66.7%) имели одинаковый генотип: vrn-A1 Vrn-B1a vrn- $D1 \, ppd-D1b$ (табл. 2), и яровой образ жизни у них детерминировался одним геном VRN-B1. Данный генотип объединял образцы из Армении, Израиля, Таджикистана и Турции, т.е. преимущественно страны Кавказа, Передней и Средней Азии. Сравнение T. compactum и T. aestivum по генам VRN-1 показывает, что аналогичный генотип встречается и у мягкой пшеницы, однако не имеет большого распространения: среди палестиноиорданских сортов генотип vrn-A1 Vrn-B1a vrn-D1 *ppd-D1b* имеет один сорт из восьми изученных

	Генетическая	Vrn-A1		Vrn-B1		Vrn-D1			Ppd-D1				
Вид	гетерогенность, <i>Н</i>	а	b	vrn-A1	а	с	vrn-B1	а	vrn- D1	new	а	b	new
T. aestivum	0.432	25.5	15.3	59.2	42.9	2.0	55.1	49.0	51.0	0	4.1	91.8	4.1
T. compactum	0.212	8.3	8.3	83.3	16.7	0	83.3	16.7	83.3	0	0	100	0
T. spelta	0.431	36.4	27.3	36.4	18.2	18.2	63.6	18.2	63.2	18.2	0	100	0

Таблица 3. Частоты встречаемости (%) аллелей генов *VRN-1* и *PPD-D1* у видов *T. aestivum* L., *T. compactum* Host и *T. spelta* L.

(k-17383), среди среднеазиатских – два сорта из десяти (k-29635 и k-52519 из Таджикистана), в Иране и Афганистане этот генотип не обнаружен. Таким образом, данный генотип можно считать скорее видоспецифичным, чем региональным, и характеризующим аллельный состав генов VRN-1 именно у азиатских карликовых пшениц. Два китайских образца *Т. compactum* (k-43683, k-44063) имеют дигенный тип детерминации яровости: Vrn-Bla Vrn-Dla, занимая по составу аллелей промежуточное положение между азиатскими карликовыми пшеницами (за счет наличия гена *Vrn-B1a*) и китайскими мягкими (за счет наличия гена Vrn-D1a). По-видимому, в Китае происходили гибридизация привнесенных из Средней Азии карликовых пшениц и местных мягких и формирование местного генофонда *Т. compactum*, более приспособленного к агроклиматическим условиям Восточной Азии. Образец Т. сотрастит из Франции (k-6027) несет доминантный ген Vrn-Ala, что сближает его с некоторыми староместными сортами мягкой пшеницы из Европы [40].

T. sphaerococcum Perciv. — пшеница шарозерная и T. antiquorum Heer ex Udacz. — пшеница свайных построек

Узколокализованные виды с округлым зерном и иным генетическим контролем компактоидности колоса, чем у карликовой пшеницы Т. сотрасtum [25]. T. sphaerococcum распространена в северных штатах Индии и Пакистана [14], T. antiquorum – в ископаемом виде описана по находкам в свайных постройках Швейцарии, а в живом виде обнаружена на Памире в Таджикистане [41]. У T. antiquorum (k-56398) обнаружен доминантный аллель Vrn-B1a, что соответствует опубликованным данным [25]. Исследованные образцы T. sphaerococcum (k-13177 и k-23890) имеют только рецессивные аллели генов яровости VRN-1. однако известно, что у шарозерной пшеницы яровой тип развития детерминируется, как правило, геном VRN-D4 или, в редких случаях, VRN-B1 [25]. Идентификация гена VRN-D4 в нашем исследовании не проводилась. Однако поскольку при весеннем посеве растения T. sphaerococсит нормально выколашивались, можно предположить, что изученные образцы несут доминантный

ГЕНЕТИКА том 57 № 3 2021

ген VRN-D4. Ряд исследователей считают, что *Т. antiquorum* – один из первых культивируемых человеком видов гексаплоидных пшениц [41]. Учитывая одинаковый характер наследования яровости (аллель Vrn-B1a) у видов с компактным колосом: T. antiquorum, азиатские формы T. comрастит и ряд образцов Т. sphaerococcum, можно предположить, что эти виды первоначально распространялись по территории Евразии в составе единого генетического пула. Такому типу распространения мог способствовать похожий габитус растений этих видов (относительно невысокая соломина, устойчивость к полеганию, короткий плотный колос), подходящий под определенную агротехнику, применяемую древним земледельцем. Ген VRN-D4, выявляемый исключительно у вида Т. sphaerococcum, географически связан с районом Пенджаба и появился, по-видимому, в результате мутации у вида T. sphaerococcum именно в районе Южной Азии. Отсутствие или крайне редкая частота его встречаемости в других регионах позволяет предположить, что ген VRN-D4 вносит вклад в местную адаптацию и поддержан естественным отбором.

T. petropavlovskyi Udacz. et Migusch., пшеница Петропавловского и Т. tibetanum Shao, тибетская пшеница

Единственный исследованный образец T. petropavlovskyi (k-51764) из Синьцзян-Уйгурского автономного округа (Китай) несет только аллель Vrn-D1a, что сближает его с китайскими мягкими пшеницами, имеющими, как правило, такой же генотип, но не вполне согласуется с ранее опубликованными ланными по другим образцам T. petropavlovskyi, в соответствии с которыми у этого вида яровой образ жизни детерминируется либо геном VRN-A1, либо комбинацией VRN-A1 *VRN-D1* [25]. Тем не менее наличие внутривиловой гетерогенности по типу развития допускает и существование генотипов, обнаруженных в нашем исследовании. Еще один вид пшеницы T. tibetanum из Тибета (Китай), характеризующийся трудным обмолотом и осыпающимися при созревании колосками, также несет один доминантный ген яровости Vrn-D1a.

T. spelta L. Спельта

Исследование пленчатой пшеницы спельты по генам VRN-1 и Ppd-D1 показало ее большое разнообразие, H = 0.431 (табл. 3), сопоставимое с таковым у мягкой пшеницы. При этом не обнаружено какой-либо видоспецифичной комбинации генов. У образцов из разных регионов и даже из одного региона детерминация ярового образа жизни осуществлялась комбинацией разных аллелей. Так, у образцов спельты из Азербайджана k-45364 и № 72 яровой тип развития определяется аллелем Vrn-Ala, у образца k-45366 – Vrn-Bla, у образца k-45368 – дигенно Vrn-A1b Vrn-B1a. У образцов спельты из Ирана присутствовал либо ген Vrn-Ala (k-45750), либо комбинация генов Vrn-Ala Vrn-Dla (k-45818). У образца k-53660 (Таджикистан) — Vrn-Alb Vrn-Dla. Похожий набор аллелей характерен и для мягкой пшеницы из соответствующих стран Азии. Что касается образцов спельты из Европы, представленных в исследовании, то они несколько выделяются из общего ряда. Так, у двух образцов из Испании (к-20538 и к-20539) по локусу Vrn-D1 обнаружен ДНК-фрагмент, отличающийся от фрагментов, характерных для других сортов (рис. 2).

Размер этого ДНК-фрагмента больше фрагментов 997 и 1671 пн, маркирующих рецессивный и доминантный аллели гена VRN-D1 соответственно. Так как оба образца по локусам VRN-A1 и VRN-B1 рецессивны, можно предположить, что новый ДНК-фрагмент по локусу VRN-D1 у них маркирует новый доминантный аллель. детерминирующий яровой тип развития. В других сортах пшеницы этот ДНК-фрагмент не обнаружен, таким образом он может быть видоспецифичным для испанской спельты. Оба образца спельты из Германии (k-1727 и k-39760) несут довольно редкий аллель Vrn-B1c. Этот аллель, кроме немецкой спельты, обнаружен только у одного образца мягкой пшеницы k-12596 из Афганистана, однако в более ранних исследованиях также показано наличие данного аллеля среди яровых сортов Нижневолжского региона в Российской Федерации [21]. Несмотря на небольшую частоту встречаемости аллеля Vrn-Blc, диффузный характер его распространения в широком ареале (от Германии до Афганистана) и у разных видов (T. aestivum, T. spelta) может свидетельствовать о "древности" данного аллеля, попавшего в основные миграционные потоки и распространившегося по территории Евразии из некоего единого пула генов.

Распределение генов VRN-1 и PPD-D1 по территории Евразии

Анализ частот встречаемости аллельных вариантов генов *VRN-1* выявляет существенные различия в характере распределения ряда аллелей.



Рис. 2. Аллели *Vrn-D1a* (1671 пн), *vrn-D1* (997 пн) и новый аллель по локусу *VRN-D1* (указан стрелкой) у староместных гексаплоидных пшениц: 140 – *T. petropavlovskyi* k-51764; 141 – *T. sphaerococcum* k-13177; 142 – *T. sphaerococcum* k-23890; 143 – *T. antiquorum* k-56398; 144 – *T. spelta* k-1727; 145 – *T. spelta* k-20538; 146 – *T. spelta* k-20539.

Так, аллель Vrn-A1b широко представлен в сортах *Т. aestivum* из Палестины – 71.4%, в других странах Ближнего Востока (Иран, Йемен) он встречается у единичных образцов, а в странах Средней и Юго-Восточной Азии не встречается совсем. По литературным данным, Vrn-A1b обнаружен у двух из семи исследованных староместных сортов Т. aestivum из Турции [18]. Изучение яровых сортов мягкой пшеницы. возделываемых в России. не выявило наличия данного аллеля [19, 21], однако *Vrn-A1b* встречается в коммерческих сортах Южной Европы [40]. Если у мягкой пшеницы этот аллель оказывается географически привязанным к Палестине и Средиземноморью, то по другим видам пшеницы ситуация несколько иная: Vrn-Alb несут также отдельные генотипы Т. compactum из Афганистана и T. spelta из Таджикистана, Азербайджана и Германии. Наличие Vrn-Alb у спельты столь разного географического происхождения, в том числе в регионах, где мягкая пшеница не имеет этого аллеля, может свидетельствовать в пользу наличия определенного центра распространения группы гексаплоидных пшениц с Vrn-A1b, причем в этом центре должны были происходить спонтанная гибридизация и обмен генетическим материалом между несколькими видами: T. aestivum, T. compactum, T. spelta. Возможная локализация этого центра — Передняя Азия (Палестина), регион с максимальной частотой встречаемости аллеля Vrn-A1b. Палестина также входит в состав западной части "Дуги плодородия", где, как предполагается, впервые произошло одомашнивание пшеницы и получены древнейшие находки зерен T. spelta и T. aestivum [42]. В некоторых работах высказывалось предположение о независимом происхождении азиатского и европейского подвидов спельты [42-44]. С одной стороны, обнаружение новых аллельных вариантов по гену VRN-D1 у европейской спельты может свидетельствовать в пользу этого предположения, с другой стороны, встречаемость ряда одинаковых аллелей (*Vrn-A1b*, *Vrn-B1c*) у европейской и азиатской спельты, причем в условиях сильно разорванного ареала, скорее свидетельствует о едином центре происхождения этого вида. Такой вариант совсем не исключает участия в генезисе европейской спельты других видов пшеницы (*T. dicoccum*), как это предполагается в ряде работ [44].

Неравномерность распределения характерна и для аллеля Vrn-Dla. У Т. spelta он присутствует только у двух образцов из 11, причем это образцы из самых восточных частей ареала вида: Талжикистана и Ирана. Такая же картина характерна и для *Т. aestivum*: в Палестине с Иорданией частота встречаемости Vrn-D1a составляет 12.5%, в Турции среди староместных сортов (по литературным данным) -0% [18], в расположенном восточнее Иране – 50%, в республиках Средней Азии – 55.6%, в Афганистане – 71.4%, в Китае (восток ареала) – 100%. Ранее высказывалось предположение, что наличие доминантного гена VRN-D1 определяет адаптивность к высоким температурам в период налива зерна [31], однако довольно четко выявляемая клинальная изменчивость в широтном направлении и концентрация генотипов, несущих *Vrn-D1a* в районах Афганистана, Индии и Китая, могут указывать на эти области как центр возникновения и первичного распространения аллеля Vrn-D1a.

По гену *PPD-D1* староместные сорта всех изученных видов гексаплоидной пшеницы демонстрируют исключительное однообразие. Почти все образцы несут рецессивный аллель ppd-D1b. Только два сорта мягкой пшеницы (k-35445 из Узбекистана и k-17417 из Иордании) имеют доминантный аллель *Ppd-D1a*, причем k-17417 является гетерогенным по этому признаку. Кроме того, еще у двух сортов (k-17298 и k-22497) выявлен ДНК-фрагмент размером около 330 пн, маркирующий, вероятно, новый аллель гена PPD-D1, однако механизм его действия пока остается неизученным. Сравнение стародавних и современных коммерческих сортов показывает, что среди современных сортов аллель *Ppd-D1a* распространен довольно широко, особенно в южной зоне производства зерна [18, 26, 40, 45]. Ранее было отмечено, что различие яровых сортов по присутствию *Ppd-D1a/ppd-D1b* всегда сопровождается более коротким сроком колошения у сортов с аллелем *Ppd-D1a* [26], что действительно актуально в некото-

ГЕНЕТИКА том 57 № 3 2021

рых южных регионах с коротким днем и недостаточным увлажнением (или экстремально высокими температурами) в летний период. Практическое отсутствие доминантного аллеля *Ppd-D1a* у староместных сортов может иметь несколько объяснений. Во-первых, отсутствие гена *Ppd-D1a* может компенсироваться наличием доминантных аллелей других генов реакции на фотопериод – *PPD-A1* и *PPD-B1*. Во-вторых, распространенная с давних пор практика использования некоторых биологически яровых сортов в качестве двуручек и посева их осенью [30] нивелирует преимущество в скороспелости у сортов, нечувствительных к длине дня.

Весьма вероятным представляется предположение, что рецессивный ген *PPD* был характерен для начального периода доместикации и культивирования пшеницы и являлся изначальным "старым" геном, обеспечивающим пластичность староместных сортов при разных сроках сева (осень или весна) за счет реакции растений на изменение длины дня. Увеличение частоты доминантных аллелей в современных сортах произошло, повидимому, уже в результате "зеленой революции", во время которой широко распространились скороспелые и ультраскороспелые сорта интенсивного типа с жесткой детерминацией длины вегетационного периода.

Таким образом, нами установлено, что староместные сорта гексаплоидных пшениц отличаются большой вариабельностью механизмов детерминации ярового образа жизни. У 42 образцов (55.3%) яровость контролировалась моногенно, у 23 образцов (30.3%) – дигенно, у двух образцов (2.6%) – тремя генами, три образца были гетерогенными по составу генов VRN-1. По аллельному составу генов VRN-1 и PPD-D1 бо́льшим разнообразием отличаются виды *T. aestivum* (H = 0.432) и T. spelta (H = 0.431), меньшим — T. compactum (H == 0.212). Ряд аллелей и генотипов отличаются географической и ботанической приуроченностью к определенным регионам и видам (группам видов) пшеницы. Распространение аллеля Vrn-D1a характеризуется клинальной изменчивостью в широтном направлении и максимальной концентрацией в районах Афганистана, Индии и Китая (у разных видов пшеницы из этого региона: T. aestivum, T. compactum, T. petropavlovskyi, T. tibetanum), что может указывать на эти области как центр возникновения и распространения аллеля Vrn-D1a. Группа "компактоидных" видов T. antiquorum, T. sphaerococcum, азиатские формы T. compactum имеют моногенный контроль яровости, опосредованный аллелем Vrn-Bla, что предполагает возможность их первоначального распространения в составе единого генетического пула. Наличие одинаковых аллелей (Vrn-Alb, Vrn-Blc) у европейских и азиатских форм T. spelta в условиях сильно разорванного ареала свидетельствует скорее о едином центре происхождения этого вида, нежели о неза-

висимом возникновении разных подвидов. Практическое отсутствие доминантного аллеля Ppd-D1a v староместных сортов (только 2.6%), возможно, объясняется тем фактом, что фоточувствительный рецессивный аллель *ppd-D1b* является изначальным "старым" геном, частота которого поддерживалась в условиях вариативной по срокам посева агротехники, а увеличение частоты доминантных аллелей в современных сортах произошло уже в результате "зеленой революции". Наличие у современных сортов такого же набора аллелей Vrn, как и у староместных образцов разных видов гексаплоидных пшениц, может свидетельствовать о том, что изученные аллели в полной мере обеспечивают адаптивность пшеницы к широкому спектру условий внешней среды. Вместе с тем выявленные новые типы ДНК-фрагментов по локусам VRN-D1 (k-20538 и k-20539, Испания, T. spelta) и PPD-D1 (k-17298, Палестина и k-22497, Иран, *Т. aestivum*), по-видимому, маркирующие неизвестные ранее аллели, представляют интерес для дальнейшего изученияих эффективности для селекции, в целях создания высокоадаптивных генотипов в конкретных условиях местообитания.

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

- Stelmakh A.F. Genetic effects of Vrn genes on heading date and agronomic traits in bread wheat // Euphytica. 1993. V. 65. P. 53–60. https://doi.org/10.1007/BF00022199
- 2. Worland A.J., Börner A., Korzun V. et al. The influence of photoperiod genes on the adaptability of European winter wheats // Euphytica. 1998. V. 100. P. 385–394. https://doi.org/10.1023/A:1018327700985
- Li C.X., Lin H.Q., Chen A. et al. Wheat VRN1, FUL2 and FUL3 play critical and redundant roles in spikelet development and spike determinacy // Development. 2019. V. 146. P. 1–11. https://doi.org/10.1101/510388
- Debernardi J.M., Greenwood J.R., Finnegan E.J. et al. APETALA 2-like genes AP2L2 and Q specify lemma identity and axillary floral meristem development in wheat // The Plant J. 2020. V. 101. P. 171–187. https://doi.org/10.1111/tpj.14528
- Distelfeld A., Li C., Dubcovsky J. Regulation of flowering in temperate cereals // Curr. Opin. Plant Biol. 2009. V. 12. P. 178–184. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.12.010
- Yan L., Loukoianov A., Tranquilli G. et al. Positional cloning of the wheat vernalization gene VRN1 // PNAS USA. 2003. V. 100. № 10. P. 6263–6268. https://doi.org/10.1073/pnas.0937399100

- 7. *Yan L., Helguera M., Kato K. et al.* Allelic variation at the VRN-1 promoter region in polyploidy wheat // Theor. Appl. Genet. 2004. V. 109. № 8. P. 1677–1686. https://doi.org/10.1007/s00122-004-1796-4
- *Kippes N., Zhu J., Chen A. et al.* Fine mapping and epistatic interactions of the vernalization gene VRN-D4 in hexaploid wheat // Mol. Genet. Genomics. 2014. V. 289. P. 47–62. https://doi.org/10.1007/s00438-013-0788-y
- Yan L., Fu D., Li C. et al. The wheat and barley vernalization gene VRN3 is an orthologue of FT // PNAS USA. 2006. V. 103. P. 19581–19586. doi: 10.1073pnas.0607142103
- Fu D., Szücs P., Yan L. et al. Large deletion within the first in Vrn-1 are associated with spring growth habit in barley and wheat // Mol. Gen. Genet. 2005. V. 273. № 1. P. 54–65. https://doi.org/10.1007/s00438–004–1095–4
- 11. *Kato H., Taketa S., Ban T. et al.* The influence of a spring habit gene *Vrn–D1*, on heading time in wheat // Plant Breed. 2001. V. 120. P. 115–120. https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2001.00586.x
- Trevaskis B. The central role of the VRN1 gene in the vernalization response of cereals // Funct. Plant Biol. 2010. V. 37. P. 479–487. https://doi.org/10.1071/FP10056
- 13. Shcherban A.B., Efremova T.T., Salina E.A. Identification of a new Vrn-B1 allele using two near-isogenic wheat lines with difference in heading time // Mol. Breed. 2012. V. 29. № 3. P. 675–685. https://doi.org/10.1007/s11032-011-9581-y
- 14. *Дорофеев В.Ф.* Пшеницы мира. Л.: Колос, 1976. 486 с.
- 15. *Cockram J., Jones H., Leigh F.J. et al.* Control of flowering time in temperate cereals: genes, domestication, and sustainable productivity // J. Exp. Bot. 2007. V. 58. P. 1231–1244.
- https://doi.org/10.1093/jxb/erm042PMID:17420173 16. *Blake N.K., Lanning S.P., Martin J.M. et al.* Effect of
- variation for major growth habit genes on maturity and yield in five spring wheat populations // Crop Sci. 2009.
 V. 49. P. 1211–1220. https://doi.org/10.2135/cropsci2008.08.0505
- Di'az A., Zikhali M., Turner A.S. et al. Copy number variation affecting the Photoperiod–B1 and Vernalization–A1 genes is associated with altered flowering time in wheat (*Triticum aestivum*) // PLoS One. 2012. V. 7. № 3. P. e33234. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033234
- Andeden E.E., Yediay F.E., Baloch F.S. et al. Distribution of vernalization and photoperiod genes (Vrn-A1, Vrn-B1, Vrn-D1, Vrn-B3, Ppd-D1) in Turkish. Bread wheat cultivars and landraces // Cereal Res. Communications. 2011. V. 39. № 3. P. 352–364. https://doi.org/10.1556/CRC.39.2011.3.5
- Лихенко И.Е., Стасюк А.И., Щербань А.Б. и др. Изучение аллельного состава генов Vrn-1 и Ppd-1 у раннеспелых и среднеранних сортов яровой мягкой пшеницы Сибири // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2014. Т. 18. № 4-1. С. 691–703.
- Kiss T., Balla K., Veisz O. et al. Allele frequencies in the VRN-A1, VRN-B1 and VRN-D1 vernalization response and PPD-B1 and PPD-D1 photoperiod sensi-

tivity genes, and their effects on heading in a diverse set of wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) // Mol. Breed. 2014. V. 34. P. 297–310. https://doi.org/10.1007/s11032-014-0034-2

- 21. Янковская А.А., Фисенко А.В., Драгович А.Ю. Генетическое разнообразие сортов яровой мягкой пшеницы европейской части России по генам VRN и PPD, определяющим сроки колошения // Генетика. 2018. Т. 54. № 13. С. S32–S36. https://doi.org/10.1134/S0016675818130209
- 22. Grogan S.M., Brown-Guedira G., Haley S.D. et al. Allelic variation in developmental genes and effects on winter wheat heading date in the U.S. Great Plains // PLoS One. 2016. V. 11. № 4. P. e0152852. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152852
- Добротворская Т.В., Мартынов С.П., Пухальский В.А. Тенденции изменения генетического разнообразия сортов яровой мягкой пшеницы, реализованных на территории России в 1929–2003 гг. // Генетика. 2004. Т. 40. № 11. С. 1509–1522.
- 24. Новосельская-Драгович А.Ю., Фисенко А.В., Имашева А.Г., Пухальский В.А. Сравнительный анализ динамики генетического разнообразия по глиадинкодирующим локусам среди сортов озимой мягкой пшеницы Triticum aestivum L., созданных за 40-летний период научной селекции в Сербии и Италии // Генетика. 2007. Т. 43. № 11. С. 1478–1485.
- Гончаров Н.П. Сравнительная генетика пшениц и их сородичей (издание 2-е, исправленное и дополненное). Новосибирск: Гео, 2012. 523 с.
- 26. Потокина Е.К., Кошкин В.А., Алексеева Е.А. и др. Комбинация аллелей генов *Ppd* и *Vrn* определяет сроки колошения у сортов мягкой пшеницы // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2012. Т. 16. № 1. С. 77–86.
- McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J. et al. Catalogue of Gene Symbols for Wheat: 11th Int. Wheat Genet. Symp. 24–29 August 2008. Brisbane, Australia, 2008.
- Torres A.M., Weeden N.F., Martin A. Linkage among isozyme. RFLP and RAPD markers in Vicia faba // Theor. Appl. Genet. 1993. V. 85. P. 937–945. https://doi.org/10.1007/BF00215032
- 29. Beales J., Turner A., Griffiths S. et al. A pseudo-response regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive Ppd-D1a mutant of wheat (*T. aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet. 2007. V. 115. № 5. P. 721–733. https://doi.org/10.1007/s00122-007-0603-4
- Якубцинер М.М. К истории культуры пшеницы в СССР: Материалы по истории земледелия в СССР. Л.: Наука, 1956. С. 16–169.
- Стельмах А.Ф., Авсенин В.И. Отечественные сорта яровой мягкой пшеницы – носители гена Vrn // Науч.-техн. бюл. ВСГИ. 1983. Вып. 4(50). С. 32–36.
- 32. *Chen A., Dubcovsky J.* Wheat tilling mutants show that the vernalization gene *VRN1* down-regulates the flowering repressor *VRN2* in leaves but is not essential for flowering // PLoS Genet. 2012. V. 8. № 12. P. e1003134.

https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003134

33. *Kippes N., Chen A., Zhang X. et al.* Development and characterization of a spring hexaploid wheat line with

no functional VRN2 genes // Theor. Appl. Genet. 2016. V. 129. № 7. P. 1417–1428. https://doi.org/10.1007/s00122-018-3141-3

- 34. Allard V, Veisz O., Kõszegi B. et al. The quantitative response of wheat vernalization to environmental variables indicates that vernalization is not a response to cold temperature // J. Exp. Bot. 2012. V. 63. № 2. P. 847–857. https://doi.org/10.1093/jxb/err316
- 35. Muterko A., Kalendar R., Salina E. Novel alleles of the VRN1 genes in wheat are associated with modulation of DNA curvature and flexibility in the promoter region // BMC Plant Biol. 2016. V. 16. P. 65–81. https://doi.org/10.1186/s12870-015-0691-2
- Golovnina K.A., Kondratenko E.Y., Blinov A.G., Goncharov N.P. Molecular characterization of vernalization loci VRN1 in wild and cultivated wheats // BMC Plant Biol. 2010. V. 10. P. 168. https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-168
- 37. Diallo A.O., Ali-Benali M.A., Badawi M. et al. Expression of vernalization responsive genes in wheat is associated with histone H3 trimethylation // Mol. Genet. Genomics. 2012. V. 287. № 7. P. 575–590. https://doi.org/10.1007/s00438-012-0701-0
- Грязневич П.А. Историко-археологические памятники древнего и средневекового Йемена. Полевые исследования 1970–1971 гг. // Южная Аравия. Памятники древней истории и культуры. Санкт-Петербург, 1994. Вып. 2. Ч. 1. 380 с.
- Badaeva E.D., Dedkova O.S., Pukhalskiy V.A. et al. Chromosomal passports provide new insights into diffusion of emmer wheat // PLoS One. 2015. V. 10. № 5. P. e0128556. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128556
- 40. Shcherban A.B., Boerner A., Salina E.A. Effect of VRN-1 and PPD-D1 genes on heading time in European breadwheat cultivars // Plant Breed. 2015. V. 134. P. 49–55. https://doi.org/10.1111/pbr.12223
- 41. Удачин Р.А. О возможном существовании Triticum antiquorum Неег в наши дни // Науч.-техн. бюл. ВНИИР. 1982. Вып. 119. С. 72–73.
- 42. *Feldman M*. The World Wheat Book. A History of Wheat Breeding. Intercept Ltd.: L.; P.; N.-Y., 2001. 60 p.
- 43. Novoselskaya-Dragovich A. Yu., Fisenko A.V., Konovalov F.A. et al. Analysis of genetic diversity and evolutionary relationships among hexaploid wheats *Triticum* L. using LTRretrotransposon-based molecular markers // Genetic Resources and Crop Evol. 2018. V. 65. P. 187–198. https://doi.org/10.1007/s10722-017-0520-6
- 44. Дедкова О.С., Бадаева Е.Д., Митрофанова О.П. и др. Анализ внутривидовой дивергенции гексаплоидной пшеницы *Triticum spelta* L. с помощью метода дифференциального окрашивания хромосом // Генетика. 2004. Т. 40. № 10. С. 1352–1369.
- 45. Yang F.P., Zhang X.K., Xia X.C. et al. Distribution of photoperiod insensitive *Ppd-D1a* allele in Chinese wheat cultivars // Euphytica. 2009. V. 165. P. 445–452. https://doi.org/10.1007/s10681-008-9745-y

ДРАГОВИЧ и др.

Vernalization (VRN) and Photoperiod (PPD) Genes in Spring Hexaploid Wheat Landraces

A. Yu. Dragovich^{*a*, *}, A. V. Fisenko^{*b*}, and A. A. Yankovskaya^{*a*}

^aVavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia ^bTsitsin Main Botanical Garden, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127276 Russia *e-mail: dragova@mail.ru

The heading time in wheatand some other cereals is mainly determined by the genetic system of VRN (vernal ization requirement) and PPD (photoperiod response) genes. Using diagnostic DNA markers, we examined VRN-A1, VRN-B1, VRN-D1 and PPD-D1 allelic diversity in a set of landraces representing seven hexaploid spring wheat species from several regions of Eurasia. The determination of the spring growth habit was found to be variable; in 55.3% accessions, it was controlled monogenically by a VRN gene; in 30.3% accessions, by a combination of two VRN genes; and in 2.6% accessions, trigenically. The dominant allele Ppd-Dla was nearly completely absent (only 2.6%) in the landraces, which suggests its being secondary to recessive allele ppd-D1b and an increase in its frequency during the recent "green revolution." In species T. aestivum, T. compactum, T. petropaylovskyi, and T. tibetanum, the Vrn-D1a frequency was shown to increase eastwards with maximum concentration in regions of Afghanistan, India and China. In species with compact spike (T. antiquorum, T. sphaerococcum, Asian forms of T. compactum), the spring growth habit is controlled by a single Vrn-Bla allele, which indicates their possible initial distribution in the same genetic pool. The Europe an and Asian T. spelta subspecies, in spite of their very fragmented distribution area, have the same alleles Vrn-A1b and Vrn-B1c, which genetically unites these subspecies. Practically the same set of alleles of genes VRN in landraces and modern cultivars have provided adaptivity of wheat to diverse environmental conditions during the long period of its cultivation. The newly detected DNA fragments in the first intron of loci VRN-D1 and *PPD-D1* may mark new alleles and be of interest for further examination and use in breeding programs.

Keywords: hexaploid wheat, vernalization, photoperiod, landraces, spring growth habit, geographic distribution.

ГЕНЕТИКА ЖИВОТНЫХ

УДК 576.312

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОТНОШЕНИЯ КАМБАЛООБРАЗНЫХ РЫБ СЕМЕЙСТВА Pleuronectidae (Ostichties: Pleuronectiformes) НА ОСНОВЕ УЧАСТКА ГЕНА 16S рРНК

© 2021 г. А. Д. Редин^{1, *}, Ю. Ф. Картавцев^{1, **}

¹Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, 690041 Россия *e-mail: shurko92@yandex.ru **e-mail: yuri.kartavtsev48@hotmail.com Поступила в редакцию 13.04.2020 г. После доработки 11.09.2020 г. Принята к публикации 08.10.2020 г.

На основе неполной нуклеотидной последовательности *16S* pPHK, полных последовательностей *Co-1* и *Cyt-b* исследована систематика и филогения камбал. Проанализированы 62 образца у 14 видов собственных сборов и из коллекций GenBank/BOLD. Реконструировано четыре типа генных деревьев: байесовское (BA), максимального правдоподобия (ML), минимальной эволюции (ME) и ближайшего соседства (NJ). Эти деревья показали сходную топологию. Две отдельных ветви на деревьях поддерживают выделенные ранее подсемейства Hippoglossoidinae и Pleuronectinae с монофилетическим статусом этих таксонов. Подсемейство Pleuronectinae можно считать монофилетическим, при исключении из него трибы Microstomini, с переносом рода *Lepidopsetta* в трибу Pleuronectini. Были сформированы и независимо исследованы три набора нуклеотидных последовательностей. Один набор включал все полученные последовательности гена *16S* pPHK (291 пн), второй набор включал выборку более длинных последовательностей *16S* pPHK (617 пн), третий набор состоял из последовательностей трех генов: *16S* pPHK, *Co-1* и *Cyt-b* (2926 пн). Все три набора данных дают схожий филогенетический сигнал, который согласуется с традиционными представлениями о таксономии отряда Pleuronectiformes; однако второй и третий наборы дают лучшую топологию.

Ключевые слова: Co-1, Cyt-b, 16S рРНК, камбалы, молекулярная филогенетика. **DOI:** 10.31857/S0016675821030115

Семейство настоящих камбаловых рыб Pleuronectidae, которому в статье уделяется основное внимание, является одним из крупнейших в отряде Pleuronectiformes, включая 59 номинальных видов правосторонних камбаловых рыб, распространенных в морских водах Северного полушария [1, 2]. В своем анализе Дж. Купер и Ф. Чаплау [1] рассматривали семейство Pleuronectidae как монофилетический таксон, основываясь на десяти синапоморфиях по морфологическим признакам. Важный итог, полученный вышеупомянутыми авторами, в целом согласуется с топологией ветвей семейства, установленной в нескольких исследованиях молекулярной филогенетики [3-10]. Согласно [1] это семейство включает подсемейства Hippoglossinae, Eopsettinae, Lyopsettinae, Hippoglossoidinae и Pleuronectinae, которые представлены родами, обычно состоящими из видов с высокой промысловой ценностью (например, виды рода палтусовидных камбал, Hippoglossoides). В связи с рыбохозяйственной значимостью этих и других камбал и необходимостью управлять такими ценными возобновляемыми ресурсами весьма важными являются как точная классификация образцов особей видов в пределах родов, так и вся система взаимоотношений между таксонами в этом семействе.

Таксономические исследования Pleuronectidae традиционно основывались на морфологических признаках, как следует из приведенного выше абзаца. Однако частое отсутствие четких доказательств гомологии признаков у видов даже на низких таксономических уровнях (внутри рода) делает не всегда убедительными постулируемые таксономическо-филогенетические взаимосвязи многих групп камбаловых рыб, если они обоснованы лишь с помощью морфологии. Существует несколько версий классификации камбал, которые были предложены разными авторами [1, 11-13]. Определенные разногласия также отмечаются в отношении филогенетических взаимоотношений камбал, полученных на основе морфологических и молекулярно-генетических данных [1, 4, 14, 15]. Разработка новых ядерных и митохондриальных маркеров на основе ДНК позволяет лучше идентифицировать морфологически сходные виды рыб [16], включая многие виды камбаловых. Поэтому актуальным является поиск новых или уже известных, но недостаточно разработанных молекулярных маркеров для реконструкции генных деревьев, а также комбинированных или видовых филогенетических деревьев для камбал семейства Pleuronectidae.

В настоящем исследовании, учитывая вышеизложенное, представлен сравнительный анализ неполных нуклеотидных последовательностей (далее – последовательности) гена 16S рРНК для 14 видов, относящихся к Pleuronectidae, ранее не использованных в таком объеме для камбал, с целью оценки успешности таксономической идентификации образцов и установления филогенетических и таксономических взаимосвязей в этом семействе камбал. Новизна представленного исследования заключается в том, что систематику данной группы в цитированных выше работах авторов не рассматривали на основе 16S рРНК. Соответственно, в представленной статье рассмотрели потенциал данного маркера на достаточной выборке образцов для таксономических и эволюционно-генетических исследований камбал Российской Федерации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В общей сложности проанализировали 62 последовательности 16S рРНК и дополнительно по 24 последовательности генов 16S рРНК, Co-1 и Cyt-b для 14 видов, относящихся к семи родам семейства Pleuronectidae. Латинские имена даны в соответствии с классификацией [1]. Пробы (2–5 образцов мышечной ткани, подвергнутой фиксации этанолом, 95%) взяты из имеющейся коллекции Лаборатории молекулярной систематики, а ваучерные экземпляры самих рыб находятся на ответственном хранении в музее ННЦМБ ДВО РАН. Выделение ДНК проводили с помощью коммерческих наборов ("ДНК Экстран-2", Синтол, Россия).

Фрагмент последовательности гена *16S* рРНК амплифицировали посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) с помощью праймеров 16Sbr-H и 16Sar-L. Реакцию ПЦР проводили в объеме 25 мкл раствора, содержащего: дистиллированную деионизированную воду – 17.8 мкл; dNTP (3AO "Евроген", Москва, Россия) – 0.5 мкл; $5 \times$ Buffer (Evrogen) – 5 мкл; праймеры в концентрации 10 мкМ/мкл – по 0.3 мкл для каждого; Taq-полимераза – 0.1 мкл. Использовали следующую тепловую программу: денатурирование при 93°C в течение 1 мин, отжиг при 55°C в течение 1 мин и элонгация при 72°C в течение 1 мин для 33 циклов. Для определения локализации и порядка расположения нуклеотидов в последовательностях продукты ПЦР (ДНК-образцы) подвергали циклическому секвенированию с помощью набора для секвенирования циклов BrightDye Terminator по следующей программе: денатурирование при $96^{\circ}C - 10 \text{ с}$, отжиг при $45^{\circ}C - 10 \text{ с}$, элонгация при $60^{\circ}C - 2$ мин.

Двунаправленные последовательности цепей ДНК генов *16S* рРНК были получены для каждого ДНК-образца. Эти последовательности затем объединяли вместе для получиния консенсусных последовательностей каждого образца. Данная процедура выполнена с использованием программного пакета Geneious, Free Trial [17].

Так как длина полученных последовательностей варьировала довольно значительно, в диапазоне от 355 пар нуклеотидов (пн) до 642 пн, то для более точного дальнейшего анализа составили два набора последовательностей. Один набор представлял собой все полученные последовательности, а другой включал только наиболее длинные последовательности. Соответственно преобразованию данных набор 1 содержал 62, а набор 2 – 27 последовательностей. После проведения процедуры выравнивания и удаления гэпов (инделов) длина последовательностей двух наборов составила 291 и 617 пн соответственно.

Выравнивание последовательностей для всех таксонов было выполнено с использованием программного пакета (ПП) MEGA-X (http://megasoftware.net/) [18] на основе модуля ClustalW [19], как интегрированного продукта MEGA. Штрафы за открытие пропусков и за удлинение пропусков были установлены размером 15.0 и 5.0 соответственно (для других настроек программы выравнивания использовали параметры по умолчанию). После первого этапа выравнивания большие пробелы были удалены вручную, и окончательное выравнивание на втором этапе выполнено с уменьшенными уровнями штрафов (5.0 и 0.5 для двух опций соответственно). Все пробелы были затем снова удалены вручную.

Для увеличения информационной емкости кроме гена *16S* рРНК в анализ включены последовательности генов *Co-1* и *Cyt-b*, ранее использованные в анализе [10]; в совокупности эти данные составили третий набор последовательностей, включающий всего 24 образца длиной 2926 пн.

Для дальнейшего анализа последовательностей и построения генных деревьев подобрали оптимальную модель замены нуклеотидов для полученного набора последовательностей. Лучшая модель эволюции, которая соответствовала полученным данным, оценена посредством специального модуля программы MEGA. Для набора гена *16S* рРНК с короткими последовательностями (291 пн) наилучшей моделью оказалась K2P + G (двухпараметрическая модель М. Кимуры с гамма-распределением замен) [20], для набора этого гена с длинными последовательностями (617 пн) лучшей была модель JC + G (модель Джукса– Кантора с гамма-распределением замен) [21], для набора последовательностей трех генов наилучшей моделью оказалась HKY + G (модель Хасегава–Кишино–Яно с гамма-распределением замен) [22].

Генные деревья были построены посредством четырех методов реконструкции: на основе байесовского анализа (ВА), максимального правдоподобия (ML), ближайшего соседства (NJ) и минимальной эволюции (ME). Они были выполнены в MrBayes 3.2.7 (http://nbisweden.github.io/Mr-Bayes/download.html) [23, 24] и MEGA-X [18]. Моделирование процесса реконструкции деревьев в ВА проводили в течение одного миллиона поколений n ($n = 10^6$). Три другие реконструкции ML, NJ, ME проводили с повторностями равными k = 1000 копий бутстрепа (бутстреп-поддержки).

В качестве внешней группы при укоренении деревьев выбрали ветвь *Platichthys stellatus*, представитель которой по данным для полного митогенома (мтДНК) ранее был отнесен к внешней ветви в семействе Pleuronectidae [10]. Филогенетические деревья визуализировали и редактировали при необходимости с помощью программного обеспечения FigTree [25] и MEGA-X [18].

Все полученные последовательности по гену *16S* рРНК были зарегистрированы в GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/); часть не опубликованных ранее последовательностей *Co-1* и *Cyt-b* также включена в статью (табл. 1).

Статистический анализ нуклеотидного состава выполнен с использованием ПП MEGA-X. Дополнительно с помощью программного пакета Statistica 6 [29] провели однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) нуклеотидного состава отдельно по каждому гену.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ строили, базируясь на последовательностях трех представленных ранее наборов данных. Полная длина участка гена *16S* рРНК (полноразмерные последовательности "от праймера до праймера") составляет 596–631 пн. Номера полноразмерных участков гена *16S* рРНК следующие: MN888911, MN888895, MN888908, MN888877, MN888901, MN888894, MN888893, MN888892, MN888917, MN888916, MN888915, MN888903,

ГЕНЕТИКА том 57 № 3 2021

MN888924, MN888918, MN888912, MN888904, MN888905, MN888868, MN888873, MN888898, MN888899, MN888902, MN888927, MN888909, MN888907, MN888884, MN888883, MN888876.

Однако не все полученные последовательности достигли полного размера. Разница в длине последовательностей обусловлена некачественным секвенированием некоторых образцов, что привело к большему "обрезанию" участков рядом с праймерами при формировании консенсусных последовательностей. Эти погрешности секвенирования возможны в связи с тем, что часть образцов тканей хранились до анализа несколько лет. Однако короткие фрагменты не обязательно плохие для оценки изменчивости в близких таксонах и сопоставления степени их сходства-различия для реконструкции генного дерева. В связи с этим для анализа материал разбили на две группы, включающие длинные (1) и короткие (2) последовательности гена. В соответствии с изложенными подходами (в разделе "Материалы и методы") построено четыре типа деревьев: ВА, ML, NJ и ME.

Анализ всех последовательностей 16S рРНК

На рис. 1 показано укорененное ML-дерево, полученное на основе набора последовательностей гена *16S* рРНК длиной 291 пн. Поддержки на деревьях указаны в следующем порядке: BA/ME/ NJ/ML.

Ветвь с образцами *Limanda sakhalinensis* вошла в состав подсемейства Hippoglossoidinae, образуя отдельную, топологически неразрешенную ветвь (узел) вместе с *Cleisthenes pinetorum* подсемейства Hippoglossoidinae. Отдельная, также неразрешенная ветвь сформирована представителями трех номинальных видов палтусовидных камбал рода *Hippoglossoides. Lepidopsetta mochigarei*, представитель трибы Microstomini, имеет для всех пяти соответствующих ветвей на дереве неразрешенную топологию. Отдельный узел на древе формируют представители тихоокеанского белокорого палтуса *Hippoglossus stenolepis* из подсемейства Hippoglossinae.

Анализ более длинных последовательностей 16S рРНК

На рис. 2 представлено укорененное NJ-дерево, полученное на основе набора последовательностей гена *16S* рРНК длиной 617 пн. Ветвь *Limanda sakhalinensis* включена в подсемейство Hippoglossoidinae, располагаясь в одном кластере с *Cleisthenes pinetorum*. Последовательности, представляющие подсемейство Hippoglossinae, образуют отдельный узел.

РЕДИН, КАРТАВЦЕВ

348

Таблица 1. Список видов и присвоенные им номера в генном банке

Видовое название с лабораторным	Номер доступа в NCBI				
номером	16S	Co-I	Cyt-b		
Pseudopleuronectes herzensteini 7k	MN888867	KF386364	KF445172		
Pseudopleuronectes herzensteini 05-07	MN888868	KF386361	KF445169		
Pseudopleuronectes herzensteini 6k	MN888869	KF386363	KF445171		
Pseudopleuronectes schrenki 119-07	MN888870				
Liopsetta pinnifasciata 90-07	MN888871				
Liopsetta pinnifasciata 40-07	MN888872				
Liopsetta pinnifasciata 39-07(2)	MN888873				
Liopsetta pinnifasciata 39-07	MN888874				
Liopsetta pinnifasciata 21-07	MN888875				
Liopsetta pinnifasciata 20-07	MN888876	KF386379	KF445186		
Liopsetta pinnifasciata 2	MN888877				
Liopsetta pinnifasciata 19-07	MN888878	KF386378	KF445185		
Liopsetta pinnifasciata 13	MN888879	KF386377	KF445184		
Pseudopleuronectes yokohamae 46	MN888880	KF386355	KF445163		
Pseudopleuronectes yokohamae 45	MN888881	KF386354	KF445162		
Pseudopleuronectes obscurus 42-07	MN888882				
Pseudopleuronectes obscurus 36	MN888883				
Pseudopleuronectes yokohamae 09-07	MN888884	KF386353	KF445161		
Pseudopleuronectes obscurus 08-08(08-07)	MN888885				
Limanda punctatissima 89-07	MN888886				
Limanda punctatissima 86-07	MN888887	KF386388	KF445195		
Limanda punctatissima 58-07	MN888888				
Limanda punctatissima 50-07	MN888889				
Limanda punctatissima 37	MN888890	KF386386	KF445193		
Lepidopsetta mochigarei LMO12-5	MN888891				
Lepidopsetta mochigarei LMO12-4	MN888892				
Lepidopsetta mochigarei LMO12-3	MN888893				
Lepidopsetta mochigarei LMO12-2	MN888894				
Lepidopsetta mochigarei LMO12-1	MN888895				
Platichthys stellatus 11-07	MN888896				
Platichthys stellatus4k	MN888897	KF386371	KF445178		
Platichthys stellatus PS6-011	MN888898				
Platichthys stellatus PS5-011	MN888899				
Platichthys stellatus PS4-011	MN888900				
Platichthys stellatus Ps3-011	MN888901				
Platichthys stellatus Ps2-011	MN888902				
Platichthys stellatus 18-07	MN888903	KF386375	KF445182		
Platichthys stellatus 16-07	MN888904				
Platichthys stellatus 15-07	MN888905				
Liopsetta pinnifasciata PG1-011	MN888906				
Liopsetta pinnifasciata Pc2-011	MN888907				
Liopsetta pinnifasciata Pc1-011	MN888908				
Liopsetta pinnifasciata 2k	MN888909	KF386376	KF445183		
Limanda sakhalinensis 72(2012)	MN888910	KF386382	KF445189		

Таблица 1. Окончание

Видовое название с лабораторным	Номер доступа в NCBI					
номером	<i>16S</i>	Co-I	Cyt-b			
Limanda sakhalinensis 71(2012)	MN888911	KF386381	KF445188			
Limanda sakhalinensis 69(2012)	MN888912					
Limanda sakhalinensis 68(2012)	MN888913					
Hippoglossus stenolepis HST12-4	MN888914					
Hippoglossus stenolepis HST12-3	MN888915					
Hippoglossus stenolepis HST12-2	MN888916					
Hippoglossus stenolepis HST12-1	MN888917					
Hippoglossoides robustus 289	MN888918	KF386414	KF445220			
Hippoglossoides robustus 288	MN888919	KF386413	KF445219			
Hippoglossoides robustus 286	MN888920	KF386411	KF445217			
Hippoglossoides elassodon 35	MN888921					
Hippoglossoides elassodon 34	MN888922	KF386418	KF445223			
Hippoglossoides elassodon 33	MN888923	KF386417	KF445222			
Hippoglossoides robustus 31	MN888924	KF386410	KF445216			
Hippoglossoides dubius 5k	MN888925					
Cleisthenes pinetorum 79-07	MN888926	KF386409	KF445215			
Cleisthenes pinetorum 78-07	MN888927	KF386408	KF445214			

Lepidopsetta mochigarei, как и ранее по короткому фрагменту, формирует неразрешенный узел, но топологически входит в трибу Microstomini.

Анализ реконструкции генных деревьев по объединенным последовательностям трех генов

Для данного анализа были сопоставлены выровненные последовательности участка гена 16S рРНК, а также генов Co-1 и Cyt-b. Последовательности были конкатенированы в MEGA-X и затем подвергнуты дальнейшему анализу. Согласно полученным данным ветвь Limanda sakhalinensis включена в подсемейство Hippoglossoidinae (рис. 3). Ветвь Cleisthenes pinetorum также включена в подсемейство Hippoglossoidinae (рис. 3).

Нуклеотидный состав

Соотношение пиримидинов (T, C) и пуринов (A, G) в генах *16S* pPHK, *Co-1* и *Cyt-b* отклонялись от соотношения 50 : 50 (Приложение, рис. 4). В последовательностях *16S* pPHK нет больших различий в соотношении пиримидинов (T, C) и пуринов (A, G), но можно наблюдать общую гетерогенность состава нуклеотидов с преобладанием C- и A-нуклеотидов (рис. 4,*a*). В случае *Co-1* и *Cyt-b* наблюдается статистически значимое отклонение в соотношении пиримидинов к пуринам с преобладанием пиримидинов (рис. 4,*б*, *в*).

ГЕНЕТИКА том 57 № 3 2021

АNOVA по каждому гену обнаружил, что различия для четырех нуклеотидов статистически значимые: для *16S* pPHK – F = 2147.9, d.f. = 3; 92, P < 0.0001; для *Co*-1 – F = 3673.3, d.f. = 3; 92, P < 0.0001; для *Cyt*-b – F = 4320.7, d.f. = 3; 92, P < 0.0001. Доля (T + C) : (A + G) для *16S* pPHK, *Co*-1 и *Cyt*-b составила 45.4 : 54.6, 56.5 : 43.5 и 61.1 : 38.9% соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как отмечено во введении, крупнейшим подсемейством в семействе является Pleuronectinae. Это подсемейство представлено двумя трибами – Місгоstomini и Pleuronectini. Согласно полученным данным по *16S* pPHK они не образуют монофилетические ветви (см. рис. 1, 2). Таким образом, систематика на уровне подсемейств нуждается в дальнейшем уточнении. Например для большего информационного сигнала необходимо увеличить число как ядерных, так и митохондриальных маркеров при исследовании. Это поможет уменьшить число неразрешенных топологически узлов полученных деревьев.

Как отмечалось, Дж. Купер и Ф. Чаплау [1] в своей ревизии этого семейства на основе традиционных признаков морфологии обосновали, что Pleuronectidae представляет монофилетическую группу. Монофилия камбаловых, установленная

РЕДИН, КАРТАВЦЕВ



Рис. 1. Укорененное генное дерево, показывающее филогенетические взаимосвязи на основе 62 коротких нуклеотидных последовательностей участка *16S* рРНК. Топология представлена на основе ML-реконструкции. В узлах даны значения поддержки для четырех способов реконструкции деревьев в порядке: BA/ME/NJ/ML. Для BA-дерева показаны апостериорные вероятности (%, $n = 10^6$ поколений), а для трех других реконструкций даны бутстреп-поддержки (k = 1000 реплик).

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОТНОШЕНИЯ КАМБАЛООБРАЗНЫХ РЫБ



Рис. 2. Топология укорененного NJ-дерева, показывающая филогенетические взаимоотношения на основании данных для 27 последовательностей участка гена *16S* рРНК. В узлах даны значения поддержек для ВА-древа (*n* = 10⁶ поколений) и трех других реконструкций в общем порядке: BA/ME/ML/NJ (k = 1000 реплик бутстрепа для трех последних методов реконструкции).

на основе классического подхода, соответствует во многих случаях молекулярно-филогенетическим реконструкциям в исследованиях этого семейства по таким маркерам как *12S* рРНК, *16S* рРНК, а также по генам *Co-1* и *Cyt-b* [4–6, 8, 9] и полному митогеному [10].

В подсемейство Hippoglossoidinae в наиболее представительном в работе материале вошли два из трех родов *Cleisthenes* (*C. pinetorum*) и *Hippoglossoides* (*H. dubius* Schmidt, 1904, *H. elassodon* Jordan & Gilbert, 1180, *H. robustus* Gill & Townsend, 1897) (рис. 3). Виды рода *Hippoglossoides* образуют смешанный кластер на ВА-дереве (рис. 3). На основании чего можно предположить, что два таксона *H. elassodon* и *H. robustus* являются синонимами одного вида. Синонимия *H. elassodon* и *H. robustus* уже предлагалась ранее на основании морфологических и молекулярно-филогенетических данных [4, 27–31]. По принципу старшинства можно принять валидным таксон видового ранга *H. elassodon* Jordan & Gilbert, 1180, а *H. robustus* Gill & Townsend, 1897 считать младшим синонимом этого вида. Предложение о сведении в синонимию *H. elassodon* и *H. robustus* уже сделано ранее, как

РЕДИН, КАРТАВЦЕВ



Рис. 3. Укорененное ML-дерево, показывающее филогенетические взаимоотношения на основании данных для 24 конкатенированных последовательностей участка гена *16S* pPHK, *Co-1* и *Cyt-b*. В узлах даны значения поддержек для ВА-древа ($n = 10^6$ поколений) и для трех других реконструкций в общем порядке: BA/NJ/ME/ML (k = 1000 реплик бутстрепа для трех последних методов реконструкции).

отмечено выше. Однако К.А. Винников с соавт. [31] в своем двустороннем анализе (морфология + + генетика) предлагают вновь ввести синонимию. Но синонимия так и не введена. В базах данных эти два таксона до сих пор фигурируют как самостоятельные виды. Одна из задач представленной статьи — заострить этот вопрос, с тем чтобы в специальной публикации наконец разрешить этот казус. Отдельного обсуждения заслуживают данные для рода *Limanda*. Последовательности вида *Limanda sakhalinensis* оказались, как отмечено в результатах и представлено на рис. 1–3, включены в ветвь подсемейства Hippoglossoidinae. В сравнительном анатомическом исследовании Дж. Купера и Ф. Чаплау [1] монофилия этого рода не была подтверждена. В нашем же исследовании, как и в


Рис. 4. Средние значения состава (%) четырех нуклеотидов в 24 исследованных последовательностях генов *16S* pPHK (*a*), *Co-1* (*b*) и *Cyt-b* (*b*). По результатам однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Вертикальные линии отмечают 95%-ный доверительный интервал.

предыдущих молекулярно-филогенетических исследованиях [4, 5, 10], *Limanda sakhalinensis* Hubbs, 1915 оказалась включена в подсемейство Hippoglossoidinae. Учитывая все эти данные, вполне уместно рекомендовать пересмотреть позицию *Limanda sakhalinensis* Hubbs, 1915, переместив ее в род *Hippoglossoides* с именем *Hippoglossoides* (Limanda) *sakhalinensis* в составе подсемейства Hippoglossoidinae. Соответственно, необходима ревизия морфологии и видовых признаков, а также диагностических ключей, что предполагается выполнить в самостоятельной работе.

Род Lepidopsetta (L. mochigarei) оказался включенным в трибу Pleuronectini, подсемейства Pleuronectiпае, тогда как в работе [1] этот род рассматривался исключительно в составе трибы Microstomini подсемейства Pleuronectinae. В молекулярно-филогенетических исследованиях на основе *Co-1* и *Cyt-b* [4, 5, 10] род *Lepidopsetta* рассматривался в трибе Pleuronectini. Таким образом, род *Lepidopsetta* предпочтительнее рассматривать в составе трибы Pleuronectini. Однако этот вопрос, учитывая слабый топологический сигнал для данной ветви по маркеру *16S* рРНК в работе, требует дальнейшего уточнения с использованием большего числа генов.

Смещение в соотношении (T + C) : (A + T) хорошо описано в литературе для многих белок-кодирующих генов [4, 32]. Представленный анализ (рис. 4, Приложение) показывает, что смещение для генов *Co-1* и *Cyt-b* в соотношении пуринов к пиримидинам значительно отличается от смещения для гена *16S* рРНК. Очевидно, что обнаруженное смещение нуклеотидного состава для изученных в работе структурных генов отражает гидрофобные свойства кодируемых ими белков [33]. Выяснение причины неоднородности нуклеотидного состава в последовательностях *16S* рРНК требует дальнейшего исследования.

Исследование финансово поддержано грантом РФФИ 15-29-02456-офи по направлению исследования генетических основ биоразнообразия, а также Дальневосточным отделением РАН — грант ДВ № 18-4-040 по тематике "Комплексное исследование биоразнообразия рыб и беспозвоночных животных на основе ДНК-штрих кодирования, разработки и поддержки баз данных и биобанкинга".

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

РЕДИН, КАРТАВЦЕВ

ПРИЛОЖЕНИЕ

Нуклеотидный состав для генов 16S рРНК, Co-1 и Cyt-b в 24 последовательностях камбалообразных рыб

Dury/Cramma anavang	Нуклеотиды, все позиции (% от общего числа)						
Вид/Средние значения	Т	С	А	G	суммарно (пн)		
16S рРНК							
Cleisthenes pinetorum 78-07	16.8	28.9	29.9	24.4	291		
Cleisthenes pinetorum 79-07	16.8	28.9	29.9	24.4	291		
Hippoglossoides elassodon 33	16.8	28.9	30.2	24.1	291		
Hippoglossoides elassodon 34	16.8	28.9	29.9	24.4	291		
Hippoglossoides robustus 286	16.8	28.9	30.2	24.1	291		
Hippoglossoides robustus 288	17.2	28.5	30.2	24.1	291		
Hippoglossoides robustus 289	16.8	28.9	30.2	24.1	291		
Hippoglossoides robustus 31	16.8	28.9	30.2	24.1	291		
Limanda sakhalinensis 71	16.8	28.9	29.9	24.4	291		
Limanda sakhalinensis 72	16.8	28.9	29.9	24.4	291		
Liopsetta pinnifasciata 13	17.5	27.8	31.6	23.0	291		
Liopsetta pinnifasciata 19-07	17.5	27.8	31.6	23.0	291		
Liopsetta pinnifasciata 20-07	17.5	27.8	31.6	23.0	291		
Liopsetta pinnifasciata 2k	17.5	27.8	31.6	23.0	291		
Myzopsetta punctatissima 37	17.2	27.5	32.3	23.0	291		
Myzopsetta punctatissima 86-07	17.2	27.5	32.3	23.0	291		
Platichthys stellatus 18-07	17.2	27.8	31.3	23.7	291		
Platichthys stellatus 4k	17.2	27.8	31.6	23.4	291		
Pseudopleuronectes herzensteini 05-07	17.5	27.8	32.0	22.7	291		
Pseudopleuronectes herzensteini 6k	17.5	27.8	32.0	22.7	291		
Pseudopleuronectes herzensteini 7k	17.5	27.8	32.0	22.7	291		
Pseudopleuronectes obscurus 09-07	17.2	28.2	32.0	22.7	291		
Pseudopleuronectes obscurus 45	16.8	28.2	32.0	23.0	291		
Pseudopleuronectes obscurus 46	17.2	28.2	32.0	22.7	291		
Среднее значение	17.14 ± 0.13	$\textbf{28.26} \pm \textbf{0.13}$	31.1 ± 0.13	23.5 ± 0.13	_		
		Co-1	1		1		
Cleisthenes pinetorum 78-07	29.4	27.5	23.6	19.5	1540		
Cleisthenes pinetorum 79-07	29.4	27.3	23.7	19.5	1540		
Hippoglossoides elassodon 33	29.3	27.6	24.0	19.2	1540		
Hippoglossoides elassodon 34	29.1	27.6	24.0	19.4	1540		
Hippoglossoides robustus 286	29.0	27.8	24.0	19.2	1540		
Hippoglossoides robustus 288	29.2	27.5	24.0	19.3	1540		
Hippoglossoides robustus 289	29.2	27.4	24.1	19.3	1540		
Hippoglossoides robustus 31	29.0	27.8	24.0	19.2	1540		
Limanda sakhalinensis 71	28.8	27.1	24.4	19.7	1540		
Limanda sakhalinensis 72	28.6	27.3	24.4	19.7	1540		
Liopsetta pinnifasciata 13	29.4	27.0	24.8	18.8	1540		
Liopsetta pinnifasciata 19-07	29.4	27.0	24.8	18.8	1540		
Liopsetta pinnifasciata 20-07	29.4	27.0	24.8	18.8	1540		
Liopsetta pinnifasciata 2K	29.4	27.0	24.8	18.8	1540		
Myzopsetta punctatissima 37	28.8	27.2	24.7	19.2	1540		
Myzopsetta punctatissima 86-07	28.8	27.2	24.7	19.2	1540		

ГЕНЕТИКА том 57 № 3 2021

Приложение. Продолжение

Вил/Сранина значания	Нуклеотиды, все позиции (% от общего числа)						
Бид/Средние значения	Т	С	А	G	суммарно (пн)		
Platichthys stellatus 18-07	29.0	27.2	24.8	19.0	1540		
Platichthys stellatus 4K	28.8	27.3	24.8	19.0	1540		
Pseudopleuronectes herzensteini 05-07	28.8	28.0	23.7	19.5	1540		
Pseudopleuronectes herzensteini 6K	28.7	28.0	23.7	19.6	1540		
Pseudopleuronectes herzensteini 7K	28.7	28.0	23.6	19.7	1540		
Pseudopleuronectes obscurus 09-07	29.3	26.9	24.5	19.2	1540		
Pseudopleuronectes obscurus 45	29.3	27.0	24.5	19.2	1540		
Pseudopleuronectes obscurus 46	29.4	27.1	24.5	19.1	1540		
Среднее значение	$\textbf{29.09} \pm \textbf{0.07}$	$\textbf{27.38} \pm \textbf{0.07}$	$\textbf{24.29} \pm \textbf{0.07}$	19.25 ± 0.07	_		
Cyt-b							
Cleisthenes pinetorum 78-07	30.8	30.9	22.5	15.9	1095		
Cleisthenes pinetorum 79-07	30.8	30.8	22.6	15.8	1095		
Hippoglossoides elassodon 33	30.3	31.2	22.2	16.3	1095		
Hippoglossoides elassodon 34	30.3	31.2	22.2	16.3	1095		
Hippoglossoides robustus 286	30.3	31.3	22.2	16.2	1095		
Hippoglossoides robustus 288	30.6	31.1	22.1	16.3	1095		
Hippoglossoides robustus 289	30.6	31.1	22.2	16.2	1095		
Hippoglossoides robustus 31	30.4	31.3	22.1	16.2	1095		
Limanda sakhalinensis 71	30.8	30.1	23.4	15.7	1095		
Limanda sakhalinensis 72	30.8	30.2	23.3	15.7	1095		
Liopsetta pinnifasciata 13	29.9	30.9	22.9	16.3	1095		
Liopsetta pinnifasciata 19-07	29.7	31.0	22.9	16.4	1095		
Liopsetta pinnifasciata 20-07	29.5	31.3	23.1	16.1	1095		
Liopsetta pinnifasciata 2K	29.8	30.9	23.0	16.3	1095		
Myzopsetta punctatissima 37	30.8	29.8	22.0	17.4	1095		
Myzopsetta punctatissima 86-07	30.8	29.9	22.1	17.3	1095		
Platichthys stellatus 18-07	30.0	30.6	22.6	16.7	1095		
Platichthys stellatus 4K	29.8	30.8	22.9	16.5	1095		
Pseudopleuronectes herzensteini 05-07	29.9	31.4	21.4	17.4	1095		
Pseudopleuronectes herzensteini 6K	30.0	31.0	21.6	17.4	1095		
Pseudopleuronectes herzensteini 7K	30.0	31.2	21.4	17.4	1095		
Pseudopleuronectes obscurus 09-07	30.5	30.1	22.6	16.7	1095		
Pseudopleuronectes obscurus 45	30.4	30.3	22.2	17.1	1095		
Pseudopleuronectes obscurus 46	30.4	30.1	22.6	16.9	1095		
Среднее значение	$\textbf{30.29} \pm \textbf{0.1}$	30.77 ± 0.1	$\textbf{22.42} \pm \textbf{0.1}$	16.52 ± 0.1	_		

Примечание. Средние значения приведены со стандартной ошибкой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Cooper J.A., Chapleau F.* Monophyly and intrarelationships of the family Pleuronectidae (Pleuronectiformes), with a revised classification // Fishery Bull. 1998. V. 96. № 4. P. 686–726.
- 2. *Keast A., Chapleau F.* A phylogenetic reassessment of the monophyletic status of the family Soleidae, with comments on the suborder Soleoidei (Pisces; Pleu-

ronectiformes) // Canad. J. Zool. 1988. V. 66. № 12. P. 2797–2810. https://doi.org/10.1139/z88-408

 Berendzen P.B., Dimmick W.W. Phylogenetic relationships of Pleuronectiformes based on molecular evidence // Copeia. 2002. V. 3. P. 642–52. https://doi.org/10.1643/0045-8511(2002)002[0642: PROPBO]2.0.CO;2

- Kartavtsev Y.P., Park T.-J., Vinnikov K.A. et al. Cytochrome b (Cyt-b) gene sequence analysis in six flatfish species (Teleostei, Pleuronectidae), with phylogenetic and taxonomic insights // Marine Biol. 2007. V. 152. № 4. P. 757–773. https://doi.org/10.1007/s00227-007-0726-9
- 5. *Kartavtsev Y.P., Sharina S.N., Goto T. et al.* Cytochrome oxidase 1 gene sequence analysis in six flatfish species (Teleostei, Pleuronectidae) of Far East Russia with inferences in phylogeny and taxonomy // Mitochondrial DNA. 2008. V. 19. P. 479–489. https://doi.org/10.1080/19401730802570934
- 6. *Pardo B.G., Machordom A., Foresti F. et al.* Phylogenetic analysis of flatfish (order Pleuronectiformes) based on mitochondrial 16S rDNA sequences // Scientia Marina. 2005. V. 69. № 4. P. 531–543.
- Шарина С.Н., Картавцев Ю.Ф. Филогенетический анализ камбал (Teleostei, Pleuronectiformes), основанный на исследовании нуклеотидных последовательностей гена цитохромоксидазы 1 (Co-1) // Генетика. 2010. Т. 46. № 3. С. 401–407.
- Betancur R.R., Munroe T.A., Ortí G. et al. Addressing gene tree discordance and non-stationarity to resolve a multi-locus phylogeny of the Flatfishes (Teleostei: Pleuronectiformes) // Syst. Biol. 2013. V. 62. P. 763– 785.

https://doi.org/10.1093/sysbio/syt039

 Betancur R.R., Ortí G. Molecular evidence for the monophyly of flatfishes (Carangimorpharia, Pleuronectiformes) // Mol. Phylogenet. and Evol. 2014. V. 73. P. 18–22.

https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.01.006

 Kartavtsev Y.Ph., Sharina S.N., Saitoh K. et al. Phylogenetic relationships of Russian Far Eastern Flatfish (Pleuronectiformes, Pleuronectidae) based on two mitochondrial gene sequences, Co-1 and Cyt-b, with inferences in order phylogeny using complete mitogenome data // Mitochondrial DNA. 2014. V. 27. № 1. P. 667–678.

https://doi.org/10.3109/19401736.2014.913139

- 11. Norman I.R. A systematic monograph of the flatfishes (Heterosomata). Volume I. Psettodidae, Bothidae, Pleuronectidae. London: British Museum, 1934. 459 p.
- Sakamoto K. Interrelationships of the family Pleuronectidae (Pisces: Pleuronectiformes) // Memoirs of the Fac. of Fisheries, Hokkaido University. 1984. V. 31. P. 95–215.
- Lindberg G.U., Fedorov V.V. Fishes of Japan Sea and nearby parts of Okhotsk and Yellow seas. Part 6. Teleostomi. Osteichthyes. Actinopterigii. XXXI. Pleuronectiformes. Sankt-Petersburg Univ. Press. Sankt-Petersburg. 1993. 272 p.
- Chapleau F. Pleuronectiform relationships: A cladistic reassessment // Bull. of Marine Sci. 1993. V. 52. № 1. P. 516–540.
- 15. Vernau O., Moreau C., Catzeflis F.M., Renaud F. Phylogeny of flatfishes (Pleuronectiformes): Comparisons and contradictions of molecular and morpho-anatomical data // J. Fish Biol. 1994. V. 45. № 4. P. 685–696. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1994.tb00934.x
- 16. Keith P., Lord C., Lorion J. et al. Phylogeny and biogeography of Sicydiinae (Teleostei: Gobiidae) inferred

from mitochondrial and nuclear genes // Marine Biol. 2011. V. 158. P. 311–326. https://doi.org/10.1007/s00227-010-1560-z

- 17. *Kearse M., Moir R., Wilson A. et al.* Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data // Bio-informatics. 2012. V. 28. № 12. P. 1647–1649. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199
- Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // Mol. Biol. and Evol. 2011. V. 28. № 10. P. 2731–2739. https://doi.org/10.1093/molbev/msr121
- 19. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // Nucl. Ac. Res. 1994. V. 22. № 22. P. 4673–4680. https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673
- *Kimura M.* A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // J. Mol. Evol. 1980.
 V. 16. P. 111–120. https://doi.org/10.1007/bf01731581
- Jukes T.H., Cantor C.R. Evolution of protein molecules // Mammalian Protein Metabolism. Volume III. N. Y.: Academic Press, 1969. P. 21–132. https://doi.org/10.1016/B978-1-4832-3211-9.50009-7
- Hasegawa M., Kishino H., Yano T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA // J. Mol. Evol. 1985. V. 22. P. 160–174. https://doi.org/10.1007/bf02101694
- Huelsenbeck J.P., Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees // Bioinformatics. 2001. V. 17. № 8. P. 754–755. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754
- Ronquist F., Huelsenbeck J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // Bioinformatics. 2003. V. 19. № 12. P. 1572–1574. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180
- 25. http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/
- 26. StatSoft, Inc. (1999). STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc. Available from: http://statsoft.ru/products/STATIS-TICA_Base/.
- Ivankov V.N., Vinnikov K.A., Borisovets E.E., Kartavtsev Y.P. Taxonomic relations between Pseudopleuronectes yokohamae and P. schrenki // Abstract of Conference for Educated Students, Science and Education Centre. Vladivostok: Far Eastern University Press, 2002. P. 69–70.
- 28. Картавцев Ю.Ф., Свиридов В.В., Ханзава Н., Сасаки Т. Генетическая дивергенция видов дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* (Pisces, Cyprinidae) и близких таксонов // Генетика. 2002. Т. 38. № 11. С. 1–14.
- 29. Винников К.А. О таксономическом статусе камбал *Hippoglossoides elassodon* и *H. robustus* (морфометрический анализ) // VI Региональная конференция по актуальным проблемам экологии, морской биологии и биотехнологии студентов, аспирантов,

молодых преподавателей и сотрудников вузов и научных организаций Дальнего Востока России. Тезисы докладов. Владивосток: Изд-во Дальневосточного университета, 2003. С. 25–26.

- 30. Винников К.А., Иванков В.Н., Питрук Д.Л. Таксономический статус японской лиманды Pseudopleuronectes yokohamae и лиманды Шренка P. schrenki (Pleuronectidae, по: Cooper, Chapleau, 1998) // Вопр. ихтиологии. 2006. Т. 46. № 3. С. 316–325.
- 31. Vinnikov K.A., Thomson R.C., Munroe T.A. Revised classification of the righteye flounders (Teleostei: Pleuronectidae) based on multilocus phylogeny with com-

plete taxon sampling // Mol. Phylogenet. and Evol. 2018. V. 125. P. 147–162. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.03.014

- 32. Kim I.C., Kweon H.S., Kim Y.J. et al. The complete mitochondrial genome of the javeline goby Acanthogobius hasta (Perciformes, Gobiidae) and phylogenetic considerations // Gene. 2004 V. 336. № 2. P. 147–153. https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.04.009
- 33. *Nailor G.J., Collins T.M., Brown W.M.* Hydrophobicity and phylogeny // Nature. 1995. V. 373. № 6515. P. 565–566. https://doi.org/10.1038/373565b0

Phylogenetic Relationships of Flounders from the Family Pleuronectidae (Ostichties: Pleuronectiformes) Based on 16S rRNA Gene

A. D. Redin^{*a*, *} and Yu. Ph. Kartavtsev^{*a*, **}

^aZhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology Far East Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690041 Russia *e-mail: shurko92@yandex.ru **e-mail: vuri.kartavtsev48@hotmail.com

The systematics and phylogeny of flatfish is investigated on the incomplete nucleotide sequence of *16S* rRNA and the complete *Co-1* and *Cyt-b* sequences. In total 62 specimens of 14 species of our own collections were submitted to the GenBank/BOLD repositories and studied. Four types of gene trees were reconstructed: Bayesian (BA), maximum likelihood (ML), minimum evolution (ME), and neighbor joining (NJ). These trees showed basically similar topology. Two separate branches on the trees support the previously identified subfamilies Hippoglossoidinae and Pleuronectinae with the monophyletic status of these taxa. The subfamily Pleuronectinae can be considered monophyletic, if the tribe Microstomini is excluded from it and genus *Lepidopsetta* is moved into the tribe Pleuronectini. Three sets of nucleotide sequences were formed and independently studied. One set included all the obtained *16S* rRNA gene sequences (291 bp), the second set included a sample of longer *16S* rRNA sequences (617 bp), the third set consisted of three gene sequences: *16S* rRNA, *Co-1* and *Cyt-b* (2926 bp). All three data sets gave similar phylogenetic signal, which consistent with the traditional concept of the taxonomy of the Pleuronectiformes order; however, the second and third sets provided better resolution of topology.

Keywords: Co-1, Cyt-b, 16S rRNA, flatfish, molecular phylogenetics.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 575.17

ИЗОЛЯЦИЯ РАССТОЯНИЕМ У СЕВЕРНЫХ ОСЕТИН

© 2021 г. Г. И. Ельчинова^{1, *}, В. В. Кадышев¹, Р. А. Зинченко^{1, 2}

¹Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, Москва, 115522 Россия ²Национальный научно-исследовательский институт общественного здоровья им. Н.А. Семашко, Москва, 105064 Россия

> **e-mail: elchinova@med-gen.ru* Поступила в редакцию 18.03.2020 г. После доработки 22.04.2020 г. Принята к публикации 17.06.2020 г.

Использована модель изоляции расстоянием Малеко для описания популяционной структуры населения Северной Осетии – Алании по 12308 брачным записям для популяции ранга "республика". Получен ряд положительных корреляций с результатами предыдущих исследований. Подтверждено отличие Моздокского р-на от остальных р-нов Республики.

Ключевые слова: изоляция расстоянием, осетины, инбредный ландшафт. **DOI:** 10.31857/S0016675821030073

Комплексное генетико-эпидемиологическое обследование населения Северной Осетии (Алании) (РСО) проводится с 2017 г. Исследования идут в соответствии с разработанным Протоколом [1], предусматривающим изучение генетической структуры как с использованием метолов клинической и молекулярной генетики, так и описание методами популяционной статистики. Обследование популяций русского Нечерноземья, Поволжья, южных российских популяций и народов Северного Кавказа проходило в соответствии с этим Протоколом. Результаты исследований полностью представлены в открытой печати как отечественной, так и зарубежной. Модель изоляции расстоянием Малеко [2] наряду с другими (планетарная, островная, лестничная и др.) неплохо отражает популяционно-генетические особенности изучаемого региона. Модель предполагает равномерное распределение населения по территории, изотропность миграций, отсутствие явных изоляционных барьеров и, как мы выяснили в наших исследованиях, однородный этнический состав населения. Население Кавказа не вполне соответствует указанным ограничениям, однако для популяции ранга "район" мы получили вполне приемлемый результат [3], в данной работе мы рассмотрели использование модели изоляции расстоянием для популяции ранга "республика", отобрав лишь осетинские внутриэтнические браки. Модель успешно использована для популяции ранга "республика" при изучении Казахстана [4].

Из тотальной выборки брачных записей за 1990–2000 гг. по всей РСО отобраны те, в которых

оба супруга осетины. Измерения и расчеты выполнены стандартным образом [5, 6]. Часть брачных записей не содержала полной информации о местах рождения супругов (например, указано только "Ставропольский край"), что сделало невозможным точное измерение расстояния брачной миграции. Кроме этого, многие мелкие населенные пункты, еще существовавшие полвека назад, когда в основном родились брачующиеся в 90-е годы, исчезли к настоящему времени; в этом случае измерение проводилось с точностью до райцентра. Тем не менее, в анализ вошли 13935 брачных записей, из которых 12308 по дальности не превышали 500 км, что оптимально при использовании модели изоляции расстоянием.

В табл. 1 представлены значения параметров изоляции расстоянием Малеко для осетин. Коэффициент линейной корреляции средней квадратичной миграции о и индекса эндогамии осетин [7] ожидаемо отрицателен и значим $-r = -0.81 \pm 0.22$. Локальный инбридинг а не коррелирует со значением случайного инбридинга $F_{\rm st}$ ($r = -0.30 \pm 0.36$), оба вектора значений определены для популяции ранга "район". Учитываем, что случайный инбридинг подсчитан по всему списку фамилий, а в Моздокском р-не осетины составляют лишь 10% населения. Исключив из корреляционного анализа этих показателей значения по Моздокскому р-ну, получаем ожидаемо положительное и значимое значение коэффициента корреляции ($r = 0.72 \pm$ ± 0.28). Не обнаружено корреляции локального инбридинга и индекса эндогамии ($r = 0.09 \pm 0.37$); при исключении Моздокского р-на коэффициент корреляции возрастает до $r = 0.92 \pm 0.16$.

Осетины	N _e	σ	а	b
Моздокский район	2810	102.6	0.001603	0.003572
Дигорский район	5693	55.1	0.000531	0.013578
Кировский район	8469	73.4	0.000334	0.006798
Правобережный район	16672	65.8	0.000172	0.007717
Ардонский район	8532	69.2	0.000380	0.006628
Алагирский район	11914	65.1	0.000240	0.008495
Ирафский район	4964	43.6	0.000725	0.012476
Пригородный район	24307	73.3	0.000149	0.005612
Владикавказ город	65482	78.2	0.000048	0.006401

Таблица 1. Параметры изоляции расстоянием Малеко для осетин (популяция ранга "район"), длина миграции не превышает 500 км

По оригинальной метрике рассчитана и составлена дистанционная матрица с использованием параметров изоляции расстоянием Малеко [8]. Коэффициент корреляции этой матрицы с матрицей фамильных дистанций составил 0.74 \pm \pm 0.12, то есть ожидаемо положителен и значим. Влияние полиэтничного Моздокского р-на нивелировано тем, что фамильные дистанционные матрицы рассчитываются не по всему списку фамилий, а лишь по частым (частота более 0.1%). Схема инбредного ландшафта представлена на рис. 1. Реальные значения инбредных дистанций



Рис. 1. Схема инбредного ландшафта Северной Осетии – Алании.

увеличены в 1000 раз. Концентричные эквидистантные фигуры без самопересечений, ориентированы вдоль основных путей сообщения. Центром кластеризации является Владикавказ. Единственным недостатком схемы можно считать отсутствие явного разделения субэтнических групп осетин (иронцев и дигорцев) на два кластера, но тем не менее, центральный кластер с уровнем 0.10 является "иронским", а "дигорские" районы присоединяются к нему значительно позже, что не противоречит логике. Кроме того, при использовании разнообразных математических моделей может акцентироваться внимание на различных элементах популяционной структуры, что неизбежно приведет как к неполным корреляциям, так и к несовпадающим графическим образам. Моздокский р-н, отличающийся от остальных районов РСО по многим параметрам [7, 9], на этой схеме также отдален. До 1944 г. Моздок входил в состав Ставропольского края [10].

Таким образом, модель изоляции расстоянием Малеко можно принять для описания инбредной структуры североосетинских популяций. Проведенный анализ параметров изоляции расстоянием опять выявил отличие Моздокского р-на от остальных районов Северной Осетии – Алании.

Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ № 17-15-01051 и государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ.

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.

Настоящее генетико-эпидемиологическое исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ "МГНЦ" (протокол № 7 от 20.12.2017). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зинченко Р.А., Куцев С.И., Александрова О.Ю., Гинтер Е.К. Основные методологические подходы к выявлению и диагностике моногенных наследственных заболеваний и проблемы в организации медицинской помощи и единых профилактических программ // Пробл. соц. гигиены, здравоохранения и истории медицины. 2019. Т. 27. № 5. С. 865–877.

https://doi.org/10.32687/0869-866X-2019-27-5-865-877

- Malécot G. Isolation by distance // Genetic Structure of Population / Ed. Morton N.E. Honolulu: Univ. of Hawaii Press, 1973. P. 72–75.
- 3. *Ельчинова Г.И., Джаджиева М.Ю., Гетоева З.К. и др.* Осетинские фамилии как генетический маркер // Генетика. 2019. Т. 55. № 7. С. 849–853. https://doi.org/10.1134/S001667581906002X
- 4. Березина Г.М., Ельчинова Г.И., Святова Г.С., Абдуллаева А.М. Параметры изоляции расстоянием Малеко и индекс эндогамии в сельских популяциях Казахстана // Мед. генетика. 2005. Т. 4. № 3. С. 103–107.
- 5. *Morton N.E.* Isolation by distance in human populations // Ann. Hum. Genet. 1977. V. 40. P. 361–365.
- Ельчинова Г.И. Методы обработки популяционногенетических данных: структура брачных миграций // Мед. генетика. 2004. Т. З. № 4. С. 185–192.
- Ельчинова Г.И., Кадышев В.В., Гетоева З.К. и др. Эндогамность населения Северной Осетии (конец XX века) // Генетика. 2020. Т. 56. № 7. С. 855–860.
- 8. *Ельчинова Г.И.* Метрика, построенная через параметры изоляции расстоянием Малеко, как характеристика генетического сходства популяций // Генетика. 2000. Т. 36. № 6. С. 856–858.
- 9. Ельчинова Г.И., Кадышев В.В., Гетоева З.К. и др. Картографический анализ случайного инбридинга и фамильной структуры населения Северной Осетии // Генетика. 2020. Т. 56. № 8. С. 969–973.
- 10. https://ru.wikipedia.org/wiki/Моздок (18 марта 2020 г.).

Isolation by Distance in North Ossetians

G. I. El'chinova^{*a*, *}, V. V. Kadyshev^{*a*}, and R. A. Zinchenko^{*a*, *b*}

^aResearch Centre for Medical Genetics, Moscow, 115522 Russia ^bSemashko National Research Institute of Public Health, Moscow, 105064 Russia *e-mail: elchinova@med-gen.ru

The model of Malékot of isolation by distance was used to describe the population structure of the population of North Ossetia- Alania based on 12308 marriage records for a population of the rank "Republic." A number of positive correlations were obtained with the results of previous studies. The difference between Mozdok district and other districts of the Republic is confirmed.

Keywords: isolation by distance, Ossetians, inbred landscape.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 575.17:582.632.2

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ СЕВЕРНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО РОССИИ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ АНАЛИЗА НОВЫХ МАРКЕРОВ SNP

© 2021 г. Б. Деген¹, Ю. А. Янбаев^{2, *}, Р. Ю. Янбаев^{2, 3}, С. Ю. Бахтина², А. А. Габитова^{2, 3}, А. А. Тагирова^{2, 3}

¹Институт лесной генетики, Гроссгансдорф, 22927 Германия ²Башкирский государственный аграрный университет, Уфа, 450001 Россия ³Башкирский государственный университет, Уфа, 450076 Россия *e-mail: Yanbaev_ua@mail.ru Поступила в редакцию 20.04.2020 г. После доработки 27.07.2020 г. Принята к публикации 25.08.2020 г.

Изучен генофонд популяций дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) из севера российской части ареала вида с использованием набора из 94-х SNP-локусов, разработанных по технологии секвенирования ДНК нового поколения ddRAD. Обнаружен близкий уровень генетического разнообразия в изолированных насаждениях с малой численностью деревьев (наблюдаемая гетерозиготность $H_0 = 0.334 \pm 0.004$, ожидаемая гетерозиготность $H_E = 0.313 \pm 0.011$, аллельное разнообразие $\upsilon_a = 1.540 \pm 0.021$, коэффициент инбридинга $F_{IS} = -0.067$) и в сравнительно больших по объему популяциях ($H_0 = 0.318 \pm 0.012$, $H_E = 0.306 \pm 0.010$, $\upsilon_a = 1.53 \pm 0.021$, $F_{IS} = -0.039$). Выявлен статистически достоверный уровень генетической дифференциации и фиксации популяций (delta_T = 0.0993, генетические расстояния Грегориуса $d_0 = 0.104 - 0.144$, $F_{ST} = 0.0725$). Байесовский кластерный анализ позволил идентифицировать генетически своеобразные популяции. Полученные результаты обсуждены с учетом истории распространения дуба черешчатого на севере ареала.

Ключевые слова: дуб черешчатый, SNP, генофонд, популяция. **DOI:** 10.31857/S001667582103005X

Глобальное изменение климата вызывает изменение ареалов многих видов, что обусловливает интерес к изучению генетической основы этого явления [1, 2]. Формирование генофондов географически краевых популяций происходит в условиях ограничения генетического потока, уменьшения популяционной плотности и численности, вследствие чего на границах ареалов смещается баланс векторов естественного отбора, более выраженной становится роль дрейфа генов [3]. Эти процессы являются мощным драйвером динамики генетического разнообразия популяций — важного ресурса, необходимого для выживания видов в экологически неблагоприятной среде [4]. Применение молекулярно-генетических маркеров позволило выявить, что на границах ареалов генетическое разнообразие чаще понижается на фоне повышения межпопуляционной подразделенности. Это в свою очередь подтверждает так называемую "центрально-маргинальную" гипотезу [5]. Данный феномен в целом подтверждается и для дуба черешчатого [3, 6] – экологически и эконо-

мически важного вида с широким континентальным ареалом. Появление технологий секвенирования ДНК нового поколения [7] позволяет разрабатывать большие наборы локусов SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Это дает возможность возвращения к изучению генофондов краевых популяций на границах ареалов на новом уровне [8, 9]. В обширной российской части ареала генетические ресурсы дуба черешчатого изучены в целом фрагментарно [10]. Необходимость восполнения этого пробела диктуется также массовой деградацией дубрав – лишь за последние полвека площадь дубрав в России уменьшилась почти на четверть [11]. Этот негативный процесс серьезно затронул насаждения на границах ареала, особенно на севере.

Цель работы — исследование генетического разнообразия и дифференциации северных популяций дуба черешчатого в российской части ареала вида на основе анализа разработанных нами 94-х локусов SNP.



Рис. 1. Карта расположения (а) и кластеризация выборок (б) дуба черешчатого.

Для разработки SNP-маркеров использована технология секвенирования ДНК нового поколения ddRAD (Double Digest Restriction Site Associated DNA) [7]. В целях поиска маркеров с наибольшим "географическим сигналом" компанией Floragenex (Портланд, США) по нашему заказу секвенированы образцы ДНК 95 деревьев *Q. robur* и *Q. petraea* Liebl. из Австрии, Белоруссии, Бельгии, Венгрии, Великобритании, Германии, Дании, Польши, Словакии, Турции, Украины и России. Обнаруженные 26074 локусов SNP прошли процедуру оптимизации [12]. В этой работе использован набор из наиболее информативных 94-х локусов.

Информация по площадям широколиственных лесов и дубрав в северной части ареала дуба черешчатого получена из базы данных "Леса России" ФГБУ "РОСЛЕСИНФОРГ" (http:// 178.176.30.40:8282/#/). Исследования проведены на базе двух групп насаждений дуба черешчатого лесной зоны (рис. 1, табл. 1). Первая из них (группа 1) представлена сравнительно большими по площадям дубравами из Владимирской и Кировской обл., Республики Марий Эл (пробные площади Vld_2, Kir_1 и Mar). Вторая группа (2) пробных площадей (Kst_2, Tvr_2, Vlg_1) заложена в географически изолированных фрагментах широколиственных лесов в Костромской, Тверской и Вологодской обл. на крайнем северном пределе распространения этой формации. На этой территории дуб черешчатый встречается в составе насаждений в основном в виде небольших изолированных древостоев и групп деревьев. В отличие от насаждений группы 1 здесь сравнительно мало широколиственных лесов (табл. 1, показатель S2), в составе которых обычно встречается дуб черешчатый. На всех пробных площадях случайным образом отобраны по десять деревьев репродуктивного возраста. Показано, что применение сравнительно большого числа локусов SNP дает возможность корректного определения показателей генетического разнообразия популяций и уровня их генетической подразделенности в выборках даже меньшего объема. Деревья располагались друг от друга на расстоянии не менее 50 м для минимизации возможной семейной генетической кластеризации [13].

Параметр	Группа 1			Группа 2			Y
	Vld_2	Kir_1	Mar	Kst_2	Tvr_2	Vlg_1	л _{ср}
S 1	104601	93359	131171	157434	187064	225126	149792
S2	6069 (5.80)	1865 (2.00)	6729 (5.13)	333 (0.22)	79 (0.04)	72 (0.03)	1730
S 3	2772 (2.65)	567 (0.61)	1262 (0.96)	150 (0.10)	14 (0.01)	_	794
Р	91.5	83.0	91.5	85.1	90.4	92.6	89.0
H _O	0.339 (0.026)	0.298 (0.025)	0.318 (0.025)	0.336 (0.027)	0.326 (0.023)	0.339 (0.025)	0.326 (0.007)
$H_{\rm E}$	0.322 (0.017)	0.310 (0.019)	0.287 (0.018)	0.290 (0.019)	0.321 (0.017)	0.327 (0.017)	0.310 (0.007)
υ_a	1.56 (0.04)	1.54 (0.04)	1.49 (0.04)	1.50 (0.04)	1.55 (0.0344)	1.57 (0.04)	1.53 (0.01)
F _{IS}	-0.035	0.060	-0.096	-0.122	-0.010	-0.034	-0.052

Таблица 1. Площади насаждений, уровни генетической изменчивости и дифференциации популяций дуба черешчатого

Примечание. Х_{ср} – среднее значение, S1 – лесопокрытая площадь лесничеств, в которых отобраны выборки, S2 – площадь широколиственных лесов, S3 – площадь насаждений с преобладанием дуба черешчатого (в скобках для S2 и S3 приведены доли от S1 в %); *P* – доля полиморфных локусов в %, *H*_O – наблюдаемая гетерозиготность, *H*_E – ожидаемая гетерозиготность, υ_a – аллельное разнообразие (в скобках приведены ошибки средних *H*_O, *H*_E и υ_a), *F*_{IS} – коэффициент инбридинга.

ДНК для лабораторных анализов выделялась из камбия модельных деревьев согласно модифицированного протокола [14]. Генотипирование проведено на платформе MassARRAY®iPLEX™ (Agena BioscienceTM) с использованием технологии iPLEXTMGOLD chemistry. Интерпретация спектров осуществлялась на устройстве Typer Viewer v. 4.0.24.71 (Agena BioscienceTM). Результаты обрабатывались с применением программ PAST [15] и GDA NT (Б. Деген, неопубл.). Вычислялись аллельное разнообразие v_a [16], наблюдаемая гетерозиготность H₀, ожидаемая гетерозиготность $H_{\rm E}$, параметры *F*-статистики Райта $F_{\rm IS}$ и $F_{\rm ST}$ [17], показатели дифференциации популяций delta_T и $\delta_{\rm T}$, генетическое расстояние d_0 [16, 18]. Визуализация генетических различий популяций обеспечивалась построением дендрограммы на основе генетических расстояний d₀ с применением программы PAST [15] и метода UPGMA. Для определения числа генетических групп в изученных шести локальностях использованы байесовский метод кластеризации и программа STRUCTURE v. 2.3.4 [19]. Оптимальное число генетических кластеров оценивалось методом ΔК [20]. Полученные результаты проанализированы и графи-

ГЕНЕТИКА том 57 № 3 2021

чески представлены с помощью программы CLUMPAK [21].

Изученные выборки представляют две группы популяций, контрастно отличающиеся объемами и по эффективной численности особей (табл. 1). Но их генетические параметры не подтверждают однозначно "центрально-маргинальную" гипотезу [5]. В относительно больших популяциях (в среднем $H_0 = 0.318 \pm 0.012$, $H_E = 0.306 \pm 0.010$, $v_a =$ $= 1.530 \pm 0.021, F_{IS} = -0.067$) и в изолированных малых насаждениях (группа 2: $H_0 = 0.334 \pm 0.004$, $H_{\rm E} = 0.313 \pm 0.011$, $v_{\rm a} = 1.540 \pm 0.021$, $F_{\rm IS} = -0.039$) выявлены близкие величины генетического разнообразия. Похожий феномен выявлен нами [22] при использовании предположительно селективно нейтральных микросателлитных локусов в географически изолированной зауральской популяции дуба черешчатого. Гетерозиготность в имеющихся 27 деревьях репродуктивного возраста была даже выше, чем в популяциях из центра ареала в Германии. Реконструкция возможных родительских пар аллелей в зародышах показала, что в популяции по крайней мере 35% опыления осуществлялось за счет "чужеродной" пыльцы (восточная граница ареала расположена западнее, в десятках километров). По этой причине ведущим факто-

ром поддержания сравнительно высокой генетической изменчивости в зауральской популяции признан генетически эффективно реализованный поток пыльшы на дальние расстояния. Возможно этот же сценарий реализован и в краевых популяциях дуба черешчатого на северной границе ареала дуба черешчатого в Костромской, Тверской и Вологодской обл. Еще одной причиной сравнительно высокого генетического разнообразия в северных дубравах может быть то, что снижение эффективной численности популяций могло произойти здесь лишь в исторически недавнее время. По данным палеографических исследований граница широколиственных лесов ранее располагалась севернее и сместилась из-за климатических изменений на юг на 300-700 км до современного предела только в позднем голоцене [23]. Сокращение площадей дубовых насаждений стало существенным лишь в прошлом тысячелетии из-за все возрастающего хозяйственного освоения территорий [24], а в XX в. из-за комплекса факторов – аномально холодных зим, сопровождающихся вспышками энтомовредителей и фитопатогенов [11]. Возможно поэтому, с учетом долголетия дуба черешчатого, феномен снижения генетического разнообразия в малых изолированных краевых популяциях [5] в северных дубравах еще не наблюдается.

В исследованных популяциях выявлен сравнительно небольшой, но статистически достоверный уровень межпопуляционной дифференциации (delta_T = 0.0993, $F_{\rm ST}$ = 0.0725). Генетические расстояния d₀ между популяциями варьируют в пределах 0.104—0.144 (в среднем $d_0 = 0.125 \pm 0.003$). Они были статистически недостоверными лишь для пар выборок Kir_1/Vlg_1 ($d_0 = 0.104$), Tvr_2/Vlg_1 ($d_0 = 0.112$) и Vld_2/Vlg_1 ($d_0 = 0.104$). Наибольший вклад в общую межпопуляционную дифференциацию вносят дубравы из Республики Марий Эл и Костромской обл. Генетические расстояния в парах с участием выборок Mar и Kst_2 составили значения $d_0 = 0.134 \pm 0.004$ и $d_0 = 0.131 \pm$ ± 0.005 соответственно. Между остальными парами популяций величина показателя снижается до $d_0 = 0.120 \pm 0.003$. Показатель дифференциации популяций (в среднем $\delta_{\rm T} = 0.099 \pm 0.005$) в выборках Vld_2, Kir_1, Tvr_2 и Vlg_1 составляет значения 0.094 ± 0.009, 0.094 ± 0.008, 0.096 ± 0.010 и 0.084 ± 0.007 соответственно. У выборок Mar ($\delta_{\rm T} =$ $= 0.116 \pm 0.010$) и Kst_2 ($\delta_{T} = 0.111 \pm 0.010$) они выше на 26.1 и 20.7%. Сравнительная высокая генетическая подразделенность некоторых соседствующих популяций (выборки Vlg_1 и Kst_2, Mar и Kir 1) и относительная близость генофондов в географически удаленных насаждениях (Vld 2,

Vlg_1, Kir_1) противоречат модели "изоляции расстоянием", связь географических и генетических расстояний отсутствуют. Наглядно этот феномен демонстрирует кластеризация выборок (рис. 1, δ). Анализ в программе STRUCTURE 2.3.4 показывает выраженные различия популяций, особенно Mar и Kst_2.

В работе [24] проведен анализ информации о содержания пыльцы древесных растений в Восточной Европе за последние 12 500 лет. На территории от Приволжской возвышенности до запада Украины выявлены семь основных рефугиумов, где дуб черешчатый присутствовал за весь анализируемый период и в зависимости от состояния климата периодически осуществлял экспансию на север. Динамика популяционных волн не происходила исключительно фронтально, распространение вида часто осуществлялось по поймам разветвленной сети рек из-за большей экологической благоприятности речных экосистем для семенного размножения и сохранности вида [25].

В настоящей работе по локусам SNP на исследованной территории выявлено отсутствие закономерной популяционно-генетической структуры дуба черешчатого на северной части ареала, существование генетически своеобразных популяций. Возможно этот феномен вызван множественностью и разновозрастностью рефугиумов [24, 26], сложностью путей миграции дуба черешчатого из ледниковых убежищ на север [27]. Наше исследование доказывает необходимость аналогичных исследований в других частях ареала, что позволит сложить "пазл" генофондов локальных популяций дуба черешчатого в России в единую геногеографическую картину. Кроме несомненной научной значимости таких работ, они актуальны в интересах лесного хозяйства – для научно обоснованного ведения лесосеменного и лесокультурного дела, создания и эксплуатации объектов Единого генетико-селекционного комплекса и др.

Исследование проведено за счет гранта Российского научного фонда № 19-16-00084.

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. *Alberto F.G., Aitken S.N., Alía R. et al.* Potential for evolutionary responses to climate change – evidence from

ГЕНЕТИКА том 57 № 3 2021

tree populations // Global Change Biol. 2013. V. 19(6). P. 1645–1661. https://doi.org/10.1111/gcb.12181

- Parmesan C. Ecological and evolutionary responses to recent climate change // Ann. Rev. Ecol. Evol. and Systematics. 2006. V. 37. P. 637–666. https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110100
- Pohjanmies T., Elshibli S., Pulkkinen P. et al. Fragmentation-related patterns of genetic differentiation in pedunculate oak (*Quercus robur*) at two hierarchical scales // Silva Fennica. 2015. V. 50(2). https://doi.org/10.14214/sf.1510
- 4. *Aitken S.N., Yeaman S., Holliday J.A. et al.* Adaptation, migration or extirpation, climate change outcomes for tree populations // Evol. Applications. 2008. V. 1. P. 95–111.

https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2007.00013.x

- Eckert C.G., Samis K.E., Lougheed S.C. Genetic variation across species' geographical ranges, the central-marginal hypothesis and beyond // Mol. Ecol. 2008. V. 17. P. 1170–1188. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03659.x
- Petit R.J., Csaikl U.M., Bordacs S. et al. Chloroplast DNA variation in European white oaks – phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations // Forest Ecol. and Management. 2002. V. 156. P. 5–26. https://doi.org/10.1016/S0378-1127(01)00645-4
- Peterson B.K., Weber J.N., Kay E.H. et al. Double Digest RADseq: An inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species // PLoS One. 2012. V. 7. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037135
- Ahrens C.W., Byrne M., Rymer P.D. Standing genomic variation within coding and regulatory regions contributes to the adaptive capacity to climate in a foundation tree species // Molecular Ecology. 2019. V. 28(10). P. 2502–2516. https://doi.org/10.1111/mec.15092
- Leroy T., Louvet J.M., Lalanne C. et al. Adaptive introgression as a driver of local adaptation to climate in European white oaks // New Phytologist. 2019. https://doi.org/10.1111/nph.16095
- Degen B., Yanbaev R., Yanbaev Y. Genetic differentiation of *Quercus robur* in the South-Ural // Silvae Genetica. 2019. V. 68(1). P. 111–115. https://doi.org/10.2478/sg-2019-0019
- 11. *Царалунга В.В., Фурменкова Е.С., Крюкова А.А.* Внешние признаки патологии дуба черешчатого. Воронеж: ВГЛТУ, 2015. 231 с.
- Blanc-Jolivet C., Bakhtina S., Yanbaev R. et al. Development of new SNPs loci on Quercus robur and Quercus petraea for genetic studies covering the whole species' distribution range // Conservation Genet. Res. 2020. https://doi.org/10.1007/s12686-020-01141-z
- 13. Willing E.-M., Dreyer C., van Oosterhout C. Estimates of genetic differentiation measured by FST do not neces-

sarily require large sample sizes when using many SNP markers // PLoS One. 2012. V. 7(8). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042649

- Dumolin S., Demesure B., Petit R.J. Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method // Theoretical Applied Genetics. 1995. V. 91. P. 1253–1256.
- Hammer O., Harper D., Ryan P. PAST: Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis // Palaeontolia Electronica. 2001. V. 4. P. 1–9.
- 16. *Gregorius H.R.* The relationship between the concepts of genetic diversity and differentiation // Theor. Applied Genetics. 1987. V. 74. P. 397–401.
- Weir B.S., Cockerham C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure // Evolution. 1984. V. 38. P. 1358–1370.
- Gregorius H.R. A unique genetic distance // Biometrical J. 1984. V. 26(1). P. 13.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data // Genetics. 2000. V. 155(2). P. 945–959.
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUC-TURE: A simulation study // Molecular Ecology. 2005. V. 14. P. 2611–2620. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x
- Kopelman N.M., Mayzel J., Jakobsson. M. et al. Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K // Molecular Ecology Res. 2015. V. 15(5). P. 1179–1191. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12387
- Bushbom J., Yanbaev Y., Degen B. Efficient long-distance gene flow into an isolated relict oak stand // J. Heredity. 2011. V. 102(4). P. 464–472. https://doi.org/10.1093/jhered/esr023
- 23. *Нейштадт М.И.* История лесов и палеогеография СССР в голоцене. М.: Изд-во АН СССР. 1957. 403 с.
- 24. *Кожаринов А.В., Борисов П.В.* Распространение дубовых лесов на территории Восточной Европы за последние 13 тысяч лет // Лесоведение. 2012. № 5. С. 22–28.
- 25. Денисов А.К. Послеледниковая динамика северной границы ареала дуба черешчатого в СССР и филогенез дубрав севера // Лесоведение. 1980. № 1. С. 3–11.
- Горчаковский П.Л. Растения европейских широколиственных лесов на восточном пределе их ареала // Тр. Ин-та экологии растений и животных. Вып. 59. Свердловск, 1968. 208 с.
- 27. *Семериков Л.Ф.* Популяционная структура древесных растений (на примере дуба Европейской части СССР и Кавказа). М.: Наука, 1986. 140 с.

ГЕНЕТИКА том 57 № 3 2021

Genetic Diversity and Differentiation of Northern Populations of Pedunculate OAK Based on Analysis of New SNP Markers

B. Degen^{*a*}, Y. A. Yanbaev^{*b*, *}, R. Y. Ianbaev^{*b*, *c*}, S. Y. Bakhtina^{*b*}, A. A. Gabitova^{*b*, *c*}, and A. A. Tagiriva^{*b*, *c*}

^aInstitute of Forest Genetics, Grosshansdorf, 22927 Germany ^bBashkir State Agrarian University, Ufa, 450001 Russia ^cBashkir State University, Ufa, 450076 Russia *e-mail: Yanbaev_ua@mail.ru

The gene pool of populations of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) from the North of the Russian part of the species' range was studied using a set of 94 SNP loci. They were developed using the new generation DNA sequencing technology (ddRAD). Similar levels of genetic diversity was found in isolated stands with a small number of trees (expected heterozygosity $H_E = 0.313 \pm 0.011$, observed heterozygosity $H_O = 0.334 \pm 0.004$, allelic diversity $v_a = 1.540 \pm 0.021$, coefficient of inbreeding $F_{IS} = -0.067$) and in relatively large populations ($H_E = 0.306 \pm 0.010$, $H_O = 0.318 \pm 0.012$, $v_a = 1.530 \pm 0.021$, $F_{IS} = -0.039$). Statistically significant levels of inter-population differentiation and population fixation (delta_T = 0.099; $F_{ST} = 0.0725$) were detected. Bayesian cluster analysis allowed identifying genetically distinct genetic groups. The results obtained are discussed taking into account the history of the distribution of pedunculate oak in the North of its range.

Keywords: pedunculate oak, SNP, gene pool, population.