

---

# БАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

ОСНОВАН В 1997 г.

Том 17  
**4/2**

Декабрь 2013

---

# VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

FOUNDED IN 1997

Vol. 17  
**4/2**

December 2013

---

«Вавиловский журнал генетики и селекции» / «Vavilov Journal of Genetics and Breeding» до 2011 г. выходил под названием «Информационный вестник ВОГиС» / «The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists».

«Вавиловский журнал генетики и селекции» включен ВАК Минобрнауки России в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук (по биологическим наукам).

(Редакция 17 июня 2011 г.: <http://vak.ed.gov.ru>)

«Вавиловский журнал генетики и селекции» включен в федеральный почтовый Объединенный каталог «ПРЕССА РОССИИ».

Персональный подписной индекс № 42153.

---

## Адрес редакции:

«Вавиловский журнал генетики и селекции»,  
ИЦиГ СО РАН,  
Проспект Академика Лаврентьева, 10,  
Новосибирск, 630090

Факс: (383) 3331278

e-mail: [vavilov\\_journal@bionet.nsc.ru](mailto:vavilov_journal@bionet.nsc.ru)

Ответственный секретарь редакции:

С.В. Зубова,

тел. 363-4922 \*1351

Регистрационное свидетельство ПИ № ФС77-45870  
выдано Федеральной службой по надзору в сфере  
связи, информационных технологий и массовых  
коммуникаций 20 июля 2011 г.

При перепечатке материалов ссылка на журнал  
обязательна.

© Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт цитологии и  
генетики Сибирского отделения Российской  
академии наук, 2013

© Вавиловский журнал генетики и селекции, 2013

© Сибирское отделение Российской академии  
наук, 2013

### Содержание

<i>В.К. Шумный</i> ЭТЮДЫ ПО ИСТОРИИ ГЕНЕТИКИ.....	782
<i>С.Г. Инге-Вечтомов</i> ПРОБЛЕМА ИЗМЕНЧИВОСТИ. ФЕНОМЕНОЛОГИЯ И МЕХАНИЗМЫ.....	791
<i>Б.Ф. Ванюшин</i> ЭПИГЕНЕТИКА СЕГОДНЯ И ЗАВТРА .....	805
<i>Н.А. Колчанов, Е.В. Игнатъева, О.А. Подколотная, В.А. Лихошвай, Ю.Г. Матушкин</i> ГЕННЫЕ СЕТИ.....	833
<i>С.Л. Киселев, М.А. Лагарькова</i> СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ И ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ.....	851
<i>П.М. Бородин</i> ЭВОЛЮЦИЯ ПУТЕМ ЕСТЕСТВЕННОГО ОТБОРА И ЕЕ АЛЬТЕРНАТИВЫ.....	864
<i>О.В. Трапезов</i> ДОМСТИКАЦИЯ КАК САМОЕ РАННЕЕ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЕ ДОСТИЖЕНИЕ ЧЕЛОВЕЧЕСТВА ....	872
<i>Н.П. Гончаров</i> ДОМСТИКАЦИЯ РАСТЕНИЙ .....	884
<i>Ю.А. Столповский</i> ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СОХРАНЕНИЯ ГЕНОФОНДОВ ДОМСТИЦИРОВАННЫХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ.....	900
<i>А.В. Родионов</i> ПОЛИПЛОИДИЯ И МЕЖВИДОВАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ В ЭВОЛЮЦИИ ЦВЕТКОВЫХ РАСТЕНИЙ.....	916
<i>С.А. Боринская, Н.К. Янковский</i> ГЕНЕТИКА И ГЕНОМИКА ЧЕЛОВЕКА. ПОПУЛЯЦИИ И ЭТНОСЫ В ПРОСТРАНСТВЕ И ВРЕМЕНИ: ЭВОЛЮЦИОННЫЕ И МЕДИЦИНСКИЕ АСПЕКТЫ .....	930

<i>Э.К. Хуснутдинова</i> ЭТНОГЕНОМИКА .....	943
<i>А.С. Филипенко</i> ПАЛЕОГЕНЕТИКА ЧЕЛОВЕКА .....	957
<i>Н.В. Равин, С.В. Шестаков</i> ГЕНОМ ПРОКАРИОТ .....	972
<i>И.А. Тихонович</i> ГЕНЕТИКА СИСТЕМНОГО КОНТРОЛЯ МИКРОБНО-РАСТИТЕЛЬНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ.....	985
<i>Л.А. Лутова</i> СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ГЕНЕТИКИ РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ .....	1003
<i>Е.Д. Бадаева, Е.А. Салина</i> СТРУКТУРА ГЕНОМА И ХРОМОСОМНЫЙ АНАЛИЗ РАСТЕНИЙ .....	1017
<i>Е.К. Хлесткина</i> МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ В ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ И В СЕЛЕКЦИИ.....	1044
<i>О.Л. Серов</i> ТРАНСГЕННЫЕ ЖИВОТНЫЕ: ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ .....	1055

## Content

<i>V.K. Shumny</i> A STUDY ON THE HISTORY OF GENETICS.....	782
<i>S.G. Inge-Vechtomov</i> VARIATION. PHENOMENOLOGY AND MECHANISMS .....	791
<i>B.F. Vanuyshin</i> EPIGENETICS TODAY AND TOMORROW .....	805
<i>N.A. Kolchanov, E.V. Ignatieva, O.A. Podkolodnaya, V.A. Likhoshvai, Yu.G. Matushkin</i> GENE NETWORKS.....	833
<i>S.L. Kiselev, M.A. Lagar'kova</i> STEM CELLS AND GENETIC REPROGRAMMING.....	851
<i>P.M. Borodin</i> EVOLUTION BY NATURAL SELECTION AND ITS ALTERNATIVE.....	864
<i>O.V. Trapesov</i> DOMESTICATION AS THE EARLIEST INTELLECTUAL ACHIEVEMENT OF MANKIND .....	872
<i>N.P. Goncharov</i> PLANTS DOMESTICATION .....	884
<i>Yu.A. Stolpovskiy</i> POPULATION GENETICS STUDIES UNDERLYING PRESERVATION OF DOMESTICATED ANIMAL SPECIES GENE POOLS.....	900
<i>A.V. Rodionov</i> POLYPLOIDY AND INTERSPECIES HYBRIDIZATION IN THE EVOLUTION OF THE FLOWERING PLANTS .....	916

<i>S.A. Borinskaya, N.K. Yankovsky</i>	
HUMAN GENETICS AND GENOMICS. POPULATIONS AND ETHNOSES IN SPACE AND TIME: EVOLUTIONARY AND MEDICAL ASPECTS .....	930
<i>E.K. Khusnutdinova</i>	
ETHNOGENOMICS .....	943
<i>A.S. Pilipenko</i>	
THE HUMAN PALEOGENETICS.....	957
<i>N.V. Ravin, S.V. Shestakov</i>	
THE GENOME OF PROKARYOTES.....	972
<i>I.A. Tikhonovich</i>	
THE GENETIC CONTROL OF PLANT-MICROBE INTERACTIONS .....	985
<i>L.A. Lutova</i>	
MODERN ASPECTS OF THE PLANT DEVELOPMENT GENETICS .....	1003
<i>E.D. Badaeva, E.A. Salina</i>	
GENOME STRUCTURE AND CHROMOSOME ANALYSIS IN PLANTS .....	1017
<i>E.K. Khlestkina</i>	
MOLECULAR MARKERS IN GENETIC STUDIES AND BREEDING.....	1044
<i>O.L. Serov</i>	
TRANSGENIC ANIMALS: BASIC AND APPLIED ASPECTS.....	1055

## VI СЪЕЗД ВОГиС

Вавиловское общество генетиков и селекционеров организует очередной VI съезд в рамках объединенного научного мероприятия «VI Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГиС) и ассоциированные генетические симпозиумы» (15–20 июня 2014 г. в Ростове-на-Дону).

Генетика является одной из наиболее динамично развивающихся областей современной науки, биотехнологии и медицины. Для участия в работе VI Съезда ВОГиС и Симпозиумов поступило более 700 заявок от ведущих исследователей, молодых ученых, преподавателей вузов, аспирантов и студентов из России, СНГ и стран ЕС.

На съезде будет представлено около 30 пленарных лекций, в рамках которых будут доложены последние достижения в области молекулярной генетики, геномики и протеомики, клеточной биологии, включая вопросы биологии стволовых клеток, генетики развития, генетики человека, нейрогенетики и медицинской генетики, генетики растений, животных и микроорганизмов, селекции, биотехнологии и биологической эволюции.

В рамках Съезда пройдут 3 круглых стола: «Генетическое образование», «Социальные, экологические, экономические и этические аспекты генетики», «Генетические ресурсы», а также состоятся 2-е курсы повышения квалификации научно-педагогических кадров по генетике с основами селекции, медицинской генетики и эволюции.

Работа 5 предыдущих съездов ВОГиС оказала мощное стимулирующее влияние на развитие российской биологической науки, формирование новых научных направлений, развитие междисциплинарных исследований и способствовала широкому внедрению передовых методических подходов в изучении биологических объектов, значимых для агропромыш-

ленного комплекса, медицины, биотехнологии, экологии и рационального использования природных ресурсов.

Мероприятие такого масштаба, как VI Съезд ВОГиС, позволит осуществить обмен опытом между учеными, ведущими фундаментальные исследования и работы прикладного характера в области генетики человека, животных, растений и микроорганизмов, что усилит интеграцию фундаментальной науки, ориентированных фундаментальных исследований и прикладных разработок.

Основными организаторами объединенного научного мероприятия «VI Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГиС) и ассоциированные генетические симпозиумы» (<http://conf.nsc.ru/vogis2014/ru>) являются Вавиловское общество генетиков и селекционеров, Научный совет по генетике и селекции РАН, Институт цитологии и генетики СО РАН, Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, кафедра генетики и биотехнологии СПбГУ, кафедра генетики МГУ, кафедра цитологии и генетики НГУ, Институт аридных зон Южного научного центра РАН и Южно-Российский институт – филиал РАНХиГС, Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии.

Председатель объединенного организационного комитета – академик В.К. Шумный, заместители председателя – академики Н.А. Колчанов и И.А. Тихонович, чл.-корр. Н.К. Янковский и чл.-корр. Д.Г. Матишов. Председатель объединенного программного комитета – академик С.Г. Инге-Вечтомов, заместители председателя – академики С.В. Шестаков, Н.А. Колчанов, Е.К. Гинтер, И.А. Тихонович).

В рамках Объединенного научного мероприятия состоятся параллельные симпозиумы:

1. Эволюционная и популяционная генетика (председатели: проф. П.М. Бородин, чл.-корр. И.А. Захаров-Гезехус).

2. Молекулярные и клеточные механизмы генетических процессов (председатели: проф. Н.Б. Рубцов, чл.-корр. Д.Г. Матишов).

3. Геномика, протеомика, биоинформатика и системная биология (председатель: акад. Н.А. Колчанов).

4. Генетика развития и стволовые клетки (Председатели: проф. С.Л. Киселев, проф. Л.А. Лутова).

5. Генетика человека, медицинская генетика и генетические модели для биомедицинских исследований (председатели: акад. Е.К. Гинтер, В.П. Пузырёв, чл.-корр. М.И. Воевода, чл.-корр. Н.К. Янковский, проф. Э.К. Хуснутдинова, проф. М.П. Мошкин).

6. Нейрогенетика и генетика поведения (председатели: чл.-корр. Н.Н. Дыгало, проф. Н.К. Попова).

7. Генетические основы селекции и биотехнологии (председатели: акад. С.Г. Инге-Вечтомов, Л.А. Беспалова, В.Г. Дебабов, чл.-корр. И.А. Захаров-Гезехус, чл.-корр. РАСХН Н.П. Гончаров, проф. Е.А. Салина).

8. Экологическая генетика (председатель: акад. И.А. Тихонович).

По всем вопросам обращайтесь, пожалуйста, в секретариат Объединенного научного мероприятия: [info-vogis@bionet.nsc.ru](mailto:info-vogis@bionet.nsc.ru).

В преддверии VI Съезда ВОГиС состоялась конференция ВОГиС «Проблемы генетики и селекции» и 1-е курсы повышения квалификации научно-педагогических кадров по генетике с основами селекции, медицинской генетики и эволюции (Новосибирск 1–7 июля 2013 г.), по материалам которых подготовлен данный номер «Вавиловского журнала генетики и селекции».

## ГЕНЕТИКА ИЗ ПЕРВЫХ РУК

Генетика является одной из наиболее динамично развивающихся областей современной науки. За последние годы реализованы десятки крупных международных проектов по секвенированию генома различных организмов. Было разработано множество высокоэффективных методов геномных и постгеномных исследований, новых технологий геномной и клеточной инженерии. Бурный методический прогресс позволил получить огромные массивы данных, прежде недоступных для исследования. Накопление этих данных привело к значительному расширению (а порой и к пересмотру) фундаментальных знаний о геномном, клеточном, организменном и популяционном уровнях организации живых систем. Методы и знания современной генетики становятся основой для практических разработок в области медицины, фармакологии, биотехнологии и селекции микроорганизмов, растений и животных.

Сегодняшние студенты-биологи (т. е. завтрашние исследователи) должны знать современную и очень быстро меняющуюся картину знаний и методов современной генетики. Развитие систем доступа к статьям, публикуемым в ведущих международных журналах, дает техническую возможность читать оригинальные статьи в момент их появления. Однако знания, изложенные в оригинальных экспериментальных и методических статьях, зачастую понятны только узким специалистам. Для того чтобы донести до студентов эти знания, их нужно прежде переработать и систематизировать – выделить главное, увязать новые знания с уже устоявшимися представлениями, показать трудности и «подводные камни» в применении новых методов и интерпретации новых данных.

Идеальным решением был бы своевременный выпуск новых учебников. Однако известно, что с момента начала подготовки нового учебника до того, как он попадет на полки университетских библиотек, как правило, уходит не один год. Более оперативное и реалистичное

решение – регулярная передача новейших фундаментальных знаний от ведущих исследователей преподавателям вузов, которые затем будут «транслировать» полученную информацию своим студентам.

Идея регулярных курсов повышения квалификации, на которых в качестве лекторов выступали бы ведущие исследователи в области генетики, оживленно обсуждалась осенью 2012 г. на совместном совещании Центрального совета Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГиС) и Научного совета по генетике и селекции Российской академии наук (НСГиС РАН). И уже в июле 2013 г. в Новосибирске на базе Института цитологии и генетики СО РАН при поддержке Новосибирского государственного университета прошли первые курсы повышения квалификации научно-педагогических кадров по генетике с основами селекции, медицинской генетики и эволюции. В качестве основных организаторов этого мероприятия помимо Вавиловского общества генетиков и селекционеров, Научного совета по генетике и селекции РАН, Института цитологии и генетики СО РАН и Новосибирского государственного университета выступили кафедры генетики Московского, Санкт-Петербургского и Башкирского государственных университетов, а также Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН. В мероприятии приняли участие более 150 российских и зарубежных ученых, преподавателей вузов, аспирантов и студентов.

Вниманию слушателей были предоставлены лекции более 40 приглашенных докладчиков. Материал лекций охватил широкую область исследований – от генетики человека и медицинской генетики до геномики, генетики и селекции растений. Особое внимание было уделено вопросам эволюции и доместикации, молекулярным и клеточным механизмам, лежащим в основе генетических процессов, а также генетике развития. Отдельный блок лекций был посвящен современным методическим подхо-



дам и технологиям, используемым для решения задач генетики. Все презентации и видеозаписи этих лекций находятся в открытом доступе на сайте ИЦиГ СО РАН в разделе <http://www.bionet.nsc.ru/nauka/konferenczii/konferenciya-vogis-2013-goda/>

По материалам лекций подготовлены статьи, часть из которых вошла частично в этот номер

«Вавиловского журнала генетики и селекции». Оставшаяся часть лекций будет опубликована в следующем номере журнала. Мы надеемся, что этот пакет (тексты, презентации и видеозаписи лекций) современных знаний по генетике будет полезен студентам и преподавателям вузов. Мы также надеемся, что сможем регулярно проводить такие курсы и обновлять этот пакет.

**В.К. Шумный, П.М. Бородин, Е.К. Хлёткина**

УДК 58.007:575.8:575.1:577.21

## ЭТЮДЫ ПО ИСТОРИИ ГЕНЕТИКИ

© 2013 г. В.К. Шумный

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,  
e-mail: shumny@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 9 июля 2013 г. Принята к публикации 1 ноября 2013 г.

Наука – это накопление знаний и формирование на их основе крупных обобщений, которые по мере их осмысления превращаются в догмы. История науки – документальное фиксирование судьбы обобщений и догм, которые или имеют перспективу развития, или рушатся под напором новых фактов.

Цель данного сообщения – проследить судьбу крупных обобщений и догм, имеющих отношение к эволюции и генетике. К эволюции потому, что вся научная фактура в биологии, по выражению Ф.Г. Добржанского и Н.В. Тимофеева-Ресовского, имеет значение только тогда, когда она расширяет наши знания о механизмах происхождения и эволюции живых систем.

История генетики, крупных открытий и обобщений довольно подробно изложена в учебниках (Жимулев, 2003). Поэтому в данном сообщении основное внимание будет уделено восприятию российским научным сообществом дарвинизма, менделизма и ламаркизма, а также краткой истории запрещения и восстановления генетики в СССР.

Появлению эволюционной теории Ч. Дарвина и ее обобщения в труде «Происхождение видов путем естественного отбора, или сохранение благоприятных рас в борьбе за жизнь» предшествовала гигантская работа по систематике растений и животных К. Линнея, Ж. Кювье и Ж.Б. Ламарка. Вершиной этой работы, длившейся многие десятилетия, стали книги К. Линнея «Система природы» и Ж.Б. Ламарка «Флора Франции» (3 тома); «Философия зоологии». Именно эти крупнейшие обобщения легли в основу систематики растений и животных, упорядочив тем самым их огромное разнообразие

и создав иерархию диагностических признаков видов, родов, семейств как главных ранговых таксонов. Но все систематики до Ч. Дарвина прошли мимо внутривидовой изменчивости, оставив, таким образом, огромное поле деятельности для Ч. Дарвина, чем он и воспользовался. Он первый ввел в исследовательский процесс внутривидовую изменчивость, мало интересную для систематиков. Это была революция в биологии, новое мировоззрение для исследователей. Сегодня мы не мыслим исследовательский процесс без таких понятий, как «популяция», «дивергенция внутри вида» и т. д.

Интересен путь дарвинизма в Россию. В 1859 г. был опубликован главный труд Ч. Дарвина «Происхождение видов ...». В 1860 г. А.И. Герцен в журнале «Колокол» публикует большую статью о книге Ч. Дарвина «Происхождение видов ...» и тем самым знакомит интеллектуальную элиту России с этим событием (Трапезов, 2009). В 1864 г. выходит русский перевод «Происхождения видов ...» профессора МГУ С.А. Рачинского. Осознание дарвинизма в России совпало с реформами Александра II – с очень сложной политической обстановкой, формированием революционной идеологии. Среди интеллектуальной элиты был популярен термин «нигилизм», т. е. отрицание всего, в том числе и науки, введенный И.С. Тургеневым и подхваченный другими выдающимися деятелями культуры, в том числе Л.Н. Толстым и Ф.М. Достоевским. Эта обстановка наложила отпечаток и на восприятие эволюционной теории Дарвина в России. Наиболее радикально настроенная часть интеллектуальной элиты во главе с Д.И. Писаревым адаптировала

дарвинизм к революционному движению, а принцип естественного отбора – «борьбу за существование» – даже к оправданию террора. Другое восприятие дарвинизма было в научной прослойке русской интеллигенции. Некоторые постулировали не только борьбу за существование, но на внутривидовом уровне – и принцип взаимной помощи. Об этом много писал ректор Санкт-Петербургского университета профессор К.Ф. Кесслер (1880).

Такое же толкование дарвинизма было и у главного идеолога анархизма натуралиста и географа князя П.А. Кропоткина. Как и А.И. Герцен, он был в эмиграции и сначала на английском, а потом на русском языке издал в 1902 г. книгу «Взаимная помощь как фактор эволюции» (Кропоткин, 1980). «Кропоткин утверждал, что внутри видов взаимопомощь играет бóльшую роль, чем борьба и именно она, а не конкуренция между особями является основным фактором эволюции» (Трапезов, 2009). Борьба за существование, по мнению П.А. Кропоткина, больше объясняет межвидовые отношения. Среди научной элиты наиболее последовательным сторонником, принявшим восторженно дарвинизм, был К.А. Тимирязев, опубликовавший капитальный обзор «Чарльз Дарвин и его учение» (Тимирязев, 1864).

Подводя итог осмысления дарвинизма учеными и революционно настроенной частью интеллигенции России, можно отметить:

а) дарвинизм был воспринят в России неоднозначно: от абсолютного отрицания (Н.Я. Данилевский, Н.Н. Страхов) до полного признания (К.А. Тимирязев, братья А.О. и В.О. Ковалевские, И.П. Мечников, И.М. Сеченов);

б) ортодоксы-революционеры, такие, как Д.И. Писарев, приняли дарвинизм, но с приставкой «социал». Но сам термин «социал-дарвинизм» как идеологию английской олигархии – «побеждает наиболее приспособленный» ввел ранее английский философ Герберт Спенсер (1870–1903).

Далее проследим судьбу второго крупнейшего события в биологии 19-го в. – открытие Г. Менделя в его работе «Опыты над растительными гибридами», опубликованной в бюллетене Брюннского общества испытателей природы в 1865 г., – наследственного фактора, названного в 1903 г. голландцем В.Л. Иогансеном геном.

Публикацию Г. Менделя можно уверенно считать днем рождения новой науки – генетики. Но история рождения генетики очень разноречива и запутанна. Наиболее распространено мнение о том, что статья Г. Менделя в течение 35 лет была неизвестна биологам, и только в 1900 г. К.Э. Корренс, Э. Чермак и Л. Бейли, а затем и Г. де Фриз узнали об этой работе и поняли ее главный вывод о наследственных факторах, четко проявляющихся в определенных соотношениях при расщеплении гибридов. Это не совсем так. Сам Г. Мендель разослал более 50 отписок своей статьи всем крупным ботаникам Европы. И еще при жизни Г. Менделя стали поступать отклики на его работу. Имя Менделя и его работу многие естествоиспытатели, в том числе и в России, узнали из книги немецкого ботаника В. Фоке «Гибридизация у растений», опубликованной еще при жизни Г. Менделя в 1881 г., в которой Фоке ссылается на эту работу Менделя 15 раз и вносит ее в список цитируемых источников. И первым по этой ссылке находит и подробно разбирает результаты исследований Менделя в своей книге «Исследование определенных видовых закономерностей и их изменения» ботаник из Гессена Г. Гофман. Он делает главный вывод из работы Г. Менделя: гибриды имеют склонность в последующих поколениях возвращаться к исходным формам» (Володин, 1968). Еще более раннее упоминание о работе Г. Менделя обнаружено в тексте магистерской диссертации профессора Московского университета И.Ф. Шмальгаузена, отца выдающегося ученого-эволюциониста Ивана Ивановича Шмальгаузена, автора книги «Стабилизирующий отбор». В 1874 г. И.Ф. Шмальгаузен, прочитав статью Г. Менделя «Опыты над растительными гибридами», провел тщательный анализ ее в своей диссертации. Это был единственный серьезный научный отклик на труд Менделя, прозвучавший при его жизни. Однако при переводе диссертации И.Ф. Шмальгаузена на немецкий язык реферат работы Менделя был упущен, хотя саму диссертацию читали многие биологи. Первым в России на русский язык перевел работу Г. Менделя в 1910 г. и составил его биографию К.А. Фляксбергер.

В России подробный анализ статьи «Опыты над растительными гибридами» был сделан од-

ним из организаторов Русского ботанического общества и «Ботанического журнала» академиком Иваном Парфеньевичем Бородиным. Он был опубликован в трех номерах журнала «Мир божий» в 1903 г. под названием «Очерки по вопросам оплодотворения в растительном царстве» (Бородин, 1903). Первым, кто в России привлек внимание к генетике животных, был крупный зоотехник-дарвинист, классик теории селекции животных Павел Николаевич Кулешов. В 1890 г. в своей диссертации «Научные и практические основы подбора племенных животных в овцеводстве» первые три главы он посвятил проблемам наследственности. В 1907 г. П.Н. Кулешов дает подробное описание законов Г. Менделя в журнале «Сельскохозяйственное животноводство» (Кулешов, 1907). Тогда же законы Г. Менделя появились в учебнике по зоологии В.М. Шимкевича (1907).

Первая русская монография «Менделизм» биолога и животновода Еллия Анатольевича Богданова вышла в свет в 1914 г. (Богданов, 1914).

Местом официального рождения генетики в России является Санкт-Петербургский университет. Именно здесь 18 сентября 1913 г. приват-доцент Ю.А. Филипченко прочитал первую лекцию разработанного им курса «Учение о наследственности и эволюции». В 1919 г. им была основана первая в России кафедра генетики и экспериментальной зоологии.

Таким образом, опираясь на известные сведения по истории рождения и трудного пути менделизма, в том числе и в России, можно утверждать, что с 1865 г. по 1900 г. многие биологи были знакомы с работой Менделя, но за деталями упустили главное в ней – открытие дискретных единиц наследственности. Г. Мендель называл их «зачатками», «факторами», а с легкой руки В.Л. Иогансена с начала XX в. их стали называть «генами». Удивительно, что Ч. Дарвин, скрещивая отличные по структуре цветка формы львиного зева, получил во втором поколении расщепление 3 : 1, но оценил это как «капризную игру сил наследственности». А. Пуанкаре предложил замечательный термин «душа факта». Но осознал «душу факта», а точнее, «душу гена» только Г. Мендель. Для остальных эта «душа факта» открылась спустя почти 30 лет после публикации работы «Опыты над растительными гибридами». Но надо

отдать должное переоткрывателям законов Г. Менделя в том, что приоритет в открытии они отдали ему.

Чуть раньше кафедры генетики в Петербурге появился Институт экспериментальной биологии в Москве, организованный Н.К. Кольцовым в 1916 г. Впоследствии этот институт стал мощным центром развития генетики в России и создания московской генетической школы, которую представляли выдающиеся ученые А.С. Серебровский, Н.П. Дубинин, С.С. Четвериков, Н.В. Тимофеев-Ресовский, И.А. Рапопорт, Б.Н. Сидоров, Н.Н. Соколов, Н.К. Беляев, Б.Л. Астауров, В.В. Хвостова и др. Кафедру генетики МГУ возглавил А.С. Серебровский, активно сотрудничавший с институтом Н.К. Кольцова. Многие сотрудники института являлись в то же время преподавателями на кафедре генетики МГУ.

Достижения московской школы генетиков общеизвестны. Отметим только крупнейшие обобщения московской школы генетиков в начале XX века:

- гипотеза матричного синтеза биологических макромолекул (по Кольцову, белковой природы);

- открытие сложной структуры гена (явление «ступенчатого аллелизма») А.С. Серебровским (он ввел термины «генофонды», «геногеография») и Н.П. Дубининым;

- значительный вклад московская генетическая школа внесла в изучение механизмов проявления эффекта положения гена в зависимости от его локализации в геноме (Н.П. Дубинин, Б.Н. Сидоров, В.В. Хвостова);

- рождение популяционной генетики (С.С. Четвериков).

С 1921 г., кроме кафедры в Петроградском университете под руководством Ю.А. Филипченко, организуется филиал-бюро по евгенике Евгенического общества, созданного в Москве Н.К. Кольцовым. Вскоре на заседании Совета КЭПС (Комитет по естественным производительным силам России) утверждается штат бюро по евгенике: Ю.А. Филипченко, Т.К. Лепин, Я.Я. Лус, позже Ф.Г. Добржанский, Ю.Я. Керкис, А.И. Зуйтина. В 1925 г. Бюро стало называться Бюро по генетике и евгенике, с 1929 г. – Бюро по генетике, а с 1930 г. получило название лаборатории генетики АН СССР, которую возглавил

Н.И. Вавилов. После переезда лаборатории в 1934 г. в Москву она была преобразована в Институт генетики АН СССР во главе с Н.И. Вавиловым. После ареста Н.И. Вавилова в 1940 г. директором был назначен Т.Д. Лысенко (до 1966 г.). В 1966 г. Институт генетики АН СССР был упразднен, а на его базе и на основе лаборатории радиационной генетики Института биофизики АН СССР был создан Институт общей генетики во главе с Н.П. Дубининым (Инге-Вечтомов, 2012). В Ленинграде в 1920-е годы начинает формироваться третья научная школа по генетике во главе с Н.И. Вавиловым. В 1922 г. он реорганизовал Сельскохозяйственный ученый комитет Наркомзема в Институт опытной агрономии, а в 1924 г. Отдел прикладной ботаники и селекции – во Всесоюзный институт прикладной ботаники и новых культур. В 1930 г. на его базе Н.И. Вавилов создал Всесоюзный институт растениеводства, знаменитый ВИР, который В.А. Комаров назвал в шутку «Вавилоном». В это же время была организована Всесоюзная академия сельскохозяйственных наук имени Ленина во главе с Н.И. Вавиловым. Наряду с важной научно-организационной деятельностью в 1920-е годы Н.И. Вавилов сделал два крупных обобщения в биологии:

– открыл закон гомологических рядов в наследственной изменчивости;

– установил центры происхождения культурных растений и их сородичей.

Это принесло Н.И. Вавилову мировую известность и сразу определило его место в ряду выдающихся биологов, а его школа по генетике и растениеводству активно пополнялась и набирала силу. Но жизнь Н.И. Вавилова никогда не была легкой. Нападки на него начались уже в двадцатые годы XX в. в период культурной революции, когда руководящие кадры учреждений, в том числе вузов и научных подразделений, укреплялись членами партии, выходцами из рабочих и крестьян. Жесткой критике подвергались «буржуазные» ученые. Несколько раз принимались решения партячеек о снятии Н.И. Вавилова с руководящих постов. Но всемирная известность и авторитет среди здравомыслящих ученых позволили ему сохранить свой статус до конца культурной революции и начала репрессий. Весь этот период впервые подробно описан в статье Э.И. Колчинского,

директора Санкт-Петербургского филиала Института истории естествознания и техники РАН, основанной на архивных материалах и опубликованной в «Вавиловском журнале генетики и селекции» (Колчинский, 2012). В конце двадцатых и начале тридцатых годов XX в. нападки на Н.И. Вавилова и попытки снять его со всех руководящих постов нарастали и к 1934 г. были частично реализованы – он был снят с поста Президента ВАСХНИЛ и стал «невъездным». Культурную революцию сменили волны репрессий, и Николай Иванович почувствовал свою обреченность. Именно в этот период он произнес своим друзьям и коллегам вещие слова: «На костер пойдем, гореть будем, но от своих убеждений не откажемся». Зловещее совпадение: именно в саратовский период своей научной деятельности в 1920-е годы на агрономическом факультете Саратовского университета Николай Иванович Вавилов сделал наиболее крупное обобщение, «Закон гомологических рядов», а в 1943 г. в саратовской тюрьме, расположенной недалеко от университета, он, так много сделавший, чтобы накормить человечество, умер от истощения и похоронен в безымянной могиле.

Таким образом, к 1935 г. в России сформировались три признанных мировым научным сообществом генетические школы: А.К. Кольцова, Ю.А. Филипченко и Н.И. Вавилова.

Для понимания дальнейших событий в истории генетики в СССР необходимо обратиться к судьбе ламаркизма в России.

Жан Батист Ламарк является выдающейся личностью в истории естествознания. Достаточно вспомнить, что Ламарк

– ввел термин «биология»;

– сформулировал концепцию эволюции (развитие живых систем от простых к сложным) и по праву считается первым эволюционистом;

– создал систематику флоры Франции и низших животных, ввел термин «беспозвоночные животные»;

– высказал гипотезу происхождения человека от обезьяноподобных (напрасно ругают и судят за это Ч. Дарвина, который только развил эту гипотезу);

– был очарован «эффектом жирафа» (он восторгался этим животным с короткими задними и длинными передними ногами и выдающейся

шеей и возможностью кормиться кронами деревьев на высоте до 7 м). Отсюда происходят его принцип «упражнения–неупражнения» и гипотеза о наследовании благоприобретенных признаков, формирующихся под влиянием условий среды и поддерживаемых отбором. Эта идеология, которую, кстати, принял и Ч. Дарвин, просуществовала более 100 лет. Она была опровергнута только в 1903 г. в работе В.Л. Иогансена «Об отборе в популяциях и чистых линиях», в которой он сделал два основополагающих вывода:

а) отбор работает в генетически гетерогенных популяциях;

б) отбор не работает в чистых линиях, и модификационная изменчивость под влиянием среды в этих линиях не наследуется (если в них не возникают мутации).

Казалось бы, что с постулатом Ж. Ламарка о наследовании благоприятных признаков было покончено и все переключились на изучение генетической изменчивости, особенно после выхода работы Г. де Фриза в 1901 г. о мутационном процессе.

Необходимо помнить, что двумя годами ранее вышла работа С.И. Коржинского (1899) о гетерогенезисе, в которой он изложил теоретические основы мутационного процесса и отметил его роль в эволюции.

Но ламаркизм как естественнонаучная идеология в части наследования благоприобретенных признаков оказался очень живучим, а в русскоязычном пространстве 30–40-х годов XX в. превратился еще и в политическую идеологию, что принесло немало бед, особенно для генетики – она была объявлена «буржуазной лженаукой», «продажной девкой империализма». В СССР почти на 20 лет генетика как наука была запрещена. Губительные последствия этого общеизвестны. При этом важно понять истоки триумфального шествия в СССР ламаркизма–лысенкоизма под общим названием «мичуринская биология». Из архивных источников известно, что 9 декабря 1930 г. состоялась беседа И.В. Сталина с членами партгруппы Института Красной профессуры (Рокитянский, 2012). Она была записана М.Б. Митиным и опубликована В.П. Троицким (2002). На вопрос, «каковы наши теоретические задачи в области естествознания?» И.В. Сталин ответил: «Я не естествознавец. Правда, в молодости я много

читал Ламарка ... увлекался неоламаркизмом». Вот одно из возможных объяснений триумфального шествия ламаркизма в Советском Союзе. Естественно, неоламаркист Т.Д. Лысенко был для И.В. Сталина идеологическим соратником. В заключение этой встречи И. Сталин подвел итог: «Ваша главная задача теперь – развернуть во всю критику. Бить по всем направлениям, и там, где не били». Первыми в категорию «... и там, где не били» еще в период «культурной революции» попали экономисты во главе с А.В. Чаиновым, вторыми – генетики во главе с Н.И. Вавиловым. Все знают историю сессии ВАСХНИЛ 1948 г., завершившей полный разгром генетики и объявившей торжество мичуринской биологии во главе с Т.Д. Лысенко.

Необходимо отметить одну закономерность в противостоянии генетиков во главе с Н.И. Вавиловым и неоламаркистов во главе с Т.Д. Лысенко. Как только в дискуссиях перевес был на стороне генетиков, лысенковцы обращались с жалобами, а часто и с доносами на генетиков к вождям (И.В. Сталину, В.М. Молотову, а позже – к Н.С. Хрущеву) и получали поддержку и разрешение проводить крупные политические акции, такие как:

1. Снятие в 1934 г. Н.И. Вавилова с поста Президента ВАСХНИЛ и объявление его «невыездным». По доносам уже было заведено «дело Н.И. Вавилова» в НКВД.

2. Идеологически спланированная И.И. Препентом и М.Б. Митиным дискуссия в журнале «Под знаменем марксизма». Дискуссию инициировал Н.И. Вавилов и выступил резко против Т.Д. Лысенко, но организаторы объявили ее триумфом «мичуринской биологии».

3. Блокирование и отмена международного генетического конгресса в Москве (1937 г.). Лысенковцы боялись, что международное генетическое сообщество подвергнет резкой и объективной критике новаторов ламаркизма.

4. Обострение дискуссии по генетике и дарвинизму в первые послевоенные годы.

В 1947 г. в самой большой аудитории МГУ с участием И.И. Шмальгаузена, А.Н. Формозова, Д.А. Сабинаина состоялась дискуссия по внутривидовой конкуренции (Медведев Ж., Медведев Р., 2012). В это же время П.М. Жуковский вступил в резкую конфронтацию с Т.Д. Лысенко по вопросам видообразования. Дрогнул и начал

критиковать Т.Д. Лысенко заведующий отделом науки ЦК КПСС Ю.А. Жданов, зять И.В. Сталина и сын соратника И.В. Сталина А.А. Жданова. Тучи сгущались, и лысенковцы применили свой испытанный вариант – политический шантаж. Их обращение к И.В. Сталину и В.М. Молотову о проведении в 1948 г. сессии ВАСХНИЛ с повесткой «О положении в биологической науке» получило поддержку. Ю.А. Жданов «покаялся», сославшись на свою возрастную неопытность. Итог – генетика как наука была запрещена.

5. Разгром редакции «Ботанического журнала». В декабре в 1958 г. на пленуме ЦК КПСС И.Д. Мустафаев заявил о неправильном поведении редколлегии «Ботанического журнала», а в ответ Н.С. Хрущев велел: «Их надо заменить, поставить настоящих мичуринцев». Кстат, дискуссия с критикой Т.Д. Лысенко по вопросам видообразования началась в 1952 г. со статьи Н.В. Турбина, в «Ботаническом журнале», нарастала до 1958 г. и была прервана тем же приемом – просьбой к вождям о защите марксистско-ленинской идеологии в науке, а в результате – полной заменой редколлегии.

6. Замена в 1958 г. советской делегации на X Международный генетический конгресс в Канаде. Н.П. Дубинин, Б.Л. Астауров, С.И. Алиханян, Д.К. Беляев, И.А. Рапопорт и другие генетики послали свои заявки на доклады и были включены в программу Конгресса, но в состав делегации вошли только сторонники Т.Д. Лысенко (В.Н. Столетов, И.Е. Глущенко, Н.И. Нуждин, Х.Ф. Кушнер и др.).

7. Снятие Н.П. Дубинина с поста директора Института цитологии и генетики СО АН СССР в ноябре 1959 г. Этот процесс также происходил посредством политического давления. Но тут испытанный метод борьбы с оппонентами дал осечку. Лысенковцам не удалось заменить Н.П. Дубинина своим человеком. Позиция Председателя СО АН СССР М.А. Лаврентьева была крайне жесткой и в пользу генетики. Говорят, что последний визит к новому первому лицу государства Л.И. Брежневу Т.Д. Лысенко сделал с просьбой защитить мичуринцев, но был отправлен к Президенту АН СССР М.В. Келдышу. С этого момента начался закат лысенкоизма.

Ж.Б. Ламарк, конечно, не предполагал, что его «эффект жирафа» породит столько дискуссий и трагедий, сам он пережил жесткое преследование

современников за свою эволюционную идею. Он был обвинен в ереси, попрании канонов божественного творения жизни на земле, снят со всех постов и закончил жизнь в нищете и забвении. До конца своих дней он искал компромисс со Всевышним, и ему казалось, что он его нашел: да, Всевышний создал первый живой организм, который и начал эволюционировать по законам Природы. Теперь нам остается только фантазировать, что он имел в виду? Ламарку повезло только в одном – еретиков уже не сжигали на кострах инквизиции, а только преследовали.

Сменивший И.В. Сталина Н.С. Хрущев был еще более ретивым сторонником неоламаркиста Т.Д. Лысенко, хотя, в отличие от предшественника, работ Ж.Б. Ламарка, похоже, не читал. До его снятия в 1964 г. генетика в стране была под запретом. Оставшиеся в живых после репрессий и Великой Отечественной войны генетики, многие из которых работали не по специальности, но сохранили свои убеждения, ждали своего часа. Почти подпольно и завуалированно начали создаваться небольшие генетические ячейки: в Институте атомной энергии – лаборатория С.И. Алиханяна; отдел И.А. Рапопорта – в Институте химической физики на кафедре ЛГУ у М.Е. Лобашева; в Институте биофизики – лаборатория радиационной генетики Н.П. Дубинина; в Киеве – группа С.М. Гершензона; в Минске – лаборатория П.Ф. Рокитского; в Москве – лаборатория Б.Л. Астаурова. Первым мощным выпадом против Т.Д. Лысенко было известное «письмо трехсот» в адрес ЦК КПСС в 1955 г. («Информационный вестник ВОГиС. 2005. Т. 9. № 1»). Вторым важным событием для генетики было создание в 1957 г. Сибирского отделения АН СССР, в перечне среди 10 создаваемых институтов значился Институт цитологии и генетики во главе с директором-организатором Н.П. Дубининым. Это означало, что в системе АН СССР генетика восстанавливалась в правах одного из направлений естествознания. Это также означало, что дан официальный старт восстановления классической генетики в СССР. Этим мы обязаны, прежде всего, академикам И.В. Курчатову и М.А. Лаврентьеву, которые понимали необходимость восстановления классической генетики и в первую очередь радиационной генетики, которую возглавил в новом институте Н.П. Дубинин. Но наряду с этим в Институте

цитологии и генетики были заложены почти все направления классической генетики: молекулярная генетика, цитогенетика, эволюционная и популяционная генетика, генетика растений и животных. На все эти направления были приглашены ведущие генетики, представители знаменитых в 1930-е годы генетических школ, основанных А.К. Кольцовым, Н.И. Вавиловым, Ю.А. Филипченко. Создалась уникальная ситуация: если раньше эти школы в какой-то степени, но доброжелательно конкурировали между собой, то в новосибирском Академгородке их представители собрались под одной крышей, объединились и мощно выступили в защиту генетики. Первыми приглашенными Н.П. Дубининым из ленинградской школы Ю.А. Филипченко были Ю.Я. Керкис, И.И. Кикнадзе, Г.М. Роничевская и др.; из школы Н.И. Вавилова – П.К. Шкварников, А.Н. Лутков, Ю.П. Мирюта, В.Б. Енкен. Школа Н.К. Кольцова была представлена самим Н.П. Дубининым, З.С. Никоро, Д.К. Беляевым, Р.Л. Берг, В.В. Хвостовой и др. Кроме того, в организации ИЦиГ активно участвовали московские и ленинградские коллеги: Б.Л. Астауров, А.А. Прокофьева-Бельговская, Б.Н. Сидоров, Н.Н. Соколов, М.Е. Лобашев, Ю.И. Полянский и др.

Но вскоре после организации генетического института возникло жесткое противостояние между сторонниками генетики и неоламаркистами во главе с Т.Д. Лысенко, продолжавшееся до 1964 г. (до снятия Н.С. Хрущева). На институт посылались комиссии с целью его закрытия или переориентации в направлении мичуринской биологии. Осенью 1959 г. по прямому указанию Н.С. Хрущева был снят с поста директора ИЦиГ Николай Петрович Дубинин. Он проработал в Сибирском отделении всего два года, но успел:

- пригласить ведущих ученых и молодежь и сформировать лабораторную структуру;
- определить основные направления исследований института;
- развернуть ряд практических программ по созданию сортов и гибридов растений, пород животных, лекарственных препаратов, которые были реализованы его преемником Д.К. Беляевым.

Н.П. Дубинин вернулся в Институт биофизики, где он сохранил за собой лабораторию радиационной генетики.

Н.С. Хрущев посетил новосибирский Академгородок дважды – в начале его строительства и когда уже появились первые институты. Во время поездки в США Н.С. Хрущев выдержал довольно жесткий прессинг американских СМИ, представители которых задавали ему вопросы о запрете генетики, репрессиях в отношении ученых-генетиков в СССР, в том числе и Н.И. Вавилова. Н.С. Хрущев доказывал преимущества мичуринской биологии во главе с Т.Д. Лысенко. Ситуация накалялась, и Н.С. Хрущев негодовал, и уже после этих событий, когда они вместе с Михаилом Алексеевичем Лаврентьевым летели в одном самолете из Пекина до Новосибирска, Н.С. Хрущев ругал его за то, что он приютил в СО АН СССР вейсманистов-морганистов, и даже грозился поменять руководство Сибирского отделения. Михаил Алексеевич оказался в очень сложной ситуации и принял очень непростое решение – согласиться на увольнение Н.П. Дубинина, но сохранить за собой право назначить нового директора и тем самым отстоять ИЦиГ и его основу – классическую генетику. После отъезда Н.П. Дубинина в Москву М.А. Лаврентьев назначил и.о. директора Д.К. Беляева – заместителя директора по науке, тем самым сохранив преемственность и основную миссию института – восстановление генетики как науки в системе АН СССР. И, как оказалось впоследствии, Михаил Алексеевич сделал единственно точный выбор. Дмитрий Константинович Беляев был директором института в течение 26 лет. Мы считаем его наряду с Н.П. Дубининым директором-организатором института, так как именно он сформировал институт в том виде, который в значительной мере присущ ему и сегодня.

Дмитрий Константинович Беляев был неординарной личностью: сын священника, брат Николая Константиновича Беляева, замечательного генетика кольцовской школы, ближайшего ученика С.С. Четверикова. Н.К. Беляев был репрессирован и в 1938 г. расстрелян. В связи с этими обстоятельствами для Д.К. Беляева двери ведущих университетов были закрыты, он смог поступить только в Ивановский сельскохозяйственный институт на зоотехнический факультет, после окончания которого стал работать во ВНИИ пушного звероводства. Д.К. Беляев



прошел всю Великую Отечественную войну от рядового до майора. В 1958 г. он принял предложение Н.П. Дубинина и переехал из Москвы в Новосибирск, став заведующим отделом генетики животных, а через некоторое время – заместителем директора по науке. Чтобы после отъезда Н.П. Дубинина сохранить основу института, его научную идеологию, М.А. Лаврентьев назначил и.о. директора ИЦиГ именно Д.К. Беляева, зная его биографию как представителя классической, общемировой генетики. В дальнейшем у них сложились дружеские и доверительные отношения. Михаил Алексеевич Лаврентьев защищал ИЦиГ даже в экстремально критических ситуациях на всех уровнях. В своих воспоминаниях он писал, что при встрече Н.С. Хрущев спросил его: «Как там поживают твои вейсманисты-морганисты?» М.А. Лаврентьев отшутился: «Я математик, откуда мне знать, кто из них вейсманист или морганист, на них же не написано». В итоге встреча закончилась благополучно. Уже уйдя с поста Председателя СО АН СССР, Михаил Алексеевич часто заходил в гости к Д.К. Беляеву в институт или домой и много рассказывал о создании СО АН СССР. Мне выпала честь несколько раз присутствовать на этих встречах. По их итогам у меня сложилось ощущение, что Михаил Алексеевич был хорошо осведомлен в вопросах генетики и истории ее становления благодаря своей супруге В.Е. Лаврентьевой (в девичестве Данчаковой). Мать Веры Евгеньевны Вера Михайловна Данчакова была известным эмбриологом и в течение 10 лет вместе со своей дочерью Верой Евгеньевной находилась в США, где работала на кафедре Т. Моргана в Колумбийском университете в тот период, когда шла активная работа по формированию хромосомной теории наследственности, за которую позже Т. Морган получил первую Нобелевскую премию по генетике. Вторую Нобелевскую премию по генетике получил его ученик, Г. Меллер, – за открытие радиационного мутагенеза. Кстати, Г. Меллер по своим коммунистическим убеждениям уехал из США и принял предложение Н.И. Вавилова работать в Институте генетики АН СССР.

Вера Евгеньевна Лаврентьева, по первому образованию биолог, естественно, рассказывала М.А. Лаврентьеву о работах Т. Моргана и о гене-

тике. Так что, кто такие «морганисты», он точно знал, но не афишировал знания по многим причинам, и в первую очередь, как член ЦК КПСС не мог открыто выступать против линии партии, во главе которой стоял такой эмоциональный и взрывной человек, как Н.С. Хрущев.

После отъезда Н.П. Дубинина у ИЦиГ даже забрали место под строительство института, и только после некоторой стабилизации обстановки вокруг ИЦиГ М.А. Лаврентьев дал команду строить институт ускоренными темпами. Дмитрий Константинович Беляев начал активно пополнять институт молодежью, организовав в Новосибирском университете три кафедры: цитологии и генетики, общей биологии и физиологии животных. Сегодня в Институте цитологии и генетики 450 научных сотрудников, из них 70 % – выпускники НГУ. В ноябре 1985 г. Д.К. Беляев ушел из жизни, и я стал третьим директором института. Годы перестройки и «лихие девяностые» были отмечены довольно массовым отъездом научных сотрудников молодого и среднего поколения, и мы потеряли более 150 человек. Пришлось восполнять потери за счет новых выпускников НГУ. Сегодня Институт цитологии и генетики – один из самых крупных генетических центров в России. С более подробной историей создания и формирования института можно познакомиться в вышедшей в 2012 г. книге «Генетика прирастает Сибирью» (2012).

Последний 7-летний бой с лысенкоизмом произошел в Сибирском отделении АН СССР. После этого с 1964 г. восстановление генетики в СССР стало возможным в полном объеме. Организация в 1966 г. Института общей генетики АН СССР во главе с Н.П. Дубининым и других генетических центров – итог этой борьбы.

## ЛИТЕРАТУРА

- Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика. Новосибирск: Сиб. универ. изд-во, 2003.
- Трапезов О.В. // Информ. вестник ВОГиС. 2009. Т. 13. № 2. С. 249–297.
- Кесслер К.Ф. О законе взаимной помощи // Тр. СПб. об-ва естествоиспытателей. 1880. Т. 11.
- Кропоткин П.А. Взаимопомощь как фактор эволюции. Харьков, 1919. 357 с.
- Тимирязев К.А. Чарльз Дарвин и его учение. Отечественные записки. СПб. 1864. № 8, 11, 12.
- Володин Б.Г. Мендель. Изд-во «Мол. гвардия», 1968.

- Бородин И.П. Очерки по вопросам оплодотворения в растительном царстве // Мир божий. 1903. № 4. 11, 12.
- Кулешов П.Н. Теория Менделя о наследственности // С.-х. животноводство. 1907. С. 1–3.
- Шимкевич В.М. Биологические основы зоологии: Уч. пособие. СПб.: Изд-во М.О. Вольф, 1907.
- Богданов Е.А. Менделизм или теория скрещиваний. Монография. М.: Книгоизд. Моск. сельхоз. ин-та, 1914.
- Инге-Вечтомов С.Г. Организация Ин-та общей генетики им. Н.И. Вавилова в Санкт-Петербурге // История Ин-та общей генетики РАН. Москва-Ижевск, 2012. С. 5–13.
- Колчинский Э.И. «Культурная революция» в СССР в 1929–1932 гг. Первые атаки на школу Н.И. Вавилова // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2012. С. 502–540.
- Рокитянский Я.Г. Сталин – инициатор. Лысенко – главный подстрекатель убийства академика Н.И. Вавилова // Изв. ТСХА. 2012. Вып. 4. С. 150–163.
- Троицкий В.П. Бить по всем направлениям и там, где не били // Посев. 2002. № 4.
- Генетика прирастает Сибири: Первые два десятилетия Института цитологии и генетики СО АН СССР – начало и становление / Шумный В.К., Захаров И.К., Кикнадзе И.И. и др. Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 2012. 354 с.

УДК 575

## ПРОБЛЕМА ИЗМЕНЧИВОСТИ. ФЕНОМЕНОЛОГИЯ И МЕХАНИЗМЫ

© 2013 г. С.Г. Инге-Вечтомов

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Санкт-Петербургский государственный университет;  
С.-Петербургский филиал Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН,  
С.-Петербург, Россия, e-mail: ingevectomov@gmail.com

Поступила в редакцию 13 мая 2013 г. Принята к публикации 1 ноября 2013 г.

Правильно назвать значит правильно понять.  
*Конфуций, VI–V в. до н. э.*

### ВВЕДЕНИЕ

В одном обзоре невозможно рассмотреть все аспекты изменчивости: соотношение наследственной и ненаследственной изменчивости, спонтанной и индуцированной, изменчивости в экосистемах, качественные и количественные закономерности изменчивости, значение разных типов изменчивости в эволюции и т. д. Мы сосредоточимся преимущественно на первом аспекте – соотношении наследственной и ненаследственной изменчивости с неизбежными экскурсами в сопредельные области.

«Генетика есть физиология наследственности и изменчивости» (Бэтсон, 1906. Цит. по: Гайсинович, 1988). Это определение характеризует предмет настоящего обзора и значение исследования изменчивости как основы генетики. В то же время напомним высказывание К.А. Тимирязева: «Общая теория наследственности представляется мне столь же мало возможной, столь же мало нужной, как общая теория изменчивости» (Тимирязев, 1890. Цит. по: Гайсинович, 1988). Очевидно, что Климентий Аркадьевич был не прав, во-первых, поскольку через десять лет, когда были переоткрыты законы Менделя, были заложены основы именно общей теории наследственности. По-видимому, он был не прав и, во-вторых, хотя следует признать, что **общая теория биологической изменчивости**

**отсутствует и в наше время.** Этот момент и определяет содержание данного обзора.

Попробуем дать определение изменчивости. Примем, что изменчивость есть свойство любой исследуемой совокупности однородных сущностей (в частности биологических объектов), описывающее их разнообразие как объективное явление. В первом приближении можно предположить, что изменчивость, наблюдаемая на данном уровне организации (материи), есть результат комбинаторики элементов разнообразия предшествующего, более низкого (предыдущего) уровня организации. Классический пример – изменчивость (разнообразие) химических элементов есть результат комбинаторики элементарных частиц, воплощенных в Периодической системе элементов Д.И. Менделеева. Этот пример относится к системе так называемых нормальных (парадигмальных) наук (Кун, 1977).

Подобный подход затруднен в биологии как преимущественно допарадигмальной науке и генетике (скорее, парадигмальной дисциплине), поскольку он сталкивается с трудностями, определяемыми многоуровневостью организации биологических систем. Механизмы биологических явлений преимущественно, если не исключительно, – молекулярные, в то время как феноменология воплощается на клеточном и организменном уровнях. Осознание этого факта

определяет особенности современного этапа в исследовании изменчивости как неотъемлемого свойства живых систем, их функционирования и эволюции.

### КЛАССИФИКАЦИЯ ИЗМЕНЧИВОСТИ

Общепринятая классификация изменчивости представлена на рис. 1 (Инге-Вечтомов, 2010). В основе классификации лежит разделение изменчивости на наследственную и ненаследственную, или модификационную. Это разделение восходит к дарвиновскому рассмотрению неопределенной (наследственной?) и определенной (модификационной?) изменчивости.

При этом мы обычно подразумеваем, что наследственная изменчивость (прежде всего, мутационная) неопределенна, поскольку она воплощается в разнонаправленных по проявлению вариантах спонтанных или индуцированных внешними воздействиями изменений. При этом рассматривают неопределенность в отношении реакции на факторы внешней среды, что ярче всего воплощают мутации, адаптивную ценность которых не определяют индуцирующие их внешние воздействия. К проблеме определения понятия «мутация» мы вернемся в дальнейшем.

Наследственную изменчивость принято подразделять на мутационную и комбинативную. При этом мутационная изменчивость подразумевает возникновение некоторых новых наследуемых вариантов. Поначалу в мутационной теории Г. де Фриза речь шла о чисто фенотипических характеристиках возникающих мутантов. Напомним, что тогда (1901 г.) еще не было ни понятия «ген», ни хромосомной теории наследственности. Несколько десятилетий потребовалось для превращения «мутационной

теории» (происхождения видов!) в «теорию мутационного процесса» (почувствуйте разницу!). Мутации принято подразделять на генные, хромосомные и геномные.

Комбинативную изменчивость связывают с перераспределением негомологичных хромосом, перераспределением хромосомных и нехромосомных генов, что происходит преимущественно в мейозе, а также и в митозе при парасексуальном процессе, и с кроссинговером, т. е. рекомбинацией участков гомологичных хромосом.

Принято особо выделять онтогенетическую изменчивость, объединяющую явления, в основе которых лежит регуляция экспрессии генетической информации, происходящая (регуляция) на всех уровнях организации и экспрессии генетического материала. Таким образом, **онтогенетическая изменчивость имеет черты, общие с модификационной изменчивостью**. Сюда же относят и явления дифференцировки, связанные с перестройками генетического материала, например, с образованием антител и вариациями иммуноглобулинов. Это роднит онтогенетическую изменчивость с наследственной.

Наконец, еще один тип изменчивости (и наследственности) – эпигенетическая, которая стала предметом интенсивного исследования в последние десятилетия (см.: Эпигенетика, 2010, 2012). **Эпигенетическую изменчивость связывают с наследуемыми в ряду клеточных (а иногда и половых) поколений вариациями в экспрессии генетической информации, но не затрагивающими первичную структуру генетического материала**.

Развитие молекулярной генетики, преимущественно с середины XX в., основанное на тенденциях здорового редуционизма, и проникновение в механизмы генетических процессов выявило серьезные противоречия в

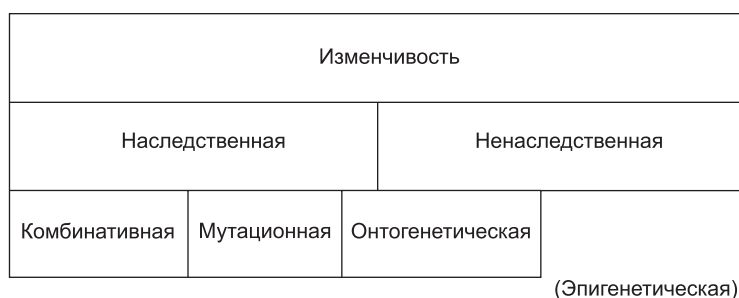


Рис. 1. Классификация изменчивости.

принятой классификации изменчивости. Это поставило под сомнение адекватность наших представлений об изменчивости и предвещает смену парадигмы в этой области генетики. Рассмотрим некоторые очевидные противоречия, возникающие на пути к разработке общей теории изменчивости.

## МОДИФИКАЦИИ

**Модификации принято связывать с адаптивными (и ненаследуемыми) изменениями организмов, адекватными внешним воздействиям.** Отсюда и связь понятий «модификации» и «определенная изменчивость». Адаптивная реакция организма на изменяющуюся среду обитания основана на разнообразных механизмах регуляции экспрессии генетической информации на разных уровнях организации генетического материала и экспрессии генов.

В наши дни представления о модификациях как исключительно адаптивных изменениях не выдерживают критики. Напомним возникновение морфозов, которые достигают у дрозофилы огромной частоты при воздействии некоторых химических веществ на определенные стадии развития (Рапопорт, 1939). Морфозы не наследуются. В этом отношении они соответствуют принятому определению модификаций. В то же время они не представляют собой адекватной, или адаптивной, реакции на применяемое воздействие.

**Модификации могут проявляться и независимо от внешних воздействий.** Впервые это показал Б.Л. Астауров (1927) на примере

спонтанной (автономной, по Астаурову) изменчивости проявления мутации *tetraptera* у дрозофилы (рис. 2), имевшей неполную пенетрантность и варьирующую экспрессивность.

Сопоставляя частоты «уродов», имеющих лишнее правое и лишнее левое крыло, с частотой симметричных аномалий, Б.Л. Астауров пришел к выводу о том, что мутантный ген имеет естественное неустойчивое проявление, реализующееся независимо на левой и правой сторонах тела дрозофилы. Это, несомненно, модификационные изменения, никак не связанные с адаптивной реакцией организма. Более того, речь шла фактически о спонтанной неоднозначности в экспрессии гена (как мы сказали бы сейчас) или о спонтанной модификационной изменчивости по аналогии со спонтанным мутационным процессом. В наши дни такие представления проникли даже в научно-популярные публикации, увы, без ссылки на Б.Л. Астаурова (см., например, Уэннер, 2008).

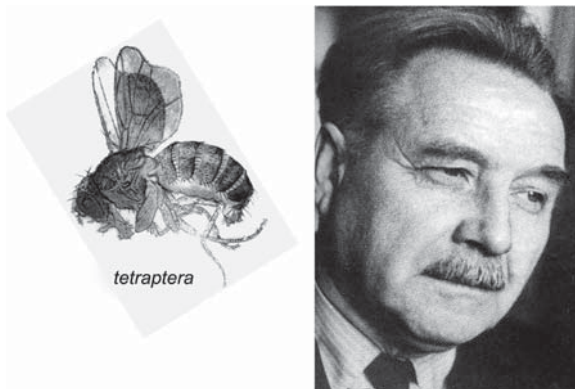
Особо следует отметить, что к модификационным изменениям (по общепринятому их определению) может приводить и фенотипическое проявление первичных изменений генетического материала (см. далее) до их устранения системами репарации (Степченкова и др., 2009). Таким образом, оказывается, что в основе мутаций и некоторых модификаций могут лежать общие механизмы. Это важно понимать при исследовании и дифференциации врожденных и наследственных аномалий, в частности у человека.

## НАСЛЕДСТВЕННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ

Обратимся к мутациям. Прежде всего, настораживает отсутствие общепринятого определения мутации. Рискну предложить еще одно определение мутации, не претендующее на истину в последней инстанции.

**Мутация – наследуемое изменение генетического материала, не сводимое к характеристикам генетического материала (генотипа) родителей.**

Это определение не включает попытки отмежеваться от понятия рекомбинации, что характерно для многих других определений и что представляется нам непродуктивным. Тем не менее предлагаемое определение однознач-



**Рис. 2.** Борис Львович Астауров (1904–1974) и исследованный им мутант *tetraptera D. melanogaster*.

но отделяет мутации от рекомбинационных событий. Тогда словосочетание «транспозонный мутагенез» оказывается неприемлемым, поскольку внедрение транспозона куда бы то ни было есть по своему механизму событие рекомбинации и, строго говоря, к мутациям относиться не должно.

Если принять наше определение, то не выдерживает критики подразделение мутаций на генные, хромосомные и геномные. **Хромосомные мутации – тоже суть события преимущественно рекомбинационные**, как предположил А.С. Серебровский еще в 1929 г. (Serebrovsky, 1929). Ныне это представление стало общепринятым. При этом нужно помнить, что рекомбинация может быть как гомологичной, тогда это – кроссинговер, так и негомолгичной, тогда это приводит к перестройкам как внутри-, так и межхромосомным.

**Мутации и хромосомные перестройки**, разделяемые по их конечному результату, тем не менее, **имеют общие черты по механизму возникновения**.

Здесь вполне уместен еще один исторический экскурс в развитие теории мутационного процесса. Представления о первичных событиях, приводящих к мутациям, связаны, прежде всего, с именами Н.В. Тимофеева-Ресовского и М.Е. Лобашева.

В 1935 г. вышла знаменитая «зеленая тетрадь», или «работа трех мужчин», посвященная разработке **теории мишени** применительно к изучению мутационного процесса у дрозофилы



Александр Сергеевич Серебровский (1892–1948).

(Timofeeff-Ressovsky *et al.*, 1935), в которой мутацию гена (в действительности рецессивные, сцепленные с полом летали) рассматривали как одноактный переход гена из одного аллельного состояния в другое в результате попадания ионизирующей частицы или кванта энергии непосредственно в ген. Трудно преувеличить значение этой работы для всего последующего развития молекулярной биологии. Сложные биологические процессы были удачно упрощены для понимания физиков, что в результате привлекло многих из них в биологию (см. Шредингер, 1972; Welch, 1995).

Параллельно в Ленинградском университете М.Е. Лобашев развивал свою **физиологическую гипотезу** мутационного процесса (Лоба-



Николай Владимирович Тимофеев-Ресовский и Михаил Ефимович Лобашев (1960-е гг. Фото В.Д. Симоненко).

шев, 1947), согласно которой любое мутагенное воздействие сначала приводит к повреждению клетки и генетического материала. Эти первичные повреждения устраняют системы репарации. **Мутация – результат неэффективной репарации.** Не вдаваясь в детали и опуская исторические этапы их уточнения, отметим только, что прав оказался именно Лобашев, как стало очевидным к концу 60-х гг. прошлого века. К этому времени стали общепринятыми представления о ДНК как генетическом материале, а становление **мутаций стали связывать с процессами репарации, происходящей как в ходе репликации, так и при рекомбинации молекул ДНК.**

Изучение репарации ДНК, несущей первичные повреждения, продолжает активно развиваться и в наши дни, и количество фактов, получаемых при изучении различных молекулярных механизмов репарации, порой отстает от теоретических обобщений. Поэтому оставим эту область для самостоятельной лекции и попробуем представить только некоторую обобщенную схему судьбы первичных повреждений (модификаций первичной структуры ДНК, однонитевых и двухнитевых разрывов) и их взаимопревращений в процессе репарации генетического материала (рис. 3).

При этом отметим, что разрывы ДНК лежат непосредственно как в основе генных мутаций, так и хромосомных перестроек, когда репарация происходит путем негомологичной рекомбинации. Этому способствует неслучайное пространственное расположение хромосом в интерфазном ядре, при котором контактируют участки негомологичных хромосом (например, см. рис. 4).

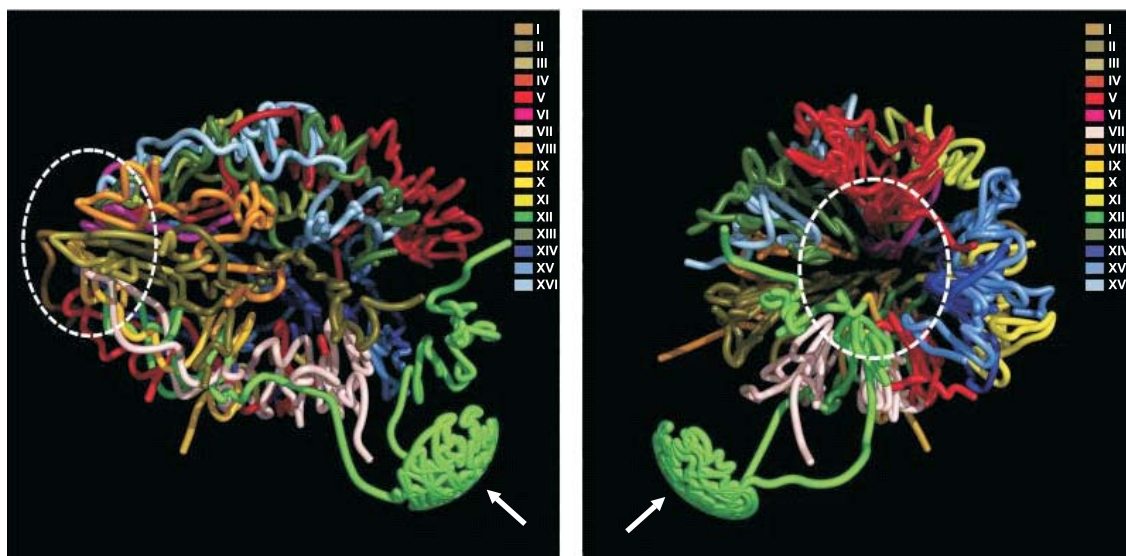
Итак, мутации генов и так называемые «хромосомные мутации» – существенно разные события, хотя и имеющие общие этапы в процессе возникновения.

Совсем иначе обстоит дело с так называемыми «геномными мутациями», приводящими к анеуплоидии и полиплоидии. В основе их возникновения лежат нарушения функций белковых элементов цитоскелета, взаимодействия нитей веретена с центромерами, в результате чего происходят потери или нерасхождение отдельных хромосом или целых геномов. Строго говоря, это – **модификационные (т. е. ненаследуемые) изменения белков, которые тем не менее влекут за собой наследственные изменения генома.**

Этот парадоксальный вывод следует учитывать, рассуждая о современном блочном принципе в теории молекулярной эволюции, в основу



Рис. 3. Судьба первичных повреждений ДНК.



**Рис. 4.** Пространственная модель интерфазного генома дрожжей *S. cerevisiae*.

Каждая из 16 хромосом окрашена своим цветом (Zhijun Duan *et al.*, 2010. P. 363–367).

которого ставятся события дупликации генов, часто путем полиплоидизации с последующей их дивергенцией. Получается, что мы недооцениваем роль модификаций в эволюции.

При этом следует напомнить, что полиплоидия может возникать и в результате гибридизации, что уж никак к мутациям не относится.

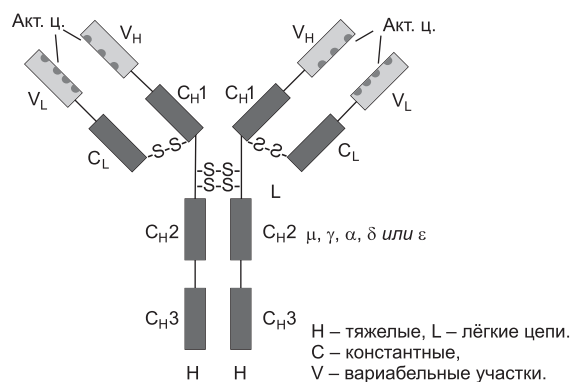
### ОНТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ

Согласно распространенной классификации **онтогенетическая изменчивость занимает промежуточное положение между наследственной и модификационной**. Как уже упоминалось, это и регуляция действия генов (о многочисленных механизмах которой следует рассказывать отдельно), и перестройки генетического материала, как в случае дифференцировки лимфоцитов. В последнем случае можно сказать, что ген для конкретной цепи иммуноглобулина не существует в половых клетках млекопитающих, а формируется в онтогенезе путем направленной сборки «заготовок» и последующего сайт-направленного мутагенеза в участках, кодирующих переменные фрагменты полипептидных цепей (рис. 5, 6).

Можно полагать, что более специфично с **онтогенезом связана эпигенетическая изменчивость**, при которой происходят некоторые изме-

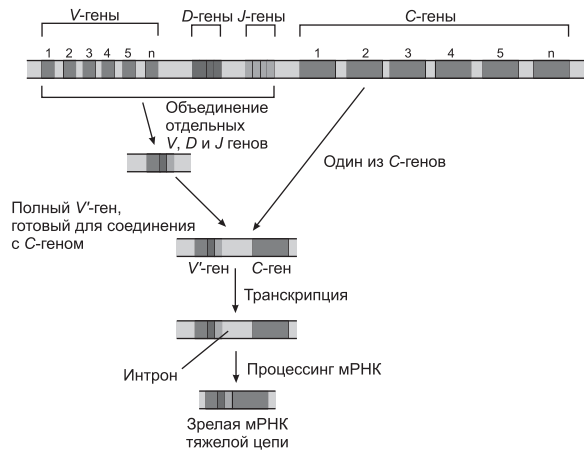
нения, обычно **не затрагивающие первичную структуру ДНК**, но, тем не менее, устойчиво наследуемые в ряду клеточных делений. Эти изменения лежат в основе процессов детерминации (и трансдетерминации) и последующей дифференцировки стволовых клеток.

То, что эпигенетическое наследование должно быть связано с регуляторным состоянием гена, устойчиво передаваемым при клеточных делениях, впервые предположил в 1949 г. М. Дельбрюк (по: Jablonka, Lamb, 1995). В 1975 г. Р.Н. Чураев и В.А. Ратнер сформулировали **теорию эпигена** (Чураев, Ратнер, 1975; Чураев, 2005), объясняющую, каким образом то или другое из двух альтернативно регулируемых состояний может устойчиво наследоваться при взаимодействии двух взаимно репрес-



**Рис. 5.** Цепи иммуноглобулинов.



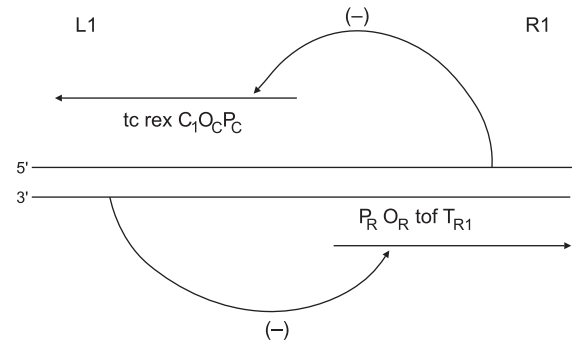


**Рис. 6.** Объединение участков генома, кодирующих тяжелую цепь иммуноглобулина (по: (Жимулев, 2002)).

Отобранные *D*- и *J*-сегменты перемещаются из различных районов хромосомы и формируют переменный ген, который соединяется с одним из константных *C*-генов. Интрон между переменной и константной последовательностями удаляется из РНК-транскрипта, в результате чего образуется молекула мРНК.

сирующихся оперонов (рис. 7). На рубеже веков эта теория получила блестящее экспериментальное подтверждение, когда эпиген, сконструированный методами генной инженерии, работал в клетках *E. coli* в полном соответствии с теорией (Tchuraev *et al.*, 2000).

Чураев и Ратнер «подглядели» свою модель эпигена в онтогенезе бактериофага  $\lambda$ . В то же время организация генетического материала эукариот отличается от таковой прокариот и их вирусов. У них нет оперонов, подобных бакте-



**Рис. 7.** Модель эпигена Р.Н. Чураева и В.А. Ратнера, 1975 (Чураев, 2005. С. 99–122).

Двухкомпонентный эпиген  $\lambda$ -фага. Белковые продукты цистронов  $C_1$  и  $toI$  являются репрессорами для оперонов R1 и L1 соответственно.  $P_C O_C$ ,  $P_R O_R$  – промотор-оперативные зоны оперонов L1 и R2,  $t_C t_{R1}$  – терминаторы транскрипции этих оперонов.

риальным единицам транскрипции и регуляции, включающим несколько генов. Регуляция экспрессии отдельных генов осуществляется на уровне хроматина, состоящего из ДНК и белков-гистонов. Идея активации и репрессии генов через модификации ДНК и гистонов хроматина, в первую очередь метилирования ДНК и ацетилирования, фосфорилирования и др. модификаций гистонов, стала основным предметом изучения исследователей эпигенетических механизмов. **Особое значение придают модификациям гистонов** через присоединение (или отщепление) как низкомолекулярных лигандов, так и убиквитин-подобных пептидов (Kouzaridis, Berger, 2007), как это частично суммировано в табл. 1.

**Таблица 1**

Типы ковалентной посттрансляционной модификации гистонов и их последствия (Kouzaridis, Berger, 2007, 2010)

Тип модификации	Влияние на транскрипцию	Гистоны (модифицируемый аминокислотный остаток)
1		
Ацетилирование	Активация	H3 (K9, K14, K18, K56) H4 (K5, K8, K12, K16); H2A? H2B (K6, K7, K16, K17)
Фосфорилирование	Активация	H3 (S10)
Метилирование	Активация Репрессия	H3 (K4, K36, K79) H3 (K9, K27); H4 (K20)
2		
Убиквитинирование	Активация Репрессия	H2B (K123) H2A (K119)
Сумоилирование	Репрессия	H2A (K126), H2B (K6, K7, K16, K17) H3 (?); H4 (K5, K8, K12, K16)

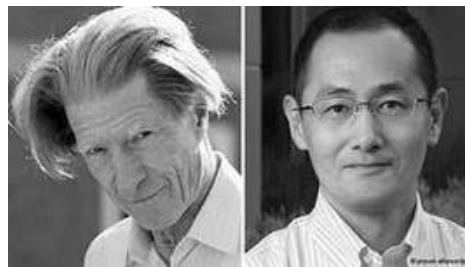
Эти подходы блестяще воплотились в открытии Ш. Яманаки, показавшего, что **соматические клетки могут быть превращены в не дифференцированные стволовые клетки** путем трансформации их всего четырьмя транскрипционными и регуляторными факторами (Takachashi, Yamanaka, 2006), получившего в 2012 г. Нобелевскую премию за это открытие (вместе с Дж. Гёрдоном). В дальнейшем такие клетки могут быть искусственно дифференцированы в клетки различных тканей и органов, что открывает огромные перспективы для выращивания индивидуальных «запасных частей» в замещающей терапии различных заболеваний человека.

Гены, достаточные для трансформации фибробластов в плюрипотентные (стволовые) клетки (iPS) (Takachashi, Yamanaka, 2006)

*Oct3/4* – транскрипционный фактор  
*Sox2* – транскрипционный фактор  
*c-Myc* – транскрипционный фактор  
*Klf4* – белок, контролирующий движение по микротрубочкам

Еще раньше было оценено по достоинству открытие **интерференции РНК как механизма, вовлеченного в регуляцию экспрессии генетической информации**. Это открытие сделали К. Мелло и А. Файр, показавшие роль небольших (около 20 нуклеотидов) молекул РНК в репрессии генов у *C. elegans* (Нобелевская премия 2006 г.). Не говоря уже о большом теоретическом значении этого открытия, мы получили потенциальную возможность вмешиваться в течение некоторых наследственных заболеваний путем выключения генов, обуславливающих патологические эффекты, а также возможность маркирования генов без использования мутаций.

В то же время успехи той области, которую мы называем эпигенетикой, и, соответственно, касательно эпигенетической изменчивости следует принимать с осторожностью. Стоит ли употреблять понятие «эпимутация», если и в определении, что такое «мутация», до сих пор нет общего мнения. Само понятие эпигенетической наследственности (и изменчивости) не



Дж. Гёрдон

Ш. Яманака

Лауреаты Нобелевской премии 2012 г. за открытие индуцированных плюрипотентных стволовых клеток.

К. Мелло  
(1960)А. Файр  
(1959)

Лауреаты Нобелевской премии 2006 г. по физиологии и медицине за открытие интерференции РНК.

достаточно строго определено и включает в себя весьма разнородные явления. Эпигенетика отнюдь не сводится к модификации хроматина (ДНК и гистонов). **Пространственную организацию ядра также рассматривают как «механизм эпигенетической регуляции»** (Эпигенетика, 2012), хотя само словосочетание «эпигенетическая регуляция» по сути является тавтологией, как мы старались показать ранее. Нет необходимости останавливаться на этом подробнее, поскольку проблемы эпигенетики будут рассмотрены в статье Б.Ф. Ванюшина в данном номере журнала.

## БЕЛКОВАЯ НАСЛЕДСТВЕННОСТЬ И ИЗМЕНЧИВОСТЬ

Еще одна область, несомненно, перекрывающаяся с эпигенетикой, – это **исследование белковой наследственности и изменчивости** (Эпигенетика, 2012). Открытие явления белковой наследственности связано с изучением инфекционных нейродегенеративных заболеваний, в которых в качестве инфекционного

агента выступали прионы – агрегаты (амилоиды) клеточных белков:

Куру

Смертельная семейная бессонница (FFI)

Болезнь Гершмана-Штрасслера-Шайнкера (GSS)

Болезнь Кройцфельда-Якоба (CJD)

Бычья губчатая энцефалопатия («Коровье бешенство»)

Скрэпи (овцы, козы, олени)

Существует также несколько десятков амилоидозов неинфекционного типа. Среди них болезни: Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона и многое другое. Общие положения теории прионогенеза были разработаны для млекопитающих С. Прузинером (Нобелевская премия 1997 г.) (рис. 8) и доказаны вскоре для дрожжей, у которых также были обнаружены инфекционные белковые агрегаты, которые ранее были описаны как цитоплазматические наследственные факторы (например, Сох, 1965), а после разработки теории прионов были использованы для белковой трансформации дрожжей (Prusiner, 1994; Fink, 2005).

Как остроумно заметил Дж. Финк, история молекулярной генетики могла быть совсем иной, если бы белковая трансформация была открыта раньше, чем трансформация при помощи ДНК (Fink, 2005).

**Возникновение амилоидов**, в частности инфекционных амилоидов-прионов, **связано с перестройкой (модификацией) вторичной и третичной структур белка PrP<sup>C</sup>** – одного

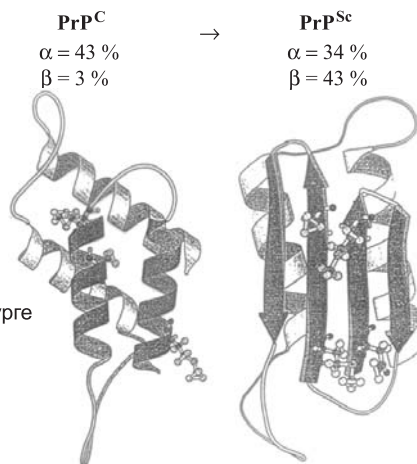
Инфекционный агент прионных заболеваний млекопитающих – белок **PrP (Prion Protein)**  
**proteinaceous infection = pro-in → prion**

из нормальных белков нервной системы млекопитающих, функция которого не до конца выяснена. Этот белок обогащается  $\beta$ -слоями, что превращает его в прионогенный белок PrP<sup>Sc</sup> (Sc – от Scrapy) (см. выше и рис. 8). Последний агрегирует с вновь синтезируемыми гомологичными молекулами, изменяя их пространственную укладку «по своему образу и подобию», т. е. выступает в роли **пространственной, или конформационной, матрицы**. Таким образом происходит рост линейного агрегата, от которого периодически отщепляются фрагменты (не менее 15 белковых субъединиц), обладающие инфекционной природой: попадая в здоровый ранее организм, они служат своего рода центрами биологической кристаллизации, обеспечивая рост новых агрегатов. Существенно, что первичная структура белка при этом не изменяется, равно как и структура кодирующего его гена. Структура амилоидов изучена недостаточно, тем не менее, имеющиеся данные позволяют строить правдоподобные компьютерные модели, одна из которых представлена на рис. 9.

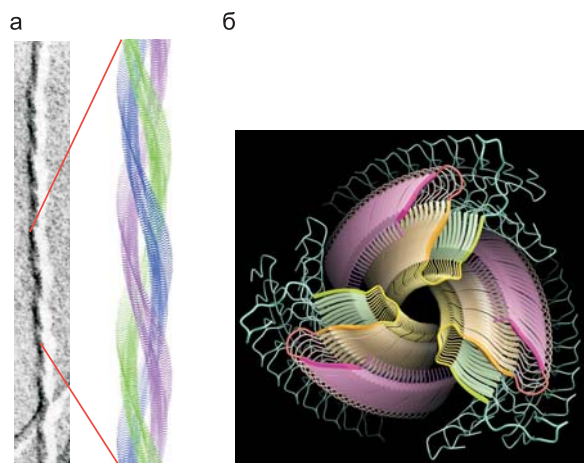
Если у млекопитающих известны прионы, предшественники которых кодирует один эволюционно консервативный ген *PRNP*, то у низших эукариот, прежде всего у **дрожжей-сахаромицетов**, описано уже более десятка **различных прионов** и кодирующих их струк-



Стэнли Прузинер в Санкт-Петербурге  
Нобелевская премия 1997 г.  
(фото Ю. Соповой)



**Рис. 8.** Прионизация белка PrP: превращение PrP<sup>C</sup> → PrP<sup>Sc</sup> (Prusiner, 1994. P. 4611–4614).



**Рис. 9.** Модель (параллельные суперскрученные  $\beta$ -слои) амилоидных фибрилл человеческого амилина (Kajava *et al.*, 2005. P. 247).

а – растянутая фибрилла, состоящая из трех цепочек агрегированных полипептидов; электронная фотография и ее реконструкция; б – компьютерная модель поперечного среза структуры, показанной слева.

турных генов. Генетический анализ определяет все эти прионы как нехромосомные наследственные факторы, локализуемые в цитоплазме или в ядре (Инге-Вечтомов и др. в кн. Эпигенетика, 2012). Следует также отметить, что прионизация белков и шире – образование амилоидных агрегатов вовсе не обязательно представляет собой патологический процесс. У разных организмов известен ряд адаптивных признаков, обусловленных амилоидными структурами (Там же).

Феномен белковой наследственности примечателен в двух отношениях в связи с обсуждаемой проблемой изменчивости.

**1. Прионизация белка, представляющая собой модификацию его пространственной структуры, тем не менее, наследуется в митозе и в мейозе у низших эукариот, несмотря на то что первичная структура белка, как и структура кодирующего его гена, при этом не изменились.**

**2. Прионы представляют собой наследственные факторы у низших эукариот, но не у млекопитающих.** У последних – это модификационное изменение, не наследуемое в мейозе.

Это лишний раз подчеркивает противоречивость принятой классификации изменчивости, по которой один и тот же механизм оказывается вовлеченным как в модификационную, так и наследственную изменчивость.

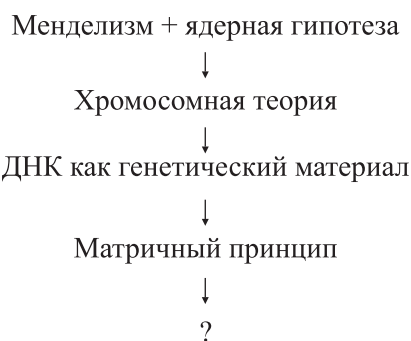
## ИНФЕКЦИОННАЯ (СИМБИОТИЧЕСКАЯ) НАСЛЕДСТВЕННОСТЬ ИЛИ МОДИФИКАЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ?

Не меньше проблем возникает, когда мы обращаемся к области экологической генетики, в значительной степени определяющей современный эволюционный синтез. В этом случае само понятие признака требует рассмотрения взаимодействия организмов разных таксонов, составляющих единую экосистему. Достаточно напомнить сигма-вирус, определяющий чувствительность дрозофилы к углекислоте, способность к фиксации азота как результат взаимодействия почвенных бактерий и высших растений, целый веер признаков членистоногих, обусловленный эндосимбиотической бактерией *Wolbachia* и т. д. Эти примеры рассматривают часто как примеры симбиотической (инфекционной) наследственности, однако их можно рассматривать и как примеры модификационной изменчивости. Рассмотрение этой проблемы потребовало бы отдельной лекции по экологической генетике. Далее рассмотрим подробнее вопросы внутривидовой изменчивости.

## МАТРИЧНЫЙ ПРИНЦИП И МЕХАНИЗМЫ ИЗМЕНЧИВОСТИ

Представления о типах изменчивости и их механизмах развивались вместе с основными концепциями генетики.

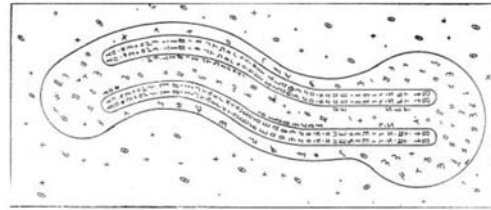
Смена и преемственность парадигмы в генетике



Объединение ядерной гипотезы и менделизма породило хромосомную теорию наследст-



Omnis molecula ex molecula



**Рис. 10.** Николай Константинович Кольцов (1872–1940) – провозвестник матричного принципа в биологии и предложенная им схема строения хромосомы, подразумевающая возможность ее матричного воспроизведения (из: (Н.К. Кольцов, 1928)).

венности. Последняя вместе с оргanelльной наследственностью была объединена в представлениях о ДНК как универсальном генетическом материале. Эта молекулярная парадигма воплотилась, в конце концов, в матричном принципе. Провозвестником его был Н.К. Кольцов, предложивший матричный принцип воспроизведения хромосом (рис. 10) (Кольцов, 1936).

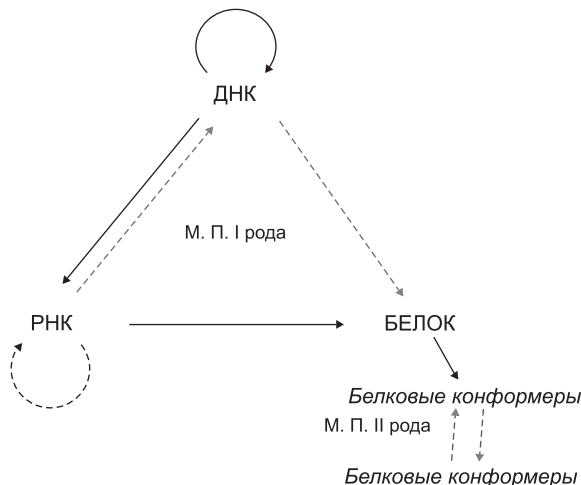
Сегодня матричный принцип воплощает Центральная догма молекулярной биологии Ф. Крика (Crick, 1958, 1970). Эти представления, казалось бы, не совместимы с концепцией белковой (прионной) наследственности. В действительности матричный принцип охватывает и эту группу явлений. Можно представить себе

существование в клетке двух типов матриц и соответственно – двух типов матричных процессов (МП), а именно: МП I рода, когда линейные матрицы воспроизводят последовательность элементов матрицы, и МП II рода, когда мы имеем дело с пространственными, или конформационными, матрицами (рис. 11). В настоящее время известны пространственные матрицы только белковой природы.

Все МП I рода определенно обладают некоторыми общими свойствами. Не будем говорить о трех стадиях: инициации, элонгации (собственно копировании), терминации, что тривиально. Важнее то, что для них характерны еще два общих свойства (табл. 2):

– Первое свойство – поливариантность и связанная с ней неоднозначность, которую часто характеризуют как частоту ошибок матричного синтеза. Лучше говорить о неоднозначности, так как «ошибки» – слишком антропоморфно.

– Второе свойство – способность к репарации или коррекции. Лучше всего (но еще далеко не окончательно) исследована репарация при репликации. При этом рекомбинация возникает



**Рис. 11.** Центральная догма молекулярной биологии (Crick, 1958, 1970. Р. 138–163) с дополнением как отражение матричного принципа.

М. П. – матричные процессы.

**Таблица 2**

Характеристики, общие для матричных процессов I рода

Этапы	Инициация Элонгация (копирование) Терминация
Свойства	Поливариантность (неоднозначность) Возможность коррекции (репарации)

как побочный результат коррекции (рекомбинационная репарация). Вспомните рис. 3. Хорошо известна рибосомная коррекция при трансляции. Слабее охарактеризована в этом отношении транскрипция.

Эти два свойства (неоднозначность и способность к коррекции) находятся в оптимальном балансе, отработанном в ходе эволюции, что и выражается в фиксируемом экспериментально уровне неоднозначности каждого МП I рода (табл. 3).

По-видимому, первым подошел к этой проблеме Н.И. Шапино в 1938 г., говоря о мутационном процессе как адаптивном признаке вида (Шапино, 1938). Сказанное справедливо для всех трех МП I рода. Их неоднозначность может быть регулируемой или канализированной в определенные клетки, участки генома или участки отдельного гена. Известны случаи регулируемой соматической мутабельности (мы приводили пример варибельных участков иммуноглобулинов), известны примеры осмысления кодонов-нонсенсов в результате модификации оснований мРНК или закономерное прочтение таких кодонов как значащих при трансляции, так же, как и закономерное изменение (сдвиг) рамки считывания.

Насколько сказанное об общих свойствах МП I рода применимо к МП II рода, о которых мы знаем гораздо меньше? Свойство неоднозначности отмечено в процессе прионизации и воспроизведения белков-прионов (см., например: Wateman, Wickner, 2013). Так, прион дрожжей – фактор [*PSI*<sup>+</sup>] может существовать в нескольких вариантах, различающихся стабильностью и степенью инактивации фактора терминации трансляции, из которого он образуется. Известны разные клоны приона млекопитающих. Свойство коррекции применительно к МП II рода, скорее всего, следует связывать с активностью некоторых белков-шаперонов, ответственных за пространственную укладку полипептидных цепей. Первая попытка подобного или близкого по смыслу рассмотрения матричных процессов II рода была предпринята Ю. Черновым (Chernoff, 2001).

Все сказанное подталкивает нас к принятию «другой» классификации изменчивости, основанной на ее молекулярных механизмах (рис. 12). Неоднозначность репликации мы склонны связывать с наследственной, прежде всего

Таблица 3

Неоднозначность (частота «ошибок») матричных процессов I рода (по: Roy, Ibbá, 2006)

Процесс	Уровень неоднозначности
Репликация ДНК	$10^{-8}$ – $10^{-10}$
Транскрипция ДНК	$10^{-4}$
Трансляция:	
Собственно трансляция мРНК	$10^{-4}$
Аминоацилирование тРНК	$10^{-3}$ – $10^{-4}$

мутационной, изменчивостью, а неоднозначность в экспрессии генетической информации (транскрипции и трансляции) связывать с модификационной изменчивостью.

### БИОЛОГИЧЕСКИЙ «ПРИНЦИП НЕОПРЕДЕЛЕННОСТИ»

Оптимизм в отношении нашего понимания молекулярных механизмов изменчивости не должен быть чрезмерным. Представленная здесь схема сталкивается, прежде всего, с отсутствием однозначного соответствия между конкретными молекулярными механизмами и явлениями на фенотипическом (клеточном, организменном) уровне. Один и тот же механизм может быть ответственен за различные типы изменчивости согласно традиционной классификации. Самый простой пример – соматические мутации и рекомбинации у многоклеточных организмов – нельзя отнести к наследствен-

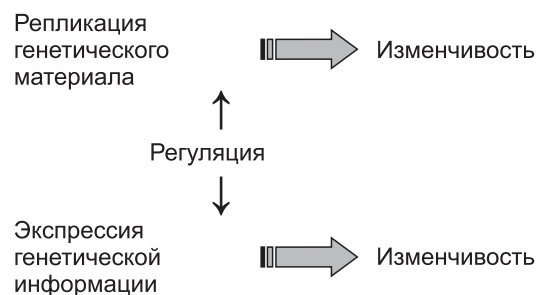


Рис. 12. Классификация типов изменчивости на молекулярном уровне, определяемая неоднозначностью репликации генетического материала и экспрессии генетической информации.

ной изменчивости в отсутствие вегетативного размножения. В то же время у одноклеточных этой проблемы чаще всего не существует. Уже упоминалось проявление первичных поврежденных генетического материала до их устранения репарацией как модификационные изменения. Наконец, прионизация белков – пример наследственной изменчивости у низших эукариот, но в то же время – пример модификаций у млекопитающих. Примеры такого рода можно продолжить, особенно, если обратиться к популярной ныне эпигенетике.

Из всего этого следует, что существует своего рода биологический «принцип неопределенности», когда нет строго однозначного соответствия между молекулярными механизмами и явлениями изменчивости на уровне организмов. Впервые о биологическом «принципе неопределенности» писал Е.Д. Сverdлов (2009) применительно к частному случаю – осмысливанию кодонов-нонсенсов, т. е. к неоднозначности трансляции. В действительности предмет обсуждения значительно шире. Биологический «принцип неопределенности» вытекает из многоуровневости организации живых систем. В результате **данный конкретный механизм может быть ответственен как за наследственную, так и ненаследственную изменчивость в зависимости от таксономической принадлежности и стадии развития исследуемого объекта.** Обратное тоже верно: разные молекулярные механизмы могут отвечать за один и тот же тип изменений.

Распространенная система понятий и классификация изменчивости – это то, что мы используем за неимением лучшего. В действительности мы являемся свидетелями и участниками формирования новой парадигмы в рассмотрении изменчивости как фундаментального свойства живых систем.

## ЛИТЕРАТУРА

- Астауров Б.Л. Исследование наследственного изменения гальтеров у *Drosophila melanogaster* Schin // Журн. эксп. биологии. 1927. Сер. А. Т. 3. Вып. 1/2. С. 1–61.
- Гайсинович А.Е. Зарождение и развитие генетики. М.: Наука, 1988. 423 с.
- Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика / Отв. ред. Е.С. Беляева, А.П. Акифьев. Новосибирск: Сиб. универ. изд-во, 2002. 458 с.
- Инге-Вечтомов С.Г. Генетика с основами селекции. СПб.: Изд-во Н-Л, 2010. 718 с.
- Кольцов Н.К. Наследственные молекулы // Организация клетки. М.; Л.: Гос. изд. биол. и мед. лит-ры, 1936. С. 585–622.
- Кун Т. Структура научных революций. М.: Прогресс, 1977. 300 с.
- Лобашев М.Е. Физиологическая (паранекротическая) гипотеза мутационного процесса // Вестн. Ленингр. ун-та. 1947. № 8. С. 10–29.
- Рапопорт И.А. Специфические морфозы у дрозофилы, вызванные химическими веществами // Бюл. эксперим. биол. и медицины. 1939. Т. 7. Вып. 5. С. 424–426.
- Сverdлов Е.Д. Взгляд на жизнь через окно генома. М.: Наука, 2009. Т. 1. 525 с.
- Степаченкова Е.И., Коченова О.В., Инге-Вечтомов С.Г. «Незаконная» гибридизация и «незаконная» цитодукция у гетероталличных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* как система для анализа генетической активности экзогенных и эндогенных факторов в «альфа-тесте» // Вестн. СПбГУ. 2009. Сер. 3. Биол. Вып. 4. С. 129–139.
- Уэннер М. Когда шум – не помеха // В мире науки. 2008. № 10. С. 6–7.
- Чураев Р.Н. Контурь неканонической теории наследственности: от генов к эпигенам // Журн. общей биологии. 2005. Т. 66. № 2. С. 99–122.
- Чураев Р.Н., Ратнер В.А. Моделирование динамики систем управления развитием  $\lambda$ -фага. Исследования по математической генетике. Новосибирск: ИЦиГ СО АН СССР, 1975. С. 5–66.
- Шапиро Н.И. Мутационный процесс как адаптивный признак вида // Зоол. журнал. 1938. Т. 17. № 4. С. 592–601.
- Шредингер Э. Что такое жизнь? С точки зрения физика. М.: Атомиздат, 1972. 88 с. (Оригинал: Schrodinger E. What is Life? The Physical Aspect of the Living Cell. Cambridge. 1945. N.Y.: The Macmillan Co.).
- Эпигенетика / Ред. С.Д. Элліса, Т. Дженювейна, Д. Рейнберга. М.: Техносфера, 2010. 495 с.
- Эпигенетика / Ред. С.М. Закияна, В.В. Власова, Е.В. Дементьевой. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2012. 586 с.
- Bateman D.A., Wickner R.B. The [PSI<sup>+</sup>] prion exists as a dynamic cloud of variants // PLOS Genet. 2013. V. 9. P. 1–13.
- Chernoff Y.O. Mutation process at the protein level: is Lamarck back? // Mutat. Res. 2001. V. 488. P. 39–64.
- Crick . Central dogma of molecular biology // Nature. 1970. V. 227. P. 561–563.
- Crick H.F.C. On protein synthesis // Symp. Soc. Exptl. Biol. 1958. V. 12. P. 138–163.
- Cox B.  $\psi$ , a cytoplasmic suppressor of super-suppression in yeast // Heredity. 1965. V. 20. P. 505–521.
- Fink G. A Transformation principle // Cell. 2005. V. 120. P. 153–154.
- Jablunka E., Lamb M.J. Epigenetic Inheritance and Evolution: The Lamarckian Dimension. N.Y.: Oxford Univ. Press, 1995. P. 82.
- Kouzaridis T., Berger S. Chromatin modifications and their mechanism of action // Epigenetics. Cold Spring Harbor

- Laboratory Press. N.Y.: Cold Spring Harbor, 2007. P. 191–209.
- Prusiner S.B. Inherited prion diseases // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 4611–4614.
- Roy H., Iba M. Molecular biology: sticky end in protein synthesis // Nature. 2006. V. 433. P. 41–42.
- Serebrovsky A.S. A general scheme for the origin of mutations // Amer. Naturalist. 1929. V. 63. P. 374–378.
- Takachashi K., Yamahaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // Cell. 2006. V. 126. P. 663–676.
- Tchuraev R.N., Stupak I.V., Tropinina T.S., Stupak E.E. Epigenes: design and construction of new hereditary units // Federation Eur. Biochem. Soc. Lett. 2000. V. 486. P. 200–202.
- Timofeeff-Ressovsky N.W., Zimmer K.G., Delbruck M. Über die Natur der Genmutation und der Genstruktur // Nachr. Ges. Wiss. Göttingen. Fachr. 1935. VI. N. F. Bd. 1. No. 13. S. 189–245. (Русский перевод см: Тимофеев-Ресовский Н.В. Избр. труды. М.: Наука, 2009. С. 437–480).
- Welch G.R. Schrödinger's What is life?: a 50-year reflection // TIBS. 1995. V. 20. P. 45–48.
- Zhijun Duan, Andronescu M., Schutz K. *et al.* A three-dimensional model of the yeast genome // Nature. 2010. V. 465. P. 363–367.

### Рекомендуемая литература для дополнительного чтения

- Инге-Вечтомов С.Г. Что мы знаем об изменчивости? // Экол. генетика. 2010. № 4. С. 4–9.
- Инге-Вечтомов С.Г. Изменчивость, матричный принцип и теория эволюции // Чарльз Дарвин и современная биология. 2010. С. 49–60.
- Лукин Е.И. О причинах замены в процессе органической эволюции ненаследственных изменений наследственными (с точки зрения теории естественного отбора) // Эволюционная биология: История и теория. 2005. Вып. III. С. 19–32.
- Молчание генов: Сб. науч. тр. Пушкино: ОНТИ ПНЦ РАН, 2008. 310 с.
- Тихонович И.А., Проворов Н.А. Симбиозы растений и микроорганизмов // Молекуляр. генетика агросистем будущего. СПб.: Изд-во СПбУ, 2009.
- Jablonka E., Lamb M.J. The epigenome in evolution: beyond the modern synthesis // Информ. вестн. ВОГиС. 2008. Т. 12. № 1/2. С. 242–257.
- Ronemus M., Martienssen R. Methylation mystery // Nature. 2005. V.433. P. 472–473.
- Sonneborn T.M. Positional information and nearest neighbor interactions in relation to spatial patterns in ciliates // Ann. Biol. 1975. V. 14. P. 565–584.



УДК 577.21:577.24

## ЭПИГЕНЕТИКА СЕГОДНЯ И ЗАВТРА

© 2013 г. **Б.Ф. Ванюшин**

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва, Россия,  
e-mail: vanyush@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 3 июня 2013 г. Принята к публикации 1 ноября 2013 г.

Эпигенетика – наука о наследуемых свойствах организма, которые не связаны с изменением собственно нуклеотидной последовательности ДНК и могут быть не прямо, а опосредованно закодированы в геноме. К числу известных эпигенетических механизмов (сигналов) относятся: энзиматическое метилирование ДНК, гистоновый код (разные энзиматические модификации гистонов – ацетилирование, метилирование, фосфорилирование, убиквитинирование и др.) и замалчивание генов малыми РНК (miRNA, siRNA). Обычно все эти процессы взаимосвязаны и иногда даже частично взаимозаменяемы. Это, скорее всего, служит обеспечению надежности реализации соответствующей эпигенетической сигнализации. Так или иначе эти процессы связаны с изменением структурной и функциональной организации хроматина. Метилирование ДНК у растений и животных, осуществляемое сайт-специфическими ферментами – цитозиновыми ДНК-метилтрансферазами, – приводит к возникновению в ней остатков 5-метилцитозина ( $m^5C$ ) в последовательностях CG, CNG и CNN. У растений открыто еще и адениновое метилирование ДНК. Появление остатков  $m^5C$  в ДНК существенно сказывается на взаимодействии ДНК с разными, в том числе и регуляторными, белками. Часто метилирование ДНК блокирует связывание ДНК с такими белками и препятствует транскрипции генов, а иногда оно наоборот является обязательным условием для связывания белков. Существуют даже специальные  $m^5CpG$  ДНК связывающие белки. Связывание таких белков с ДНК аранжирует весь ансамбль белков транскрипционного аппарата и необходимо для его активности. Таким образом, метилирование ДНК может служить сигналом как позитивного, так и негативного контроля за активностью генов. Метилирование ДНК у эукариот видо- и тканеспецифично, оно контролируется гормонами, изменяется с возрастом и является одним из механизмов клеточной и половой дифференцировки. Метилирование ДНК контролирует все генетические процессы (репликация ДНК, репарация, рекомбинация, транскрипция и др.). Нарушение метилирования ДНК и искажение других эпигенетических сигналов приводят к преждевременному старению и таким заболеваниям, как рак, диабет, астма, различные тяжелые психические расстройства и др. Профиль метилирования ДНК изменяется при канцерогенезе, служит надежным диагностическим признаком разных форм рака уже на ранних этапах канцерогенеза. Эпигенетические параметры имеют первостепенное значение для расшифровки механизмов соматической изменчивости, характеристики и идентификации клонов и клеточных культур (стволовые клетки) и их направленной дифференцировки. Целенаправленное изменение метилирования ДНК служит эффективным биотехнологическим средством активации экспрессии генов запасных белков семян у растений и, например, наследуемого увеличения белковости зерна пшениц. Ингибитор метилирования ДНК (5-азациитидин) используется для лечения рака кожи. Разные регуляторы энзиматических модификаций гистонов уже нашли клиническое применение при лечении некоторых болезней человека и животных. Большие надежды возлагаются сегодня на использование специфических малых РНК в терапии рака и других болезней, это преимущественно связывают с направленным ингибированием активности генов, отвечающих за раковую трансформацию клеток и метастазирование. Терапевтическое действие многих коротких биологически активных пептидов во многом может определяться их действием на эпигенетическом уровне. Таким образом, фенотип на самом деле представляет собой продукт совокупной реализации генома и эпигенома. В этой связи вполне справедливо известное выражение Нобелевского лауреата Питера Медавара «Генетика предполагает, а эпигенетика располагает». Эпигенетика является бурно развивающейся, очень

перспективной наукой XXI в., уже основательно проросшей в передовые биотехнологии, медицину и сельское хозяйство.

**Ключевые слова:** апоптоз, гистон, ДНК-метилтрансфераза, ДНК-связывающие белки, геномика, геносистематика, замалчивание генов, клеточная дифференцировка, метилирование ДНК, митохондрии, онтогенез, репликация, рак, старение, транскрипция, хроматин, эволюция, эндонуклеазы, эпигенетика, 5-метилцитозин, N<sup>6</sup>-метиладенин.

## ВВЕДЕНИЕ

Генетика предполагает, а эпигенетика располагает.

*Питер Медавар, Нобелевский лауреат*

Всякий раз убеждаешься в том, что как будто все ученые и специалисты понимают, что такое эпигенетика, но до сих пор каждый понимает ее по-своему. Термин «эпигенетика» предложен К. Уоддингтоном как изучение причинных механизмов реализации генома (генов) в фенотип. Фенотипические изменения, которые происходят от клетки к клетке во время развития многоклеточного организма, были названы им как «фенотипический ландшафт». На самом деле это очень общее и очень неконкретное понятие (определение), которое, по сути дела, объединяет и обозначает все развитие организма, в том числе и все механизмы онтогенеза. Д. Нэнни (D.L. Nanney) рассматривает эпигенетику как область знания, объясняющую как и почему клетки (организмы) с идентичным генотипом могут различаться по наследуемому фенотипу. Другие (например, Д. Готчлинг, А. Риггс) описывают эпигенетику как науку о наследуемых изменениях, которые не связаны с мутациями собственно в ДНК. С. Эллис определяет эпигенетику как наследуемую «клеточную память», связанную со структурными изменениями хроматина. Это определение хоть и слишком общее и расплывчатое, по сути, очень верно, потому что многое в онтогенезе в конечном итоге определяется именно модуляциями структуры хроматина. Известный генетик Робин Холлидей рассматривает эпигенетику как «изучение контроля за активностью генов во времени и пространстве в процессе развития сложных организмов». Он относится к числу первых, кто указал на возможную биохимическую природу (метилирование ДНК) наследуемых эпигенетических сигналов. Эти сигналы сопутствуют и часто имеют решающее значение в ходе реали-

зации генетической информации. Эпигенетику рассматривают как свод знаний об изменениях в транскрипции генов в результате модуляции организации хроматина без изменения последовательности ДНК. В принципе, пожалуй, этим можно было бы и ограничиться. Мне бы хотелось к этому лишь добавить, что *эпигенетика – это наука о наследуемых свойствах организмов, которые не связаны с изменением собственно нуклеотидной последовательности ДНК, и они могут быть не прямо, а косвенно закодированы в геноме*. Эта бурно развивающаяся область знаний уже основательно встала на ноги, превратилась в самостоятельную науку и уже существенно проросла в современные биотехнологию и медицину. К эпигенетическим феноменам к тому же относят, в частности, явление лизогении у бактериофагов, так называемый эффект положения генов у дрозофилы, прионные болезни, инактивацию X-хромосомы при половой дифференцировке у животных и др. Так или иначе, уже на ранних этапах зарождения эпигенетики ее связывали с реорганизацией (ремодулированием, перестройками) хроматина и модификациями белков хроматина, в том числе гистонов. В 1930 г. Х. Мюллер описал мутации у дрозофилы, которые приводили к изменению фенотипа и были обусловлены, собственно, не изменением, а перемещением генов – перестройкой хромосом («eversporting displacements»). Таким образом, активность гена зависит от его местоположения в геноме, хроматине и хромосоме.

Из классических работ Нобелевского лауреата Джона Гёрдона по пересадке ядер в оплодотворенные безъядерные яйцеклетки шпорцевой лягушки стало ясно, что реализация генетической информации ядерной ДНК (яДНК) и развитие эмбриона не связаны с какими-либо мутациями в яДНК, а запускаются и контролируются некими компетентными эпигенетическими элементами (сигналами)

цитоплазмы. Интересно, что картина реснитчатости у простейшего – парамеции – передается клонально. Установлено, что транспозоны могут определять профиль экспрессии генов в соматических клетках. С другой стороны, большое разнообразие антител в основном связано с перестройками ДНК в соматических клетках. В 1975 г. Артур Риггс, а также Р. Холлидей сообщили о том, что инактивация X-хромосомы и, стало быть, половая дифференцировка у млекопитающих связаны с метилированием ДНК. В России была открыта тканевая (клеточная) разнокачественность метилирования ДНК и было сформулировано представление о том, что метилирование ДНК – механизм регуляции экспрессии генов и клеточной дифференцировки (Vanyushin *et al.*, 1970). На самом деле это был первый материальный химически идентифицированный и расшифрованный эпигенетический сигнал. Теперь уже появилось представление об эпигеноме, так что фенотип любого организма представляет собой суммарную реализацию генома и эпигенома. Уже вошли в употребление понятие и термин *эпимутации*. Наряду с генетическими болезнями существуют эпигенетические заболевания. Нарушения в эпигеноме вызывают рак, диабет, астму, многие психические и другие заболевания. Разумеется, это во многом зависит от среды. Так называемый эпигенетический профиль организма лежит в основе создания картины цифровой патологии (Digital Pathology). Эпигеном существенно изменяется с возрастом. В частности, мы открыли возрастную специфичность метилирования ДНК. Более того, по нашим представлениям, обусловленные метилированием ДНК эпимутации могут лежать в основе запрограммированного старения и определять продолжительность (лимит) жизни. В результате фундаментальных эпигенетических исследований изменились наши представления о генетической идентичности гомозиготных близнецов и клонов животных и растений. Оказалось, что они могут существенно различаться по эпигенетическим профилям. Соматическая изменчивость часто во многом обусловлена изменением именно эпигенетических параметров и сигналов.

Несмотря на грандиозные успехи молекулярной биологии и молекулярной генетики

прошлого века, все еще очень многие важные проблемы общебиологического значения остаются нерешенными. И среди них важнейшими являются клеточная дифференцировка и регуляция активности генов. Мы до сих пор еще до конца не понимаем, как происходит нормальное развитие организма, как изначально клетки, имеющие исходно одинаковую генетическую информацию, в процессе развития идут своим собственным (разным) путем с точной и правильной реализацией в пространстве и времени особых областей генома в специфический фенотип. Как клетка решает, когда ей делиться и начать дифференцироваться? Как бы там ни было, именно эпигенетика позволяет по-новому взглянуть на эти проблемы и найти решение таких животрепещущих загадок биологии, как клеточная идентичность (специфичность), канцерогенез, пластичность стволовых клеток, регенерация клеток и тканей у животных и растений, старение, запрограммированная смерть и др.

Об эпигенетике часто вспоминают, когда речь идет о влиянии внешней среды на экспрессию генов (диета, гормоны и другие факторы и условия среды). Эпигенетика – новый обширный и многообещающий горизонт наших знаний в постгеномную эру. Действительно, мы наследуем нечто большее, чем сумму генов, а по мнению Нобелевского лауреата Д. Уотсона, «что-то еще и кроме последовательностей ДНК». Все это подчеркивает лишний раз, что без эпигенетики невозможно решение главной проблемы биологии – приводных механизмов регуляции экспрессии генов и клеточной дифференцировки при разных условиях среды.

У человека генетическая информация записана в 23 парах хромосом, содержащих примерно 25 000 генов. Геном человека содержит около  $3 \times 10^9$  пар оснований или  $1 \times 10^7$  нуклеосом. Длина ДНК у высших эукариот около 2 м, и она сконденсирована в ядре примерно в 10 000 раз. Около 96 % генома млекопитающих представлено некодирующими и повторяющимися последовательностями ДНК. Здесь имеется очень много всевозможных элементов и факторов для регуляции экспрессии генов: ДНК-связывание с разными, в том числе и регуляторными, белками, метил-СрG ДНК-связывающие и другие белки, разные модификации гистонов, ремодеу-

лирование нуклеосом и перестройка хроматина в целом, гормон-рецепторные комплексы, метилирование ДНК и взаимодействие с короткими некодирующими РНК и др. Для экспрессии генов необходимы большие сложные комплексы и ансамбли из более 100 белков, участвующих в инициации и элонгации транскрипции с одного избранного промотора и в процессинге информационной РНК. Скорее всего, для образования компетентного для транскрипции состояния гена мало только одного какого-то пускового фактора (например, той или иной модификации белка), необходимо суммарное и кумулятивное действие многих факторов для создания должного активного эпигенетического статуса в определенной зоне хроматина. Эпигенетический контроль может промотировать (усиливать) первичный сигнал (стимуляция промотора) или осуществлять сайленсинг генов. Эпигенетическая память часто бывает связана со специфическими модификациями гистонов в хроматине. Такая возникшая уникальная конфигурация хроматина, по-видимому, и может передаваться от клетки к клетке в череде клеточных делений. В частности, это может происходить при сайленсинге генов, этот запрет (конформационный «замок») в определенном участке хромосомы может стать еще более прочным и значимым в результате индуцированного (разрешенного) этим состоянием хроматина дополнительного метилирования ДНК. При этом саму ДНК можно рассматривать как самоорганизующий полимер с упорядоченной структурой в хроматине, способный реагировать и воспринимать разные эпигенетические сигналы.

Факторы среды могут оказывать заметное влияние на активность ферментов (и их кофакторов), осуществляющих модификации гистонов и ДНК. К таким кофакторам относятся: АТФ для киназ, ацетилкоэнзим А для ацетилаз, S-аденозил-L-метионин (SAM) для разных метилтрансфераз. Разумеется, содержание этих кофакторов в клетке может существенно варьировать и зависеть от среды, в том числе и от диеты. Адекватный эпигенетический контроль в клетке формируется на основе баланса множества факторов. И не всегда это с точностью передается при делении клеток. Возникает важный вопрос: как информация о структуре хроматина передается от материнской клетки к

дочерней. В принципе, это может происходить следующим образом. Известно, что синтез «коровых» гистоновых белков четко регулируется в клеточном цикле. Транскрипция генов этих белков происходит в S-фазе клеточного цикла и хорошо скоординирована с репликацией яДНК. По мере сборки вновь образованного хроматина определенные его белки в зависимости от степени и характера их энзиматических модификаций могут связываться (или не связываться) с ДНК с образованием соответственно недоступных или доступных для транскрипции мест. При этом ДНК вновь выступает здесь в качестве самоорганизующей матрицы. Недавно стало известно, что мутации в генах ферментов энзиматических модификаций гистонов приводят к ремоделированию нуклеосом и сопровождаются нарушениями развития организмов и неоплазией. Возникновение опухолей у мутантных мышей с данной патологией традиционно относили к разряду генетических заболеваний. На самом же деле выявленные при этом изменения в характере метилирования гистонов и ДНК, структурные изменения нуклеосом не вызваны непосредственно мутировавшим геном, а поэтому с полным правом должны рассматриваться как эпигенетические aberrации. В равной степени это относится и к мутациям генов синтеза и утилизации SAM: отсутствие SAM приводит к нарушению многих реакций трансметилирования в клетке и инактивации многих ферментов, для которых SAM служит аллостерическим фактором. Это полностью соответствует мысли о том, что эпигенетика в большинстве своем имеет дело с наследуемыми явлениями (свойствами живого), которые не прямо, а косвенно закодированы в геноме. Тем не менее эпигенетика и генетика – два близкородственных феномена или области знаний. В геноме могут быть ценные гены, но в зависимости от того или иного специфического эпигенетического сигнала они вовсе могут и не реализоваться. Вместе с тем, хотя эпигенетические изменения и передаются по наследству, это происходит не бесконечно. Часто клетки стараются вернуться к исходному эпигенетическому статусу, если это им удастся, и эти эпигенетические изменения стираются в ряду поколений. Таких примеров множество. Все еще не очень ясно, могут ли и каким образом эпигенетические параметры или

черты как-то отражаться собственно в зародышевой линии, т. е. в ДНК.

Центральная догма биологии ДНК ↔ РНК → белок – сегодня пополнена новыми знаниями о белках – прионах. Так же, как ДНК и РНК, эти белки способны к репликации, они наследуются без участия матриц ДНК и РНК.

Давно известно, что белки хроматина гистоны подавляют транскрипцию: свободная от них ДНК транскрибируется гораздо лучше, чем связанная с ними ДНК в составе хроматина. Складывалось впечатление, что для эффективной транскрипции нужно «раздеть» ДНК, освободив ее от гистонов, однако В. Олфри и А. Мирский много лет назад показали, что для активации транскрипции неактивного хроматина можно проацетилировать гистоны, что сопровождается значительным ослаблением связи этих белков с ДНК. Уже сформировалось общепринятое представление о существовании так называемого «гистонового кода».

Открыты и описаны модификации гистонов – ацетилирование, фосфорилирование, убиквитинирование, АДФ-рибозилирование, биотинилирование, сумоилирование, изомеризация пролинового остатка и др.

Если на самом деле и существует гистоновый код, то в отличие от генетического этот эпигенетический код не универсален. У каждого организма он свой.

Эпигенетических сигналов в клетке и организме, по-видимому, очень много, и они весьма разнообразны, многое в этой области еще неизвестно. Тем не менее многие из них уже материализованы и описаны. Среди значимых эпигенетических сигналов, например, сегодня известны:

- метилирование ДНК;
- разнообразные энзиматические модификации гистонов (*гистоновый код*);
- геномные и хромосомные перестройки;
- малые некодирующие РНК (siRNA, или так называемые малые интерферирующие РНК);
- другие.

Эти сигналы, их детальная природа, взаимодействие между ними и вызываемые ими физико-химические эффекты, их результирующее биологическое действие в клетке при разных функциональных состояниях организма и в

разных условиях внутренней и внешней среды и являются главным предметом исследования эпигенетики.

К сожалению, в небольшом обзоре невозможно подробно описать все аспекты эпигенетики. Рассмотрим лишь некоторые из них.

### МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК – ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ КОНТРОЛЯ ЗА ГЕНЕТИЧЕСКИМИ ФУНКЦИЯМИ ОРГАНИЗМА

Метилирование помогает жизни, но оно может и отнять ее. На самом деле, без метилирования жизнь была бы вообще невозможна.

*Craig Cooney*

Более полувека назад профессор Андрей Николаевич Белозерский предложил мне (студенту кафедры биохимии растений МГУ) изучить нуклеотидный состав ДНК и РНК у нескольких бактерий. Анализ состава этих ДНК в то незабываемое время четко показал, что GC-содержание в ДНК видоспецифично и оно может служить важным таксономическим признаком у бактерий (Спирин и др., 1957). По сути дела, эта работа была одной из тех, которые заложили основы геносистематики. Мир ДНК эукариот в то время был практически незатронутым. Так, например, сведения о составе ДНК у представителей всего растительного царства ограничивались тогда лишь данными по ДНК зародышей пшеницы. Одна из наших задач того времени – хотя бы отчасти ответить на вопрос, каковы же ДНК у этих эукариот. Первые системные исследования состава ДНК у высших растений были выполнены в России, они касались ДНК архегониальных (мхи, плауны, хвощи, папоротники, голосеменные) и цветковых (покрытосеменные, как одно-, так и двудольные) растений.

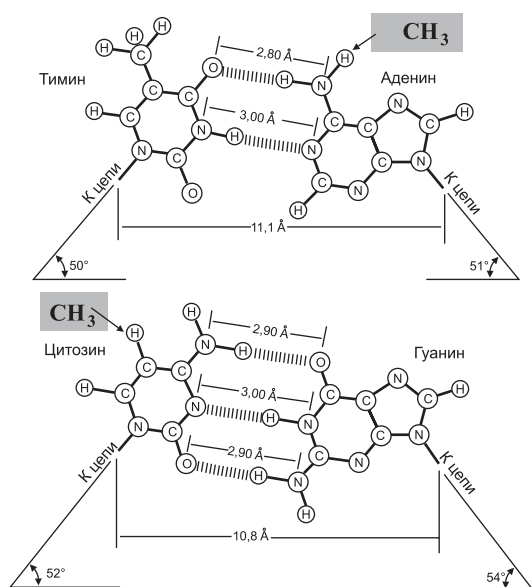
Уже тогда было установлено, что отличительной особенностью ДНК всех высших растений является относительно высокое содержание в них дополнительного основания – 5-метилцитозина ( $m^5C$ ) (табл. 1). Затем в растительных ДНК, как у бактерий, был найден  $N^6$ -метиладенин ( $m^6A$ ).

Долгое время происхождение этих оснований в ДНК оставалось неизвестным. Лишь в 1963 г. были обнаружены изначально у бакте-

**Таблица 1**  
Минорные метилированные  
основания в ДНК

Организмы	Минорные основания, %	
	m <sup>5</sup> C	m <sup>6</sup> A
Бактерии	0,01–1,53	0,02–0,70
Водоросли	0,20–3,50	0,10–0,60
Грибы	+	0–0,5
Простейшие		0,3–1,0
Растения	2,0–10,0	0,5–1,0
Беспозвоночные	0,1–2,5	?
Позвоночные	0,7–3,5	+

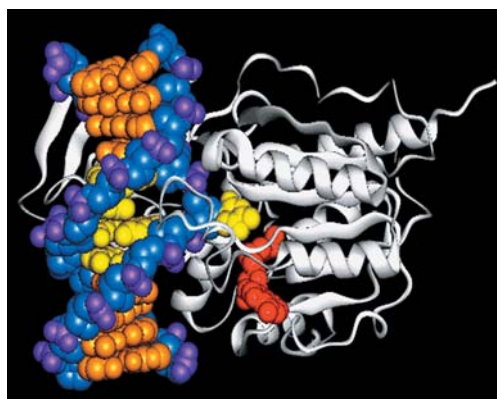
рий, а позже и у эукариот ферменты, которые в присутствии донора метильных групп *S*-аденозилметионина избирательно метилировали отдельные остатки цитозина и аденина в цепях ДНК. Стало ясно, что обнаруживаемые в молекуле ДНК «минорные» основания (m<sup>5</sup>C и m<sup>6</sup>A) не встраиваются в них в готовом виде, а возникают в результате ферментативной модификации (метилирования) соответствующих обычных оснований (рис. 1) в сформированных или формирующихся цепях ДНК. При этом фермент ДНК-метилтрансфераза «ловко расправляется» с ДНК, он образует с ней ковалентно связанный комплекс с выворачиванием наружу из дву-



**Рис. 1.** Канонические WC-пары оснований в ДНК. Стрелками показаны места метилирования оснований.

цепочечной спирали ДНК модифицируемого основания и метилирует это основание (рис. 2). После этого ковалентная связь между ферментом и ДНК рвется, комплекс распадается, а метилированное основание (m<sup>5</sup>C) возвращается на свое прежнее место в структуре ДНК.

Специфичность и функциональное значение ферментативного метилирования ДНК очень многие годы оставались неизвестными. Более того, очень распространенным было представление о том, что эти «минорные» основания вообще не играют никакой роли ни в структуре самой ДНК, ни в ее функционировании. В качестве «неотразимого» аргумента для таких представлений часто использовался излюбленный объект классической генетики – дрозофила. В геноме этого насекомого долго никому не удавалось найти минорные основания, в том числе m<sup>5</sup>C. Это давало многим, в том числе и Нобелевскому лауреату У. Гилберту, повод утверждать, что поскольку дрозофила живет без метилирования ДНК, то эта модификация генома вообще не имеет существенного значения в жизнедеятельности эукариотических организмов. Это на долгие годы охладило у многих биохимиков и молекулярных биологов мира интерес к изучению метилирования ДНК и позволило нам в течение многих лет в более или менее спокойной обстановке шаг за шагом идти по пути исследования метилирования ДНК у разных организмов. В результате было замечено, что геном дрозофилы характеризуется значительным дефицитом CpG-последовательностей, служащих обычно основным сайтом



**Рис. 2.** Комплекс цитозиновой ДНК-метилтрансферазы с ДНК.

при *in vivo* метилировании ДНК у эукариот. По нашему мнению, такая выраженная CpG-супрессия в геноме дрозофилы могла быть обусловлена только метилированием в ней цитозинового остатков. Поскольку обнаружить собственно ДНК-метилтрансферазную активность у дрозофилы в то время нам не удавалось, мы назвали такую возможную модификацию ДНК у этого насекомого «ископаемым» метилированием ДНК. Сейчас другими специалистами уже четко доказано, что у дрозофилы ДНК метилирована и эта модификация генома важна для развития насекомого, а ДНК-метилтрансферазная активность четко выявляется на ранних стадиях развития насекомого.

Мы всегда были убеждены в том, что минорные основания в ДНК и сама энзиматическая модификация генома не могут быть бесследными в структуре генома и обязательно должны сказываться на его биологических функциях.

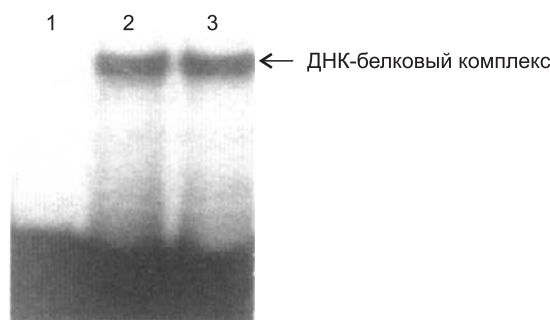
### МЕТИЛИРОВАНИЕ И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА СТРУКТУРУ ДНК И ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С БЕЛКАМИ

Нам удалось найти такую необычную природную двуязычную ДНК (ДНК бактериофага AR9 *Bac. brevis*), у которой вместо обычного для ДНК тимина присутствует характерное для РНК основание – урацил. Так что урацил прекратил свое существование в качестве принципиально отличительного признака РНК. Грубо говоря, урацил – это тот же тимин, но без метильной группы. Урацилсодержащая ДНК бактериофага AR9 плавилась (денатурировала) при гораздо более низкой температуре, чем эквивалентная ей по составу нормальная ДНК, содержащая тимин. Стало ясно, что метилирование остатков цитозина небезразлично для самой структуры ДНК. Это было первым надежным указанием на то, что метильные группы пиримидиновых оснований в ДНК стабилизируют ее вторичную структуру. Еще более привлекательным оказалось то, что метилирование ДНК ощутимо сказывается на ее взаимодействии (связывании) с различными белками. В частности, в ядрах растений нами выявлены белки, специфически связывающиеся с регуляторными элементами генов рРНК (135 bp subrepeat element), и продемонстрировано, что связывание некоторых из

этих ядерных белков модулируется метилированием *in vitro* цитозинового остатков ДНК. Во многих случаях метилирование ДНК по цитозиновым остаткам препятствует связыванию со специфично реагирующими с ДНК ядерными белками (факторами), которые осуществляют разные генетические процессы, в том числе транскрипцию, репликацию и репарацию ДНК. Так, например, предварительное метилирование второго цитозинового остатка в CCGG сайте во фрагменте гена рибосомной РНК пшеницы лишало его способности связывать один из ядерных пшеничных белков (рис. 3). С другой стороны, известны и так называемые m<sup>5</sup>CpG ДНК-связывающие белки, которые специфично аранжируют на ДНК весь ансамбль сложных белковых комплексов, контролирующих и осуществляющих экспрессию генов.

### НЕЭНЗИМАТИЧЕСКОЕ МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК

Если ДНК без всяких белков проинкубировать с меченым по метильной группе S-аденозил-L-метионином (SAM, AdoMet), то через некоторое время его радиоактивность обнаруживается уже в составе ДНК в виде вновь возникших в ней остатков 5-метилцитозина и тимина. Так, было открыто неэнзиматическое метилирование ДНК (рис. 4). Интересно, что при этом меченый тимин в ДНК обнаруживался в гораздо более заметных количествах, чем m<sup>5</sup>C. Тем самым



**Рис. 3.** Связывание ядерного белка пшеницы с DCR фрагментом (174 пар оснований) гена пшеничной рРНК блокируется метилированием *in vitro* CCGG сайта ДНК-метилтрансферазой HpaII.

1 – Фрагмент рРНК предварительно метилирован с помощью HpaII. 2, 3 – комплекс фрагмента гена рРНК с белком.

было выявлено, что неэнзиматическое метилирование ДНК в водном растворе сопровождается быстрым окислительным дезаминированием возникших остатков  $m^5C$  с превращением их в остатки тимина. Это явилось доказательством того, что метилирование остатков цитозина в ДНК может приводить к  $C \rightarrow T$  транзиции (GC-пара оснований заменяется AT-парой), а остатки 5-метилцитозина служат «горячими» мутационными точками. Само это явление лежит в основе заметного частичного исчезновения (супрессии) некоторых CpG последовательностей из генов и геномов разнообразных организмов и является одним из магистральных путей природного мутагенеза и эволюции.

### СПЕЦИФИЧНОСТЬ ЭНЗИМАТИЧЕСКОГО МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК

Существование в природе потенциальной возможности метилирования ДНК, по-видимому, и было использовано появившимися в эволюции особыми белками-ферментами ДНК-метилтрансферазами, которые в отличие от хаотичного неэнзиматического метилирования ДНК модифицируют цитозиновые или адениновые остатки в строго определенных нуклеотидных последовательностях. Мы расшифровали одну из самых первых таких метилируемых нуклеотидных последовательностей в ДНК у бактерий. В клетках бацилл *Bac. brevis* цитозиновая ДНК-метилтрансфераза метилирует цитозиновые остатки в последовательности (5') GCTGC (3'). Позднее это было подтверждено в работах Нобелевского лауреата Р. Робертса. Оказалось, что метилирование ДНК у бактерий лежит в основе явления так называемой хозяйской рестрикции-модификации. Это явление, в частности, означает, что выращенный в клетках того или иного бактериального штамма бактериофаг приобретает хозяйскую специфичность и способен заражать клетки только этого хозяина (рестрикция – ограничение круга хозяев), поскольку ДНК бактериофага метилирована хозяйскими бактериальными ДНК-метилтрансферазами и тем самым защищена от гидролиза чувствительными к такому метилированию ДНК хозяйскими ферментами эндонуклеазами. В известной мере эти данные наряду с другими



Рис. 4. Неэнзиматическое метилирование ДНК.

послужили обоснованием химической природы явления хозяйской рестрикции-модификации у бактерий. До этого мы убедились в том, что ДНК у разных бактерий метилирована по-разному, и выявили штаммовую и видовую специфичность метилирования генома у микроорганизмов. Более того, было показано, что характер метилирования ДНК у бактерий изменяется при диссоциации (R-, S-формы) и спорообразовании. Пожалуй, эти данные явились одними из самых первых указаний на то, что метилирование ДНК связано с клеточной дифференцировкой у микроорганизмов.

Предстояло еще выяснить, какова химическая и биологическая специфичность метилирования ДНК у эукариотических организмов, в том числе у растений и животных. Еще до появления методов секвенирования ДНК при анализе выщепляемых из ДНК пиримидиновых последовательностей (блоки) нам удалось показать, что в геноме растений 5-метилцитозин содержится в последовательностях Pu- $m^5C$ -Pu, Pu- $m^5C$ -T-Pu, Pu- $m^5C$ -C-Pu и Pu- $m^5C$ - $m^5C$ -Pu (Кирнос и др., 1981). Это совпало с появившимися позднее данными группы А. Разина (Израиль) о метилировании остатков цитозина в CG и CNG сайтах в растительных и животных ДНК. По нашим данным, в геноме растений значительная доля (около 30 %) 5-метилцитозина содержится именно в последовательностях  $m^5CNG$  (Кирнос и др., 1981). Существование  $m^5C$  в CNG сайтах, в особенности у животных, долгое время вообще не признавалось и первые сообщения об этом даже вызывали резкое недоверие и неприятие. Между тем такое метилирование ДНК действительно осуществляется и в животных клетках, и оно имеет существенное биологическое значение. Метилирование цитозиновых остатков в этих и асимметричных последовательностях в основном и наблюдается при индуцированном малыми двутяжевыми



РНК метилировании ДНК, сопряженном с инактивацией генов. У растений выявлен фермент, который метилирует цитозиновые остатки в любом контексте, за исключением CpG. Таким образом, в принципе, природа химической специфичности метилирования ДНК у растений и животных установлена.

У растений арабидопсиса довольно сильно метилирована ДНК центромерной и периферической областей гетерохроматина, в особенности это касается транспозонов и других повторяющихся последовательностей. ДНК эухроматина метилирована гораздо меньше,  $m^5C$  найден как в межгенных областях, так и в отдельных генах. Около 55 %  $m^5C$  содержится в CG, 23 % – в CNG и 22 % – в CNN-последовательностях (Vanyushin, Ashapkin, 2011). Все три типа метилированных последовательностей найдены в повторах центромерных областей хроматина, а тела генов почти исключительно метилированы по CG сайтам. Соответствующие кодирующие siRNA области генома содержали значительное количество остатков 5-метилцитозина в CG, CNG и CNN сайтах. Более 60 % экспрессируемых генов неметилированы вовсе. 5'- и 3'-концевые проксимальные части метилированных генов относительно гипометилированы. Неметилированные гены обычно транскрибируются весьма умеренно, и они значительно обогащены генами, кодирующими факторы транскрипции. Гены с метилированным промотором транскрибируются относительно слабо и тканеспецифично. При всех обстоятельствах метилирование промотора имеет большее значение для инактивации (сайлесинга) генов, чем метилирование собственно тела гена (Vanyushin, Ashapkin, 2009, 2011). Профиль метилирования ДНК у тройных *drm1 drm2 cmt3* мутантов арабидопсиса незначительно отличался от такового у растений дикого типа, и более 90 % метилируемых сайтов оказались метилированными. Таким образом, у растений существует мощная компенсаторная система защиты статуса метилирования генома от выпадения функций отдельных генов ДНК-метилтрансфераз.

Что касается биологической специфичности метилирования ДНК у эукариот, мы уже давно знали, что оно видоспецифично: у многих беспозвоночных степень метилирования генома очень мала; как уже упоминалось,

в ДНК дрожозофилы долгое время  $m^5C$  вообще не могли обнаружить, а у позвоночных в ДНК  $m^5C$  всегда обнаруживается в ощутимых количествах, в ДНК растений его уже вовсе нельзя назвать «минорным» основанием: часто в этих ДНК  $m^5C$  по количеству вполне сопоставим с цитозином. Например, в сателлитной ДНК у пророски почти весь цитозин представлен его метилированным производным ( $m^5C$ ).

Мы установили, что у животных и растений наряду с видовой существуют также тканевая (клеточная) (Vanyushin *et al.*, 1970), субклеточная (органонидная) и возрастная (Бердышев и др., 1967) разнокачественность (специфичность) метилирования ДНК. Один из наших американских коллег, Крейг Куни, признавал, что русские показали, что метилирование ДНК у животных уменьшается с возрастом. Это было интригующим указанием на то, что старение и уменьшение метилирования ДНК идут «рука об руку». Означает ли это, что существует связь между старением клеток и уменьшением уровня метилирования ДНК? Скорее всего, да. Б.Ф. Ванюшин с коллегами первыми показали еще в 1960-х годах, что у горбуши уровень метилирования ДНК уменьшается с возрастом (Бердышев и др., 1967). Они же показали, что это также происходит и в большинстве органов у стареющих коров и крыс (Vanyushin *et al.*, 1973). Позднее несколько групп ученых в США и Японии обнаружили, что и у мышей при старении уменьшается метилирование ДНК (Cooney, 1999). Теперь возрастное падение уровня метилирования ДНК стало вполне очевидным, и некоторые исследователи даже склонны считать, что степень метилирования ДНК может служить некими биологическими часами, по которым можно судить о возрасте и прогнозировать продолжительность жизни. Искажение метилирования ДНК может приводить к преждевременному старению. По нашему мнению, обусловленный метилированием ДНК эпимутагенез служит механизмом запрограммированного старения и фенотоза. Мы нашли существенные возрастные изменения в характере метилирования ДНК и у растений. Метилирование ДНК у растений изменяется в течение всего онтогенеза, начиная с прорастания семян вплоть до конечных стадий развития растения, в том числе и при апоптозе и фенотозе (*термин*

предложен В.П. Скулачевым) – запрограммированной гибели организма, которая особенно ярко и иногда даже «драматично» выражена у монокарпических растений. Мне довелось самому много лет назад видеть в Батумском ботаническом саду очень грустную картину: вымершую в одночасье вскоре после цветения большую многолетнюю «плантацию» бамбука. Как и у нерестящейся горбуши (Бердышев и др., 1967), запрограммированная гибель растений бамбука сопровождалась глобальным уменьшением степени метилирования ДНК во всех органах. Скорее всего, это общебиологическое явление, и, по-видимому, оно определяется гормональным контролем как у животных, так и у растений. Так что «флориген» М.Х. Чайлахяна может быть ответственным не только за индукцию цветения, но и за фенотоз в результате модуляции фитогормонами метилирования генома.

Мы обнаружили, что в разных клетках одного и того же организма ДНК метилирована по-разному, и, следовательно, метилирование генома связано с клеточной дифференцировкой. Это позволило нам первыми заявить, что метилирование ДНК – механизм регуляции экспрессии генов и клеточной дифференцировки (Vanyushin *et al.*, 1970). Эта и другие наши работы привлекли очень большое внимание многих исследователей в нашей стране и за рубежом и послужили толчком к интенсивному исследованию метилирования ДНК во всем мире.

Установлено, что в митохондриях и ядре одной и той же клетки ДНК метилированы по-разному. В митохондриальной ДНК сердца быка обнаружен 5-метилцитозин. Наряду с этим нами была выделена цитозиновая ДНК-метилтрансфераза из митохондрий животных и показано, что этот фермент обладает иной сайтовой специфичностью действия по сравнению с ядерной ДНК-метилтрансферазой. Так, была открыта субклеточная (органелльная) специфичность метилирования ДНК. В отличие от животных у растений мы не нашли 5-метилцитозин в ДНК митохондрий, зато в них обнаружен N<sup>6</sup>-метиладенин. В отличие от сильно метилированных ядерных ДНК высших растений, их хлоропластные ДНК неметилированы. Имеются единичные сведения о том, что ДНК иных пластид (лейкопласты, хромо-

пласты, амилопласты) высших растений могут содержать разные минорные метилированные основания, и предполагается, что метилирование ДНК может участвовать в дифференцировке пластид, однако эти данные и предположения пока еще никем не подтверждены.

### ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ

У растений обнаружено как минимум три класса цитозиновых ДНК-метилтрансфераз и более дюжины генов, кодирующих ДНК-метилтрансферазы (табл. 2, рис. 5) (Finnegan *et al.*, 2000; Vanyushin, Ashapkin, 2009). Это гораздо больше, чем у всех известных эукариот.

### ЦИТОЗИНОВЫЕ ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ КЛАССА МЕТИ

Эти ферменты осуществляют так называемое поддерживающее метилирование CpG сайтов при репликации ДНК, в целом обеспечивая сохранение и передачу по наследству общей картины (pattern) метилирования этих сайтов в геноме. Поэтому неудивительно, что гены *MET1* экспрессируются во всех органах (рис. 6), а собственно само тело этих генов как у растений дикого типа, так и у разных трансгенных растений арабидопсиса практически неметилировано (рис. 7). Это же свойственно и гену главной поддерживающей метилирование CpNpG сайтов ДНК-метилтрансферазы СМТ3. Экспрессия этого гена весьма консервативна: у трансгенных линий арабидопсиса с антисмысловой конструкцией *MET1* под индуцибельным промотором экспрессия этого гена значительно не изменяется в зависимости от индукции конструкта.

### ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗ РАЗНЫХ КЛАССОВ

Хотя вопрос об участии отдельных метилаз в осуществлении метилирования ДНК того или иного типа в последние годы в значительной мере прояснился, однако во многом неизученным остается значение самого существования различных типов метилирования ДНК. В меньшей степени это относится к метилированию

Таблица 2

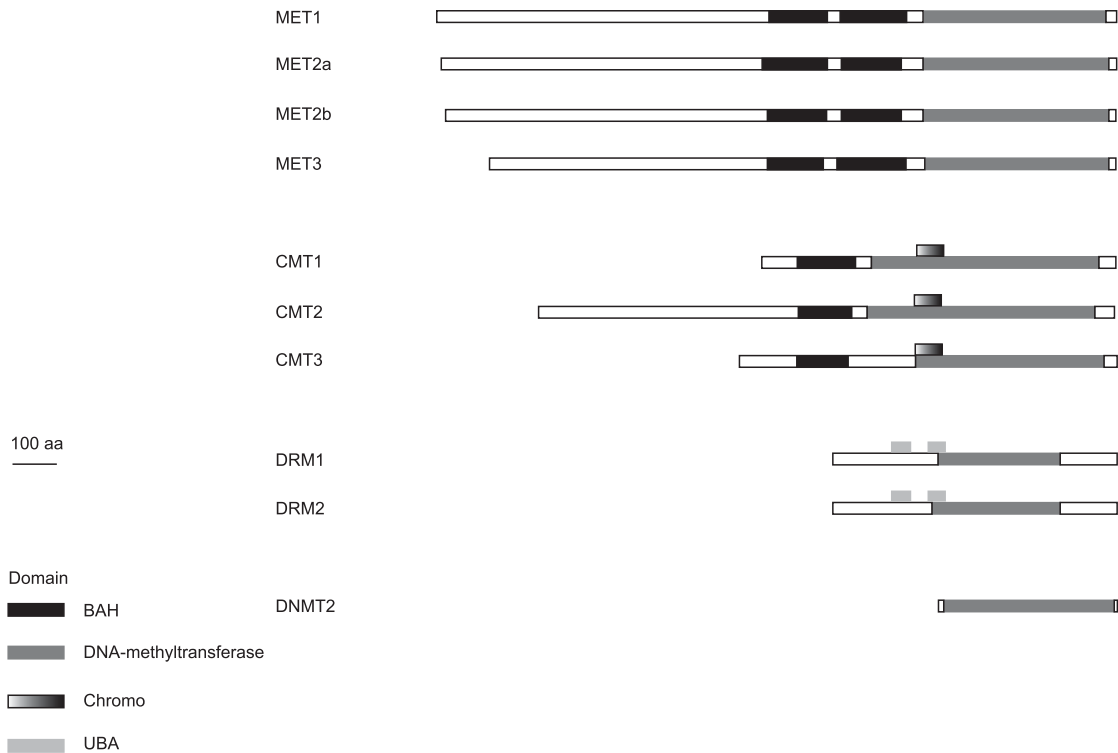
## Цитозиновые ДНК-метилтрансферазы растений

Семейство	Сокращенное наименование	Синонимы	Локус, координаты, nts	Наличие доменов	Экспрессия	Функция
MET	<b>MET1</b>	MET1, DMT1, DDM2	AT5G49160, 19949456–19955595	BAH (2) m <sup>5</sup> C-DNA-methyltransferase	Во всех органах, особенно активно делящихся	<b>Главная поддерживающая CpG-метилаза</b>
	MET2a	METII, MET2, DMT2	AT4G14140, 8146340–8152126	BAH (2) m <sup>5</sup> C-DNA-methyltransferase	Аналогично MET1, но в 10000 раз слабее	Не установлена
	MET2b	DMT8, METIIb	AT4G08990, 5764778–5770493	BAH (2) m <sup>5</sup> C-DNA-methyltransferase	Не изучена	Не установлена
	MET3	DMT3, METIII	AT4G13610, 7915018–7921227	BAH (2) m <sup>5</sup> C-DNA-methyltransferase	Не изучена	Неизвестна, у экотипа Columbia поврежден
CMT	CMT1	DMT4	AT1G80740, 30347286–30351940	BAH, Chromo, m <sup>5</sup> C-DNA-methyltransferase	Не обнаружена	Неизвестна, у экотипа Columbia поврежден
	CMT2	DMT5	AT4G19020, 10414537–10421211	BAH, Chromo, m <sup>5</sup> C-DNA-methyltransferase	Аналогично MET1, но в ~10 раз слабее	<b>Вторая поддерживающая CpNpG-метилаза</b>
	<b>CMT3</b>	DMT6	AT1G69770, 26251990–26257248	BAH, Chromo, m <sup>5</sup> C-DNA-methyltransferase	Во всех органах, особенно в частях цветка	<b>Главная поддерживающая CpNpG-метилаза</b>
DRM	DRM1	DMT9	AT5G15380, 4991350–4994829	UBA (2) m <sup>5</sup> C-DNA-methyltransferase	Не обнаружена	Вторая <i>de novo</i> ДНК-метилаза?
	<b>DRM2</b>	DMT7	AT5G14620, 4715256–4718707	UBA (2) m <sup>5</sup> C-DNA-methyltransferase	Во всех органах	<b>Главная <i>de novo</i> ДНК-метилаза</b>
	DRM3	DMT10	AT3G17310, 5909007–5913248	m <sup>5</sup> C-DNA-methyltransferase	Не обнаружена	Не установлена

CpG-типа и, соответственно, к ферментам класса MET1. Сама MET1, без сомнения, является главной поддерживающей ДНК-метилтрансферазой у растений. Это подтверждается не только ее высокой гомологией с поддерживающей метилтрансферазой животных Dnmt1, но и характером экспрессии. Она преимущественно экспрессируется в делящихся клетках меристематических зон. Трансгенные растения, содержащие антисенс-конструкции к MET1, как и растения с мутацией в консервативном

мотиве I гена MET1, имеют сниженный уровень метилирования уникальных и повторяющихся последовательностей ДНК. При этом уменьшение метилирования касается в основном сайтов CpG, но оно затрагивает, хотя и в меньшей степени, и метилирование сайтов CpNpG.

Основной, если не единственной, мишенью метилирования ДНК-метилтрансферазой MET1 является симметричная последовательность CpG. Уменьшение степени метилирования последовательностей CpNpG при введении в

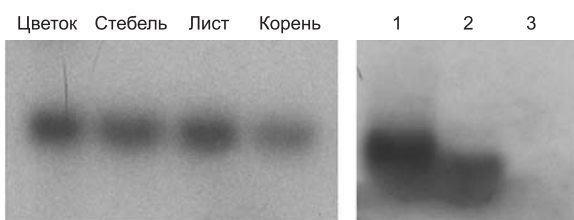


**Рис. 5.** Семейство цитозиновых ДНК-метилтрансфераз *Arabidopsis thaliana* (Vanyushin, Ashapkin, 2009. 152 p.).

растения антисенс-конструктов *MET1* может быть не прямым эффектом, а опосредованным другими метилтрансферазами. У гомозиготных самоопыляющихся линий растений, дефектных по *MET1* и, соответственно, по метилированию CpG-типа, наблюдаются прогрессивные нарушения морфогенеза. Это представляется вполне логичным следствием постепенно накапливающихся аномалий в регуляции тканеспецифической транскрипции генов в результате утраты метилированных сайтов в их регуляторных участках. Однако в действительности все обстоит несколько сложнее. В клетках таких растений на фоне общего снижения степени метилирования ДНК часто наблюдается локальное гиперметилирование некоторых генов (например гена *Superman*), сопровождающееся характерными фенотипическими проявлениями (гомейоти-

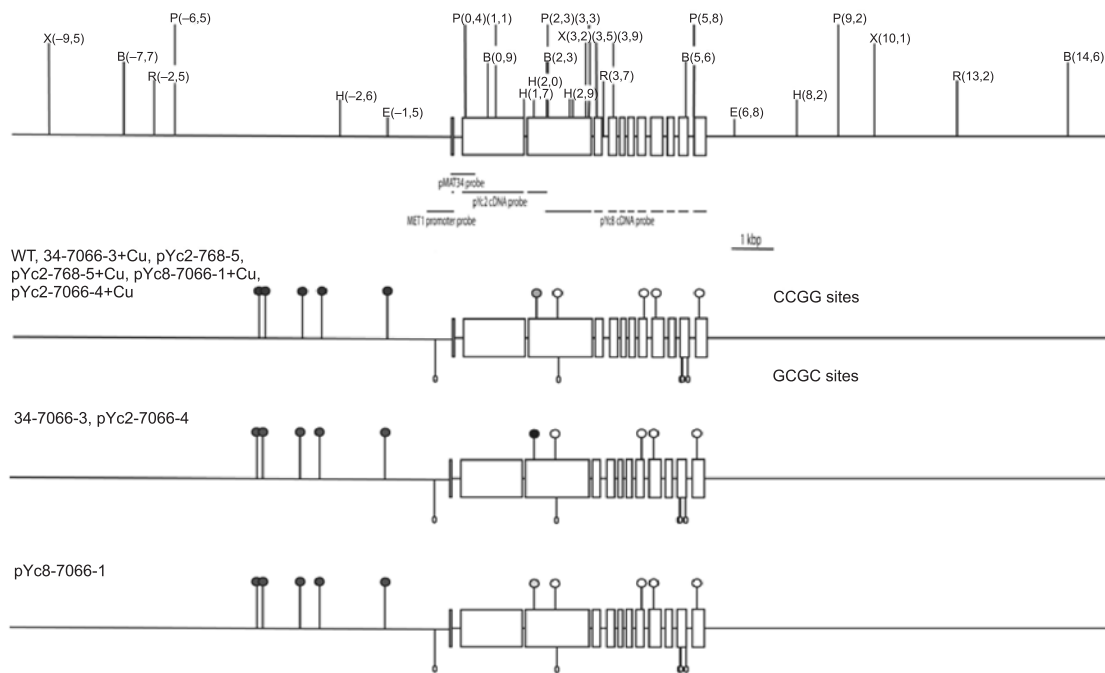
ческие трансформации цветка). Мишенью гиперметилирования в таких растениях служат остатки цитозина в асимметричных CpNpN и симметричных сайтах CpA/TrG, но никогда не служат в симметричных сайтах CpG.

При спонтанных эпимутациях гена *Superman* в растениях с активной ДНК-метилтрансферазой *MET1* (так называемые *clark kent* аллели) наблюдается гиперметилирование ДНК по сайтам всех типов. Исследование растений, у которых активность метилтрансферазы *MET1* существенно снижена с помощью трансгенных антисенс-конструктов или мутаций по самому гену *MET1*, в течение ряда последовательных поколений обнаружено постепенное накопление все более выраженных аномалий развития, которые постепенно исчезали при восстановлении активности *MET1* путем возвратного



**Рис. 6.** Транскрипция гена *MET1* у *Arabidopsis thaliana* (Ашапкин и др., 2011. С. 320–331).

1 – дикий тип; 2 – трансгенное растение без индукции антисмысловой *MET1* конструкции; 3 – то же растение после обработки Cu.



**Рис. 7.** Характер цитозинового метилирования гена *MET1* у *Arabidopsis thaliana* (Ашпкин и др., 2011. С. 320–331).

WT – растения дикого типа. Остальные – наши трансгенные растения (мутанты) с антисмысловой конструкцией гена ДНК-метилтрансферазы *MET1* под индуцибельным промотором. + Cu – растения обработаны индуктором (Cu). Черные кружки – найденные метилированные сайты, серые кружки – частично метилированные сайты, пустые кружки – неметилированные сайты.

скрещивания с растениями дикого типа. Значит, причиной аномалий является не собственно подавление активности ДНК-метилтрансферазы, а постепенное накопление аномального недометилирования в генах, регулирующих развитие.

Можно считать установленным, что *MET1* является главной поддерживающей CpG ДНК-метилтрансферазой, прямо или косвенно участвующей в регуляции транскрипции многих генов. Анализ ряда ноль-мутантов арабидопсиса по гену *SMT3* (получены как супрессоры эпимутаций гена *Superman*) показал, что в них практически полностью утрачено метилирование геномной ДНК по симметричным сайтам CpNpG, но практически не затронуто метилирование по сайтам CpG. Аналогичную картину наблюдали и при анализе метилирования ДНК у мутантов кукурузы по гену *Zmet2*, являющемуся гомологом генов *SMT1* и *SMT3* арабидопсиса. По-видимому, *SMT3* является поддерживающей CpNpG-метилтрансферазой. Степень уменьшения метилирования асимметричных

сайтов варьирует у разных линий мутантных растений в широких пределах и, по-видимому, является непрямым эффектом. При сравнении фенотипа ноль-мутантов по генам метилтрансфераз *MET1* и *SMT3*, а также характера экспрессии и метилирования ряда генов оказалось, что для супрессии активности гена *Superman* существенно метилирование по сайтам CpNpG, но не CpG, в то время как для гена *fwa* картина прямо противоположная. Иными словами, экспрессия каждого конкретного гена у растений может зависеть от метилирования любой из двух поддерживающих ДНК-метилтрансфераз. Заметим, однако, что в целом фенотипические последствия инактивации *MET1* существенно более выражены, чем эффекты инактивации *SMT3* (Vanyushin, Ashapkin, 2009).

Очевидными кандидатами на роль ферментов, ответственных за метилирование асимметричных последовательностей в ДНК растений, являются метилтрансферазы семейства DRM. Действительно, сохранение метилирования сайтов этого типа предполагает постоянное их

метилирование *de novo*, а именно DRM метилтрансферазы являются гомологами *de novo* метилтрансфераз животных. Кроме того, метилирование асимметричных сайтов практически не затронуто у многих линий растений с ноль-мутациями по генам *MET1* и *СMT3*. У двойных ноль-мутантов *drm1 drm2* арабидопсиса полностью отсутствует *de novo* ДНК-метиلاзная активность, необходимая для инактивации трансгенов. Однако прямой анализ метилирования ряда индивидуальных последовательностей ДНК у таких мутантов обнаружил, что метилирование асимметричных сайтов полностью элиминировано в одних локусах, но лишь частично – в других. С другой стороны, в некоторых локусах частично элиминировано также метилирование по сайтам CpNpG. У тройных мутантов *drm1 drm2 cmt3* полностью элиминировано метилирование по асимметричным сайтам и сайтам CpNpG и практически не затронуто метилирование по сайтам CpG. Добавим также, что ни у двойных *drm1 drm2* мутантов, ни у одинарных *cmt3* мутантов не наблюдалось заметных морфологических аномалий, в то время как у тройных *drm1 drm2 cmt3* мутантов таких аномалий множество. Это доказывает то, что функции DRM и СMT3 взаимозависимы и локус-специфичны.

При изучении биологической роли разных ДНК-метилтрансфераз до сих пор практически не учитывалось их взаимное влияние как на уровне транскрипции кодирующих их генов, так и на уровне самих реакций метилирования ДНК. Между тем существование таких влияний не вызывает сомнений: во-первых, от метилирования ДНК зависит транскрипция многих генов, в том числе и генов самих ДНК-метилтрансфераз, во-вторых, все реакции энзиматического метилирования ДНК зависят от ее метилированности по тем или иным сайтам, т. е. метилирование ДНК одной метилтрансферазой может и должно влиять на ее последующее метилирование другими метилтрансферазами. Более того, в клетках высших растений (и других эукариот), по-видимому, существует единая сложно организованная целая система эпигенетической регуляции активности генов. Все три типа метилирования ДНК тесно «увязаны» не только друг с другом, но и с двумя другими глобальными эпигенетическими системами, а именно системой модификации

гистонов и системой регуляции экспрессии генов малыми РНК. Так, например, активность Lys-9 метилазы гистона H3 необходима для метилирования сайтов CpNpG метилтрансферазой СMT3, а само метилирование гистона H3 по остатку Lys-9 зависит от метилирования ДНК по сайтам CpG метилтрансферазой MET1. Показано также, что именно малые РНК являются тем самым давно искомым элементом сайт-специфического узнавания, который обеспечивает точное «наведение» цитозинового *de novo* ДНК-метилтрансферазы на определенные последовательности ДНК.

Для углубленного изучения роли ДНК-метилтрансфераз и метилирования генома у растений мы задались целью получить трансгенные растения арабидопсиса, которые содержат в геноме экспрессируемые под разными индуцибельными промоторами (медь-, этанол- и стероид-зависимый) антисмысловые конструкции для всех известных генов растительных ДНК-метилтрансфераз. В принципе это могло дать нам действительно уникальную возможность выключать каждый из этих генов в любой последовательности и любой комбинации практически на любом этапе развития растения по нашему выбору. В результате мы получили целую коллекцию таких трансгенных растений арабидопсиса. Действительно, под воздействием индукторов нам удалось избирательно инактивировать гены соответствующих ДНК-метилтрансфераз, в том числе и MET1 (рис. 6). Оказалось, что разные типы метилирования ДНК влияют друг на друга. Так, наличие метилированного CG сайта увеличивает вероятность метилирования близлежащих сайтов CNG, а наличие метилированного CNG сайта увеличивает вероятность метилирования близлежащих сайтов CNN. У ноль-мутантов *met1* на фоне общего снижения уровня метилирования ДНК часто гиперметилованы промоторы некоторых генов по сайтам CNG и CNN.

У комбинированных мутантов *met1-drm1-drm2* заметно увеличено метилирование CNG в структурной части многих генов, как бы отчасти «заменяя» исчезнувшее CpG метилирование. Таким образом, множество ДНК-метилтрансфераз и их генов у растений, по-видимому, имеет взаимный компенсаторный смысл, обеспечивая надежную модификацию генома при различ-

ных, в том числе и неблагоприятных, условиях внешней среды и при возможной инактивации отдельных элементов энзиматического эпигенетического контроля.

При изучении полученных нами трансгенных растений арабидопсиса мы столкнулись с рядом непредвиденных обстоятельств и проблем. Так, у трансгенных растений с активными антисмысловыми конструктами генов цитозиновых ДНК-метилтрансфераз морфологических изменений может сразу и не быть или же они появляются в последующих поколениях. В ходе селекции устойчивых homozygotных трансгенных линий арабидопсиса их фенотипические характеристики могут заметно изменяться. Нередко селекция таких растений невозможна из-за нарушений формирования и созревания семян. Вопреки нашим ожиданиям, инактивация генов-мишеней антисенсами может быть необратимой, т. е. сохраняться и в отсутствие индуктора. Наконец, эффекты выключения генов могут быть не следствием отсутствия собственно той или иной ДНК-метилтрансферазы, а результатом действия на другие эпигенетические механизмы.

### ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ЗНАЧЕНИЕ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК

Поскольку мы волей судеб оказались одними из первых, кто задался вопросом о биологической роли метилирования ДНК на фоне общего скепсиса относительно значения этой модификации генома, нам пришлось выбирать и использовать самые разные биологические модели для доказательства исключительной роли метилирования ДНК в жизнедеятельности организмов. Изначально мы исходили из принципа, что если метилирование ДНК имеет какие-либо биологические функции, то оно само, скорее всего, не может оставаться «равнодушным» к этим функциям и должно, по крайней мере, более или менее специфично изменяться при их индукции. Так, мы пришли к таким индуцируемым моделям, как гидрокортизон–печень и обучение (память)–нейрон. И действительно, оказалось, что после введения животному гидрокортизона в его печени сильно изменяется характер метилирования ДНК и это сопряжено с индукцией в ней разных генов. Нами установлено, что при

обучении в нейронах, а не других клетках мозга, изменяется характер метилирования ДНК. Найденные изменения в ДНК при обучении – одно из первых указаний на участие генома в формировании памяти.

У растений метилирование ДНК сильно изменяется при прорастании семян, переходе к цветению, после заражения разными грибами и вирусами и при поражении растениями-паразитами. Стало понятно, что инфекционные агенты могут тонко воздействовать на организм растения, подчиняя его своим «прихотям» путем модуляции метилирования хозяйской ДНК.

Еще в 1977 г. русские сравнили характер метилирования ДНК в клетках крови у нормальных и больных лимфолейкозом коров. В целом уровень метилирования ДНК у больных этим видом рака крови животных оказался ниже. Это было одним из самых первых свидетельств того, что метилирование ДНК, по крайней мере, как-то участвует в этой болезни либо в качестве ее причины, либо в качестве следствия (Cooney, 1999). Действительно, в лимфоцитах крови крупного рогатого скота при хроническом лимфолейкозе характер метилирования генома резко изменяется. На фоне очень высокой ДНК-метилтрансферазной активности степень тотального метилирования ДНК в раковых (лейкозных) клетках животных существенно ниже, а палиндромных последовательностей наоборот гораздо выше, чем в нормальных клетках. В ядрах лимфоцитов крови лейкозных коров были обнаружены, по крайней мере, две ДНК-метиلاзные активности, одна из которых резко отличалась по сайтовой специфичности действия от ДНК-метилазной активности из клеток здоровых коров. Все это и позволило нам в числе первых обоснованно заявить, что нарушение метилирования ДНК – путь к раку. Теперь это стало истиной и получило подтверждение и развитие в работах С. Бейлина, Р. Ениша, П. Джонса, П. Пфайфера, М. Эрлих (все из США), Я.И. Бурьянова, Ф.Л. Киселева и многих других, а сведения о характере метилирования генов – ранний диагностический признак рака.

У растений метилирование ДНК контролируется разными фитогормонами и специфическими регуляторами роста и развития растений. Под действием разных фитогормонов у расте-

ний заметно уменьшается глобальное метилирование ДНК в клеточном цикле (Ванюшин, 2009). Кроме того, фитогормоны подавляют метилирование вновь синтезируемых цепей ДНК, не влияя на метилирование фрагментов Оказаки (табл. 3). Так, впервые было установлено, что фитогормоны действуют на геном растений путем модуляции его метилирования. Более того, мы считаем, что именно модуляция метилирования ДНК является одной из ведущих сторон действия гормонов у растений и животных. Не исключено, что гормон-рецепторные комплексы могут конкурировать за места связывания и метилирования генома соответствующими ДНК-метилтрансферазами.

Мы всегда рассматривали метилирование ДНК как способ негативного или позитивного контроля за активностью генов. В большинстве случаев метилирование ДНК инактивирует гены, однако уже имеются примеры того, что метилирование отдельных генов индуцирует их активность как у микробов (ген *tom*), так и у растений. Так, например, метилирование гена *pMADS3* у петунии стимулирует его экспрессию. Механизмы этой стимуляции экспрессии гена не известны. Предполагается, что метилирование CG сайта, по-видимому, препятствует сайт-специфическому связыванию некоего репрессора с сайленсерным элементом и таким образом стимулирует экспрессию гена. Метилирование 12 CG сайтов в тройном тандемном повторе у гена *PHERES1* арабидопсиса является обязательным условием экспрессии отцовского аллеля. Предполагается, что замалчивание материнского аллеля с геном *PHERES1* в центральной клетке женского гаметофита осуществляется деметилированием с помощью гликозидазы DME. Пока это лишь немногочисленные примеры того, что метилирование ДНК позитивно влияет на транскрипцию генов у растений. Как правило, подавление метилирования ДНК у мутантов с дефектами метилирования генома или под влиянием ингибиторов ДНК-метилтрансфераз сопровождается наследуемыми фенотипическими изменениями, вызванными эктопической реактивацией разных молчащих генов.

Метилирование цитозинового остатка в ДНК растений вовлечено в замалчивание повторяющихся трансгенов (Matzke M.A., Matzke A.J.M., 1995) и различных мобильных элемен-

Таблица 3

Степень метилирования  
вновь синтезированной ДНК  
в суспензионной культуре клеток табака  
и L-клетках мыши (Кирнос и др., 1993)

Клетки и условия выращивания	100 × m <sup>5</sup> C/ C+m <sup>5</sup> C	
	Репликативные фрагменты ДНК	
	≤ 5S	≥ 5S
Клетки табака	17,0 ± 0,4	40,2 ± 0,3
Клетки табака + 2,4-Д (5 мг/л)	20,2 ± 0,6	20,1 ± 0,5
L-клетки мыши	2,8 ± 0,2	4,2 ± 0,1

тов. Это позволяет рассматривать такое метилирование ДНК как механизм избирательной инактивации встроенных в геном чужеродных генов, в том числе и разных элементов вирусной природы.

Ингибитор метилирования ДНК 5-азациитидин подавляет образование адвентивных побегов у петунии, а метилирование цитозинового остатка в CCGG и CGCG сайтах в генах *MADS-box* и *CDC48* позитивно коррелирует с индукцией образования адвентивных побегов. Обработка растений 5-азациитидином приводит к наследуемому карликовости у риса и увеличению белковости зерновок у пшениц (Ванюшин и др., 2009). У трансгенных растений риса индуцированная 5-азациитидином экспрессия *bar* гена исчезает примерно через 50 дней. Это означает, что растения обладают способностью со временем более или менее восстанавливать исходный статус метилирования их генома, нарушенный этим химическим деметилирующим ДНК агентом. Аналогичную картину мы наблюдали у пшениц, у них индуцированное 5-азациитидином увеличение белковости зерновок сохранялось лишь в нескольких поколениях.

Метилирование ДНК контролирует цветение растений (Finnegan *et al.*, 1995). Так, например, обработка 5-азациитидином, как и антисмысловая инактивация *MET1* гена, делают ненужной яровизацию у холодозависимых растений арабидопсиса. Метилирование ДНК регулирует экспрессию репрессора цветения *FLC*. На самом деле холодная обработка (стресс) приводит к частичному деметилированию ДНК у



многих растений, что, скорее всего, сопряжено с холодовой индукцией неких особых белков. ДНК озимых сортов пшениц метилированы в большей степени, чем яровых.

Метилирование ДНК – один из механизмов геномного импринтинга и регуляции всей программы развития. В эндосперме особые области ДНК при материнском типе наследования оказались гипометилированными, а при мужском типе наследования они по метилированию были такими же, как в зародыше или листе. Широко известная соматоклональная изменчивость в культуре растительных клеток и тканей обусловлена не только мутациями, но и эпимутациями, в том числе и существенным изменением профиля метилирования ДНК.

Метилирование ДНК может существенно модулироваться различными биологическими (вирусы, бактерии, грибы, паразитические растения) и абиотическими факторами (стрессы). Любопытно, что повышенный уровень радиации в результате Чернобыльской катастрофы привел к сильному увеличению глобального метилирования генома у многих растений. Профиль метилирования ДНК может заметно изменяться под воздействием среды. Обычно у стресс-толерантных и неустойчивых к тому же стрессу растений он различен. Так, например, ДНК солеустойчивых мангровых деревьев, растущих в соленых болотах, оказались гипометилированными по сравнению с ДНК этих деревьев, растущих на речных пресноводных участках. Таким образом, эпигенетическая вариабельность в естественных растительных популяциях, по-видимому, важна для адаптации растений к условиям среды.

Поражение растений хлопчатника вилтом сопровождается искажением метилирования повторяющихся, но не уникальных последовательностей в геноме растения. Существенно изменяется характер метилирования суммарной ДНК у растения-хозяина (люцерна) при развитии на нем растения-паразита (*Cuscuta* sp.). Таким образом, грибы, вирусы и другие инфекционные агенты путем модуляции метилирования ДНК могут переключать программу работы генов хозяина в свою пользу. С другой стороны, растения способны на свой лад модифицировать вирусные ДНК, которые не встроены в хозяйский геном. Так, неинкапсулированная

ДНК вируса мозаики цветной капусты быстро становится метилированной в листьях турнепса по всем HpaII/MspI сайтам.

«Правильное» метилирование может стабилизировать свободную чужеродную ДНК в клетках растения-хозяина. При трансформации клеток ячменя наиболее стабильной оказалась вирусная ДНК с полностью метилированными CG сайтами, а та же ДНК, метилированная только по адениновым остаткам, быстро деградировала. Таким образом, в клетках ячменя определенно имеется некая система распознавания неправильно метилированных ДНК, обеспечивающая их быстрое удаление из делящихся клеток. Эти интригующие сведения могут указывать на существование системы хозяйской рестрикции–модификации у растений. Это хорошо согласуется с нашими данными о выявлении у растений специфических эндонуклеаз, распознающих статус метилирования ДНК (Fedoreyeva *et al.*, 2007).

Метилирование ДНК у растений и животных имеет много общего, однако у растений оно имеет целый ряд специфических особенностей. Так, например, доля метилированных CNG и асимметричных последовательностей ДНК в растительных геномах гораздо выше, чем у животных. В целом растения имеют существенно более сложную систему метилирования геномов по сравнению с животными. Прежде всего, следует отметить, что растения обладают гораздо большим арсеналом ДНК-метилтрансфераз (более 12). Это, возможно, обеспечивает им более надежную систему модификации генома, чем у животных. У растений выживают даже тройные ноль-мутанты (по генам трех разных ДНК-метилтрансфераз), тогда как у животных нокаут гена всего лишь одной ДНК-метилтрансферазы является летальным. Некоторые растительные ДНК-метилтрансферазы вообще не имеют аналогов в животном мире. Они уникальны и в отличие от животных ДНК-метилтрансфераз содержат консервативный убиквитин-связывающий домен, а их убиквитинизация может влиять на локализацию фермента в клетке в зависимости от тех или иных внеклеточных сигналов, клеточного цикла и транспозонной или ретровирусной активностей. Интересно, что активность растительных ДНК-метилтрансфераз может напрямую зависеть от регуляторов

роста растений. Кроме того, в отличие от животных растения обладают специфическими органеллами – пластидами (хлоропласты, хромопласты, амилопласты, лейкопласты), которые имеют собственные, отличные от ядерных, системы модификации (метилирования) ДНК. Эти системы могут играть важную роль в дифференцировке и функционировании пластид. Метилирование ДНК в растительных митохондриях иное, чем в ядре. В растительных мтДНК найден N<sup>6</sup>-метиладенин, но не 5-метилцитозин, который свойственен животным мтДНК. Поэтому в целом системы модификации ДНК в цитоплазматических органеллах в животной и растительной клетках весьма различны. В отличие от животных у растений, по-видимому, имеется система рестрикции–модификации генома; во всяком случае, мы установили, что у растений имеются S-аденозилметионин-зависимые эндонуклеазы, чувствительные к статусу метилирования ДНК. Судя по этим признакам, найденные и изученные нами растительные эндонуклеазы в известной мере аналогичны типичным бактериальным рестрикционным эндонуклеазам.

Растения – уникальные системы или модели организмов, которые представляют нам необычные и разнообразные возможности для расшифровки и понимания интимных механизмов и функциональной роли метилирования ДНК и функционирования геномов у эукариот. Каждый раз, глядя на уровень и характер метилирования генома, включая метилом, нужно отдавать себе отчет в том, что это, как правило, всего лишь моментальный снимок, а не полная целостная картина состояния модификации генома в онтогенезе. На самом деле, это очень динамичный процесс, результирующий метилирование и деметилирование ДНК.

Нет сомнений в том, что метилирование ДНК связано с эволюцией и таксономией организмов. Мы уже давно заметили, что в целом ДНК архегониальных и голосеменных растений метилированы в меньшей степени, чем ДНК покрытосеменных растений. При анализе профилей метилирования геномов у 30 поколений 10 линий *A. thaliana*, полученных из одного и того же предшественника, установлено, что примерно 30 000 цитозиновых остатков в ДНК этих штаммов (линий) растений метилированы

по-разному, т. е. эпигеномы у этих растений весьма различны и своеобразны. В особенности это касается характера метилирования транспозонов и кодирующих малые интерферирующие РНК элементов.

Говоря об этой модификации генома, мы должны отдавать себе отчет в том, что, по сути, мы имеем дело, по крайней мере, с тремя компонентами этой сложной реакции или даже системы: собственно субстрат реакции – ДНК, фермент (ДНК-метилтрансфераза) и донор метильных групп (S-аденозилметионин). Разумеется, контроль за модификацией ДНК и эффективностью этого процесса осуществляется на уровне всех этих компонентов, да еще и с участием иных самых разнообразных составляющих клеточного метаболизма. Наряду с этим статус метилирования генома в дифференцированной клетке на определенной стадии онтогенеза зависит также и от активности деметилирующих ДНК ферментов. Одна из таких животных деметилаз ДНК, отщепляющая непосредственно метильную группу от остатков 5-метилцитозина ДНК, открыта недавно, она выделена в виде индивидуального белка и ее ген проклонирован. Так что степень и характер метилирования генома на самом деле могут быть некими динамичными признаками, которые в каждый момент во многом определяются соотношением активностей метилирующих и деметилирующих ДНК ферментов.

Однако часто даже в присутствии этих активных ферментов, достаточного количества S-аденозилметионина (донора метильных групп и модулятора активностей ферментов) и в отсутствие соответствующих ингибиторов эти реакции в ядре невозможны просто из-за недоступности субстрата – ДНК в хроматине для ферментов. Здесь на первое место выходит организация собственно хроматина. Кроме упомянутых уже множественных модификаций гистонов, заметно модулирующих организацию хроматина и доступность ДНК для ферментов, за связывание и взаимодействие ДНК-метилтрансфераз с ДНК конкурируют многие иные белки. В частности, к ним могут относиться и белки гормон-рецепторных комплексов. Этим, по-видимому, во многом объясняются выявленная нами регуляция метилирования ДНК гормонами у растений и животных и действие

гормонов в клетке. Как бы то ни было, дальнейший прогресс в исследовании метилирования генома сильно зависит от детального изучения тонкой структуры хроматина и ее разнообразных функциональных флюктуаций в ядре.

Таким образом, на самом деле цитозинное метилирование ДНК контролирует рост и развитие растений (Ванюшин, 2006) и животных (Holliday, Pugh, 1975), оно участвует в регуляции всех генетических процессов, в том числе транскрипции, репликации, репарации ДНК, клеточной дифференцировке, геномном импринтинге и транспозиции генов.

### РЕПЛИКАТИВНОЕ МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК И НАСЛЕДОВАНИЕ ХАРАКТЕРА МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОМА

Нас давно интересовал вопрос о том, когда и в какой степени метилируются ДНК в клеточном цикле у растений и животных. Известно, что синтез одной из цепей ДНК при репликации двуцепочечных ДНК происходит непрерывно, а другой – прерывисто, с образованием относительно коротких фрагментов (фрагменты Оказаки), которые затем сшиваются в одну непрерывную цепь (рис. 8). Мы задались целью выделить эти фрагменты по мере синтеза (репликации) ДНК и выяснить, метилированы они или нет. Оказалось, что при выращивании клеток растений и животных в среде при высокой концентрации клеток синтез ДНК в них ограничивается образованием коротких интактных фрагментов без их лигирования. Эти фрагменты нам удалось получить в ощутимых количествах и изучить их метилирование. Они представляли собой фрагменты Оказаки, которые в условиях эксперимента Херши-Чейза сшивались с образованием нормальных длинных тяжей ДНК. Оказалось, что фрагменты Оказаки метилированы (табл. 3, рис. 8). Так было открыто и документировано собственно репликативное метилирование ДНК у растений и животных и предполагалось, что ДНК-метилтрансферазы могут входить в состав репликативного комплекса (Александровская и др., 1991; Кинос и др., 1986, 1993).

По степени и специфичности метилирования сформированные *in vivo* в проростках пшеницы фрагменты Оказаки отличались от лигированных

интермедиатов репликации и зрелой ДНК (табл. 3). В отличие от метилирования лигированной ДНК метилирование фрагментов Оказаки устойчиво к действию различных ингибиторов реакции метилирования (S-изобутиладенозин и др.) и не подавляется гормонами (ауксины у растений). Мы пришли к выводу, что в ядре имеется несколько ДНК-метилтрансфераз и метилирование ДНК на разных стадиях репликации может осуществляться разными по специфичности действия ферментами. Это полностью согласуется с современными сведениями о множественности ядерных ДНК-метилтрансфераз у животных и растений. Затем нам удалось дискриминировать репликативное и пострепликативное метилирование ДНК у растений. Эти процессы различаются по специфичности метилируемых последовательностей в ДНК и по чувствительности к разным гормонам и ингибиторам.

Мы предложили и описали механизм природной регуляции репликации ДНК метилированием (рис. 9). Нам удалось это сделать благодаря удивительному подарку природы – существованию синхронного развития злаков. Оказалось, что при развитии проростков пшеницы в стандартизированных условиях в их первом листе и coleoptile происходит природный выраженный синхронный и периодичный

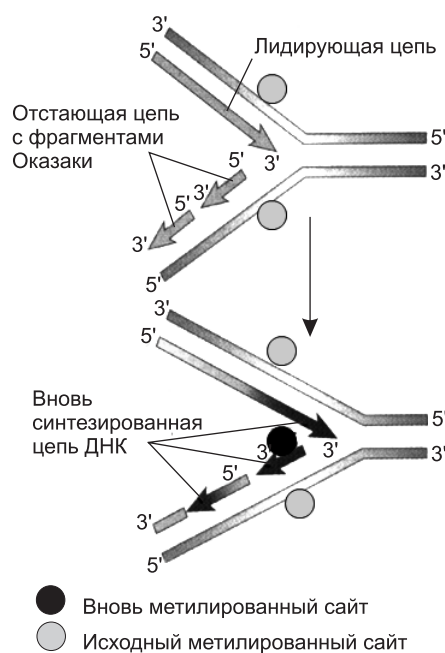


Рис. 8. Репликативное метилирование ДНК.

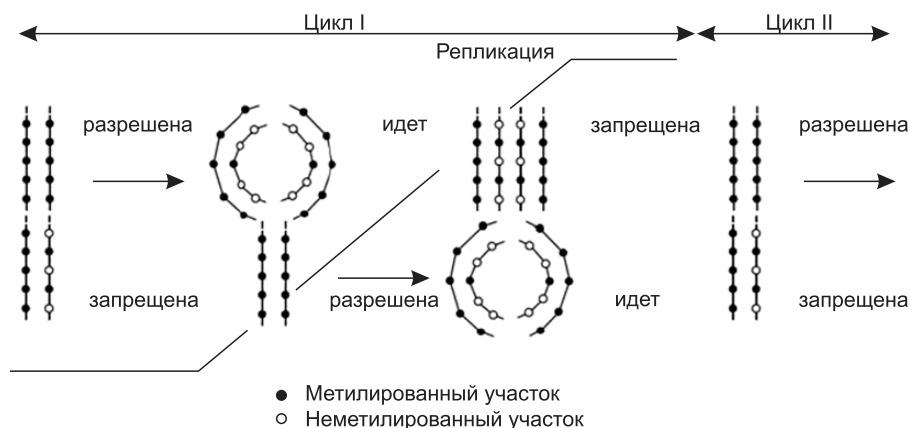
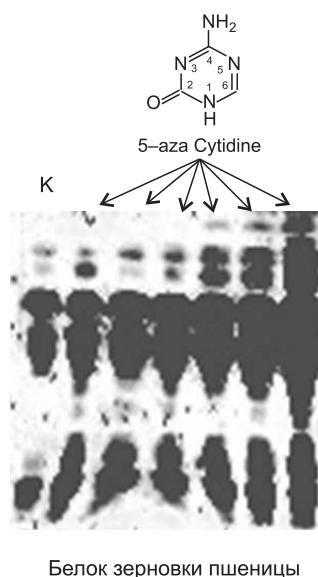


Рис. 9. Регуляция метилированием репликации ДНК в клеточном цикле (Ванюшин, 2009).

синтез (репликация) ДНК (Кирнос и др., 1993). Такой степени синхронизации деления клеток не удастся получить даже у бактерий, не говоря уже о культурах клеток животных и растений, в том числе и с применением самых ухищренных современных способов синхронизации. В листе проростка мы выявили по крайней мере пять четких пиков синтеза (репликации) ядерной ДНК. Таким образом, в терминах ДНК целый интактный орган растения (лист) можно рассматривать как одну клетку. Причем в отличие от искусственных суспензионных культур клеток в этом интактном органе на растении функционируют все сигнальные системы организма. Нам оставалось лишь выделить из первых листьев ДНК в начале, середине и после репликации и установить, как метилированы их отдельные цепи. Для этой цели мы выращивали проростки в присутствии 5-бромурацила, чтобы вновь синтезируемые цепи ДНК были утяжеленными, выделяли ДНК и с помощью центрифугирования в градиенте плотности CsCl разделили цепи исходной материнской (легкой) ДНК и заново синтезированной в клеточном цикле (тяжелой) ДНК. Сначала было установлено, что в результате репликации у растений образуются полуметилированные дуплексы ДНК, и молекулы ДНК сильно асимметричны по степени метилирования комплементарных цепей. Эта асимметрия цепей уменьшается к концу клеточного цикла, и перед новой репликацией полуметилированные сайты становятся вновь полностью метилированными. Репликация полуметилированных ДНК в клетке, по-видимому, запрещена, так как она приведет к утрате эпиге-

нетического сигнала. Много позже нашей работы было показано, что такая регуляция репликации реализуется *dam*-метилированием у бактерий. Теперь стало более или менее понятным, как происходит передача этого сигнала (характера метилирования) ДНК по наследству.

Как уже отмечалось, при репликации возникают полуметилированные ДНК, в таком состоянии, по-видимому, и работает большинство генов в интерфазном ядре. Перед очередным раундом репликации генома и делением клетки ДНК-метилтрансферазы поддерживающего типа, в частности *dmt1* (они поддерживают наследственный статус метилирования генома), метилируют полуметилированные сайты с образованием полностью метилированных сайтов. Метилированный цитозин в одной цепи служит сигналом для метилирования этим ферментом цитозинового остатка в оппозитной комплементарной цепи. При этом гены инактивируются, и они в принципе готовы к репликации, когда клетка завершает свой цикл (рис. 9). Таким образом, характер метилирования ДНК наследуется! Так, например, установлено, что обработка растений пшеницы ингибитором метилирования ДНК – 5-азациитидином – приводит к наследуемому в нескольких поколениях сильному (иногда более чем на 30 %) увеличению белковости зерна (рис. 10). Обычно гены запасных белков довольно сильно репрессированы; для прорастания и начального развития растения вполне достаточно запасного белка, который имеется в зерновке, и избыток его не нужен. В присутствии 5-азациитидина в растении ДНК сильно деметилируется и экспрессия генов



**Рис. 10.** Увеличение белковости зерновок пшеницы под влиянием 5-азацитидина – ингибитора метилирования ДНК.

К – контроль. Остальные дорожки – белок из зерновок растений, обработанных 5-азацитидином разными способами.

запасных белков в зерновке увеличивается. Этот факт может использоваться в биотехнологии.

Значит, целенаправленная регуляция экспрессии генов у растений может служить весьма эффективным биотехнологическим приемом. Здесь приходят на память удивительные слова Джонатана Свифта, написанные им еще в 1726 г.: «... whoever could make two ears of corn, or two blades of grass, to grow upon a spot of ground where only one grew before, would deserve better of mankind, and do more essential service to his country, than the whole race of politicians put together» (Jonathan Swift. The King of Brobdingnag to Gulliver, in Gullivers Travels, «A Voyage to Brobdingnag»). Поистине справедливые и святые слова, которые неплохо было бы твердо усвоить и нашим политикам. В них – благородная и почетная задача, адресованная и к нам из глубины веков. Может быть, в наше время ее к тому же можно дополнительно решать и несколько иным путем, например, добиться увеличения содержания белка в зерновке по крайней мере вдвое. Хлеб ценен именно белком, а крахмал можно получить из картофеля. Наш скромный опыт показывает, что этого добиться вполне возможно, в частности с использованием знаний эпигенетики.

**Деметилирование генома.** Мы уже отметили, что репликация ДНК сопровождается возникновением неметилированных сайтов во вновь образованной цепи дуплекса ДНК. Часто это ошибочно называют пассивным деметилированием ДНК. На самом деле это или неметилирование, или недометилирование ДНК при репликации в результате некоей блокады действия поддерживающей ДНК-метилтрансферазы DMT1. Вопрос о деметилировании ДНК долгое время оставался спорным, хотя все время появлялись неопровержимые сведения о том, что оно существует, в частности при эмбриогенезе. В принципе, остатки 5-метилцитозина могут выщепляться из ДНК и замещаться затем при последующей репарации остатками цитозина. По мнению М. Шифа, возможно и прямое отщепление метильной группы от остатков 5-метилцитозина с окислением ее в метанол.

У растений имеется *DEMETER (DME)* ген, экспрессирующийся у женского гаметофита с индуцированием материнских аллелей с импринтированным геном *MEDEA*. *DME* кодирует ДНК-гликозидазу -лиазу, которая активирует *MEA* ген путем вырезания некоторых остатков 5-метилцитозина у *MEA* в двух компактных областях соответственно выше и ниже кодирующей последовательности. Отцовский аллель при этом не затрагивается, поскольку *DME* экспрессируется в центральной клетке только перед оплодотворением. Другая  $m^5C$ -специфическая ДНК-гликозидаза *ROS1* (repressor of silencing 1) была выявлена у трансгенных растений арабидопсиса с мутацией по *ROS1*. *DME* и *ROS1* гликозидазы преимущественно вырезают остатки 5-метилцитозина из  $m^5CG$  сайтов. Они способны выстригать также остатки тимина из T-G мисматчей. Два других белка из семейства *DME*, *DEMETER-LIKE 2* и *3 (DML2, DML3)*, также являются  $m^5C$ -специфическими ДНК-гликозидазами, которые необходимы для контроля за правильным метилированием различных генов. При оплодотворении один спермий оплодотворяет гаплоидную яйцеклетку с образованием диплоидного зародыша, а другой попадает в диплоидную центральную клетку, которая дает начало триплоидному эндосперму. Перед оплодотворением или на ранних стадиях развития эндосперма ДНК в нем подвержена сильному деметилированию по многим и самым

разным сайтам. Большинство  $m^5CG$  сайтов деметируется материнскими DME. Одновременное удаление обоих остатков  $m^5C$  из симметрично метилированного сайта может приводить к фатальному разрыву двуцепочечной спирали ДНК. На терминальных стадиях развития женского гаметофита экспрессия гена *MET1* сильно подавлена перед последним синцитиальным делением, она очень слаба и в центральной клетке. Может быть, это изящное благоприятное эволюционное приспособление у растений. Последний раунд репликации ДНК в отсутствие MET1 активности должен приводить к возникновению ДНК с полуметилированными сайтами, которые затем могут деметилироваться с помощью DME без роковых двуцепочечных разрывов ДНК.

Часто спрашивают, что лучше: когда ДНК сильно или слабо метилирована? Мой ответ – ни то и ни другое. Она должна быть метилирована нормально, как это умеет делать и поддерживать всеми силами и возможностями нормальная клетка, следуя принципу поддержания гомеостаза. Действительно, когда мой коллега из Национального токсикологического центра США Л. Пуарье исключает из рациона питания аминокислоту метионин (источник метильных групп), у всех подопытных крыс через две недели неотвратно развивается рак (гепатома) печени. Рак развивается и в том случае, когда у трансгенных мышей активирован ген фермента человеческой ДНК-метилтрансферазы, что приводит к суперметилированию у них генома. В результате нокаута только одного из генов ДНК-метилтрансфераз у животных останавливается развитие эмбрионов и включается запрограммированная гибель клеток (апоптоз). К изменению метилирования ДНК нужно относиться с большой осторожностью.

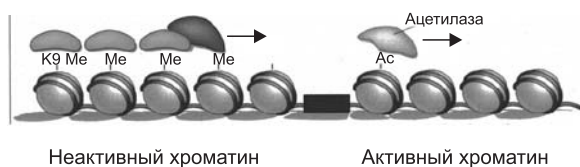
Как бы то ни было, скептики, о которых упоминалось в начале статьи, повержены, и сегодня доподлинно известно, что метилирование ДНК в клетке – не пустяк: оно контролирует **все!** генетические процессы, в том числе и такие, как транскрипция, репликация, рекомбинация, транспозиция генов, репарация, инактивация X-хромосомы (половая дифференцировка). Не удивительно, что к изучению этой относительно небольшой энзиматической модификации генома сейчас прикован очень большой интерес многих исследователей мира.

## МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК И ДРУГИЕ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ СИГНАЛЫ

С раскрытием и описанием исключительной роли метилирования ДНК в жизни организмов, по сути дела, впервые по-настоящему произошли становление и материализация эпигенетики. Долгое время эпигенетику не признавали вовсе, а часто стыдливо или даже намеренно о ней умалчивали. В основном это происходило потому, что природа эпигенетических сигналов и пути их реализации в организме были очень расплывчатыми. Теперь стало ясно, что одним из таких эпигенетических сигналов в клетке выступает энзиматическая модификация (метилирование) самой генетической матрицы (Ванюшин, 2006).

В клетке есть и другие системы эпигенетических сигналов, их много и они весьма разнообразны. У некоторых из них решительная роль принадлежит не ДНК, а белкам, в том числе белкам хроматина. Сегодня говорят о гистоновом «коде». Этот код существенно расширяет потенциал собственно генетического кода ДНК. Вследствие той или иной модификации гистонов изменяется структура хроматина, что приводит к наследуемым изменениям в транскрипции генов. Модификация гистонов «туда и обратно» (метилирование, фосфорилирование, ацетилирование, убиквитинирование без или с приставкой *de-*) часто определяет, будут ли гены активными или нет. К этому примыкают еще и множественные специальные негистоновые регуляторные белки, формирующие затейливые комплексы на ДНК, которые замалчивают гены или, напротив, запускают их в работу. Мы на пороге расшифровки и этих любопытных сигналов.

Имеется уже много данных о том, что существует взаимозависимость между метилированием ДНК и модификацией гистонов. У *Neurospora* метилирование лизина 9 в гистоне H3 критично для цитозинового метилирования ДНК и нормального развития гриба. Иначе говоря, гистоны могут выступать в качестве переносчика сигналов для метилирования генома. С другой стороны, у арабидопсиса метилирование CpG в ДНК предшествует и направляет метилирование лизина 9 в гистоне H3. Интересно, что неметилированный по лизину 4 (K4) хвост гистона H3 служит аллостерическим актива-



**Рис. 11.** Активация хроматина в результате деметилирования ДНК и ацетилирования гистонов.

тором ДНК-метилтрансферазы Dnmt3a. Этап взаимодействия неметилированного хвоста гистона является своеобразным checkpoint для метилирования ДНК этим ферментом.

У животных и растений существует связь между метилированием ДНК и деацетилированием гистонов. Например, ген гистоновой деацетилазы необходим для метилирования ДНК, индуцированного малыми РНК (dsRNA). Поистине «метилирование встречается с ацетилированием». С другой стороны, известно, что нокаут гена деметилазы гистона подавляет *de novo* метилирование ДНК и искажает развитие эмбрионов мыши. Без деметилирования остатка метил-лизина K4 в гистоне H3 у мыши *de novo* метилирование ДНК ферментом ДНК-метилтрансферазой dmt3a не происходит.

### НАПРАВЛЯЕМОЕ РНК МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК И ЗАМАЛЧИВАНИЕ ГЕНОВ

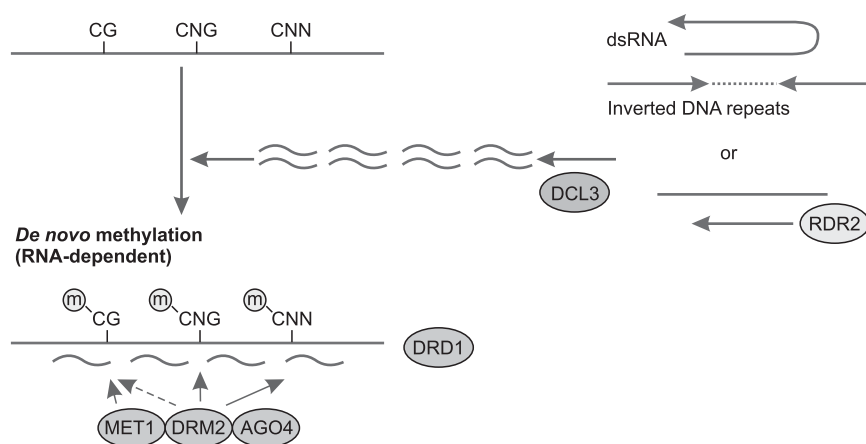
Особый интерес привлекает сегодня изучение механизмов и биологической роли метилирования ДНК, направляемого малыми РНК (RNA-di-

rected DNA methylation), которые осуществляют специфическое выключение генов (gene silencing) (Matzke M.A., Matzke A.J., 1995).

Считается, что сайт-специфичные ДНК-метилтрансферазы в присутствии маленькой сигнальной РНК (рис. 12) осуществляют *de novo* метилирование ДНК по CNG и другим сайтам в нуклеотидной последовательности ДНК, узнаваемой малой РНК; это метилирование мобилизует соответствующие ферменты, которые, в частности, и модифицируют гистоны.

Модификация гистонов приводит к индукции или усилению метилирования CNG сайтов, которое затем поддерживается без участия РНК-триггера (рис. 11). В цепи этих событий метилирование ДНК может быть как причиной, так и следствием «замалчивания» генов. Не удивительно, что особый прогресс в области направленного РНК метилирования генов достигнут благодаря изучению метилирования ДНК именно у растений, а не животных. Это, по-видимому, во многом объясняется тем, что именно растения обладают выраженным метилированием CNG и несимметричных сайтов в ДНК, которое в основном и вовлечено в РНК-направляемое метилирование генома. В последнее время появилось много указаний на то, что такое наведенное РНК. Метилирование ДНК в триплексе РНК-ДНК играет решающую роль в замалчивании генов малыми РНК; у организмов или мутантов с дефектным цитозиновым метилированием ДНК это РНК-замалчивание генов неэффективно.

Открытие специфических так называемых малых РНК (siRNA, miRNA) произвело взрыв



**Рис. 12.** Замалчивание генов малыми интерферирующими РНК (siRNA).

в представлениях о молекулярных механизмах регуляции экспрессии генов и сыграло исключительную роль в признании и упрочении эпигенетики. Как правило, эти РНК закодированы в повторяющихся инвертированных последовательностях генома, в результате считывания которых и последующего процессинга они появляются в виде коротких 12–14-членных олигонуклеотидов. Эти регуляторные фрагменты впервые были выявлены у петунии, и было показано, что они контролируют экспрессию генов, отвечающих за синтез пигментов, и определяют характер окраски цветка. Они узнают соответствующие им комплементарные последовательности в ДНК или мРНК и, связываясь с ними, могут блокировать экспрессию соответствующих генов на уровне транскрипции и (или) трансляции. Считается, что большинство таких палиндромных повторов в геноме эукариот имеет вирусное происхождение и в принципе могут защищать клетки от вирусных генетических инвазий.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одним из существенных эпигенетических сигналов в клетке является метилирование ДНК. У высших растений ДНК сильно метилированы по остаткам цитозина; 5-метилцитозин локализован преимущественно в CG и CNG последовательностях. Глобальное метилирование ДНК видо-, ткане-, органоидспецифично, оно изменяется при прорастании семян, переходе растений к цветению, различных вирусных и грибных инфекциях и уменьшается с возрастом. Как правило, ДНК архегониальных менее метилированы, чем ДНК цветковых растений. Найдены видовые различия филогенетического значения по встречаемости метилированных CNG последовательностей в геномах растений. Тканевая специфичность метилирования ДНК, выявленная изначально у животных (Vanuyshin *et al.*, 1970), затем обнаружена у растений. Отдельные гены в разных тканях одного и того же организма метилированы по-разному. Содержание  $m^5C$  в ДНК разных тканей связано и с так называемым градиентом цветения. Первое же картирование характера метилирования целого генома (метилом) *Arabidopsis thaliana* показало, что ДНК перичентромерного гетерохроматина,

повторяющиеся последовательности и зоны образования малых интерферирующих РНК сильно метилированы, примерно треть генов метилировано в транскрибируемых областях и только около 5 % генов – в промоторной области.

Метилированные в транскрибируемых областях гены, характеризуются конститутивной транскрипционной активностью, в то время как у метилируемых по промоторной области генов существует сильно выраженная тканевая специфичность экспрессии. Так, например, мы установили, что степень метилирования промотора пататинового гена в разных тканях картофеля обратно коррелирует со степенью экспрессии этого гена, он заметно неометилирован в клубнях картофеля, где в основном и осуществляется синтез этого белка.

Специфические изменения в характере метилирования ДНК происходят на протяжении всей жизни растения, начиная от прорастания семян и вплоть до его гибели, запрограммированной или вызванной разными агентами и факторами биологической и абиотической природы. Онтогенез растений и животных вообще невозможен без метилирования генома, потому что метилирование ДНК участвует в контроле за всеми генетическими функциями, включая транскрипцию, репликацию, репарацию ДНК, транспозицию генов, геномный импринтинг и клеточную дифференцировку. Индуцируемое холодом цветение растений регулируется метилированием ДНК. При холодной обработке (яровизация) ДНК частично деметируется и в результате активируются гены, отвечающие за индукцию цветения.

Метилирование генома вовлечено в замалчивание генов маленькими РНК (siRNA). Нокаут и нокаун генов соответствующих ДНК-метилтрансфераз сопровождаются серьезными изменениями фенотипических свойств, нарушением роста и развития. Индуцированное 5-азациитидином деметилирование ДНК при формировании зерновки приводит к наследуемому увеличению белковости пшениц. Таким образом, избирательная регуляция метилирования ДНК – новое эффективное средство биотехнологического контроля за продуктивностью растений.

Мы обнаружили, что репликация генома сопровождается появлением полуметилиро-



ванных сайтов в ДНК; возникшая при этом асимметрия метилирования цепей ДНК значительно уменьшается или вовсе исчезает к концу клеточного цикла. На этом основании нами предложена модель регуляции репликации ДНК метилированием.

Мы установили, что первичные репликативные элементы генома (фрагменты Оказаки) метилированы. Так, было открыто и документировано собственно репликативное метилирование ДНК у растений и животных и показано, что ДНК-метилтрансферазы могут входить в состав репликативного комплекса. Мы пришли к выводу, что в ядре имеется несколько ДНК-метилтрансфераз, и метилирование ДНК на разных стадиях репликации может осуществляться разными по специфичности действия ферментами. Это подтвердилось современными сведениями о множественности ядерных ДНК-метилтрансфераз. Нам удалось дискриминировать репликативное и пострепликативное метилирование ДНК у растений. Эти процессы различаются по специфичности метилируемых сайтов в ДНК и по чувствительности к разным гормонам и ингибиторам метилирования.

Найдено, что фитогормоны контролируют метилирование ДНК. Под действием фитогормонов заметно уменьшается глобальное метилирование ДНК. Кроме того, они подавляют метилирование вновь синтезируемых цепей ДНК, не влияя на метилирование фрагментов Оказаки. Так, впервые было обнаружено, что фитогормоны воздействуют собственно на геном путем модуляции его метилирования. Мы считаем, что именно модуляция метилирования ДНК является одним из ведущих механизмов действия гормонов у растений и животных. Не исключено, что гормон-рецепторные комплексы конкурируют за места связывания и метилирования генома соответствующими ДНК-метилтрансферазами.

Нет сомнений в том, что метилирование ДНК связано с эволюцией и таксономией растений. Мы уже давно заметили, что в целом ДНК архегониальных и голосеменных растений метилированы в меньшей степени, чем ДНК покрытосеменных растений. При анализе профилей метилирования геномов у 30 поколений 10 линий *A. thaliana*, полученных из одного и того же предшественника, установлено, что примерно 30 000 цитозиновых остатков в ДНК

этих штаммов (линий) метилированы по-разному, т. е. эпигеномы у этих растений весьма различны и своеобразны. В особенности это касается характера метилирования транспозонов и кодирующих малые интерферирующие РНК элементов.

Говоря об этой модификации генома, мы должны отдавать себе отчет в том, что, по сути, мы имеем дело, по крайней мере, с тремя компонентами этой сложной реакции или даже системы: собственно субстрат реакции – ДНК, фермент (ДНК-метилтрансфераза) и донор метильных групп (S-аденозилметионин). Разумеется, контроль за модификацией ДНК и эффективностью этого процесса осуществляется на уровне всех этих компонентов, да еще и с участием иных самых разнообразных составляющих клеточного метаболита. Наряду с этим, статус метилирования генома в дифференцированной клетке на определенной стадии онтогенеза зависит также и от активности деметилирующих ДНК ферментов. Одна из таких деметилаз ДНК животных, отщепляющая непосредственно метильную группу от остатков 5-метилцитозина ДНК, открыта недавно, она выделена в виде индивидуального белка, ее ген проклонирован. Так что степень и характер метилирования генома на самом деле могут быть некими динамичными признаками, которые в каждый момент во многом определяются соотношением активностей метилирующих и деметилирующих ДНК ферментов.

Однако часто даже в присутствии этих активных ферментов, достаточного количества S-аденозилметионина (донора метильных групп и модулятора активностей ферментов) и в отсутствии соответствующих ингибиторов эти реакции в ядре невозможны просто из-за недоступности субстрата – ДНК в хроматине для ферментов. Здесь на первое место выходит организация собственно хроматина. Кроме упомянутых уже множественных модификаций гистонов, заметно модулирующих организацию хроматина и доступность ДНК для ферментов, за связывание и взаимодействие ДНК-метилтрансфераз с ДНК конкурируют многие иные белки. В частности, к ним могут относиться и белки гормон-рецепторных комплексов. Этим, по-видимому, во многом объясняются выявленная нами регуляция метилирования ДНК

гормонами у растений и животных и действие гормонов в клетке. Как бы то ни было, дальнейший прогресс в исследовании метилирования генома в значительной мере зависит от детального изучения тонкой структуры хроматина и ее разнообразных функциональных флюктуаций в ядре.

Открыто адениновое метилирование ДНК у растений; N<sup>6</sup>-метиладенин (m<sup>6</sup>A) найден в митохондриальной и ядерной ДНК. У *Arabidopsis thaliana* ген цитозиновой ДНК-метилтрансферазы DRM2 метилирован как по цитозиновым (CCGG), так и адениновым (GATC) остаткам. Индукция антисмысловых конструкций цитозиновой ДНК-метилтрансферазы (MET1) у трансгенных растений арабидопсиса приводит к изменению характера метилирования адениновых остатков в гене *DRM2*. Значит, у растений существует взаимозависимый контроль между метилированием адениновых и цитозиновых оснований. Это новый механизм утонченного эпигенетического контроля сопряженными метилированиями ДНК за функциями генома у эукариот.

Из богатой митохондриями фракции вакуолярных везикул, возникающих при апоптозе у стареющих колеоптилей пшеницы, выделена **первая** адениновая ДНК-метилтрансфераза высших эукариот. В присутствии S-аденозил-L-метионина (SAM) этот Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-зависимый фермент (*wadmtase*) метилирует *de novo* остаток аденина в середине последовательности TGATCA у одно- и двутяжевых ДНК, предпочитая однотяжевые структуры. По-видимому, *wadmtase* модифицирует мтДНК и участвует в регуляции репликации митохондрий; не исключено, что она же метилирует и яДНК.

Из колеоптилей пшеницы выделены SAM-зависимые эндонуклеазы WEN1 и WEN2, чувствительные к статусу метилирования ДНК. Эти свойства не были известны для эндонуклеаз высших эукариот, а характерны лишь для некоторых бактериальных рестрикционных эндонуклеаз, что указывает на возможное существование системы рестрикции-модификации у растений. Конкурентные ингибиторы метилирования ДНК S-аденозил-L-гомоцистеин и S-изобутиладенозин также модулируют гидролиз ДНК этими ферментами. Таким образом, открыт новый тип регуляции активности эукариотиче-

ских (растительных) эндонуклеаз, основанный на их модуляции донором метильных групп SAM и его аналогами – ингибиторами реакции метилирования. По-видимому, ферменты WEN1 и WEN2 участвуют в деградации ядерной ДНК при запрограммированной гибели растительной клетки. По некоторым свойствам эндонуклеаза WEN1 напоминает животную эндонуклеазу G, которая фрагментирует ДНК при апоптозе. Другая выделенная из колеоптилей пшеницы уникальная эндонуклеаза WEN2, как и WEN1, также чувствительна к статусу метилирования ДНК и модулируется SAM. У растений существует система сопряженной регуляции SAM-зависимых (в том числе и чувствительных к статусу метилирования ДНК) эндонуклеазных активностей с разнонаправленным действием на них эффектора (модулятора) SAM. К тому же действие этих эндонуклеаз модулируется гистоном H1, это может существенно влиять на межнуклеосомную фрагментацию яДНК этими ферментами при апоптозе.

Описанные здесь модификации генома и гистонов, малые интерферирующие РНК – очень delicate и эффективные природные механизмы регуляции активности генов, состояния, репликации и репарации генома в клетке. Модификации генома тесно связаны с другими утонченными эпигенетическими сигналами, превращениями в структурной и функциональной организации генома и клетки, которые в совокупности и определяют жизнь, ее сущность и качество. Принципиально важно отметить, что существующие в клетке множественные эпигенетические системы и сигналы часто взаимозависимы. Во многом это имеет некий подстраховочный смысл, для того чтобы гарантированно обеспечить надежность регуляторного сигнала. Конкретные цепочки, отдельные связи и изошренная паутина этих взаимозависимых сигналов еще очень далеки от полного понимания. Однако нет никакого сомнения в том, что метилирование ДНК и модификации гистонов, а также избирательный сайленсинг генов малыми РНК играют очень важную роль в жизни клетки и организма, поэтому дальнейшие исчерпывающие исследования в этой захватывающей области знаний – очень важная и плодотворная задача нашего века, который по праву называют эрой эпигенетики. Именно эпи-

генетике принадлежит исключительная роль в решении многих общебиологических проблем. По данным биотехнологического бюллетеня Массачусетского технологического института (MIT, США), эпигенетика принадлежит к десятку новых технологий, которые в ближайшее десятилетие могут перевернуть весь мир. Без эпигенетических знаний невозможны развитие и совершенствование клеточных технологий (стволовые клетки), надежная диагностика, предупреждение и лечение разных форм рака, предупреждение преждевременного старения. Эпигенетика лежит в основе эффективных способов борьбы со многими инфекционными (в том числе вирусными) болезнями человека, животных и растений. Несомненно, эпигенетика послужит и делу улучшения качества урожая разных сельскохозяйственных культур, продуктивности пород животных. Иными словами, без эпигенетики прогресс биологии, медицины, сельского хозяйства и биотехнологий немислим.

### ЛИТЕРАТУРА

- Александрюшкина Н.И., Ротаенко Е.П., Никифорова И.Д. и др. Двухэтапное метилирование генома пшеницы в культуре клеток и в проростке // Биохимия. 1991. Т. 56. С. 361–368.
- Ашапкин В.В., Кутуева Л.И., Ванюшин Б.Ф. Регулируется ли метилированием транскрипция гена цитозинового ДНК-метилтрансферазы MET1 у растения *Arabidopsis thaliana*? // Генетика. 2011. Т. 47. С. 320–331.
- Бердышев Г.Д., Коротяев Г.К., Боярских Г.В., Ванюшин Б.Ф. Нуклеотидный состав ДНК и РНК соматических тканей горбуши и его изменение в течение нереста // Биохимия. 1967. Т. 32. С. 988–993.
- Ванюшин Б.Ф. Метилирование ДНК и эпигенетика // Генетика. 2006. Т. 42. С. 1–14.
- Ванюшин Б.Ф. Метилирование ДНК у растений: механизмы и биологическая роль // Тимирязевские чтения / Ред. В.В. Кузнецов. Ин-т физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. М.: Наука, 2009. Вып. 69. 77 с.
- Кирнос М.Д., Александрюшкина Н.И., Ванюшин Б.Ф. 5-метилцитозин в пиримидиновых последовательностях ДНК растений и животных: специфичность метилирования // Биохимия. 1981. Т. 46. С. 1458–1474.
- Кирнос М.Д., Александрюшкина Н.И., Ванюшин Б.Ф. Двухэтапное метилирование реплицирующегося генома в клетках высших растений // Усп. биол. химии. 1993. Т. 33. С. 148–172.
- Спирин А.С., Белозерский А.Н., Шугаева Н.В., Ванюшин Б.Ф. Изучение видовой специфичности нуклеиновых кислот у бактерий // Биохимия. 1957. Т. 22. С. 744–754.
- Cooney C. Methyl Magic. Kansas City: McMeel, 1999. 253 p.
- Fedoreyeva L.I., Sobolev D.E., Vanyushin B.F. Wheat endonuclease WEN1 dependent on S-adenosyl-L-methionine and sensitive to DNA methylation status // Epigenetics. 2007. V. 2. P. 50–53.
- Fedoreyeva L.I., Vanyushin B.F. N6-Adenine DNA-methyltransferase in wheat seedlings // FEBS Lett. 2002. V. 514. P. 305–308.
- Finnegan E.J., Genger R.K., Kovac K. *et al.* DNA methylation and the promotion of flowering by vernalization // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 5824–5829.
- Holliday R., Pugh J.E. DNA modification mechanisms and gene activity during development // Science. 1975. V. 187. P. 226–232.
- Matzke M.A., Matzke A.J.M. Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: What does it really tell us? // Trends Genet. 1995. V. 11. P. 1–3.
- Vanyushin B.F., Ashapkin V.V. DNA methylation in higher plants: past, present and future // Biochim. Biophys. Acta. 2011. V. 1809. P. 360–368.
- Vanyushin B.F., Ashapkin V.V. DNA methylation in plants. N.Y.: Nova Biomedical Books: Nova Science, 2009. 152 p.
- Vanyushin B.F., Tkacheva S.G., Belozersky A.N. Rare bases in animal DNA // Nature. 1970. V. 225. P. 948–949.
- Vanyushin B.F., Nemirovsky L.E., Klimenko V.V. *et al.* The 5-methylcytosine in DNA of rats. Tissue and age specificity and the changes induced by hydrocortisone and other agents // Gerontologia. 1973. V. 19. P. 138–152.

### ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Эпигенетика / Ред. С.М. Закиян, В.В. Власов, Е.В. Дементьева. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2012. 592 с.
- Эпигенетика / Под ред. С.Д. Эллис. М.: Техносфера, 2010. 496 с.

## EPIGENETICS TODAY AND TOMORROW

**B.F. Vanyushin**

M.V. Lomonosov Moscow State University, A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow, Russia, e-mail: vanyush@belozersky.msu.ru

Epigenetics is a science of inheritable organism properties that are not associated with changes in the DNA nucleotide sequence but can be indirectly encoded in the genome. The most known epigenetic mechanisms (signals) are enzymatic DNA methylation, the histone code (various enzymatic histone modifications including acetylation, methylation, phosphorylation, ubiquitination and others), and gene silencing mediated by small RNAs (miRNA, siRNA). Very often all these processes are interconnected or even partially interchangeable. This seems to be needed for reliable realization of respective epigenetic signaling. Anyway, these processes are closely associated with chromatin structural and functional organization. DNA methylation in plants and animals carried out by site-specific enzymes cytosine DNA-methyltransferases produces 5-methylcytosine ( $m^5C$ ) residues in such DNA sequences as CG, CNG and CNN. Adenine DNA methylation also occurs in plants. The resulting  $m^5C$  residues in DNA influence substantially the interaction of DNA with different proteins including regulatory ones. Often DNA methylation prevents DNA binding to such proteins and inhibits gene transcription but sometimes it is a must for binding to other regulatory proteins. Specific  $m^5CpG$  DNA-binding proteins have been described. Binding of such proteins to DNA orchestrates the whole protein ensemble of the transcription machinery and induces its activity. Thus, DNA methylation can serve as a signal of negative or positive control for gene activities. DNA methylation in eukaryotes is species- and tissue (cell) specific. It is regulated by hormones and aging-related changes, being one of the mechanisms controlling cellular and sex differentiation. DNA methylation controls all genetic functions: DNA replication, recombination, repair, transcription and others. Distortions in DNA methylation and other epigenetic signals cause premature aging, cancer, diabetes, asthma, and severe mental dysfunctions. Changes in the DNA methylation profile accompany carcinogenesis, being a reliable diagnostic marker of various cancer species even at early stages of tumor formation. Epigenetic parameters are very significant for understanding of somaclonal variation mechanisms; characterization of clones and cell cultures, including stem cells at various differentiation stages; and determination of their differentiation directions. Directed change in the DNA methylation profile is an efficient biotechnological tool of activation of transcription of seed storage protein genes in cereals, and it is used, in particular, for inheritable increase in protein content in wheat grain. The inhibitor of DNA methylation 5-azacytidine is used for treatment of skin cancer. Various regulators of enzymatic modifications of histones are efficient in the treatment of different tumors as well. Use of specific small RNAs in the therapy of cancer and other diseases appears to be particularly promising, especially in connection with directed inhibition of transcription of genes responsible for cell malignization and metastasis. The therapeutic action of many known small biologically active peptides seems to be expressed mainly at the epigenetic level.

Thus, a phenotype is a product of combined expression of the genome and epigenome. In this regard, the known P. Medawar's expression «genetics supposes but epigenetics disposes» sounds quite correct and very impressive. In fact, epigenetics is a relatively new, quickly developing, and very promising science of the 21st century that has already engrained in biotechnologies, medicine, and agriculture.

**Key words:** apoptosis, histone, DNA methyltransferase, DNA-binding proteins, genomics, gene systematics, gene silencing, cell differentiation, DNA methylation, mitochondria, development, replication, cancer, aging, transcription, chromatin, evolution, endonucleases, epigenetics, 5-methylcytosine,  $N^6$ -methyladenine.

УДК 57.011:577.121:57.087.2:57.05:57.052:575.85:519.716

## ГЕННЫЕ СЕТИ

© 2013 г. **Н.А. Колчанов<sup>1,2,3</sup>, Е.В. Игнатьева<sup>1,2</sup>, О.А. Подколотная<sup>1</sup>,  
В.А. Лихошвай<sup>1,2</sup>, Ю.Г. Матушкин<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия;  
e-mail: kol@bionet.nsc.ru

<sup>2</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,  
Новосибирск, Россия;

<sup>3</sup> НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

Поступила в редакцию 5 сентября 2013 г. Принята к публикации 1 ноября 2013 г.

### ВВЕДЕНИЕ

Исследования последнего десятилетия свидетельствуют о том, что подавляющее большинство фенотипических признаков человека, животных, растений и микроорганизмов (молекулярных, биохимических, клеточных, физиологических, морфологических, поведенческих и т. д.) контролируются очень сложным образом и что в основе их формирования лежат генные сети, т. е. группы координированно функционирующих генов, взаимодействующих друг с другом как через свои первичные продукты (РНК и белки), так и через разнообразные метаболиты и другие вторичные продукты функционирования генных сетей.

### БАЗОВЫЕ ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ ГЕННЫХ СЕТЕЙ

В каждой генной сети можно выделить несколько обязательных типов структурных и функциональных компонентов: 1) группа координированно экспрессирующихся генов, составляющая ядро сети; 2) белки, кодируемые этими генами; 3) низкомолекулярные компоненты (гормоны и другие сигнальные молекулы, энергетические компоненты, метаболиты); 4) отрицательные и положительные обратные связи, стабилизирующие параметры генной сети на определенном уровне или, напротив, отклоняющие их от исходного значения, обес-

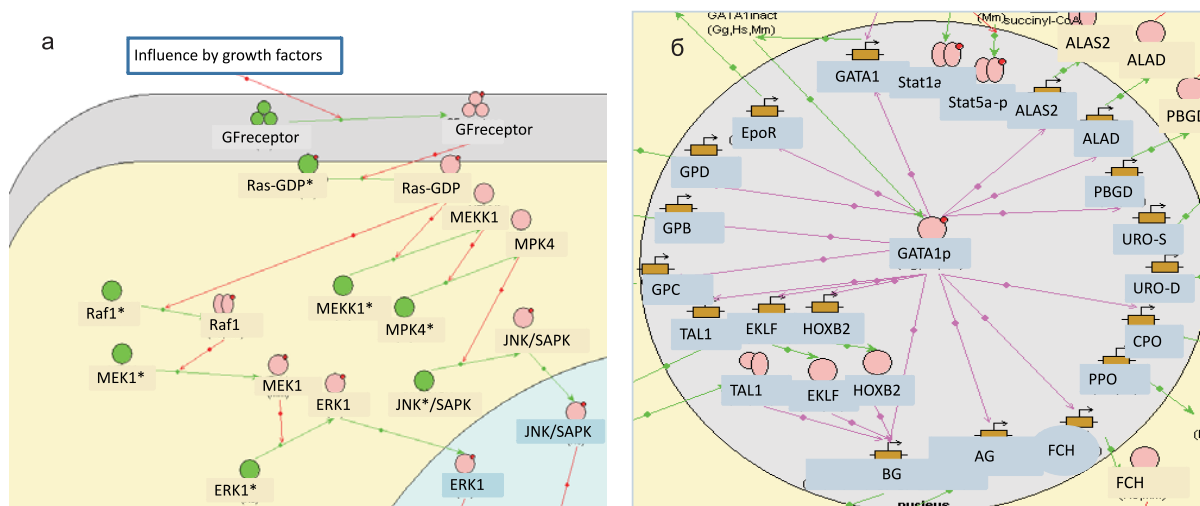
печивая переход к новому функциональному состоянию. Генные сети могут включать такие крупные функциональные модули, как: а) метаболические пути; б) пути передачи сигналов от клеточных мембран в ядра клеток, обеспечивающие активацию или подавление транскрипции генов в ответ на внешние по отношению к клетке стимулы (рис. 1, а).

Генные сети могут функционировать как на уровне отдельных клеток (тогда данный тип клеток будет включать все структурные компоненты генной сети), так и на уровне ткани, органа либо целого многоклеточного организма. В этом случае в реализации обратных связей генной сети будут участвовать гены и белки, экспрессирующиеся в различных типах клеток.

Рассмотрение структурно-функциональной организации генных сетей (Колчанов и др., 2000) позволяет выделить следующие базовые принципы их организации.

1. Существование большого разнообразия молекулярных механизмов, обеспечивающих функционирование обратных связей, в том числе за счет изменения интенсивности про-

**Генные сети** – группы координированно функционирующих генов, взаимодействующих друг с другом как через свои первичные продукты (РНК и белки), так и через разнообразные метаболиты и другие вторичные продукты функционирования генных сетей.



**Рис. 1.** Примеры, иллюстрирующие некоторые компоненты и базовые принципы организации генных сетей.

а – MAP-киназный путь передачи сигнала в ядро клетки, контролирующей процесс клеточного деления, активируемый ростовыми факторами; б – координированно экспрессирующиеся гены ядра генной сети и каскадная регуляция транскрипции генов транскрипционным фактором GATA1 в процессе дифференцировки эритроцита.

цессов транскрипции, сплайсинга, трансляции, посттрансляционных модификаций белков, ферментативных реакций, транспорта и т. д.

2. Наличие в каждой сети «центральных» генов и белков (ключевых регуляторов), обеспечивающих координацию функций остальных генов этой сети (рис. 1, б).

3. Каскадный механизм активации транскрипции больших групп генов транскрипционными факторами (рис. 1, б).

4. Авторегуляция генной сети, осуществляемая благодаря функционированию регуляторных контуров с положительными и отрицательными обратными связями и направленная на поддержание определенного, характерного для каждой генной сети типа динамики (рис. 2, а, б).

Некоторые типы динамики критических параметров генных сетей приведены на рис. 2, в–е.

Молекулярная основа работы регуляторных контуров, управляющих функционированием генных сетей и определяющих тип их динамики, – наличие сайтов-мишеней в ДНК, РНК и белках, с которыми могут взаимодействовать различные молекулярные компоненты генной сети и внешние регуляторные факторы.

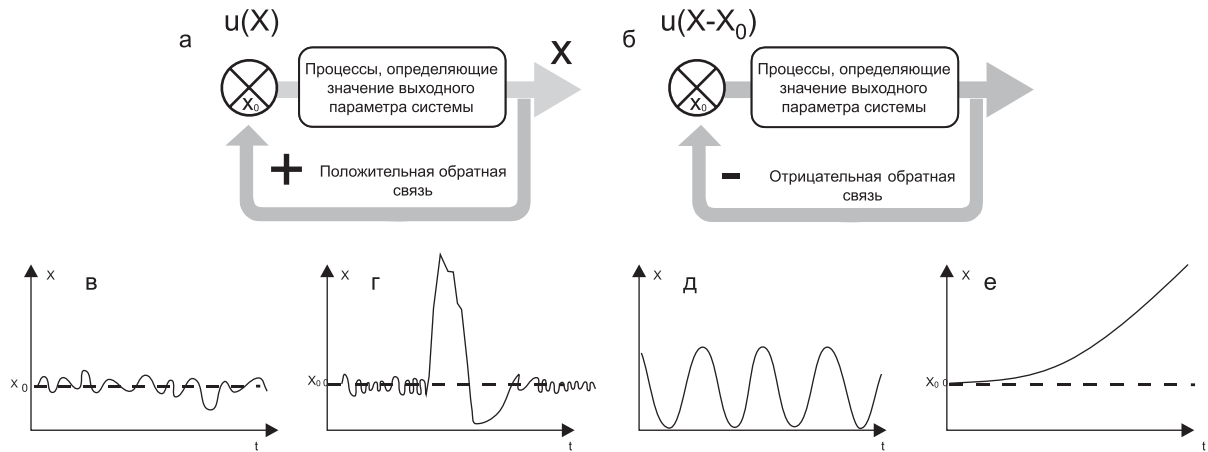
Особенность процесса формирования любого сложного фенотипического признака – наличие множества иерархических уровней

его регуляции. В качестве примера приведем генные сети регуляции стероидогенеза у млекопитающих (рис. 3).

Сеть наиболее высокого иерархического уровня функционирует в гипоталамусе, регулируется транскрипционным фактором SF1 и продуцирует релизинг-факторы, контролирующие работу гипофиза. Генная сеть промежуточного уровня в гипофизе продуцирует тропные гормоны, контролирующие гонады и надпочечники, и регулируется тем же фактором. Наконец, генная сеть самого нижнего уровня, собственно продуцирующая стероидные гормоны в гонадах и надпочечниках (кортикостерон, эстрадиол, тестостерон), также контролируется фактором SF1.

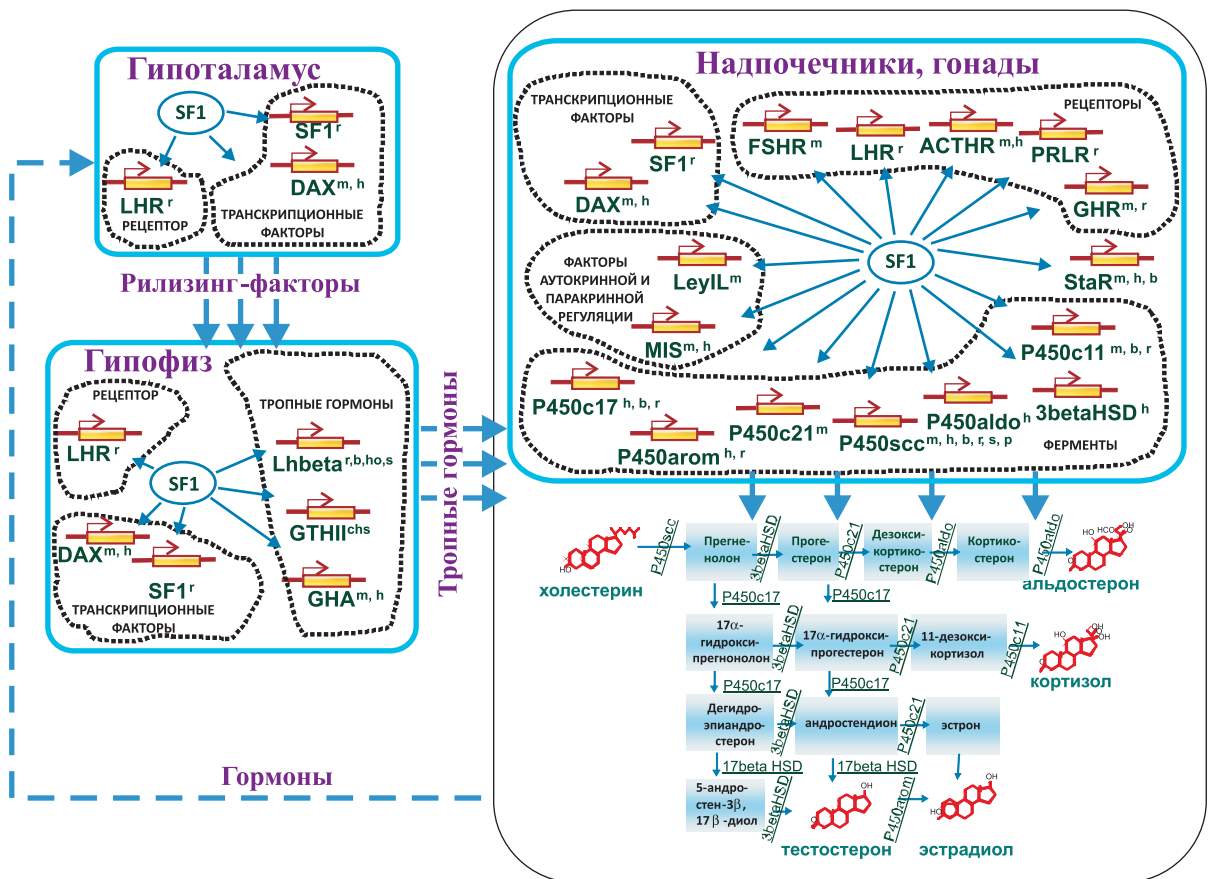
Этот пример интересен тем, что все три иерархически связанные генные сети контролируются одним и тем же транскрипционным фактором.

Еще одной особенностью генных сетей и молекулярно-генетических систем можно назвать «молекулярной бюрократией» (Meléndez-Nevia *et al.*, 1996). Ее суть состоит в том, что каждый рабочий процесс, непосредственно ведущий к формированию того или иного фенотипического признака, обеспечивается исключительно большим количеством регу-



**Рис. 2.** Регуляторные контуры с обратными связями и типы динамики критических параметров, контролируемых генными сетями.

а – регуляторный контур с отрицательной обратной связью; б – регуляторный контур с положительной обратной связью; в – постоянство контролируемых параметров для генных сетей гомеостаза; г – выраженное отклонение контролируемых параметров с последующим возвращением к норме для генных сетей стрессового ответа; д – осцилляция контролируемых параметров для генных сетей циклических процессов; е – монотонное отклонение параметров от текущего состояния для некоторых генных сетей морфогенеза.



**Рис. 3.** Генные сети регуляции стероидогенеза у млекопитающих.

Функционирование генных сетей трех иерархических уровней регуляции контролируется транскрипционным фактором SF1. Реконструировано по: (Бусыгина и др., 2003. С. 364–382). В обозначениях генов h – человек, m – мышь, r – крыса, b – корова, chs – лосось, ho – лошадь, s – овца, p – свинья.

ляторных процессов. Например, цикл трикарбоновых кислот у *E. coli K-12*, снабжающий клетку энергией, включает 1882 регуляторных и только 139 метаболических процессов. То есть на один рабочий процесс приходится более 10 контролирующих процессов. Наличие мощной регуляторной компоненты проявляется и на уровне экспрессии генов: регуляторные районы генов эукариот содержат большое количество сайтов связывания транскрипционных факторов, что обеспечивает огромное разнообразие вариантов регуляции экспрессии одного и того же гена. Таким образом, характерное свойство генных сетей, функционирующих в живых системах, состоит в том, что в них регуляторная компонента на порядки больше, чем рабочая. Это касается как метаболической, так и генетической компоненты генных сетей, и проявляется на каждом иерархическом уровне их организации.

### МЕТОДЫ РЕКОНСТРУКЦИИ ГЕННЫХ СЕТЕЙ

Среди множества подходов к реконструкции генных сетей можно выделить следующие основные группы.

1. Ручная реконструкция генных сетей экспертами с использованием специальных программных средств – редакторов генных сетей.

2. Извлечение знаний о молекулярно-генетических взаимодействиях и семантических ассоциациях различного типа из текстов научных публикаций компьютерными методами (методы text-mining).

3. Методы автоматической интеграции гетерогенных данных о молекулярно-генетических взаимодействиях (ДНК-белковых и белок-белковых и т. д.), метаболических и сигнальных путях, генных сетях и других из различных источников данных, основанные на использовании онтологических подходов.

Заметим, что современные системы для реконструкции и анализа генных сетей, как правило, построены на сочетании нескольких подходов и используют, кроме того, различные подходы, основанные на многомерном анализе данных и компьютерных методов предсказания (Taylor, Singhal, 2009; Haibe-Kains *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013).

**Онтология** – согласование понятий предметной области, их определений и атрибутов, отношений между ними, способов их описания и использования, а также связанных с ними аксиом и правил вывода.

Первый исторически возникший способ реконструкции генных сетей был основан на ручном экстрагировании информации из научных публикаций и других источников экспериментальных данных. При этом ввод информации о структуре генных сетей и функции их элементов осуществлялся с помощью специальных графических и текстовых редакторов. Этот подход является трудоемким, но по-прежнему остается актуальным при необходимости реконструкции максимально точной и подробной генной сети. Наиболее известными из систем, использующих данный подход, являются Reactome, KEGG, MetaCyc, WikiPathways и др. (Kanehisa *et al.*, 2006; Croft *et al.*, 2011; Caspi *et al.*, 2012; Kelder *et al.*, 2012). К этому же классу относится разработанная в ИЦиГ СО РАН в 1998 г. система GeneNet, в которой все компоненты генных сетей делятся на два больших класса: 1) элементарные структуры (гены, РНК, белки, метаболиты) и 2) элементарные события (реакции и регуляторные события), позволяющая экспертам вводить в базу данных GeneNet информацию о генных сетях как с использованием графических образов элементарных структур и событий, так и в текстовой форме (Колчанов *et al.*, 2000).

Стремительный рост объемов экспериментальных данных и, как следствие, аккумулирующих их баз данных, научных публикаций, патентов явился предпосылкой для создания методов реконструкции генных сетей на основе автоматического анализа тестов научных публикаций и баз данных (Rzhetsky *et al.*, 2004; Cooper *et al.*, 2005; Harmston *et al.*, 2010). Одна из систем построения таких сетей на основе автоматического анализа текстов, названная AND System (Associative Network Discovery System), была создана в ИЦиГ СО РАН (Demchenkova *et al.*, 2011). Система AND System может быть настроена на конкретную область биологических знаний. Настройка осуществляется путем построения



специфических для нее словарей объектов, включая гены, белки, малые молекулы, типы клеток тканей и органов, метаболические пути и пр. Непрерывный рост как объемов, так и типов экспериментальных данных потребовал разработки методов интеграции гетерогенной информации, полученной в результате экспрессионного и ChIP-seq анализа, исследования ДНК-белковых, белок-белковых взаимодействий, а также исследования протеомов, метаболомов, проведенного на уровне клеток, тканей, организмов в различных экспериментальных условиях (Mungall *et al.*, 2007; Mi, Thomas, 2009; Zamboni *et al.*, 2012). Одним из основных этапов семантической интеграции такого типа данных является построение онтологий. Примерами широко используемых онтологий служат онтологии BioPAX и GO (Gene Ontology Consortium ..., 2006; Demir *et al.*, 2010).

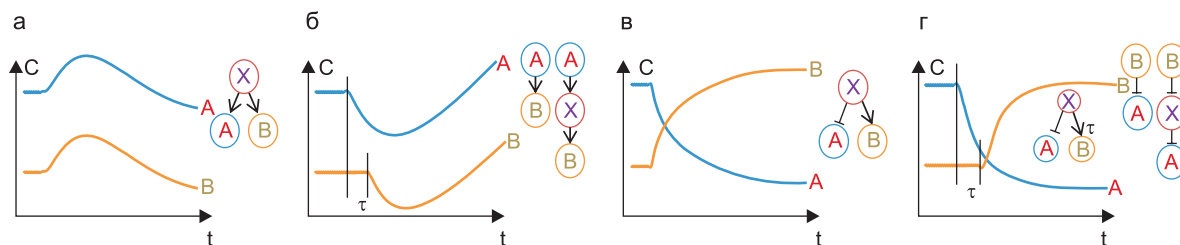
Еще одно направление в реконструкции генных сетей основано на использовании данных о динамике экспрессии больших массивов генов, полученных с помощью ДНК-чипов или метода RNA-seq, который позволяет секвенировать транскрибируемые участки генома. На основе серии таких экспериментов в различных временных точках можно с помощью методов биоинформатики реконструировать сеть межгенных взаимодействий, отвечающих за наблюдаемую динамику всего массива изучаемых генов. Качественно идею этого подхода можно представить на простых примерах (рис. 4). Если два гена (A и B) имеют очень похожие профили экспрессии, как это показано для первого случая (рис. 4, а), можно предположить наличие общего регулятора их экспрессии. Отметим, что это только одна из возможных гипотез. Если профиль экспрессии гена B повторяет профиль

экспрессии гена A с неким временным запаздыванием  $\tau$  (рис. 4, б), это может означать, что ген B регулируется геном A. Если профиль экспрессии гена A возрастает, а профиль экспрессии гена B падает (рис. 4, в), это может означать, что они находятся во взаимно антагонистических регуляторных отношениях. Профиль экспрессии генов на рис. 4, г может быть следствием целого ряда разнообразных процессов, позволяющих построить множество гипотез.

Анализ такого рода экспрессионных данных осуществляется с привлечением различных методов многомерной статистики, результатом чего является построение моделей межгенных взаимодействий, отвечающих за динамику всего массива изучаемых генов. Даже из этих простых примеров становится ясно, что анализ динамических механизмов регуляции экспрессии генов в клетке является одной из сложнейших задач системной биологии. Конечной целью этого направления исследований является построение цельной картины биологических процессов, протекающих на всех иерархических уровнях организма, что значительно сложнее, чем просто сумма отдельных частей. Решение этой задачи может быть осуществлено только с привлечением самых современных методов молекулярной биологии и генетики, а также и мощного аппарата биоинформатики и компьютерной техники.

## МАЛЫЕ ГЕННЫЕ СЕТИ И ТЕОРИЯ ИХ ДИНАМИКИ

Для понимания фундаментальных особенностей динамики регуляторных генных сетей (ГС) очень ценную информацию дают компьютерный анализ и моделирование генных сетей малой размерности. Теория динамики таких



**Рис. 4.** Примеры, описывающие потенциально возможные особенности межгенных взаимодействий, отвечающих за динамику экспрессии генов.

На оси OY представлен уровень экспрессии гена (в условных единицах), на оси OX – время (в условных единицах).

генных сетей разрабатывается В.А. Лихошваем с коллегами в ИЦиГ СО РАН и ИМ СО РАН (Колчанов и др., 2001; Лихошвай и др., 2001; Лихошвай и др., 2003; Демиденко и др., 2004, 2009; Лихошвай и др., 2004; Фадеев и др., 2004; Голубовский и др., 2010; Demidenko *et al.*, 2010; Лихошвай, 2013).

В данной теории элементарными единицами ГС являются генетические элементы  $G$ . Генетический элемент представляет собой пару  $G = (g, p)$ , состоящую из гена  $g$  и целевого (конечного) продукта  $p$ , синтезируемого с него (рис. 5, а). Активность генетического элемента  $G$  характеризуется скоростью синтеза  $V$  целевого продукта  $p$  и скоростью его деградации/диссипации  $D$ . Целевым продуктом может быть как молекула РНК, так и белок. Если изменение концентрации продукта  $p_1$  снижает/увеличивает скорость изменения концентрации продукта  $p_2$ , то полагаем, что между генетическими элементами  $G_1$  и  $G_2$  существует регуляторная (ориентированная) связь  $\sigma = \sigma(G_1, G_2)$ . Механизмы осуществления регуляторных связей могут быть самыми различными. На рис. 5, б показан пример реализации регуляторной связи посредством влияния гомомультимера белка  $p_1$  на скорость синтеза продукта  $p_2$ .

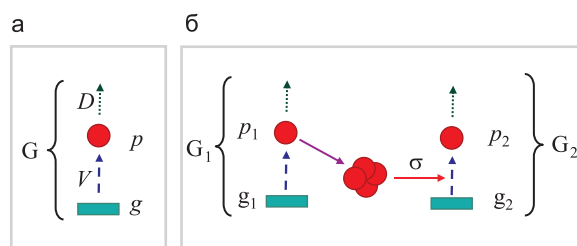
Скорость синтеза целевого продукта  $p$  описывается уравнением общего вида:

$$\frac{dp}{dt} = V(\bar{p} \in B) - D(\bar{p} \in C), \quad (1)$$

где  $V$  и  $D$  – функции регуляции активности синтеза целевого продукта  $p$  и скорости его деградации/диссипации;  $B$  и  $C$  – множества целевых продуктов, участвующих в регуляции процессов синтеза и деградации/диссипации соответственно. Данные уравнения также могут содержать запаздывающие аргументы, учитывающие время, затрачиваемое на синтез целевых продуктов, модификацию и доставку в компартмент функционирования.

Основной задачей теории генных сетей является выявление причинно-следственных связей между структурно-функциональной организацией генных сетей и их динамическими свойствами. При этом под структурно-функциональной организацией ГС понимается совокупность всех регуляторных связей и молекулярно-генетических механизмов, их осуществляющих, а под динамическими свой-

**Динамический портрет генной сети** – совокупность траекторий динамики изменения концентраций синтезируемых веществ, реализуемых в некоторой заданной параметрической области из некоторой заданной области начальных данных.



**Рис. 5.** Генетические элементы и регуляторные связи ГС.

$G, G_1, G_2$  – генетические элементы,  $\sigma$  – регуляторная связь,  $V$  – синтез целевого продукта,  $D$  – деградация/диссипация целевого продукта.

ствами понимаются характеристики траекторий концентраций продуктов, которые могут реализовываться в данной системе при определенных значениях параметров и начальных данных. Часто изменение параметров или начальных данных ведет к изменению качественных характеристик динамического поведения системы. Например, при одних условиях концентрация всех продуктов со временем стремится к некоторому постоянному значению – стационару, а при других – наблюдаются незатухающие колебания. Поэтому важно знать динамические свойства ГС не просто для отдельных наборов значений параметров и начальных данных, но и для некоторых областей значений параметров и начальных значений. В этом случае уместно говорить о динамическом портрете ГС.

В общем случае системы уравнений, описывающие ГС, имеют настолько общий вид, что их полное изучение вряд ли возможно. Поэтому в теории генных сетей выделяются более узкие классы, которые, с одной стороны, допускают более полное изучение, а с другой – позволяют выявить новые биологически значимые закономерности.

В частности, изучаются генные сети с отрицательными механизмами регуляции, описываемые системами уравнений:

$$\frac{dp_i(t)}{dt} = \frac{\alpha_i}{1 + \sum_{j \in B_i} \left[ \frac{p_j(t - \tau_i)}{K_{i,j}} \right]^{\gamma_{i,j}}} - \beta_i p_i, \quad i = 1, \dots, n, \quad (2)$$

здесь  $p_i$  – концентрация белка, синтезируемого  $i$ -м генетическим элементом;  $\alpha_i$  – базисная скорость синтеза  $i$ -го белка в отсутствие регуляторов;  $\beta_i$  – константа скорости деградации  $i$ -го белка;  $K_{i,j}$  – константа ингибирования скорости синтеза белка  $p_i$  белком  $p_j$ ;  $\gamma_{ij}$  – константа, характеризующая степень нелинейности механизма репрессии синтеза белка  $p_i$  белком  $p_j$ ;  $n$  – число генетических элементов  $G_i$ ;  $B_i \subseteq \{1, \dots, n\}$  – множество номеров белков, являющихся регуляторами активности синтеза белка  $p_j$ ;  $t$  – текущее время;  $\tau_i$  – суммарное время, необходимое для синтеза, модификации и транспорта конечного продукта  $p_i$  в компартмент его функционирования.

В них (а) регулируемыми являются только стадии инициации синтеза конечных продуктов

(для простоты – белков), стадии деградации/диссипации не регулируются, но каждый продукт имеет конечное время функциональной жизни в пространственном компартменте функционирования генной сети; (б) функциональными молекулами (белками-регуляторами) являются гомомультимеры; (в) белки-регуляторы конкурируют между собой в процессе регуляции активности экспрессии каждого конкретного генетического элемента.

На рис. 6, а представлена генная сеть, содержащая четыре генетических элемента. Активность каждого генетического элемента регулируется двумя белками-репрессорами (красные стрелки). Для этой сети модель без учета стадий промежуточного синтеза, созревания и транспорта целевых продуктов ( $\tau_i = 0$ ) имеет вид:

$$\begin{cases} \frac{dp_1}{dt} = \alpha_1 \left/ \left[ 1 + \left( \frac{p_3}{K_{1,3}} \right)^{\gamma_{1,3}} + \left( \frac{p_4}{K_{1,4}} \right)^{\gamma_{1,4}} \right] \right. - \beta_1 p_1, & \frac{dp_2}{dt} = \alpha_2 \left/ \left[ 1 + \left( \frac{p_1}{K_{2,1}} \right)^{\gamma_{2,3}} + \left( \frac{p_4}{K_{2,4}} \right)^{\gamma_{2,4}} \right] \right. - \beta_2 p_2, \\ \frac{dp_3}{dt} = \alpha_3 \left/ \left[ 1 + \left( \frac{p_2}{K_{3,2}} \right)^{\gamma_{3,3}} + \left( \frac{p_4}{K_{3,4}} \right)^{\gamma_{3,4}} \right] \right. - \beta_3 p_3, & \frac{dp_4}{dt} = \alpha_4 \left/ \left[ 1 + \left( \frac{p_2}{K_{4,2}} \right)^{\gamma_{4,2}} + \left( \frac{p_3}{K_{4,3}} \right)^{\gamma_{4,3}} \right] \right. - \beta_4 p_4. \end{cases} \quad (3)$$

Для нее при  $K_{i,j} = 1$ ,  $\beta_i = 1$ ,  $\gamma_{i,j} = 4$ ,  $\alpha_1 = \alpha_2 = \alpha_3 = 5$ ,  $\alpha_4 = 10$  численно выявляется единственный стационарный режим, к которому со временем стремятся концентрации продуктов  $p_i$  (рис. 6, а). С биологической точки зрения это означает, что соответствующая генетическая система имеет только один устойчивый режим

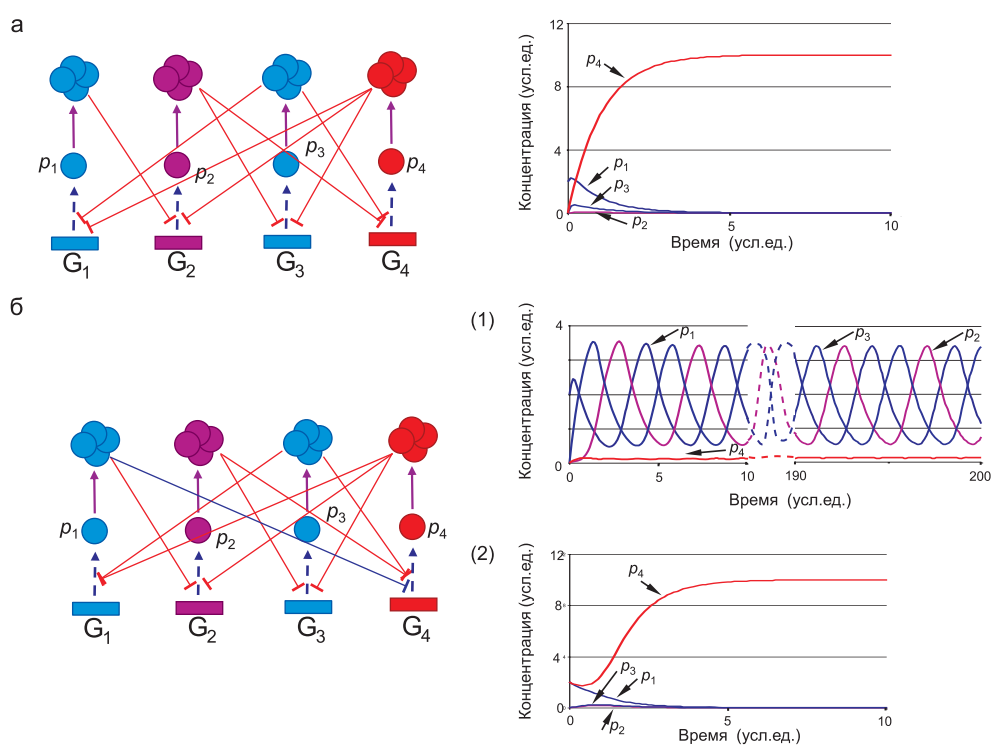
функционирования: четвертый генетический элемент активно синтезирует белок-репрессор, который подавляет синтез других белков.

На рис. 6, б показана вышерассмотренная генная сеть с дополнительной регуляторной связью (синяя стрелка). В этом случае система уравнений принимает вид:

$$\begin{cases} \frac{dp_1}{dt} = \alpha_1 \left/ \left[ 1 + \left( \frac{p_3}{K_{1,3}} \right)^{\gamma_{1,3}} + \left( \frac{p_4}{K_{1,4}} \right)^{\gamma_{1,4}} \right] \right. - \beta_1 p_1, & \frac{dp_2}{dt} = \alpha_2 \left/ \left[ 1 + \left( \frac{p_1}{K_{2,1}} \right)^{\gamma_{2,3}} + \left( \frac{p_4}{K_{2,4}} \right)^{\gamma_{2,4}} \right] \right. - \beta_2 p_2, \\ \frac{dp_3}{dt} = \alpha_3 \left/ \left[ 1 + \left( \frac{p_2}{K_{3,2}} \right)^{\gamma_{3,3}} + \left( \frac{p_4}{K_{3,4}} \right)^{\gamma_{3,4}} \right] \right. - \beta_3 p_3, & \frac{dp_4}{dt} = \alpha_4 \left/ \left[ 1 + \left( \frac{p_1}{K_{4,1}} \right)^{\gamma_{4,3}} + \left( \frac{p_2}{K_{4,2}} \right)^{\gamma_{4,2}} + \left( \frac{p_3}{K_{4,3}} \right)^{\gamma_{4,3}} \right] \right. - \beta_4 p_4. \end{cases} \quad (4)$$

Здесь член уравнения выделен и соответствует добавленной регуляторной связи. Ее добавление и задание значений  $K_{4,1} = 1$ ,  $\gamma_{4,1} = 4$  приводят к радикальному изменению динамики поведения системы. В этом случае для соответствующей генной сети прогнозируются два качественно различ-

ных устойчивых состояния: стационарный режим, который подобен стационару, описанному выше (рис. 6, б (2)); циклический режим, при котором концентрации белков  $p_1$ ,  $p_2$  и  $p_3$  претерпевают значительные по амплитуде периодические изменения, а концентрация белка  $p_4$  колеблется с малой амплитудой, всегда



**Рис. 6.** Пример качественного изменения динамики поведения малой генной сети в результате добавления одной регуляторной связи.

На панелях а и б слева представлена схема взаимодействия объектов в генной сети, справа – динамическое поведение сети во времени.

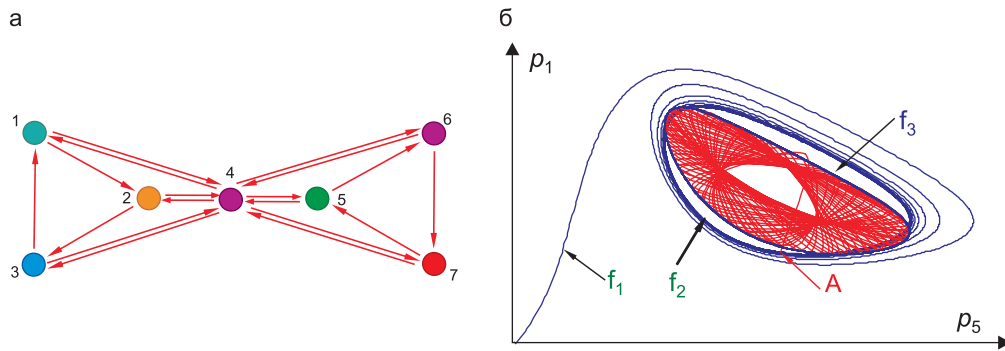
оставаясь много ниже значений, необходимых для его функционирования в качестве репрессора (рис. 6, б (1)). Здесь следует подчеркнуть, что рассмотренная ситуация весьма реалистична, так как исчезновение существующей или появление новой регуляторной связи может быть результатом одиночной аминокислотной замены в регуляторном белке или нуклеотидной замены в ДНК-сайте его связывания.

Данный пример интересен также тем, что из него прогнозируется, что генная сеть (рис. 6, б) обладает эпигенетической памятью – зависимостью ее динамики от начальных концентраций белков в клетке, которые могут, например, задаваться ее предыдущим делением.

Анализ показывает, что даже простейшие генные сети могут иметь очень большое разнообразие режимов функционирования. В качестве примера на рис. 7, а показан граф малой генной сети, содержащей 7 генетических элементов и 12 регуляторных взаимодействий между ними. Вид соответствующей системы не

приводим, так как ее легко выписать из системы (2) и структурного графа, представленного на рис. 7, а. На рис. 7, б показан фрагмент динамического портрета генной сети, прогнозируемого на основе численного анализа модели.

В начальный момент семимерная траектория концентраций продуктов генной сети (кривая  $f_1$ ) стартует в гиперпространстве  $p_1 = p_5, p_2 = p_6, p_3 = p_7$  из точки  $p_1 = p_5 = 1, p_2 = p_3 = p_4 = p_6 = p_7 = 0$  и притягивается к предельному циклу  $f_2$ , лежащему в данном многообразии. В точке А на генную сеть оказывается слабое внешнее воздействие, выводящее ее за пределы данного гиперпространства, после чего концентрационная траектория притягивается к новому стабильному циклу (кривая  $f_3$ ). Для данной генной сети численно выявляются три таких стабильных цикла и одно устойчивое стационарное состояние. Имеются также пять дополнительных циклов, лежащих в различных многообразиях. Возможно, имеются и другие замкнутые траектории. Из рассмотрения этой модели можно сделать несколько выводов.



**Рис. 7.** Сложное динамическое поведение малой генной сети.

а – структурный граф малой ГС: вершины – генетические элементы, стрелки – регуляторные связи отрицательного типа действия; б – фазовый портрет эволюции малой ГС: в нулевой момент времени траектория стартует в гиперпространстве  $p_1 = p_5, p_2 = p_6, p_3 = p_7$  (кривая  $f_1$ ) и притягивается к визуальному циклу, лежащему на данном аттракторе (кривая  $f_2$ ); в точке А на систему оказывается слабое внешнее воздействие, выводящее ее за пределы данного гиперпространства (красная кривая); после стимула А система притягивается к новому визуальному циклическому аттрактору (кривая  $f_3$ ). Расчеты проведены при следующих значениях параметров:  $K_{i,j} = \beta_i = 1, \gamma_{i,j} = 4, \alpha_i = 5$ .

1. Здесь имеет место эффект эпигенетической памяти системы – зависимость ее динамики от начальных концентраций белков в клетке. Впервые, еще в начале 70-х годов прошлого века (т. е. еще до начала эпохи эпигенетики), это показал методами математического моделирования российский ученый Р.Н. Чураев, который работал в те годы в ИЦиГ СО РАН (Чураев, 2010).

2. Эти результаты показывают, что биологическая сложность кодируется, прежде всего, не на уровне геномов, а на уровне генных сетей, которые даже при малом количестве генетических элементов могут обеспечивать огромное разнообразие режимов функционирования.

3. Следует иметь в виду, что на протяжении большей части времени генная сеть пребывает в том или ином устойчивом состоянии или близко к нему, которых хотя и много, но все же конечное количество. А суть функционирования любой генной сети заключается в переходах между этими устойчивыми состояниями, из которых наибольшее значение имеют два типа – стабильные стационарные состояния и стабильные циклы. Именно эти состояния оцениваются естественным отбором.

На рис. 8 показан авторепрессилиатор – сверхмалая генная сеть, состоящая всего из одного генетического элемента, обеспечивающего по механизму отрицательной обратной связи регуляцию экспрессии гена  $g$ , кодирующего белок-авторепрессор  $p$ . Модели таких систем

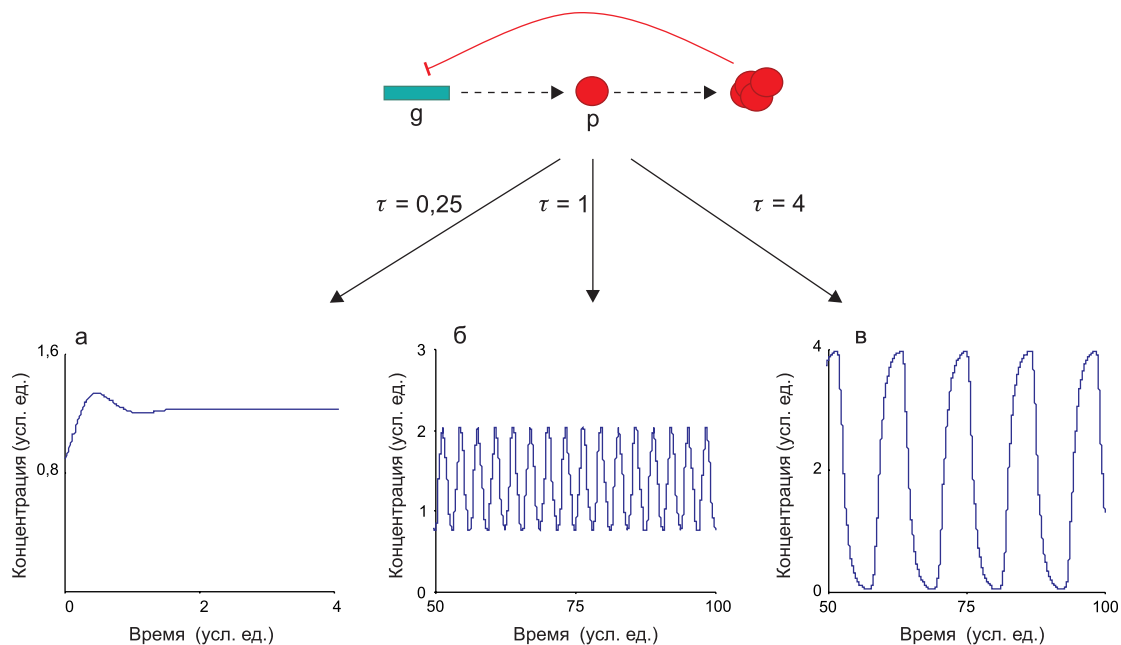
изучаются уже давно и различными математическими методами. Модель (2), примененная к авторепрессилиатору, преобразуется к следующему виду:

$$\frac{dp(t)}{dt} = \frac{\alpha}{1 + \left[ \frac{p(t-\tau)}{K} \right]^\gamma} - \beta p. \quad (5)$$

Если предполагать, что процессы синтеза белков протекают быстро, то  $\tau$  мало и с течением времени в системе устанавливается постоянный уровень репрессора (рис. 8, а). Если же последовательность процессов транскрипции, трансляции, транспорта и модификации молекул занимает достаточно времени, то в системе устанавливается устойчивая циклическая динамика изменения уровня белка авторепрессора  $p$  (рис. 8, б, в). В этом случае период и амплитуда цикла зависят от параметров модели (рис. 8, б, в).

В качестве примера природной генной сети малого размера рассмотрим генную сеть регуляции циркадного ритма (рис. 9). Такие генные сети функционируют практически в каждой клетке живого организма млекопитающих и синхронизируются центральным циркадным осциллятором, локализованным у млекопитающих в супрахиазматических ядрах гипоталамуса.

Минимальная (коровая) генная сеть циркадного осциллятора млекопитающих основана на регуляции транскрипции небольшой группы генов по механизму отрицательной обратной



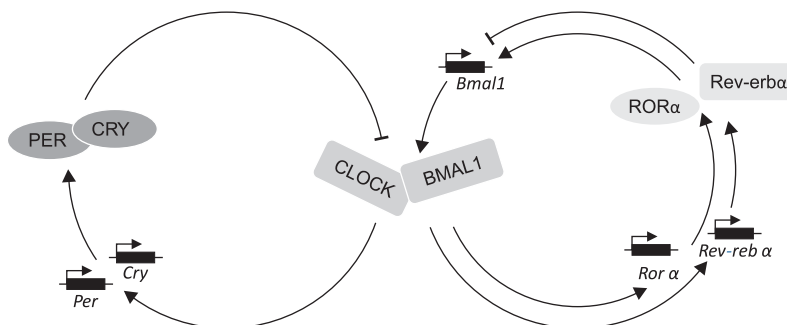
**Рис. 8.** Различные режимы функционирования авторепрессилатора.

а – стационар; б – цикл с малыми периодом и амплитудой; в – цикл с большими периодом и амплитудой. Расчеты проведены по модели (5), во всех расчетах полагали  $\alpha = 4, \gamma = 4, \beta = 1$ , а в качестве начальной функции использовали постоянную функцию  $p(t) = 0,9, -\tau \leq t \leq 0$ .

**Авторепрессилатор** – генетический элемент, обеспечивающий по механизму отрицательной обратной связи регуляцию экспрессии гена, кодирующего белок-авторепрессор.

связи. Гетеродимерный транскрипционный фактор CLOCK/BMAL1 активирует транскрипцию генов *Per* и *Cry*, а димер *Per/Cry* за счет белок-белковых взаимодействий подавляет активность CLOCK/BMAL1. Это в свою очередь приводит к замыканию регуляторного цикла за счет снижения уровня транскрипции генов *Per*

и *Cry*, обеспечивая формирование циркадного ритма. Стабильность этого цикла поддерживается двумя дополнительными регуляторными контурами. В положительном регуляторном контуре CLOCK/BMAL1 активирует транскрипцию гена *Ror α*, а фактор *Ror α* активирует транскрипцию гена *Bmal1*. В отрицательном регуляторном контуре CLOCK/BMAL1 активирует транскрипцию гена *Rev-erba*, кодирующего негативный регулятор *Rev-erba*, который подавляет транскрипцию гена *Bmal1*. При этом белки *Ror α* и *Rev-erba* конкурируют за связывание с сайтом в регуляторных районах гена *Bmal1*. Эти две дополнительные петли обеспечивают



**Рис. 9.** Минимальная генная сеть циркадного осциллятора млекопитающих.

устойчивое функционирование циркадного осциллятора с периодом, близким к 24 ч.

## РЕАЛЬНАЯ СЛОЖНОСТЬ ГЕННЫХ СЕТЕЙ

### Генная сеть регуляции уровня холестерина

Рассмотрим более детально механизмы функционирования генных сетей и их реальную сложность на примере генной сети регуляции внутриклеточного уровня холестерина в клетках человека и животных.

Холестерин – незаменимая структурная компонента клеточных мембран и наружного слоя липопротеинов плазмы крови, предшественник целого ряда других стероидов, а именно: кортикостероидов, половых гормонов, желчных кислот и витамина D. Отклонения от нормального уровня холестерина приводят к тяжелым патологиям, включая атеросклероз сосудов головного мозга, сердечной мышцы и других органов.

У человека холестерин поступает в организм с пищей, а также синтезируется в клетках многих тканей *de novo* из предшественника ацетил-СоА. Генная сеть регуляции внутриклеточного уровня холестерина включает несколько регуляторных контуров, функционирующих при участии транскрипционных факторов семейства SREBP (Sterol Regulatory Element-Binding Proteins). У человека белки семейства SREBP (SREBP1a, SREBP1c, SREBP2) кодируются двумя генами, *SREBF1* и *SREBF2*. Активность транскрипционных факторов семейства SREBP регулируется в обратной зависимости от уровня холестерина в клетке: чем выше уровень холестерина, тем ниже активность факторов SREBP.

У человека активность гена *SREBF2* контролируется регуляторным **контуром с положительной обратной связью** (рис. 10, а): транскрипция гена *SREBF2* активируется фактором SREBP2 (авторегуляция) (Fernández-Hernando, Moore, 2011).

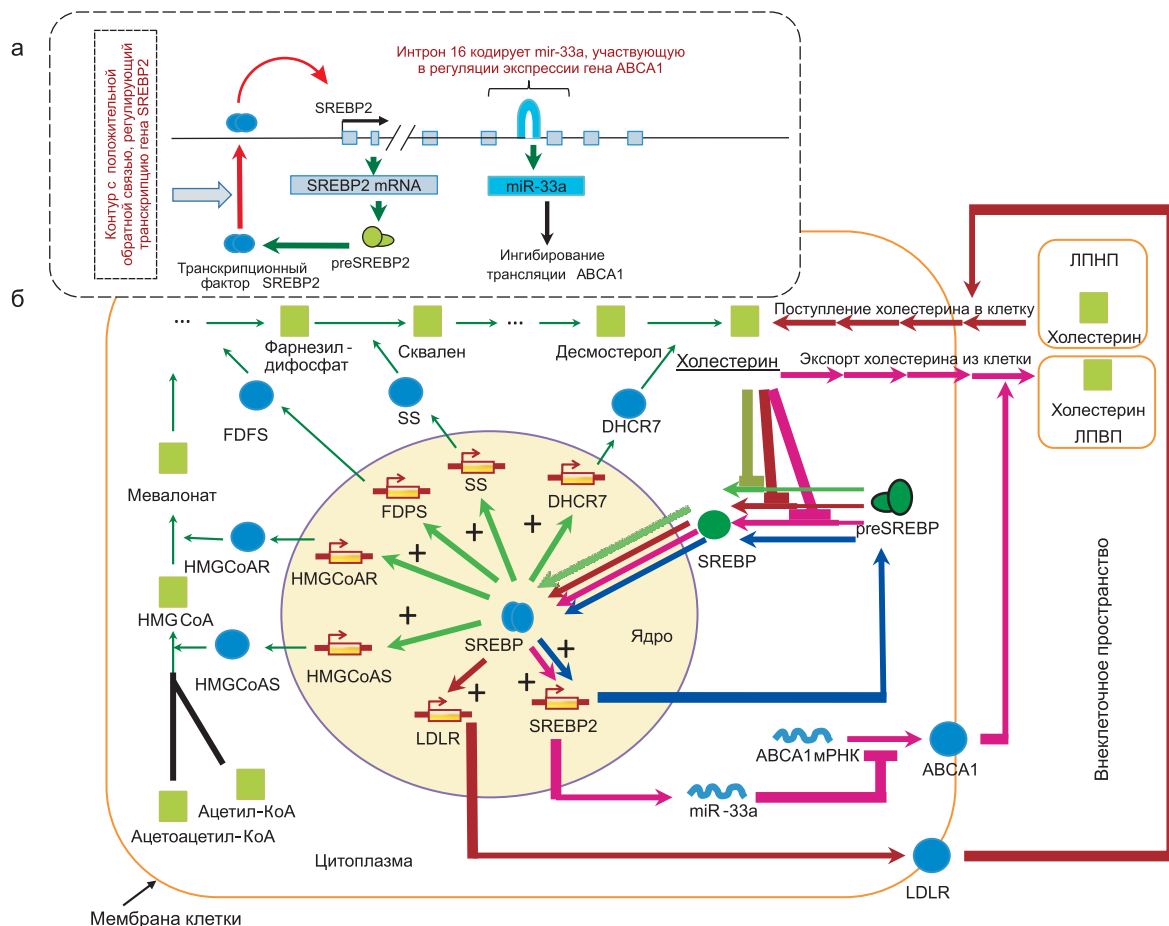
Генная сеть включает также **контур** с отрицательной обратной связью, регулирующие уровень холестерина.

**Центральными элементами первых двух контуров с отрицательной обратной связью** являются транскрипционные факторы семейства

SREBP (рис. 10, б), регулирующие активность целой кассеты генов, включая гены ферментов мевалонатного пути биосинтеза холестерина (*HMGCoAS*, *HMGCoAR*, *FDFS*, *SS*, *DHCR7* и др.), а также рецептора липопротеинов низкой плотности (*LDLR*). В пределах **первого контура** по механизму обратной связи регулируется активность генов мевалонатного пути биосинтеза холестерина: чем выше концентрация холестерина, тем ниже активность транскрипционных факторов SREBP и тем ниже уровень транскрипции ферментов *HMGCoAS*, *HMGCoAR*, *FDFS*, *SS*, *DHCR7*. В пределах **второго контура** по аналогичному механизму обратной связи регулируется транскрипция гена *LDLR*, кодирующего рецептор LDL, обеспечивающий транспорт липопротеинов низкой плотности в клетку, вследствие чего интенсивность поступления холестерина в цитоплазму снижается (Игнатьева и др., 1997; Меркулова и др., 2013).

**Третий контур с отрицательной обратной связью**, регулирующий уровень холестерина в клетке, был выявлен недавно, когда было обнаружено, что район 16-го интрона гена *SREBF2* кодирует микроРНК (Fernández-Hernando, Moore, 2011). Эта микроРНК (miR-33a) экспрессируется в составе первичного транскрипта гена *SREBF2* и подавляет трансляцию мРНК, кодирующей белок ABCA1. Белок ABCA1 является мембранным белком, осуществляющим перенос холестерина из цитоплазмы во внеклеточное пространство, где этот метаболит захватывается частицами липопротеинов высокой плотности. Регуляция уровня холестерина в пределах третьего регуляторного контура с отрицательной обратной связью осуществляется следующим образом. При низком уровне холестерина активность транскрипционных факторов семейства SREBP повышается. Далее белки SREBP активируют экспрессию гена *SREBF2*. МикроРНК (miR-33a), экспрессируемая в составе первичного транскрипта гена *SREBF2*, ингибирует трансляцию белка ABCA1, осуществляющего экспорт холестерина из клетки. Замедление экспорта холестерина приводит к нормализации внутриклеточного уровня холестерина.

Помимо контуров с обратной связью, функционирующих на уровне клетки, существуют дополнительные механизмы активации транс-



**Рис. 10.** Регуляторные контуры с обратной связью, функционирующие в генной сети, контролирующей уровень холестерина в клетках человека.

а – экспрессия микроРНК в составе первичного транскрипта гена *SREBF2* и контур с положительной обратной связью, регулирующий экспрессию *SREBF2*; б – четыре регуляторных контура (обозначены стрелками различных цветов), функционирующих с участием транскрипционных факторов семейства SREBP.

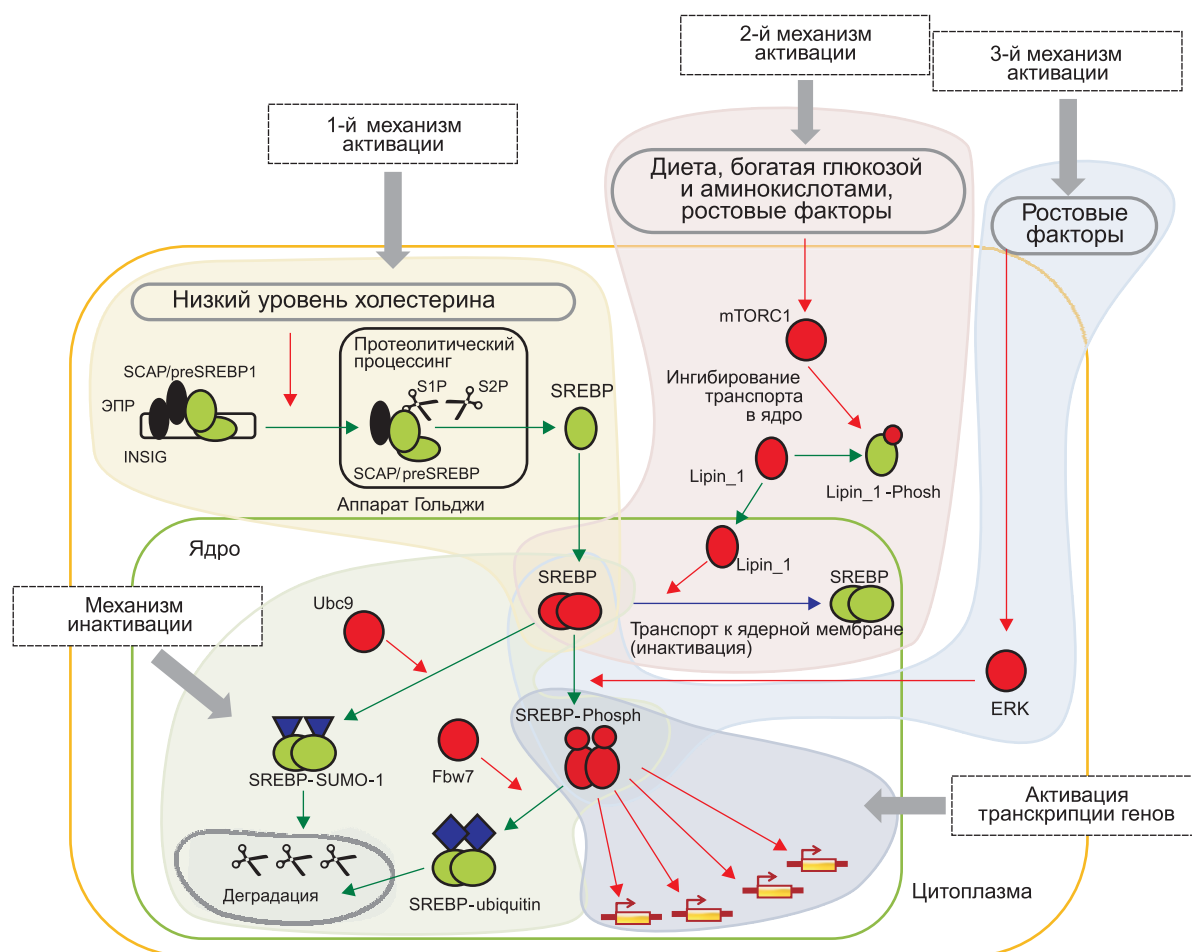
крипционных факторов семейства SREBP, обеспечивающие настройку активности белков SREBP в соответствии с потребностями многоклеточного организма (рис. 11).

**Первый механизм активации** факторов семейства SREBP – это протеолитический процессинг неактивного предшественника preSREBP в активную форму SREBP. Как уже упоминалось выше, этот процесс запускается при низком уровне холестерина за счет изменения конформации якорного белка INSIG, удерживающего комплекс белков SCAP/preSREBP на мембране эндоплазматического ретикулума. В результате связь комплекса белков SCAP/preSREBP с мембраной нарушается и preSREBP вместе с белком SCAP перемещается в аппарат Гольджи, где под действием протеаз S1P и S2P происходит

расщепление preSREBP и образуются активные факторы SREBP (Gimpl *et al.*, 2002).

**Второй механизм активации** факторов SREBP запускается под действием ростовых факторов и диеты, богатой аминокислотами и глюкозой. Как ростовые факторы, так и полноценная диета активируют киназу mTOR, которая фосфорилирует белок lipin1. Фосфорилированная форма белка lipin1 не может проникать в ядро, поэтому концентрация белка lipin1 в ядре снижается. В ядре клетки белок lipin1 подавляет активность факторов SREBP за счет того, что lipin1 способствует транспорту транскрипционных факторов SREBP из активных центров ядра к ядерной мембране, где SREBP инактивируется, связываясь с белком lamin A. Таким образом, второй механизм активации





**Рис. 11.** Пути регуляции активности транскрипционных факторов семейства SREBP человека и животных внеклеточными и внутриклеточными сигналами.

факторов SREBP реализуется через ингибирование транспорта в ядро инактиваторного белка lipin 1 (Peterson *et al.*, 2011).

**Третий механизм** активации факторов SREBP опосредуется ERK-киназами. Этот механизм запускается под действием ростовых факторов (например insulin-like growth factor-1), активирующих ERK-киназы (ERK1 и ERK2). ERK-киназы осуществляют фосфорилирование факторов SREBP, что повышает их ДНК-связывающую и транскрипционную активность (Arito *et al.*, 2008).

Наряду с путями активации факторов SREBP в клетке постоянно осуществляются и **процессы инактивации**, запускаемые посттрансляционными модификациями. Известно, что сумоилирование может осуществляться под действием SUMO-1-конъюгирующего фермента Ubc9 (Arito *et al.*, 2008), а убиквитинирование

запускается убиквитин-лигазой Fbw7 (Sundqvist *et al.*, 2005).

Таким образом, итоговый уровень активности SREBP контролируется сложно организованной генной сетью, интегрирующей все описанные выше процессы и включающей многие десятки генов и белков. Очевидно, что данное описание генной сети, составленное на основании доступных к настоящему времени экспериментальных данных, еще далеко от полного представления о реальной сложности процесса регуляции уровня холестерина в клетках и тканях организма, в контроле которого могут быть задействованы продукты многих сотен генов.

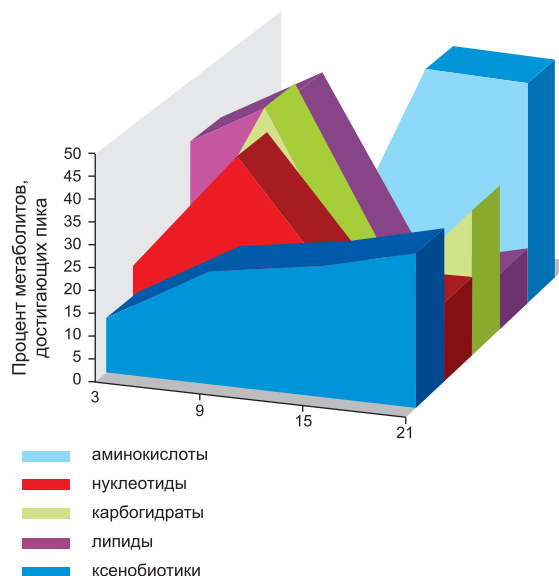
### Взаимодействие генных сетей

Нормальное функционирование живого организма предполагает координацию и син-

хронизацию всех процессов на всех уровнях его иерархии. Одним из ярких примеров такой координации является настройка активности генных сетей метаболизма генными сетями регуляции циркадного ритма. Генная сеть регуляции циркадного ритма управляет временной разверткой всех функций организма (молекулярных, клеточных, физиологических и др.), контролируя на уровне транскрипции значительную часть генома через транскрипционный фактор CLOCK/Bmal1. Следует отметить, что среди мишеней CLOCK/Bmal1 представлены различные функциональные группы генов. Так, например, в печени мыши наиболее обогащены сайтами связывания CLOCK/Bmal1 группы генов липидного и углеводного метаболизма, а также регуляторы транскрипции, в частности ядерные рецепторы (Rey *et al.*, 2011). Циркадные часы могут контролировать периферические системы как прямо (через CLOCK/Bmal1), так и опосредованно, через активируемые им регуляторы транскрипции. На рис. 12 в интегрированном виде представлены результаты метаболомного анализа печени мыши, демонстрирующие наличие циркадной ритмики метаболитов, участников путей обмена аминокислот, нуклеотидов, углеводов, липидов и ксенобиотиков. Эта ритмика является следствием согласованной работы транскриптома и протеома и определяет состояние метаболического гомеостаза (Eckel-Mahan *et al.*, 2012).

Можно отметить, что максимум метаболитов путей обмена ксенобиотиков и аминокислот приходится на вторую половину суток, в то время как нуклеотидов, углеводов и липидов – на первую.

Поскольку существует контроль метаболических процессов со стороны циркадных часов, естественно предположить, что функциональные



**Рис. 12.** Циркадная ритмика метаболитов, принадлежащих различным путям обмена веществ в печени мыши.

По оси X – время суток в часах (модифицировано по: (Eckel-Mahan *et al.*, 2012. P. 5541–5546)).

и структурные нарушения элементов циркадного осциллятора могут приводить к нарушениям метаболизма и развитию различных патологических состояний. Это предположение нашло частичное подтверждение в ряде эпидемиологических исследований. Некоторые примеры однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) гена *CLOCK* человека и ассоциированных с ними фенотипов или патологий приведены в табл. 1.

## ЭВОЛЮЦИЯ ГЕННЫХ СЕТЕЙ

В ходе микроэволюции популяций человека отбор неоднократно приводил к возникновению комплексов адаптивных полиморфизмов,

**Таблица 1**

Ассоциации некоторых ОНП гена *CLOCK* человека с метаболическими нарушениями

ОНП	Патология или фенотип
rs1801260; T > C	Ожирение (Garaulet <i>et al.</i> , 2010) Устойчивость к воздействиям, направленным на потерю веса (Garaulet <i>et al.</i> , 2010) Предрасположенность к высокому индексу массы тела (Monteleone <i>et al.</i> , 2008) Изменение пищевого поведения со сдвигом на вечернее время (Garaulet <i>et al.</i> , 2011) Высокое потребление жиров (Garaulet <i>et al.</i> , 2011)
rs11932595; A > G	Стеатоз (Sookoian <i>et al.</i> , 2007)
rs6850524; C > G	Высокий индекс массы тела или ожирение (Sookoian <i>et al.</i> , 2008)

оптимизировавших функцию генных сетей под конкретные условия жизнеобитания. Оптимизация затрагивала как особенности экспрессии отдельных генов, так и другие аспекты организации и функции генных сетей. Такого рода адаптивные комплексы являлись относительно стабильными единицами наследственной памяти, устойчиво передавались в ряду поколений и обеспечивали формирование оптимальных для данной среды фенотипических характеристик организмов. Простейший вариант адаптивного комплекса – гаплотип.

Проведенный нами ранее анализ «мутационного портрета» генной сети, контролирующей гомеостаз холестерина в клетках животных, выявил интересную особенность генной сети, контролируемой контурами с отрицательной обратной связью (Ананько и др., 2008). Сеть гомеостатирует любые флуктуации: как изменения параметров, вызванные физиологическими воздействиями на клетку, так и их отклонения, вызванные мутациями генов. Исследование влияния мутаций в математических моделях показало, что мутационные повреждения многих генов либо практически не влияют на уровень холестерина в клетке, либо изменяют этот показатель в незначительной степени. Зато есть группа генов, повреждения которых вызывают значительные отклонения уровня холестерина (от 0 до более чем 200 % относительно нормы). Доля таких генов невелика (около 15 %), однако все они выполняют очень важные регуляторные функции.

Сходная картина наблюдается и в популяциях человека: как показывает рассмотренный далее пример, наиболее существенными оказываются последствия в регуляторных звеньях генных сетей, контролирующих те или иные фенотипические признаки.

Комплексы полиморфизмов, адаптивные для популяций человека в историческом прошлом, в настоящее время могут быть источником системных заболеваний. Выявлено, что японские популяции отличаются от европейских по частотам полиморфизмов в 8 генах, регулирующих потребление, запасание и расход энергии (табл. 2). Предполагается, что этот комплекс аллельных вариантов генов фиксировался в японских популяциях в результате отбора голодом, например, за период между 501 и 1947 годами японцы пе-

**Гаплотип** – устойчивый набор полиморфных вариантов (аллелей) в пределах одного или нескольких генетических локусов, расположенных на одной хромосоме.

режили 226 периодов сильнейшего неурожая и голода (Kagawa *et al.*, 2002). Однако в настоящее время, когда потребление основных продуктов (жиров, углеводов и мяса) возросло в Японии в 10–20 раз (по сравнению с 1950 г.), этот комплекс полиморфизмов создает предпосылки к нарушению метаболизма углеводов и липидов и возникновению сопутствующих этому патологий. В частности, заболеваемость диабетом второго типа у японцев превышает таковую у жителей США в 1,5 раза.

Примечательно, что половина из 8 генов (*AGT*, *PPAR $\gamma$* , *ADRB3* и *LEPR*) кодирует белки с регуляторными функциями и большинство генов (*AGT*, *PPAR $\gamma$* , *ADRB3*, *UCP2*, *CAPN10*) экспрессируется в адипоцитах, клетках, в которых и происходит запасание энергии в виде триглицеридов.

**Ген *AGT***, кодирующий ангиотензиноген, экспрессируется как в печени, так и в адипоцитах и является предшественником регуляторного белка ангиотензина 2. Примечательно, что в адипоцитах человека и животных экспрессируются и ренин – фермент, под действием которого из ангиотензиногена образуется ангиотензин 1 и ангиотензин-превращающий белок (АПФ), который расщепляет ангиотензин 1 с образованием ангиотензина 2. Ангиотензин 2 воздействует на мышечные клетки кровеносных сосудов, что приводит к повышению кровяного давления (Goossens *et al.*, 2007). У индивидов с нормальной массой тела основная масса ангиотензиногена образуется в печени, ренин синтезируется в почках, а АПФ в основном нарабатывается в легких. В результате секреции этих белковых продуктов в кровь нарабатывается регулятор кровяного давления – ангиотензин 2. Однако, поскольку при накоплении избыточной массы тела возникает проблема сердечно-сосудистой системы, необходимо было фиксировать дополнительные механизмы, которые позволяли бы более эффективно и динамично осуществлять подрегуляцию артериального давления и сер-

Таблица 2

Гены энергетического метаболизма, для которых обнаружены различные частоты полиморфных аллелей у монголоидов и европеоидов (Kagawa *et al.*, 2002)

Ген	Продукт гена	Функция	Орган (ткань), где преимущественно наблюдается экспрессия
<i>AGT</i>	Ангиотензиноген, предшественник ангиотензина 2	Регуляция кровяного давления	Печень, адипоциты
<i>PPAR<math>\gamma</math></i>	Транскрипционный фактор PPAR $\gamma$	Регуляция дифференцировки адипоцитов и поддержание их зрелого фенотипа	Адипоцит
<i>ADRB3</i>	Бета 3 адренергический рецептор	Регуляция липолиза и термогенеза	Адипоциты
<i>LEPR</i>	Рецептор гормона лептина	Регуляция пищевого поведения	Гипоталамус
<i>UCP2</i>	Белки митохондрий UCP2 и UCP3, разобщающие окислительное фосфорилирование и синтез АТФ	Активация теплопродукции	Адипоцит
<i>UCP3</i>			Мышцы
<i>CAPN10</i>	Кальций-зависимая протеаза	Разрушение внутриклеточных белков	Экспрессируется повсеместно, включая адипоцит
<i>FABP2</i>	Транспортный белок	Внутриклеточный транспорт жирных кислот	Кишечник

дечно-сосудистой системы. И действительно, у японцев частота аллеля 235T (*AGT/M235T* полиморфизм), ассоциированного с повышенным давлением, оказалась в два раза выше, чем у европеоидов (Katsuya *et al.*, 2003).

**Ген PPAR $\gamma$**  кодирует транскрипционный фактор, который регулирует транскрипцию большого количества генов, экспрессирующихся в адипоците, и обеспечивает дифференцировку адипоцитов и поддержание их зрелого фенотипа (Кузнецова и др., 2008).

Третий ген с регуляторными функциями – *ADRB3* (adrenoceptor beta 3) – экспрессируется преимущественно в жировых клетках и кодирует катехоламинный рецептор (бета 3 адренергический рецептор). Рецептор *ADRB3* воспринимает сигналы, идущие от нервных окончаний, и вовлечен в регуляцию липолиза и термогенеза.

Четвертый ген с регуляторными функциями из числа генов, в которых фиксировались адаптивные замены, кодирует **рецептор лептина (*LEPR*)**. Рецептор лептина экспрессируется в нейронах аркуатных ядер гипоталамуса, отвечающих за восприятие чувства голода либо насыщения. *LEPR* взаимодействует с гормоном лептином, который нарабатывается жировыми

клетками, в результате чего пищевое поведение подавляется (Колчанов и др., 2005).

Рассмотренные примеры показывают, что когда возникла жесткая необходимость приспособиться к суровым условиям среды, большинство адаптивных вариантов аллелей зафиксировались не в генах метаболизма, а в небольшом количестве регуляторных звеньев (иерархически высоких точек), которые обеспечили настройку на оптимальный уровень функционирования генной сети.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при частичной поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации (НШ-5278.2012.4), Президиумов СО РАН (проект VI.61.1.2. из направления VI.61) и РАН (программа «Молекулярная и клеточная биология» – Интеграция РАН 6.6), Междисциплинарного интеграционного проекта № 136 программы Президиума СО РАН, РФФИ (проект № 11-04-01748-а), а также проекта № 14.В25.31.0033 от 28.07.2013 в рамках постановления Правительства России N 220 от 09.04.2010.

## ЛИТЕРАТУРА

- Ананько Е.А., Гунбин К.В., Суслов В.В. и др. Генные сети: описание в базах данных и моделирование // Системная Компьютерная биология / Ред. Н.А. Колчанов, С.С. Гончаров, В.А. Лихошвай, В.А. Иванисенко. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2008. С. 313–393.
- Бусыгина Т.В., Игнатъева Е.В., Осадчук А.В. Регуляция транскрипции генов, контролирующей биосинтез стероидных гормонов: описание в базе данных ES-TRRD // Усп. соврем. биологии. 2003. Т. 123. С. 364–382.
- Голубятников В.П., Голубятников И.В., Лихошвай В.А. О существовании и устойчивости циклов в пяти-мерных моделях генных сетей // Сиб. журн. вычисл. математики. 2010. Т. 13. № 4. С. 403–412.
- Демиденко Г.В., Колчанов Н.А., Лихошвай В.А. и др. Математическое моделирование регуляторных контуров генных сетей // Журн. вычисл. матем. и матем. физики. 2004. Т. 44. С. 2276–2295.
- Демиденко Г.В., Лихошвай В.А., Мудров А.В. О связи между решениями дифференциальных уравнений с запаздывающим аргументом и бесконечномерных систем дифференциальных уравнений // Дифференциальные уравнения. 2009. Т. 45. С. 34–46.
- Игнатъева Е.В., Меркулова Т.И., Вишневский О.В., Кель А.Э. Регуляция транскрипции генов липидного метаболизма: описание в базе данных TRRD // Молекуляр. биология. 1997. Т. 31. С. 684–700.
- Колчанов Н.А., Лихошвай В.А., Матушкин Ю.Г. Регуляторные контуры генетических систем: принципы организации и эволюции // Информ. вестн. ВОГиС. 2001. № 16. С. 5–10.
- Колчанов Н.А., Ананько Е.А., Колпаков Ф.А. и др. Генные сети // Молекуляр. биология. 2000. Т. 34. С. 533–544.
- Колчанов Н.А., Подколдная О.А., Игнатъева Е.В. и др. Интеграция генных сетей, контролирующей физиологические функции организма // Информ. вестн. ВОГиС. 2005. Т. 9. № 2. С. 179–198.
- Кузнецова Т.Н., Игнатъева Е.В., Мордвинов В.А. и др. Анализ структуры инсулин-зависимых регуляторных контуров зрелых адипоцитов // Усп. физиол. наук. 2008. Т. 39. № 1. С. 3–22.
- Лихошвай В.А., Матушкин Ю.Г., Фадеев С.И. Задачи теории функционирования генных сетей // Сиб. журн. индустриальной математики. 2003. Т. 6. С. 64–80.
- Лихошвай В.А., Матушкин Ю.Г., Фадеев С.И. О связи графа генной сети с качественными режимами ее функционирования // Молекуляр. биология. 2001. Т. 35. С. 1080–1088.
- Лихошвай В.А., Фадеев С.И. О сдвиге регуляторного сигнала в моделях матричного синтеза // Сиб. журн. индустриальной математики (СИБЖИМ). 2013. Т. XVI. № 1(53). С. 66–74.
- Лихошвай В.А., Фадеев С.И., Демиденко Г.В., Матушкин Ю.Г. Моделирование многостадийного синтеза вещества без ветвления уравнением с запаздывающим аргументом // Сиб. журн. индустриальной математики. 2004. Т. 7. № 1. С. 73–94.
- Меркулова Т.И., Ананько Е.А., Игнатъева Е.В., Колчанов Н.А. Регуляторные коды транскрипции геномов эукариот // Генетика. 2013. Т. 49. № 1. С. 37–54.
- Фадеев С.И., Гайнова И.А., Березин А.Ю. и др. Исследование стационарных решений в моделях генных сетей методом гомотопии // Сиб. электрон. матем. известия (SEMR). 2004. Т. 1. С. 64–75.
- Чураев Р.Н. Эпигены – наследственные единицы надгенного уровня // Экол. генетика. 2010. Т. 8. С. 17–24.
- Arito M., Horiba T., Hachimura S. *et al.* Growth factor-induced phosphorylation of sterol regulatory element-binding proteins inhibits sumoylation, thereby stimulating the expression of their target genes, low density lipoprotein uptake, and lipid synthesis // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. No. 22. P. 15224–15231.
- Caspi R., Altman T., Dreher K. *et al.* The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases // *Nucl. Acids Res.* 2012. V. 40. P. D742–D753.
- Cooper J.W., Kershenbaum A. Discovery of protein-protein interactions using a combination of linguistic, statistical and graphical information // *BMC Bioinformatics.* 2005. V. 6. P. 143.
- Croft D., O’Kelly G., Wu G. *et al.* Reactome: a database of reactions, pathways and biological processes // *Nucl. Acids Res.* 2011. V. 39. P. D691–D697.
- Demenev P.S., Ivanisenko T.V., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A. ANDVisio: A new tool for graphic T. V. visualization and analysis of literature mined associative gene networks in the ANDSystem // *In Silico Biol.* V. 11. P. 149–161.
- Demidenko G.V., Likhoshvai V.A., Melnik I.A. On properties of solutions to equations of multistage substance synthesis // *J. Anal. Appl.* 2010. V. 8. P. 47–61.
- Demir E., Cary M.P., Paley S. *et al.* The BioPAX community standard for pathway data sharing // *Nat. Biotechnol.* 2010. V. 28. P. 935–942.
- Eckel-Mahan K.L., Patel V.R., Mohney R.P. *et al.* Coordination of the transcriptome and metabolome by the circadian clock // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. P. 5541–5546.
- Fernández-Hernando C., Moore K.J. MicroRNA modulation of cholesterol homeostasis // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011. V. 31. No. 11. P. 2378–2382.
- Garaulet M., Corbalán M.D., Madrid J.A. *et al.* CLOCK gene is implicated in weight reduction in obese patients participating in a dietary programme based on the Mediterranean diet // *Int. J. Obes. (Lond).* 2010. V. 34. P. 516–523.
- Garaulet M., Sánchez-Moreno C., Smith C.E. *et al.* Ghrelin, sleep reduction and evening preference: relationships to CLOCK 3111 T/C SNP and weight loss // *PLoS One.* 2011. V. 6. P. e17435.
- Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology (GO) project in 2006 // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. P. D322–D326.
- Gimpl G., Burger K., Fahrenholz F. A closer look at the cholesterol sensor // *Trends Biochem. Sci.* 2002. V. 27. P. 596–599.
- Goossens G.H., Jocken J.W., Blaak E.E. *et al.* Endocrine role of the renin-angiotensin system in human adipose tissue and muscle: effect of beta-adrenergic stimulation // *Hypertension.* 2007. V. 49. No. 3. P. 542–547.
- Haibe-Kains B., Olsen C., Djebbari A. *et al.* Predictive

- networks: a flexible, open source, web application for integration and analysis of human gene networks // *Nucl. Acids Res.* 2012. V. 40. P. D866–875.
- Harmston N., Filsell W., Stumpf M.P. What the papers say: Text mining for genomics and systems biology // *Hum. Genomics.* 2010. V. 5. P. 17–29.
- Kagawa Y., Yanagisawa Y., Hasegawa K. *et al.* Single nucleotide polymorphisms of thrifty genes for energy metabolism: evolutionary origins and prospects for intervention to prevent obesity-related diseases // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. V. 295. No. 2. P. 207–222.
- Kanehisa M., Goto S., Hattori M. *et al.* From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. P. D354–D357.
- Katsuya T., Ishikawa K., Sugimoto K. *et al.* Salt sensitivity of Japanese from the viewpoint of gene polymorphism // *Hypertens. Res.* 2003. V. 26. No. 7. P. 521–525.
- Kelder T., van Iersel M.P., Hanspers K. *et al.* WikiPathways: building research communities on biological pathways // *Nucl. Acids Res.* 2012. V. 40. P. D1301–D1307.
- Meléndez-Hevia E., Sicilia J., Ramos M.T. *et al.* Molecular bureaucracy: who controls the delays? Transient times in branched pathways and their control // *Theor. Biol.* 1996. 182. No. 3. P. 333–339.
- Mi H., Thomas P. PANTHER pathway: an ontology-based pathway database coupled with data analysis tools // *Methods Mol. Biol.* 2009. V. 563. P. 123–140.
- Monteleone P., Tortorella A., Docimo L. *et al.* Investigation of 3111T/C polymorphism of the CLOCK gene in obese individuals with or without binge eating disorder: association with higher body mass index // *Neurosci. Lett.* 2008. V. 435. P. 30–33.
- Mungall C.J., Emmert D.B. FlyBase Consortium. A Chado case study: an ontology-based modular schema for representing genome-associated biological information // *Bioinformatics.* 2007. V. 23. P. i337–i346.
- Peterson T.R., Sengupta S.S., Harris T.E. *et al.* mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway // *Cell.* 2011. V. 146. No. 3. P. 408–420.
- Rey G., Cesbron F., Rougemont J. *et al.* Genome-wide and phase-specific DNA-binding rhythms of BMAL1 control circadian output functions in mouse liver // *PLoS Biol.* 2011. V. 9. P. e1000595.
- Rzhetsky A., Iossifov I., Koike T. *et al.* GeneWays: a system for extracting, analyzing, visualizing, and integrating molecular pathway data // *J. Biomed. Inform.* 2004. V. 37. P. 43–53.
- Sookoian S., Castaco G., Gemma C. *et al.* Common genetic variations in CLOCK transcription factor are associated with nonalcoholic fatty liver disease // *World J. Gastroenterol.* 2007. V. 13. P. 4242–4248.
- Sookoian S., Gemma C., Gianotti T.F. *et al.* Genetic variants of Clock transcription factor are associated with individual susceptibility to obesity // *Am. J. Clin. Nutr.* 2008. V. 87. P. 1606–1615.
- Sundqvist A., Bengoechea-Alonso M.T., Ye X. *et al.* Control of lipid metabolism by phosphorylation-dependent degradation of the SREBP family of transcription factors by SCF(Fbw7) // *Cell. Metab.* 2005. V. 1. No. 6. P. 379–391.
- Taylor R., Singhal M. Biological Network Inference and analysis using SEBINI and CABIN // *Methods Mol. Biol.* 2009. V. 541. P. 551–576.
- Wang M., Verdier J., Benedito V.A. *et al.* LegumeGRN: a gene regulatory network prediction server for functional and comparative studies // *PLoS ONE.* 2013. V. 8. P. e67434.
- Zambon A.C., Gaj S., Ho I. *et al.* GO-Elite: a flexible solution for pathway and ontology over-representation // *Bioinformatics.* 2012. V. 28. P. 2209–2210.

УДК 576.5

## СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ И ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ

© 2013 г. С.Л. Киселев, М.А. Лагарькова

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия,  
e-mail: sl\_kiselev@yahoo.com

Поступила в редакцию 22 мая 2013 г. Принята к публикации 1 ноября 2013 г.

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТВОЛОВОЙ КЛЕТКИ, ТИПЫ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И ИХ ВОЗМОЖНОСТИ

Стволовые клетки – это особый тип клеток, которые имеют способность к самообновлению и в то же время могут давать при делении иные специализированные клетки. Важно отметить, что стволовые клетки могут существовать как внутри организма, так и вне его. Стволовые клетки являются уникальной моделью и одновременно инструментом для того, чтобы изучать механизмы раннего развития, клеточной дифференцировки, поддержания и регенерации тканей. Уникальные способности стволовых клеток к длительной пролиферации и к дифференцировке делают их перспективным инструментом для клеточной терапии, а учитывая результаты последних исследований по вовлеченности стволовых клеток в процесс опухолеобразования – одновременно и мишенью воздействия на организм.

Первое упоминание термина «стволовая клетка» принадлежит великому немецкому естествоиспытателю и философу Эрнсту Геккелю. Это ему мы также обязаны такими словами, как питекантроп, экология и филогенез. Именно построение филогенетических схем привело его к мысли, что есть стволовая клетка – предшественник одноклеточных организмов, из которых потом развились многоклеточные. В 1877 г. в своем труде «Антропология» Э. Геккель провел параллели между эволюцией (филогенезом) и эмбриологией (онтогенезом), предположив, что оплодотворенная яйцеклетка и является

стволовой клеткой. На самом деле мы видим, что яйцеклетки или более поздние клетки внутренней клеточной массы не совсем однозначно соответствуют критерию стволовой клетки, они не способны к самообновлению *in vivo*. Тем не менее по своей способности дифференцироваться во все эмбриональные и экстраэмбриональные ткани они являются *тотипотентными*, как зигота, или *плюрипотентными*, как клетки внутренней клеточной массы, которые дают начало всем тканям взрослого организма. Строго говоря, имея в виду эти клетки *in vivo*, мы не должны использовать словосочетание *тоти-* или *плюрипотентные стволовые клетки*. Однако, учитывая то, что *плюрипотентные клетки* могут быть выведены в искусственно поддерживаемую клеточную культуру, называемую *эмбриональными стволовыми клетками*, они представляют классический пример стволовых клеток. Дальнейшее развитие термин «стволовая клетка» получил в работах Валентина Хакера, работавшего над теорией бессмертной зародышевой плазмы Августа Вейсмана (Ramalhos-Santos, Willenbring, 2007). В 1892 г. Хакер опубликовал исследование, в котором описывал несимметричное деление, при котором клетка, определенная им как стволовая, дает начало двум другим типам клеток, среди которых одна сохраняет свойства клетки зародышевого пути, а вторая становится предшественником мезодермальных соматических клеток. Примерно в это же время исследователи в области развития и регенерации системы кроветворения поставили вопрос о существовании единственного предшественника кроветворной системы.

Исследования, проводимые А. Папенхаймом (1896 г.), а позднее российским ученым А. Максимумым (1909 г.), подтвердили унитарную теорию кроветворения, которая была экспериментально доказана американскими учеными Дж. Тиллом и Э. МакКаллохом в начале 60-х годов прошлого века. Стволовая кроветворная клетка является *мультипотентной* и обеспечивает все разнообразие специализированных клеток кровеносной системы. При построении условной иерархической лестницы потенциалов стволовых клеток принято считать, что наибольшими возможностями обладает *тотипотентная* клетка, на ступеньку ниже находится *плюрипотентная* клетка, еще ниже находятся *мультипотентные стволовые клетки* взрослого организма. В отличие от клеток-основательниц они не способны дать начало всем типам клеток организма, а служат для поддержания и регенерации той или иной ткани, поэтому зачастую их называют региональными (регионарными) стволовыми клетками. В настоящий момент хорошо описаны мультипотентные стволовые клетки крови, мезенхимальные стволовые клетки различных тканей, нейрональные стволовые клетки и целый ряд других. Необходимо отметить, что в пределах одной гистологической структуры во взрослом организме могут находиться мультипотентные стволовые клетки различных типов,

дающие начало различным дифференцированным производным.

В 1960 г. Дж. Тилл и Э. МакКаллох исследовали костный мозг в попытке найти клетки, ответственные за регенерацию крови. Эксперименты проводились на мышах, облученных летальной дозой радиации: введенные клетки костного мозга здоровых животных полностью восстанавливали гематопозз реципиентных мышей. Гематопозэтические стволовые клетки (ГСК) функционально определяются по способности восстанавливать кроветворение у облученных или генетически дефектных мышей введением кроветворных клеток здорового донора в серии предельных разведений и отвечают за формирование всех типов клеток крови. В костном мозге одновременно существуют несколько типов ГСК, которые отличаются по способности к самоподдержанию и способности к восстановлению кроветворения.

Для ГСК взрослого организма было показано, что они обладают хотя и высоким, но ограниченным пролиферативным потенциалом и что кроветворение поддерживается за счет последовательного созревания ГСК. Существует вид ГСК, способный надолго заселять костный мозг при введении в облученное животное (long-term repopulating cells), т. е. эти ГСК могут продуцировать все типы клеток крови и помимо этого способны долговременно поддерживать в необходимом количестве свою собственную клеточную популяцию. Всего одной такой клетки достаточно для поддержания кроветворения у реципиентной мыши в течение длительного времени. Для клеток человека в качестве основного маркера таких ГСК используют молекулу адгезии CD34. Другой вид ГСК (short-term repopulating cells) способен полностью репопулировать облученный организм, однако этот эффект кратковременен, и через 4–6 недель стволовые клетки перестают самовозобновляться и кроветворные способности истощаются. Недавно описан совсем малочисленный тип покоящихся ГСК, всего около 1000 клеток. Для покоя и пролиферации ГСК важны межклеточные контакты и взаимодействия с внеклеточным матриксом стромы костного мозга, в котором концентрируются цитокины, вырабатываемые клетками различных типов. Наиболее хорошо изучено влияние GM-CSF и IL-3. Установлено,

**Тотипотентная** клетка дает начало эмбриональным, экстраэмбриональным и трофобластическим тканям. Примером является зигота.

**Плюрипотентные стволовые** клетки дают начало эмбриональным и экстраэмбриональным тканям. Примерами являются клетки внутренней клеточной массы бластоцисты, эмбриональные стволовые клетки и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

**Мультипотентные (регионарные) стволовые** клетки дают начало нескольким типам клеток внутри одного зародышевого листка. Примерами являются стволовые клетки крови, стромальные стволовые клетки, нейрональные стволовые клетки, стволовые клетки волоса и т.д.

В организме *in vivo* **мультипотентные стволовые** клетки имеют ограниченный потенциал самовозобновления.



что в регуляции самовозобновления клеток крови участвуют Notch-, Shh- и Wnt-сигнальные пути. В костном мозге локализуются не только ГСК, там же находятся стромальные клетки, которые обеспечивают специальные условия для стволовых клеток крови. Большой вклад в исследования двух соседствующих популяций стволовых клеток внесли российские исследователи А.Я. Фриденштейн и И.Л. Чертков, ставшие основоположниками изучения стромальных (мезенхимальных) мультипотентных стволовых клеток костного мозга. В конце 1960-х годов в своих экспериментах они показали в костном мозге наряду с существованием кроветворных стволовых клеток наличие мультипотентных стволовых клеток стромы, которые могли дифференцироваться в остеобласты, хондроциты, адипоциты и собственно стромальные клетки, поддерживающие гемопоэз. Стволовые клетки мезенхимального ряда обнаружены в других тканях, наиболее известным источником является жировая ткань. Мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани хотя и имеют меньший потенциал дифференцировки и не могут поддерживать гемопоэз, но, тем не менее, обладают способностью дифференцироваться в хондрогенном и адипогенном направлениях. Следует отметить, что далеко не все типы клеток, которые *in vitro* имеют свойства стволовых, а именно: могут самообновляться, воспроизводя себя и дифференцируясь в другие типы клеток, сохраняют эти свойства *in vivo*. При характеристике клеток вне организма приходится полагаться в основном на клеточные маркеры, иммунологические, генетические, реже – функциональные. Это зачастую приводит к лабораторным артефактам, когда ожидаемое кажется действительным и потенции клеток преувеличиваются. Наиболее ярким примером такого артефакта является безграничный потенциал мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга. Ряд исследователей приписывали им возможность не только дифференцироваться в разнообразные типы клеток, таких как инсулин-продуцирующие, гепатоциты, нейроны и т. д. *in vitro*, но и во все ткани организма *in vivo*. Однако такие фантастические открытия не всегда подтверждаются работами других коллективов, а тщательное расследование экспериментов

позволяет установить даже фальсификацию результатов. Так, спустя несколько лет были опровергнуты шумевшие научные работы о безграничном потенциале клеток костного мозга. Скорее всего, мультипотентные стволовые клетки взрослого организма в нормальных физиологических условиях имеют потенциал дифференцировки только в пределах собственного зародышевого листка, хотя с помощью воздействия специальных факторов *in vitro* это можно существенно изменить.

Удивительно, но наряду со стволовыми клетками костного мозга, представленными 2 типами, у взрослого человека есть стволовые клетки мозга. Всем известно выражение, что нервные клетки не восстанавливаются. Однако еще в середине 60-х годов прошлого века Джозеф Альтман доказал, что клетки мозга восстанавливаются и, как было показано позднее на примере обучения канареек новым песням, в мозге у птиц формируются новые нейроны и устойчивые нейрональные связи. Каким образом происходит восстановление клеток взрослого мозга и откуда берутся новые зрелые нейроны? Очевидно, что имеется запас клеток-предшественников, стволовых клеток, которые дают начало как нейронам, так и сопутствующим глиальным клеткам. В присутствии определенных ростовых факторов из тканей гиппокампа были выделены клетки, которые в суспензии формировали сфероиды, причем эти сфероиды могли быть разрушены до отдельных клеток, которые опять формировали сфероиды, т. е. клетки обладали способностью к самообновлению. Если перевести клетки сфероидов в другие условия культивирования и посадить их на поверхность, то начинается дифференцировка, которая приводит к появлению клеток, имеющих морфологию и маркеры, соответствующие нейронам, астроцитам и олигодендроцитам. В гетерогенной популяции нейросфер был определен маркерный белок промежуточных нейрофиламентов – нестин. Нестин оказался великолепным маркером нейрональных стволовых клеток. Используя трансгенных мышей, у которых флуоресцентные белки находились под контролем промотора гена нестина, а также ряд других трансгенных животных, Г.Н. Ениколопов совсем недавно доказал, что выражение «нервные клетки не восстанавливаются» отчасти верно (Encinas *et*

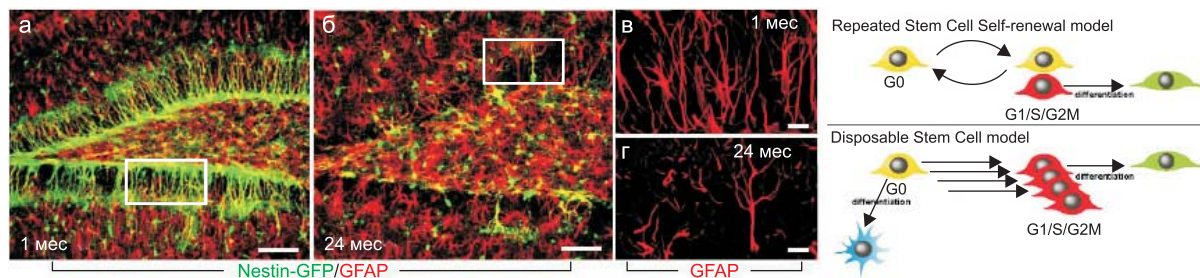
al., 2011). В своем исследовании он продемонстрировал, что нейроны восстанавливаются, но восстановление зрелых нейронов происходит за счет потери нейрональных стволовых клеток. По предложенной им модели «расходных нейрональных стволовых клеток» в гиппокампе находятся покоящиеся нейрональные предшественники (quiescent neuronal progenitors, QNP) (рис. 1), которые проходят примерно 3 несимметричных митотических деления, в результате которых образуются симметрично делящиеся, дважды размножающиеся нейрональные предшественники (amplifying neuronal progenitors), которые формируют нейробласты, далее – незрелые, а потом и зрелые нейроны. Последние две стадии сопровождаются апоптозом делящихся клеток, лишь единицы становятся зрелыми нейронами. Исходные покоящиеся нейроны (QNP), совершив несколько циклов деления, выходили из него, приобретая морфологию предшественников астроцитов и далее становясь постмитотическими астроцитами. В завершение всего сложного многоступенчатого процесса один нейрональный предшественник (QNP) приводит к образованию одного астроцита и одного–двух нейронов. Таким образом, во взрослом организме происходит восстановление зрелых нейронов и нейрональные связи могут быть восстановлены, однако потенциал восстановления ограничен изначальным количеством покоящихся нейрональных предшественников. Предложенная модель отчасти согласуется с наличием среди ГСК двух типов репопулирующих клеток.

Описан еще целый ряд региональных стволовых клеток млекопитающих, но пока они еще мало изучены и их потенциал еще не так

значим, как потенциал стволовых клеток взрослого организма.

## ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

Соматические клетки многоклеточного организма от его зарождения (оплодотворенная яйцеклетка) до момента биологической смерти претерпевают множество делений. С каждым из делений клетка движется вниз по лестнице онтогенеза, приобретая все больше черт терминальной дифференцировки и постепенно теряя потенциал к превращению в разные типы клеток. Это билет в один конец: в норме любая дифференцированная клетка не возвращается назад, не становится клеткой предшественницей или стволовой клеткой. Зигота и бластомеры ранней морулы обладают способностью дифференцироваться во все эмбриональные типы клеток и в клетки трофоэктодермы. Эта способность называется *тотипотентностью*. *Плюрипотентные клетки* внутренней клеточной массы бластоцисты (ВКМ, inner cell mass, ICM) могут дифференцироваться во все эмбриональные и экстраэмбриональные ткани. Клетки ВКМ бластоцисты, культивируемые в лабораторных условиях, получили название *эмбриональные стволовые клетки* (ЭСК, ESCs). Можно подобрать такие условия культивирования, что программа дальнейшего развития ЭСК *in vitro* не реализуется, они сохраняют свойство плюрипотентности неограниченное время. Самым замечательным свойством ЭСК является то, что, несмотря на длительное существование



**Рис. 1.** Покоящиеся нейрональные предшественники и их постепенное исчезновение из района гиппокампа. Модель расходных нейрональных стволовых клеток (Encinas *et al.*, 2011. P. 566–579).

в культуре *in vitro* (более 300 пассажей), они сохраняют свойство группы клеток ВКМ, из которой они произошли, а именно: они способны полностью выполнить программу эмбрионального и онтогенетического развития, если помещены обратно в ранний эмбрион. В химерной мышце производные ЭСК могут присутствовать во всех тканях, включая клетки зародышевого пути. Возможность культивировать клетки *in vitro*, производить с ними генетические манипуляции, а потом получить из них целый организм делает ЭСК не только уникальным объектом для изучения фундаментальных аспектов биологии развития, но и эффективным биотехнологическим инструментом (Philonenko *et al.*, 2011).

Эти удивительные свойства ЭСК были использованы для разработки технологии генетического нокаута. Эта технология позволяет манипулировать генами на уровне целого организма, выяснять биологическую функцию гена *in vivo*, а также создавать модельные системы для изучения молекулярной генетики заболеваний человека. В 2007 г. за разработку технологии генетического нокаута с использованием ЭСК была вручена Нобелевская премия. Сегодняшние технологии редактирования генома с помощью нуклеаз типа цинковых пальцев (zinc finger nucleases, ZFN) или TALEN позволяют эффективно вносить генетические изменения уже на стадии оплодотворенной яйцеклетки. В апреле 2013 г. было опубликовано сообщение, что в знаменитом Рослинском институте (Шотландия), где была клонирована овечка Долли, получен Пиг26 – поросенок с измененным геномом и не подверженный африканской свинной лихорадке (<http://www.independent.co.uk/news/science/pig-26-can-this-little-piggy-win-over-the-enemies-of-gm-8574119.html>). При использовании технологии редактирования генома на стадии зиготы в геном домашней свиньи была внесена определенная мутация, которая делает африканских сородичей, не скрещивающихся с домашней свиньей, устойчивыми к лихорадке.

В 1998 г. группа Джеймса Томсона получила линии ЭСК человека, тем самым открыв новые возможности не только для изучения эмбрионального развития человека, но и для направленного гистогенеза *in vitro*. Для получения стабильных линий ЭСК человека используют неостребованные после искусственного опло-

дотворения (экстракорпоральное оплодотворение, ЭКО) бластоцисты человека. Обычно после такой процедуры количество бластоцист больше, чем необходимо реципиенту. По грубым оценкам только в России остаются неостребованными после ЭКО несколько десятков тысяч бластоцист, которые могли бы быть использованы с согласия доноров для научных целей. Эмбриональные стволовые клетки человека имеют характерные поверхностные иммунологические маркеры, например SSEA-3, SSEA-4 – антигенные детерминанты гликолипидов и TRA-1-60, TRA-1-81 – разные эпитопы одного протеогликана клеточной поверхности, а также CD90. В отличие от ЭСК мыши ЭСК человека не экспрессируют SSEA-1. Также в ЭСК высока активность эндогенной щелочной фосфатазы и теломеразы. И иммунологические маркеры, характерные для ЭСК, и высокая теломеразная активность присущи также трансформированным клеткам. Для полной характеристики линий ЭСК человека обязателен анализ кариотипа. Нормальный набор хромосом и отсутствие хромосомных аномалий – это признаки нормального кариотипа, который, однако, в процессе культивирования клеток может быть нарушен. По данным Amps с соавт. (2011), 70 % линий плюрипотентных стволовых клеток человека сохраняют неизменный кариотип на длительных сроках культивирования. В остальных случаях наблюдаются разнообразные хромосомные перестройки. Необходимо отметить, что *in vivo* на доимплантационной стадии развития очень высок уровень миксоплоидии и частота встречаемости анеуплоидных клеток в эмбрионе достигает 30–65 %. *In vivo* большая часть таких аномалий либо оказывается несовместимой с дальнейшей жизнью эмбриона, либо аномальные клетки подвергаются апоптозу в ходе дальнейшего развития эмбриона. Таким образом, определенная нестабильность генотипа ЭСК является их внутренним свойством, возможно, обусловленным влиянием окружающей среды. В то же время в целом ряде работ подчеркивается способность ЭСК сохранять стабильный кариотип. Сохранение стабильного кариотипа в ходе длительного культивирования было даже названо уникальным свойством, присущим только ЭСК, в отличие от других известных культур клеток, например от фибробластов человека,

способных пройти только около 30 делений *in vitro*, сохраняя нормальный кариотип.

Наиболее полное исследование генетической стабильности линий ЭСК человека было проведено консорциумом International Stem Cell Initiative, который собрал для анализа около 140 линий плюрипотентных стволовых клеток человека из 39 ведущих лабораторий мира, включая и линии ЭСК человека, которые были получены в России (Amps *et al.*, 2011). Совокупно в этом исследовании были задействованы линии ЭСК человека, полученные для многих этнических групп. Для анализа были отобраны линии на ранних и поздних пассажах, разница составляла 30 и более пассажей. Для того чтобы определить, насколько генетически стабильны линии ЭСК человека, проводился цитогенетический анализ этих линий. SNP анализ и анализ метилирования ДНК. Проведенные исследования показали, что более 70 % линий, включенных в исследование, были генетически стабильны при культивировании *in vitro*. Оставшиеся линии (30 %) имели различную вариабельность, которую нельзя было однозначно отнести к условиям культивирования конкретной лаборатории. Не исключено, что вариабельность может быть связана с деталями ЭКО или особенностями генотипов линий. Тем не менее в некоторых линиях ЭСК человека по мере культивирования наблюдалось накопление определенных изменений в определенном участке хромосомы 20. Проведенный детальный анализ перестроек хромосомы 20 позволил определить антиапоптотический ген *BCL2L1* как кандидатный на амплификацию в ходе культивирования. На самом деле такому глубокому и строгому анализу не подвергались никакие первичные (нетрансформированные) долговременные культуры клеток человека. Не исключено, что любые первичные культуры клеток человека, например популярные мезенхимальные стволовые клетки костного мозга или жира, при относительно долгом культивировании также накапливают генетические изменения, дающие им преимущество в выживании при пролиферации *in vitro*.

Так как сохранение способности клеток к неограниченному делению *in vitro* без трансформации и потери свойства плюрипотентности является искусственно поддерживаемым состо-

янием, механизмы поддержания плюрипотентности являлись предметом изучения со времен первого получения ЭСК мыши. Первые линии ЭСК мыши и человека были получены и поддерживались на фидерном слое из инактивированных мышечных эмбриональных фибробластов. В дальнейшем было показано, что линии ЭСК могут быть получены в бесфидерных условиях, в среде, содержащей различные комбинации ростовых факторов и сигнальных молекул. Исследования ряда лет были направлены на выявление влияния каждого из этих факторов на поддержание плюрипотентности ЭСК мыши и человека. Было обнаружено, что для ЭСК человека LIF не является необходимой сигнальной молекулой поддержания плюрипотентности, а для ЭСК мыши является. Обратная ситуация наблюдалась для фактора роста фибробластов (FGF). Таким образом, несмотря на то что ЭСК человека и мыши были получены из эмбриологически сходных структур, основные сигнальные пути у них различаются, вероятно, вследствие различий в процессах эмбрионального развития. Новым шагом к пониманию свойства плюрипотентности явилось получение стволовых клеток мыши на стадии эпибласта – mEpiSC. Для mEpiSC так же, как и для ЭСК человека, главными позитивными регуляторами плюрипотентного состояния являются TGF-beta, Activin, FGF2, ERK1/2, Wnt, IGF. Эти два принципиально разных состояния плюрипотентности были определены как «naive», характерное для ЭСК мыши, и «primed», характерное для mEpiSC и ЭСК человека. По всей вероятности, ЭСК человека могут являться аналогом более поздней стадии развития эмбриона, чем ЭСК мыши. Однако этот факт не влияет на способность ЭСК человека дифференцироваться в производные 3 зародышевых листков и поддерживать плюрипотентное состояние *in vitro* (Philonenko *et al.*, 2011).

Каскады сигнальных путей поддержания плюрипотентности направлены как на блокирование путей дифференцировки, так и на поддержание и активацию транскрипционных факторов плюрипотентности. Выявлены основные транскрипционные факторы поддержания плюрипотентности, которые являются общими для человека и мыши, – это POU5F1 (или Oct3/4), Sox2, Nanog, Klf4, Zfp42/Rex1 и

ряд других. Эти транскрипционные факторы связаны с регуляторными районами транскрибируемых и неактивных генов, часть из которых связана с поддержанием самообновления и плюрипотентности ЭСК, другие контролируют основные программы дифференцировки в экстраэмбриональные и эмбриональные типы тканей. Первая тройка транскрипционных факторов плюрипотентности связана с 10 % всех промоторов в геноме человека, при этом половина регуляторных районов, с которыми связан Oct3/4, также связана с Sox2, и 90 % этих районов занято транскрипционным фактором Nanog. Гены, с регуляторными районами которых связано сразу несколько транскрипционных факторов, активны в ЭСК, в то время как с регуляторными районами генов, ответственных за дифференцировку и, следовательно, репрессированных в ЭСК, связаны только одиночные транскрипционные факторы.

Когда мы говорим о начальных стадиях развития и специализации клеток, то невозможно обойти вклад эпигенетики в эти процессы. Термин «эпигенетика» произошел от слова «эпигенезис», которое обозначало отображение генома клетки во время развития, дающее определенный фенотип клетки (Waddington, 1942). Сейчас под эпигенетическими механизмами понимаются наследуемые изменения в функционировании генов, не связанные с изменением последовательности ДНК. Эпигенетические модификации генома – это метилирование ДНК, метилирование и ацетилирование гистонов, организация негистоновых белков хроматина, а также регуляторные некодирующие РНК. Эпигенетические модификации обратимы. Эпигенетические модификации генома служат для закрепления определенного статуса хроматина, «открытого» или «закрытого». Модификации гистонов и метилирование ДНК тесно связаны. Метилирование ДНК может приводить к последующей модификации гистонов, и наоборот модификация гистонов может приводить к метилированию ДНК (Jaenisch, Bird, 2003).

Принято считать, что метилирование ДНК служит для того, чтобы маркировать неактивную область генома. Модификации гистонов могут как активировать, так и репрессировать транскрипцию генов. В процессе эмбрионального развития, гаметогенеза и при тканеспецифи-

ческой дифференцировке геном подвергается изменению метилирования ДНК и модификаций гистонов. Скорость обмена гистонов в ЭСК мыши высока – от нескольких секунд до минуты. Возможно, такая высокая скорость замены гистонов позволяет ЭСК быстро вступить на путь дифференцировки. Клетки постепенно приобретают определенный паттерн метилирования в процессе дифференцировки. Снижение активности генов, определяющих плюрипотентность (Oct3/4, Nanog) в дифференцирующихся клетках, сопровождается гиперметилированием их промоторных областей. Если метилтрансферазы в дифференцирующихся клетках не работают (например, Dnmt1-/-), то это приводит к вступлению клеток на путь апоптоза. При этом эти клетки эффективно поддерживают недифференцированное состояние, что говорит о том, что гипометилирование может являться одним из механизмов поддержания самообновления. В то же время далеко не все гены, ассоциированные с плюрипотентностью, гипометилированы одинаково во всех линиях ЭСК человека. Регуляторные участки ключевых генов, таких как Oct3/4, Nanog, гипометилированы сходным образом в линиях ЭСК. Интересно, что при общей открытой организации хроматина плюрипотент-

**Эмбриональные стволовые** клетки получают в результате культивирования внутренней клеточной массы бластоцисты. Для получения эмбриональных стволовых клеток человека используют бластоцисты, невоплощенные в результате экстракорпорального оплодотворения и предназначенные для уничтожения.

**Эмбриональные стволовые** клетки вне организма способны неограниченно долго пролиферировать и сохранять свойство плюрипотентности, не претерпевают опухолевой трансформации, а также способны дифференцироваться в разнообразные специализированные клетки и ткани *in vitro* и *in vivo*.

**Индукцированные плюрипотентные стволовые** клетки получают путем **репрограммирования** любых соматических клеток взрослого организма генами транскрипционных факторов плюрипотентного состояния или их аналогами. В результате репрограммирования получаются клетки, практически идентичные по свойствам **эмбриональным стволовым** клеткам.

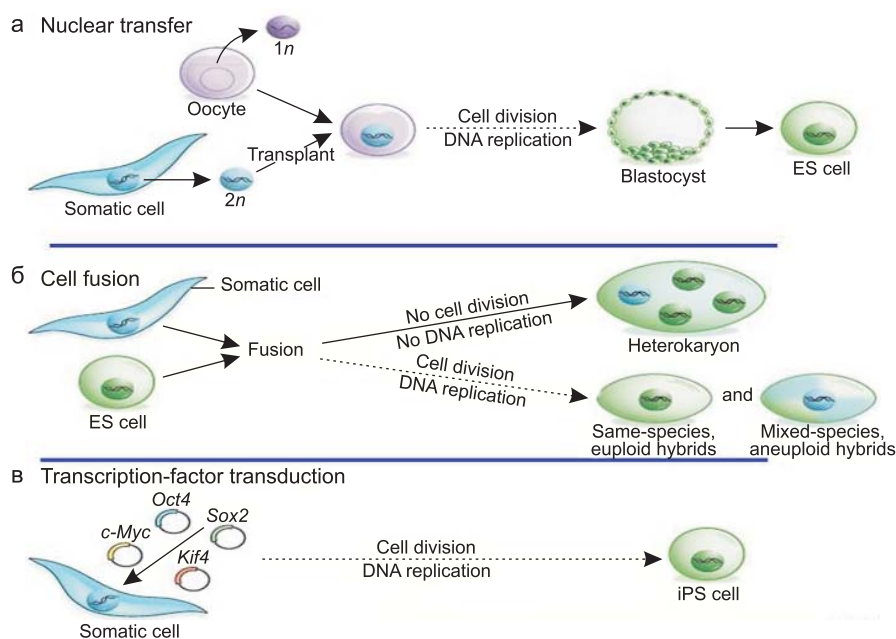
ных стволовых клеток уровень метилирования промоторных участков более чем 20 тыс. генов, а также других последовательностей генома значительно выше в плюрипотентных стволовых клетках человека, чем в соматических клетках (Lagarkova *et al.*, 2010). Остается непонятным, каким образом большая часть гиперметилированных промоторов в ЭСК переходит в гипометилированное состояние в дифференцированных клетках, так как к настоящему моменту нет устойчивого представления о ферментах, которые могут удалять метильную группу.

Несомненно, такие плюрипотентные стволовые клетки человека, как ЭСК, представляют большой интерес как модельная система изучения процессов развития и дифференцировки. Возможность неограниченного деления в культуре и способность к дифференцировке ЭСК являются весьма привлекательными для использования этих стволовых клеток в целях получения специализированных клеток и тканей, пригодных для терапевтических целей. Однако возникает проблема иммунологической совместимости ЭСК и реципиентов. Отчасти эта проблема может быть решена созданием банка линий ЭСК с определенными параметрами комплекса гистосовместимости. Несколько сотен линий ЭСК (300–400) с подобранными сочетаниями вариантов комплекса гистосовместимости достаточно, чтобы они были иммунологически совместимы с 70 % представителей европеоидной расы. В то же время получение полностью иммунологически совместимых плюрипотентных стволовых клеток человека является весьма привлекательным для их дальнейшего использования в практике.

Исследования по переносу ядра соматической клетки в энуклеированный ооцит (somatic cell nuclear transfer, SCNT) или слияние соматической клетки с плюрипотентной продемонстрировали, что геном соматической клетки может быть переведен в эмбриональное состояние, т. е. однонаправленная программа развития может быть изменена, а клетка репрограммирована (Jaenisch, Young, 2008). Репрограммирование возможно не только до плюрипотентного состояния. Например, в 1987 г. Вайнтраубу с коллегами с помощью введения в фибробласты генетической конструкции, экспрессирующей транскрипционный фактор гладкомышечной

дифференцировки, удалось репрограммировать эти клетки в мышцы. Соответственно, зная, какие генетические факторы определяют плюрипотентность, можно репрограммировать соматическую клетку.

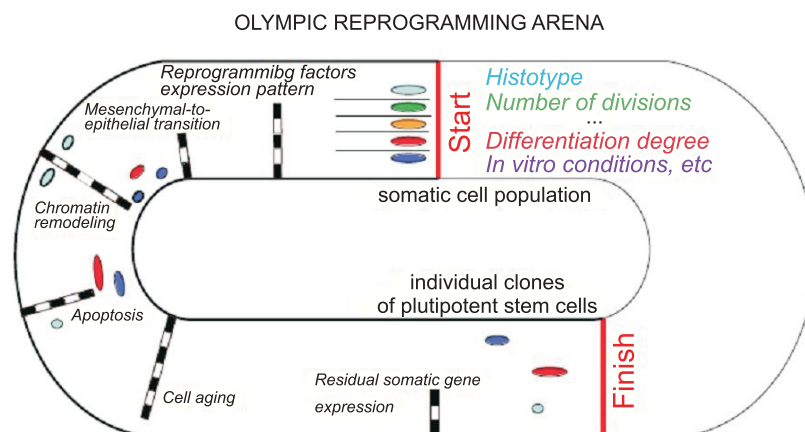
С помощью подбора различных сочетаний 24 транскрипционных факторов, участвующих в приобретении и поддержании плюрипотентного состояния, были определены всего 4 фактора Oct3/4, Sox2, Klf4 и С-Мус (известные теперь как коктейль Яманаки), экспрессия которых в соматической клетке приводила к ее переходу в плюрипотентное состояние. Этот процесс получил название «генетическое репрограммирование», т. е. репрограммирование путем прямого воздействия на генетический материал взрослой клетки (в отличие от SCNT и слияния клеток) (рис. 2). За создание технологий репрограммирования с помощью энуклеированного ооцита и определенного набора генов в 2012 г. была вручена Нобелевская премия по физиологии и медицине двум ученым – Дж. Гёрдону и Ш. Яманаке. Клетки, репрограммированные с помощью генов до плюрипотентного состояния, получили название индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (induced pluripotent stem cells, iPSCs), иПСК. При репрограммировании с течением времени реактивируются эндогенные транскрипционные факторы Oct3/4, Nanog и Sox2, которые активируют автономные механизмы поддержания плюрипотентности, не зависящие от введенных трансгенов. иПСК обладают основными свойствами ЭСК и являются их аналогом, полученным искусственным путем. При генетическом репрограммировании приобретение соматическими клетками плюрипотентного состояния происходит с довольно низкой эффективностью. В первой работе 2006 г. К. Такахашаи и Ш. Яманаки (Takahashi, Yamanaka, 2006) эффективность получения клеток иПСК из эмбриональных фибробластов мышцы с использованием ретровирусов для доставки транскрипционных факторов составила всего 0,02 %. В дальнейших работах по репрограммированию соматических клеток человека, мышцы и крысы (Stadtfield, Hochedlinger, 2010) максимальная эффективность составила 0,5 %. Две различные модели: «элитная и «стохастическая» были предложены для объяснения



**Рис. 2.** Существующие технологии репрограммирования генома соматической клетки до плюрипотентного состояния: перенос ядра соматической клетки в энуклеированный ооцит (а), слияние соматической и эмбриональной стволовой клетки (б), прямое генетическое репрограммирование (в) (Yamanaka, Blau, 2010. P. 704–712).

того, что не все клетки подвергаются репрограммированию. «Элитная» модель предполагает присутствие в популяции части клеток, которые с большей вероятностью вступают на путь приобретения плюрипотентности, чем остальные. «Стохастическая» модель постулирует одинаковую вероятность перехода всех клеток популяции в репрограммированное состояние. На самом деле это весьма упрощенный взгляд на процесс репрограммирования. Можно рассматривать процесс репрограммирования как бег с препятствиями (рис. 3). «Бегуны», т. е. клетки той или иной специализации, возраста, пассажа располагаются на разных дорожках, и им предстоит преодолеть ряд барьеров, таких, как эффективность экспрессии в каждой клетке репрограммирующего фактора или их сочетания, состояние хроматина, способность к пролиферации или апоптозу и т. д. Совсем недавно было показано, что гены эмбрионального развития физически недостижимы для экзогенных транскрипционных факторов из-за своеобразной упаковки хроматина. Скорее всего, на повороте «олимпийского забега» происходит переход от стохастического сценария репрограммирования к элитарному, но даже среди

элиты не все приходят к финишу (Philonenko *et al.*, 2011). Удивительно, что финишная прямая может растягиваться для некоторых клонов репрограммируемых клеток очень надолго, требуется до нескольких месяцев культивирования, пока иПСК не достигнут некоего «золотого стандарта» плюрипотентных стволовых клеток. В случае иПСК мыши «золотым стандартом» может служить тест на тетраплоидную комплементацию. На стадии двухклеточного эмбриона производится электрослияние клеток, развитие тетраплоидного эмбриона продолжается дальше *in vitro* до стадии бластоцисты. Если такую бластоцисту имплантировать, то трофобласту обеспечит имплантацию, но развития эмбриона не произойдет. Если во внутреннюю полость тетраплоидной бластоцисты ввести диплоидные плюрипотентные клетки, например иПСК, то они сформируют все ткани эмбриона и организма. С иПСК человека такая проверка невозможна, необходимы другие значимые критерии репрограммирования. Самое значимое на начальном этапе – это переход клеток от роста в монослое или суспензии к росту отдельными морфологически четкими колониями. На физиологическом и молекулярном уровнях репро-



**Рис. 3.** Процесс репрограммирования клеток можно представить как «бег с препятствиями», где «бегуны» (клетки, обладающие различными свойствами), расположившись на своих дорожках, должны преодолеть ряд барьеров, таких, как различная экспрессия в разных клетках самих факторов репрограммирования, провести ремоделирование хроматина, преодолеть апоптоз и т. д. (Philonenko *et al.*, 2011. P. 153–196).

граммирование сопровождается потерей ранее установленных щелевых контактов и установлением новых, характерных для плюрипотентных клеток. Замолкают гены, характерные для соматических клеток, активизируется работа эндогенных генов плюрипотентности, прекращается работа внесенных извне (экзогенных) факторов плюрипотентности. Происходит ремоделирование хроматина, он становится менее компактным, деметируются регуляторные районы генов плюрипотентности, нарастает общий уровень метилирования ДНК.

Полностью репрограммированные клетки способны дифференцироваться в клетки трех зародышевых листков, а при введении их иммунодефицитным животным – формировать разнообразные ткани. Наиболее широко используется вирусная доставка факторов репрограммирования в соматические клетки, хотя ее негативные стороны очевидны: это неконтролируемая интеграция трансгенов и их возможное влияние на геном.

На смену интеграционному подходу пришел ряд систем репрограммирования, в которых не используются молекулы ДНК. В первую очередь, это репрограммирование с помощью *in vitro* синтезированных мРНК транскрипционных факторов или рекомбинантных белков, а также вируса Сендая, который существует только в форме РНК. Некоторые транскрипционные факторы можно заменить на химические сое-

динения, способствующие ремоделированию хроматина. Сегодня очевидно, что практически любой тип соматических клеток можно репрограммировать до плюрипотентного состояния с помощью различных сочетаний транскрипционных факторов, молекул и технологий. А насколько при этом иПСК будут соответствовать тому, к чему мы стремились, – ЭСК? Между ЭСК и иПСК действительно существует ряд различий. Оказалось, что есть гены, которые по-разному экспрессируются в индуцированных и эмбриональных стволовых клетках. Экспрессия части генов была характерна для того типа клеток, из которого иПСК клетки были получены. Этот феномен был назван «соматической памятью». Было показано, что эффект «соматической памяти» значительно уменьшается с течением пассажей, однако полностью не исчезает. Также были показаны различия в экспрессии miRNA. Следует отметить, что, говоря о иПСК человека, очень сложно сравнивать линии клеток с индивидуальными характеристиками генома, полученные из разных типов клеток, с различной интеграцией трансгенов и в разных лабораторных условиях. Остается открытым вопрос о влиянии репрограммирования на целостность генома. В целом ряде работ было показано, что в процессе репрограммирования в геноме накапливаются одиночные замены и происходит амплификация повторов. Однако последние исследования показывают, что вклад



самого репрограммирования сильно преувеличен. Когда были проанализированы геномы иПСК и конкретно геномы тех участков кожи, из которых были получены иПСК (и, соответственно, из фибробластов, полученных из этих участков), то оказалось, что между участками существует разница в количестве повторов (copy number variations), которая потом и обнаруживается в отдельных клонах иПСК. Примерно 30 % наших клеток мозаичны, и это надо учитывать, если с помощью технологии репрограммирования мы будем делать тот или иной тип клеток или моделировать заболевание. Отдельно хочется отметить такое глобальное явление репрограммирования на эпигенетическом уровне, как реактивация инактивированной в женских клетках X-хромосомы. Если с плюрипотентными клетками мыши все достаточно ясно и две активные X-хромосомы в плюрипотентных клетках могут считаться одним из «золотых стандартов» плюрипотентности, то в плюрипотентных стволовых клетках человека ситуация не столь однозначна. В основном, за редким исключением, реактивации X-хромосомы не происходит.

### **ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ПЛУРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА, ВОЗМОЖНОСТИ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ**

Практическое использование каждого из двух типов плюрипотентных стволовых клеток имеет свои недостатки и достоинства. ЭСК – наиболее охарактеризованный тип плюрипотентных клеток, биология которых изучена в большой степени, однако использование ЭСК в клинике связано с ожидаемым иммунным ответом. Использование иПСК снимает проблемы иммунологической совместимости, однако недостаточно охарактеризованные особенности иПСК также препятствуют использованию их в клинических целях.

На сегодняшний день для наиболее изученных плюрипотентных стволовых клеток человека – ЭСК – разработаны протоколы получения более полусотни специализированных типов клеток (Philonenko *et al.*, 2011). В последние годы было опубликовано множество протоколов диффе-

**Репrogramмирование** соматических клеток сопровождается глобальным ремоделированием хроматина и изменением транскрипционной активности генов.

Эффективность **репрограммирования** составляет доли процента, и хотя репрограммирование не вносит значительных изменений в геном, полученные **индуцированные плюрипотентные стволовые** клетки имеют геном, сходный с конкретным участком ткани, клетки которой использовались для репрограммирования.

Кроме наследования генома **индуцированные плюрипотентные стволовые** клетки могут унаследовать транскрипционную активность генов того типа клеток, из которых они были получены, – «соматическую память».

ренцировки плюрипотентных клеток в клетки – производные трех зародышевых листков – эктодермы (нейроны, астроциты, олигодендроциты, клетки пигментного эпителия и др.), мезодермы (кардиомиоциты, фибробласты, хрящ, кость, клетки крови и др.), энтодермы (клетки, продуцирующие инсулин, гепатоциты). Ряд специализированных клеточных типов, полученных из ЭСК человека, показал свою эффективность при испытаниях *in vivo* на животных. В 2009–2010 гг. в США было разрешено проведение нескольких первых клинических испытаний производных ЭСК человека, а в 2013 г. в Японии начались клинические испытания иПСК человека.

Основными проблемами на пути использования производных плюрипотентных клеток являются, во-первых, разработка самих протоколов направленной дифференцировки, а во-вторых, их пересадка (трансплантация, введение) пациентам. Остановимся только на биологических проблемах, но таких, которые диктуются современными подходами и требованиями. Во-первых, протоколы культивирования и дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток должны быть основаны на полностью определенных (defined) условиях культивирования клеток. Во-вторых, даже для доклинических исследований необходимо разработать технологии массового культивирования клеток и высокоэффективного получения их дифференцированных производных. В-третьих, необходимо иметь возможность селекции

желаемого клеточного типа для минимизации негативных последствий от контаминации другими низкодифференцированными клеточными типами или другими функциональными типами клеток. Сегодня практически не существует протоколов, удовлетворяющих всем этим требованиям. Технология получения iPСК является относительно новой, и основные протоколы направленной дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток были разработаны для ЭСК как наиболее охарактеризованного источника.

В итоге каждый из протоколов дифференцировки сводится к тому, что изменяются условия искусственного поддержания плюрипотентного состояния, вследствие чего клетки вступают на путь спонтанной дифференцировки. Варьируя условия культивирования (использование сыворотки, рекомбинантных ростовых факторов или факторов, выделяемых фидерными клетками), можно увеличить выход клеток необходимого пути дифференцировки. Детектировать направление дифференцировки возможно, оценивая экспрессию генов, характерных для данного пути развития.

В качестве примера рассмотрим дифференцировку по мезодермальному направлению. Предполагается, что гематопоэтические и эндотелиальные клетки происходят от общего мезодермального предшественника – гемангиобласта, который коэкспрессирует Flk-1 и VEGFR2. В искусственных условиях возможно получить гемангиобласты при дифференцировке через стадию эмбрионидных телец с последующим помещением клеток в полужидкие среды с ростовыми факторами. При дальнейшей дифференцировке клеток по мезодермальному пути формируется ряд клеток-предшественников, из которых можно получить кардиомиоциты, эндотелии и гематопоэтические клетки. Направленная дифференцировка позволяет увеличить выход целевой популяции клеток. При разработке метода дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в эндотелии мы использовали для селекции антиген CD31. Необходимо отметить, что при использовании разработанного протокола дифференцировка ЭСК человека в клетки эндотелия сопровождалась не только экспрессией генов специфических транскрипционных факторов (GATA-2, GATA-3 и гена eNOS), но и деметилированием

регуляторных районов этих генов, что подтверждает эпигенетическую составляющую направленного процесса и его фиксацию. Клетки формировали сетчатую структуру, такую же, как и зрелые человеческие эндотелиальные клетки из пупочной вены, что свидетельствует об их функциональности.

Другое направление дифференцировки гемангиобластов – это дифференцировка по пути гематопоеза. Нет необходимости обсуждать практическую значимость этого направления дифференцировки – она огромна. К настоящему моменту существуют несколько основных методов дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток по гематопоэтическому пути, и все их можно разделить на 2 группы: кокультивирование стволовых клеток со стромальными, поддерживающими кроветворение, клетками и дифференцировка через стадию эмбрионидного тельца. Существующие протоколы являются многоступенчатыми, труднопроизводимыми и почти всегда содержат стадии, в которых используются неохарактеризованные компоненты животного происхождения (сыворотки, клеточные линии), в то же время был получен большой спектр специализированных клеток иммунной системы, в частности дендритные клетки, Т-клетки, эритроциты. Последние кажутся наиболее перспективными для клинических испытаний, так как они не несут генетического материала и таким образом минимизирован риск злокачественной трансформации.

Одним из наиболее изученных является процесс дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток человека в нейроны и астроциты. Впервые такая дифференцировка была описана в 2001 г. С тех пор опубликовано несколько эффективных протоколов дифференцировки функциональных нейрональных клеток, в том числе определенной специализации, например дофаминергических. Производные эндодермы получить труднее всего. В недавно опубликованных сообщениях о дифференцировке ЭСК человека в инсулин-секретирующие клетки и гепатоциты было показано, что по белковым маркерам и набору транскрибирующихся генов они совпадают со зрелыми инсулин-секретирующими клетками или гепатоцитами. Однако факторы, определяющие дифференцировку в эндодерму, плохо охарактеризованы, и известно

мало маркеров ранней энтодермальной дифференцировки.

В заключение остановимся на последних наиболее ярких примерах использования технологии репрограммирования и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток для разработки терапевтических подходов, связанных с инфекционными заболеваниями и онкоиммунологией. Одна из проблем – низкая иммуногенность опухолевых клеток или отсутствие распознавания патогена. Причем это может быть на уровне индивидуального ответа организма. Необходимо усилить этот ответ, сделать вакцину *ex vivo*. Для этого из периферической крови пациента можно выделить единичные Т-клетки, которые распознают необходимый антиген, или «обучить» их распознавать *ex vivo*. Что это значит на молекулярном уровне? То, что Т-клеточный рецептор, распознающий антиген, будет закодирован в геноме этой Т-клетки. Дифференцированные клетки имеют ограниченную возможность к пролиферации, а для их терапии нужно много. Можно репрограммировать их в иПСК, так как они могут пролиферировать неограниченно долго, годами, а геном сохраняется в том же виде, как и у исходной Т-клетки, с необходимой перестройкой Т-клеточного рецептора. Теперь дело за малым: дифференцировать пациент-специфические и антиген-направленные иПСК в цитотоксические или хелперные Т-клетки – и индивидуальная вакцина против определенного типа опухоли или патогена готова. Такие работы уже ведутся на экспериментальных животных (Vizcardo *et al.*, 2013).

## ЛИТЕРАТУРА

- Amps K., Andrews P.W., Baker J. *et al.* Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage // *Nat. Biotechnol.* 2011. V. 29. No. 12. P. 1132–1144.
- Encinas J., Michurina T.V., Peunova N. *et al.* Division-coupled astocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus // *Cell Stem. Cell.* 2011. V. 8. No. 5. P. 566–579.
- Jaenisch R., Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrate the intrinsic and environmental signals // *Nat. Genet.* 2003. V. 33. Suppl. P. 245–254.
- Jaenisch R., Young R. Stem cells, the the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming // *Cell.* 2008. V. 132. No. 4. P. 567–582.
- Lagarkova M.A., Shutova M.V., Bogomazova A.N. *et al.* Induction of pluripotency in human endothelial cells resets epigenetic profile on genome scale // *Cell Cycle.* 2010. V. 9. No. 5. P. 937–946.
- Philonenko E.S., Shutova M.V., Chestkov I.V. *et al.* Current progress and potential practical application of human pluripotent stem cells // *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2011. V. 292. P. 153–196.
- Romalhos-Santos M., Willenbring H. On the origin of the term «stem cell» // *Cell Stem. Cell.* 2007. V. 1. P. 35–39.
- Stadtfeld M., Hochedlinger K. Induced pluripotency: history, mechanisms and applications // *Genes Dev.* 2010. V. 24. No. 20. P. 2239–2263.
- Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell.* 2006. V. 126. P. 663–676.
- Vizcardo R., Masuda K., Yamada D. *et al.* Regeneration of human tumor antigen-specific T cells from iPSCs derived from mature CD8<sup>+</sup> T cells // *Cell Stem. Cell.* 2013. V. 12. P. 31–36.
- Waddington C.H. *Science and Ethics.* London: G. Allen and Unwin Ltd, 1942. 144 p.
- Yamanaka S., Blau H.M. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches // *Nature.* 2010. V. 45. P. 704–712.

УДК 575.82

## ЭВОЛЮЦИЯ ПУТЕМ ЕСТЕСТВЕННОГО ОТБОРА И ЕЕ АЛЬТЕРНАТИВЫ

© 2013 г. П.М. Бородин

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,  
e-mail: borodin@bionet.nsc.ru;  
Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,  
Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 28 мая 2013 г. Принята к публикации 1 ноября 2013 г.

### ВВЕДЕНИЕ

Эволюционную биологию преподавать трудно. Дарвиновская идея эволюции путем естественного отбора случайных наследственных отклонений встречает мощное сопротивление нашего разума по нескольким причинам.

1. Эволюция настроила наш разум таким образом, что он во всем пытается искать план, цель и смысл. Те особи, которые жили одновременно с нашими предками, но не обладали этой склонностью, проигрывали в приспособленности и потомков не оставили. Отсюда такая популярность конспирологических теорий. Нам трудно поверить, что метеорит падает на наш дом случайно, а не для того, чтобы нам навредить. Нам трудно поверить, что так сложно устроенные и так идеально приспособленные к среде обитания организмы могли возникнуть из простых форм путем естественного отбора случайных наследственных отклонений, а не были созданы для определенной цели по заранее продуманному плану. На этих наших вполне естественных предубеждениях базируются идеи «разумного плана».

2. Мы видим, как хорошо живые организмы приспособляются к изменению условий. Мы знаем, что упражнение мышц делает их более сильными и крупными. Обучение приводит к образованию полезных навыков. Мы склонны экстраполировать назад изменения, которые происходят у нас на глазах. Идея о том, что сложные инстинкты животных возникли за

счет обучения, а наследственные – адаптации – за счет физиологических приспособлений, кажется нам интуитивно верной. В этом причина живучести ламаркистских идей.

3. Наш разум – результат миллионов лет эволюции – хорошо справляется с минутами, часами и днями, с трудом воспринимает годы, а миллионы лет для него пустой звук. За краткие годы нашей жизни мир вокруг нас, конечно, меняется, но мыши остаются мышами, а воробьи – воробьями. Поэтому так привлекательна идея о неизменности видов. Нам трудно представить себе, что мыши и воробьи, а вместе с мышами и все млекопитающие (включая и нас с вами), а вместе с воробьями и все птицы, происходят от общего предка, который жил на Земле 324,5 млн лет назад (<http://www.timetree.org/>). Мышь и воробей так мало похожи друг на друга, что кажется невероятным их происхождение от

Дарвиновская идея эволюции путем естественного отбора наилучшим образом объясняет возникновение адаптаций, видообразование и возникновение более высоких таксонов (макрэволюцию). Она подтверждается всей совокупностью палеонтологических находок, результатами секвенирования геномов, исследованиями в области биологии развития и нейробиологии.

Преподавание эволюции в современных условиях должно учитывать естественные предубеждения студентов и массивную антидарвиновскую пропаганду.

этого самого общего предка за счет накопления мелких случайных различий. Наш разум не привык оперировать с долгими временами и мелкими различиями. Мы скорее поверим в большой скачок. Поэтому такой популярностью до сих пор пользуются сальтационистские идеи эволюции.

Наши студенты приходят к нам в аудитории со всеми перечисленными выше врожденными предубеждениями. Телевидение, радио, газеты и журналы, миллионы страниц Интернета неустанно работают против дарвиновской идеи эволюции. Каждый день мы слышим и читаем, что британские (японские, российские – нужно подчеркнуть) ученые доказали, что никакой эволюции нет, а если она есть, то идет скачками в заранее заданном направлении, и что вообще Ламарк был прав, а Дарвин заблуждался. Именно с этими представлениями приходят к нам студенты. А мы начинаем рассказывать им про уравнение Харди–Вайнберга, дрейф генов, правило Бергмана и модусы филэмбриогенеза. Они успешно сдают нам экзамены и живут дальше в гармонии со своими заблуждениями.

Преподавание эволюционной биологии радикальным образом отличается от преподавания анатомии и физиологии. Из 100 аргументов против дарвиновской идеи эволюции 99 начинаются словами «я не могу поверить, что...». Наша задача заключается в том, чтобы показать нашим студентам, что дарвиновская идея эволюции не является предметом веры. Она дает убедительное и непротиворечивое объяснение фантастического разнообразия почти идеально приспособленных живых существ. Она была высказана более полутора веков назад и с тех пор прошла бесчисленное множество очень строгих проверок фактами, полученными в результате наблюдений и прямых экспериментов. Именно этим она отличается от альтернативных точек зрения.

Противники дарвиновской идеи эволюции постоянно жалуются, что эволюция преподается безальтернативно. Давайте пойдём им навстречу и рассмотрим альтернативы. Лучше всего это делать не на уровне общих рассуждений, а на конкретных примерах.

Здесь будет представлено нескольких примеров из современной литературы, которые касаются трех ключевых проблем эволюцион-

ной биологии: возникновения адаптаций, видообразования и макроэволюции. Мы рассмотрим факты, дарвиновские объяснения этих фактов, а затем предложим студентам объяснить их с альтернативных точек зрения.

## ВОЗНИКНОВЕНИЕ АДАПТАЦИЙ

Эхолокация дельфинов и летучих мышей – один из самых поразительных примеров адаптации. Человечество пришло к идее радара только в 20-м веке. Трудно поверить в то, что слепой отбор случайных мутаций мог создать такое чудо техники. Сторонники идеи «разумного замысла» верят, что эхолокационные устройства были созданы по определенному плану. Дарвиновская идея эволюции не требует веры. Она объясняет наблюдаемые факты. При этом дарвиновские объяснения должны отвечать двум очень строгим ограничениям.

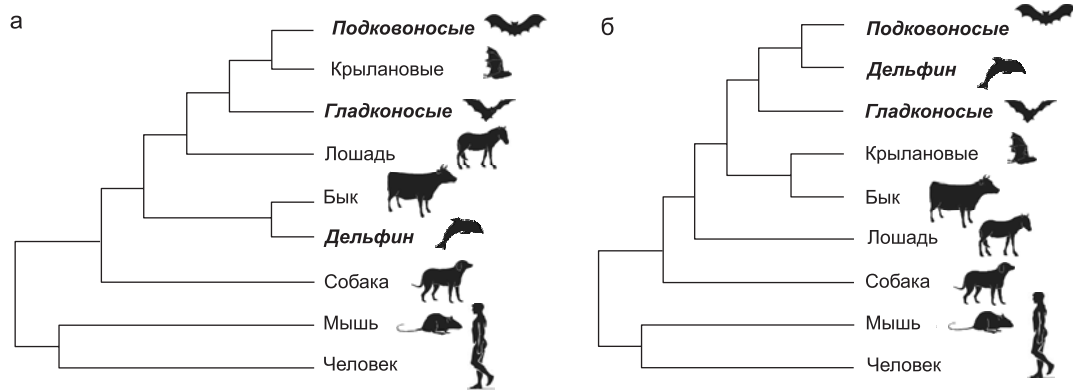
1. Новые функции не возникают *de novo*. Они складываются из мелких случайных изменений в уже существующих функциях.

2. Ни одно изменение не должно идти во вред его носителю.

Можно думать, что способность к эхолокации – это, наверное, измененная способность воспринимать звуки. Известно, что слепые люди способны ориентироваться по слуху. Известно также, что эта способность улучшается в результате упражнений. Так, может быть, прав Ламарк, и летучие мыши с дельфинами унаследовали эти улучшения от их усиленно тренировавшихся предков?

Мы не можем проследить, как это происходило, но, проанализировав современные виды, можем установить различия в устройстве систем восприятия звуков между «эхолокаторами» и животными, не способными к эхолокации.

Исследователи проанализировали последовательности генов, контролирующих синтез трех белков: Cdh23, Pcdh15 и Otof (Shen *et al.*, 2012). Эти белки участвуют в восприятии и передаче звукового сигнала. В анализ были включены дельфины, две группы видов летучих мышей, способных к эхолокации, и одна группа неспособных, а также коровы, лошади, собаки, мыши и человек. Оказалось, что эти последовательности, как и большинство последовательностей ДНК, в основном эволюционировали



**Рис. 1.** Филогенетические деревья гена *Otof* млекопитающих, построенные на основе сравнения нуклеотидных последовательностей (а) и на основе сравнения несинонимичных замен и последовательностей аминокислот (б).

Курсивом обозначены виды, способные к эхолокации, прямым шрифтом – не способные (модифицировано по: (Shen *et al.*, 2012. P. e1002788)).

в нейтральном режиме. Число синонимичных различий между видами было пропорционально времени их дивергенции, определенному по палеонтологическим находкам и по другим последовательностям ДНК (рис. 1, а). Однако в каждом из трех слуховых белков обнаружили позиции, по которым неродственные, но способные к эхолокации виды (дельфины и летучие мыши) были практически идентичны и сильно отличались от родственных каждому из них, но не способных к эхолокации видов (рис. 1, б). Всего было 58 таких позиций.

Теперь, когда мы знаем факты, попытаемся объяснить их с использованием дарвиновской идеи и ее альтернатив.

Дарвиновское объяснение выглядит следующим образом. В генах, отвечающих за синтез белков, от которых зависит восприятие звукового сигнала, постоянно возникают мутации. Синонимичные мутации, которые не затрагивают функцию белка, фиксируются в разных видах в результате дрейфа генов с примерно одинаковой скоростью. Несинонимичные мутации, грубо нарушающие функцию белка, отсеиваются стабилизирующим отбором. Несинонимичные мутации, слегка меняющие функцию белка, диапазон его реакций на звуковые волны разной длины, подхватываются движущим отбором. Чем короче длина волны, тем больше ее разрешающая способность и тем меньше энергии затрачивается на генерацию звука. При этом оказывается, что наилучшее восприятие ультразвука обес-

печивают строго определенные аминокислоты в строго определенных позициях этих белков. Они и фиксируются параллельно и независимо в разных филогенетических линиях.

Ламарковское объяснение предполагает наследование результатов упражнения. Упражнение слуха в данном конкретном случае подразумевает улучшение способности центральных анализаторов к фильтрации информативных сигналов от белого шума. Предложите студентам объяснить, каким образом такая тренировка может привести к тому, что в половых клетках тренирующихся особей произойдут направленные замены одних нуклеотидов на другие в генах, которые экспрессируются в сенсорных клетках внутреннего уха.

Сальтационная гипотеза предполагает, что новые органы и функции возникают за счет единичных макромутаций, ведущих к согласованному изменению существующих функций. В реальности мы наблюдаем последовательное и одновременное замещение нуклеотидов в 58 позициях.

Наконец, в рамках идеи «разумного замысла» мы должны допустить, что автор этого замысла случайно тасовал нуклеотиды в синонимичных позициях и старательно подбирал соответствующие несинонимичные замены. В чем же был его замысел? В том, чтобы снабдить одних своих созданий (дельфинов и летучих мышей) эффективным средством истребления других созданий (рыб и насекомых)?

## ВИДООБРАЗОВАНИЕ

В последнее время некоторые оппоненты дарвиновской эволюции смягчили свою позицию. Они перестали отрицать, что естественный отбор случайных мутаций обеспечивает локальные адаптации. Однако, по их мнению, все это – внутривидовые изменения: летучие мыши, хоть с эхолокацией, хоть без нее, остаются летучими мышами, а микроэволюция не ведет к образованию новых видов.

По поводу определения вида идут нескончаемые споры. Тем не менее большинство исследователей сходятся в признании продуктивности биологической концепции вида (Cooper, Orr, 2004). В рамках этой концепции образование нового вида определяется как возникновение репродуктивной изоляции. Взяв этот критерий за основу, мы можем обнаружить в научной литературе множество примеров незавершенного видообразования, т. е. когда видообразование происходит на наших глазах.

Один из таких примеров – видообразование у *Craseonycteris thonglongyai* – свиноносой летучей мыши (Puechmaille *et al.*, 2011). Ее еще называют мышь-шмель. Средний вес тела этого создания – 2 г. Этот вид населяет две географически изолированные территории. Одна популяция обитает в Мьянме, другая – на севере Таиланда. Они достоверно отличаются друг от друга по маркерам ядерного и митохондриального геномов. Время их дивергенции оценивается примерно в 400 тыс. лет. В настоящее время обмен генами между ними практически не происходит. Кроме того, эти две популяции различаются по частотным характеристикам звуков, которые они используют для эхолокации и коммуникации. Известно, что у летучих мышей звуковые характеристики являются основным критерием, по которому они отличаются своих от чужих. Дивергенция по этому признаку ведет к репродуктивной изоляции. Таким образом, популяции Мьянмы и Таиланда отвечают критериям видов: они репродуктивно изолированы и различаются по биологически важным признакам.

Анализ показал, как эти различия возникают из внутривидового разнообразия. Исследователи обнаружили в таиландской популяции, занимающей довольно протяженный

ареал, клинальные различия по частоте аллелей и по характеристикам сонограмм, т. е. по тем же признакам, что отличают ее от популяции, обитающей в Мьянме. Внутривидовые генетические и акустические различия были пропорциональны географическому расстоянию между локальными колониями летучих мышей. Более того, в образцах ДНК, собранных на краях ареала, где сонограммы проявляют наибольшие различия, исследователи выявили следы разнонаправленного движущего отбора в одном из генов эхолокации – *RBP-J*. Этот отбор мог быть обусловлен тем, что на разных краях ареала мышам-шмелям приходилось конкурировать за добычу с разными видами летучих мышей. Соответственно, успех приносили разные смещения режимов эхолокации.

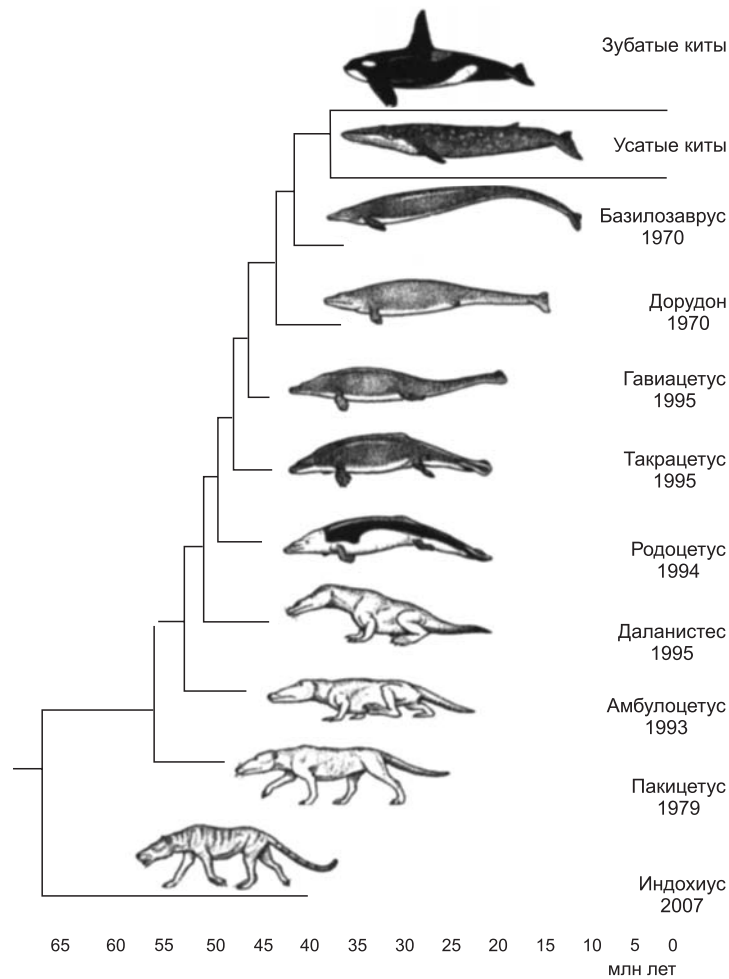
Таким образом, мы видим, как дивергенция внутри вида, обусловленная пространственной изоляцией и приспособлением к локальным условиям, со временем приводит к формированию репродуктивной изоляции и видообразованию. Мы также видим, что для объяснения этого процесса нам не нужно привлекать ни вмешательство потусторонних сил, ни внутреннее стремление летучих мышей к видообразованию, ни возникновение специальных «видообразовательных» макромутаций.

## МАКРОЭВОЛЮЦИЯ

Наиболее либеральные противники дарвиновской идеи эволюции соглашаются, что и видообразование может происходить по законам микроэволюции (мутации, отбор, дрейф генов). Однако они категорически утверждают, что для объяснения происхождения таксонов выше видового (родов, семейств, отрядов) эти законы неприменимы. Последователи идеи «разумного замысла» настаивают на неизменности высших таксонов. Сторонники сальтаций объясняют макроэволюцию макромутациями.

Рассмотрим дарвиновские и альтернативные объяснения макроэволюции на примере эволюции китообразных (рис. 2).

Палеонтологические находки 1990–2000-х годов позволили восстановить историю постепенного превращения мелких наземных парнокопытных в гигантов моря – китов (Thewissen *et al.*, 2009). Ископаемые остатки свидетель-



**Рис. 2.** Филогенетическое дерево китообразных по палеонтологическим данным.

Рядом с названием вида указано время его описания. Шкала в млн лет.

ствуют, что древний предок современных китообразных пакицетус, который жил около 50 млн лет назад, был обитателем прибрежной зоны. Он был ростом с собаку и весил около 20 кг. Его конечности были устроены по образцу копытных, а устройство внутреннего уха сближало его с современными китами.

Амбулоцетус — ходячий кит (45 млн лет назад) был ростом с морского льва, весил около 200 кг, имел довольно длинные конечности, хорошо приспособленные как для плавания, так и для хождения по дну, и длинный хвост, тоже полезный для плавания, хотя пока еще очень мало похожий на мощный хвостовой плавник кита. Родоцетус (43 млн лет назад) сделал следующий и уже необратимый шаг в море. Его конечности сильно уменьшились, а тазовый пояс практически отделился от позво-

ночника. И наконец, 40 млн лет назад появился базилозаврус. Его передние конечности уже полностью преобразовались в мощные плавники, но он еще сохранял тазовый пояс, а на его рудиментарных задних конечностях все еще были пальцы. Длина его тела достигала 15 м. Его массу тела оценивают от 7 до 70 т.

Можно ли объяснить эти преобразования с использованием того механизма микроэволюции, который нам известен — отбора случайно возникающих наследственных вариантов, или нам требуются иные законы?

Рассмотрим изменение размеров в линии китообразных от 20 кг до 7 т за 10 млн лет.

Могло оно произойти скачком за счет одной макромутации? Все, что нам известно сегодня о механизмах действия генов в развитии, противоречит этому допущению. За 100 лет



исследований спонтанных и индуцированных мутаций и 30 лет практики геной инженерии ничего подобного получить не удалось.

Упражнения, конечно, очень полезны для увеличения мышечной массы, но не в таких же пределах.

Способен ли отбор слабых наследственных отклонений увеличить массу тела с 20 кг до 7 т за 10 млн лет?

Воспользуемся классическим аппаратом генетики количественных признаков (Фолкнер, 1985). Если мы допустим, что смена поколений занимает 10 лет, коэффициент наследуемости по массе тела равен 0,5, а селекционный дифференциал равен средней массе тела в каждом поколении плюс 1 %, то при таких пессимистических допущениях мы получим ожидаемое значение не за 10 млн, а за 11740 лет (1174 поколения).

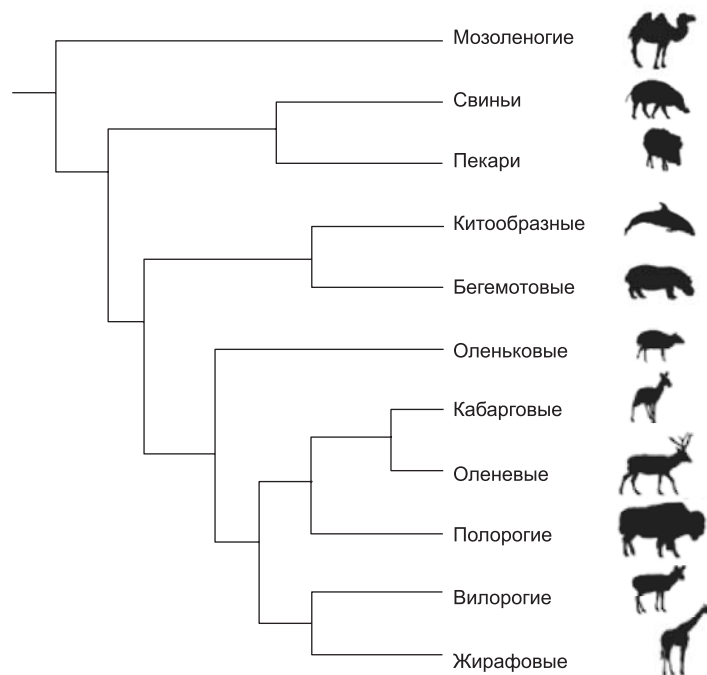
Попробуйте решить обратную задачу и рассчитать, какими должны быть значения селекционного дифференциала и коэффициента наследуемости, чтобы за 10 млн лет превратить пакицетуса в базилозавруса. Вы удивитесь, какими ничтожными окажутся эти значения.

Скорость эволюции количественных признаков измеряют в дарвинах (Haldane, 1949). Один дарвин равен натуральному логарифму измене-

ния признака за миллион лет. В этих единицах скорость изменения веса от пакицетуса до базилозавруса составила 8,55 дарвина. Много это или мало? Геометрическая средняя скорость изменений, достигнутых за счет искусственного отбора, составляет 60000 дарвинов (от 12000 до 200000), скорость изменений, происходящих при колонизации новых территорий, – 370 дарвинов (от 0 до 80000 (Gingerich, 1983)). Из этих данных следует, что в случае китов отбор действовал не в полную силу.

Теперь зададимся вопросом, можем ли мы доверять реконструкциям палеонтологов о происхождении китов от древних парнокопытных. Иными словами: есть ли какие-нибудь независимые свидетельства в пользу близкого родства китов и парнокопытных. Такие свидетельства есть. Они базируются на сравнении последовательностей ДНК.

За последние 25 лет опубликована большая серия работ, в которых разные последовательности ДНК китов сравнивались с гомологичными им последовательностями копытных (Price *et al.*, 2005; Kullberg *et al.*, 2006; Murphy *et al.*, 2007). Эти сравнения дали поразительный результат: оба подотряда китообразных отличаются от бегемотов – представителей



**Рис. 3.** Филогенетическое древо китопарнокопытных, построенное на основе сравнения последовательностей ДНК (модифицировано по: (Price *et al.*, 2005. Р. 445–473)).

одного-единственного семейства парнокопытных – меньше, чем остальные семейства парнокопытных отличаются друг от друга. Иными словами, молекулярно-генетические данные свидетельствуют, что киты вовсе не произошли от парнокопытных: они остались в пределах отряда парнокопытных! Теперь этот отряд называется – китопарнокопытные.

Свидетельства родства китов с парнокопытными мы находим в их анатомии и эмбриологии. У китов, как и у всех остальных млекопитающих, начинают развиваться зачатки задних конечностей. Остановка их развития и дегенерация происходят у дельфинов на пятой неделе эмбрионального развития. Было показано, что остановка в развитии обусловлена отсутствием в зачатке задней конечности белка Sonic hedgehog (Shh), одного из важнейших морфогенов. В свою очередь, Shh не экспрессируется в данной зоне потому, что там отсутствует его регулятор Hand2 (Thewissen *et al.*, 2006).

Эти нарушения не связаны с утратой самих генов. Никаких макромутаций здесь не происходило. Данные палеонтологии показывают: редукция тазового пояса происходила постепенно. При переходе к водному образу жизни естественный отбор перестал строго контролировать развитие полноценных задних конечностей. Это привело к накоплению мутаций в регуляторных районах генов, вовлеченных в контроль развития задних конечностей.

Поразительно сходно по механизму, хотя и в совершенно другом направлении, шла эволюция передних конечностей у летучих мышей. Естественный отбор на увеличение длины пальцев передней конечности привел к тому, что у эмбрионов расширилась (по сравнению с лабораторными мышами) зона активности Shh в почке конечности, а затем возникла вторая волна индукции этого морфогена, но уже в районе развивающихся фаланг (Hockman *et al.*, 2008).

Таким образом, вся совокупность фактов, накопленных разными науками: палеонтологией, молекулярной генетикой и генетикой развития – убедительно свидетельствует о том, что макроэволюция китообразных получает исчерпывающее объяснение в рамках дарвиновской идеи эволюции. Напротив, все альтернативные объяснения сталкиваются с непреодолимыми трудностями.

Данные палеонтологии показывают, что процесс шел постепенно, а не путем скачков. Хромосомные перестройки, которые сторонники сальтационизма называют системными мутациями, крайне редко фиксировались в филогенетической линии китообразных: гораздо реже, чем во всех остальных линиях данного отряда. Если в эволюционной линии свиней и пекарей скорость фиксации была 1,76 перестроек за 1 млн лет, то в линии китов она была в 25 раз меньше – 0,07 перестроек за 1 млн лет (Kulemzina *et al.*, 2009).

Казалось бы, сторонникам ламаркизма история с китами должна нравиться. Действительно, копытные, перейдя к водному образу жизни, перестали упражнять задние конечности и они у них, как и следовало ожидать, атрофировались.

Однако, как только мы начинаем разбирать детали этого процесса в рамках идеи наследования приобретенных признаков, несостоятельность ламаркизма становится очевидной. Не существует механизмов трансформации неупражнения конечностей у взрослых животных в наследуемые изменения экспрессии генов, вовлеченных в дифференцировку зачатка конечности у их эмбрионов.

Попытайтесь рассмотреть данные по палеонтологии, эмбриологии, сравнительной анатомии и молекулярной генетике китообразных с точки зрения идеи разумного замысла. Что разумного в том, чтобы создавать обитателей моря на основе копытного прототипа? Зачем было создавать сначала прибрежные, затем полуводные и, наконец, водные варианты, что мешало создать китов сразу в том виде, как они есть сейчас? Что разумного в плане развития, который предусматривает сначала формирование, а затем дегенерацию задних конечностей у всех китов, сначала закладку, а потом резорбцию зубов у усатых китов? Если это называется разумным планом, то что тогда называть безумным планом?

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На этих нескольких примерах я попытался показать вам объяснительную силу дарвиновской идеи эволюции и слабость альтернативных объяснений. Этот подход мне кажется весьма продуктивным в современной ситуации. Преподавателю эволюции приходится работать

против неверных суждений об эволюции, уже сложившихся у студентов и распространяемых средствами массовой информации. Мы не можем делать вид, что этих заблуждений не существует. Мы должны показать, что именно дарвиновская идея эволюции наилучшим образом объясняет потрясающее разнообразие изумительно приспособленных живых организмов. Она подтверждается все новыми и новыми палеонтологическими находками, результатами секвенирования геномов, исследованиями в области биологии развития и нейробиологии.

Мы должны показывать нашим студентам блеск и нищету альтернативных гипотез. Блеск их обычно проявляется в элоквентной критике дарвиновской идеи эволюции, в провозглашении глобальных принципов, в апелляциях к Платону, Аристотелю и Блаженному Августину, в терминологии с греческими корнями. Как только мы отвлекаемся от высоких материй и просим объяснить реальные факты, нищета альтернатив становится очевидной.

### ЛИТЕРАТУРА

- Coyne J.A., Orr H.A. Speciation: Sinauer Associates Sunderland, MA, 2004.
- Gingerich P.D. Rates of evolution: effects of time and temporal scaling // *Science*. 1983. V. 222. P. 159–161.
- Haldane J.B.S. Suggestions as to quantitative measurement of rates of evolution // *Evolution*. 1949. P. 51–56.
- Hockman D., Cretokos C.J., Mason M.K. *et al.* A second wave of Sonic hedgehog expression during the development of the bat limb // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. P. 16982–16987.
- Kulemzina A.I., Trifonov V.A., Perelman P.L. *et al.* Cross-species chromosome painting in Cetartiodactyla: reconstructing the karyotype evolution in key phylogenetic lineages // *Chromosome Res.* 2009. V. 17. P. 419–436.
- Kullberg M., Nilsson M.A., Arnason U. *et al.* Housekeeping genes for phylogenetic analysis of eutherian relationships // *Mol. Biol. Evol.* 2006. V. 23. P. 1493–1503.
- Murphy W.J., Pringle T.H., Crider T.A. *et al.* Using genomic data to unravel the root of the placental mammal phylogeny // *Genome Res.* 2007. V. 17. P. 413–421.
- Price S.A., Bininda-Emonds O.R., Gittleman J.L. A complete phylogeny of the whales, dolphins and even-toed hoofed mammals (Cetartiodactyla) // *Biol. Rev.* 2005. V. 80. P. 445–473.
- Puechmaile S.J., Gouilh M.A., Piyapan P. *et al.* The evolution of sensory divergence in the context of limited gene flow in the bumblebee bat // *Nat. Commun.* 2011. V. 2. P. 573.
- Shen Y.-Y., Liang L., Li G.-S. *et al.* Parallel evolution of auditory genes for echolocation in bats and toothed whales // *PLoS Genet.* 2012. V. 8. P. e1002788.
- Thewissen J., Cooper L.N., George J.C., Bajpai S. From land to water: the origin of whales, dolphins, and porpoises // *Evol. Edu. Outreach.* 2009. V. 2. P. 272–288.
- Thewissen J.G.M., Cohn M.J., Stevens L.S. *et al.* Developmental basis for hind-limb loss in dolphins and origin of the cetacean bodyplan // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. P. 8414–8418.

### ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Бородин П.М. «Происхождение видов...». 150 лет спустя // *Информ. вестник ВОГиС*. 2009. V. 13. P.
- Докинз Р. Самое грандиозное шоу на земле: доказательства эволюции. М.: Астрель: Corpus, 2012 г.
- Марков А.В. Антидарвинизм как симптом интеллектуальной деградации (размышления, навеянные дарвиновским юбилеем) // *В защиту науки*. 2009. Т. 6. P. 24–30.
- Марков А.В. Рождение сложности. М.: Астрель: Corpus, 2010.
- Фолкoner Д.С. Введение в генетику количественных признаков. Агропромиздат, 1985.
- Циммер К. Эволюция. Триумф идеи. М.: Альпина нон-фикшн, 2011 568 с.

### ИСТОЧНИКИ В ИНТЕРНЕТЕ

- Антропогенез.РУ: Эволюция человека.  
<http://antropogenez.ru/>
- Библиотека публикаций (в том числе учебников) по эволюционной биологии  
<http://evolbiol.ru/>
- Конспект лекций А.В. Маркова  
<http://evolbiol.ru/nes01.htm>
- Сочинения студентов НГУ по книге Ч. Дарвина «Происхождению видов».  
<https://sites.google.com/site/darwinupdated/>
- Элементы науки. Постоянно обновляющиеся обзоры новостей эволюционной биологии  
<http://elementy.ru/>
- Оценка времени дивергенции между любыми двумя современными видами живых организмов  
<http://www.timetree.org/>

УДК 591.612:57.024:575.82

## ДОМСТИКАЦИЯ КАК САМОЕ РАННЕЕ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЕ ДОСТИЖЕНИЕ ЧЕЛОВЕЧЕСТВА

© 2013 г. **О.В. Трапезов**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,  
e-mail: trapezov@bionet.ru

Поступила в редакцию 10 мая 2013 г. Принята к публикации 1 ноября 2013 г.

И сказал мне Ангел: что ты дивишься?  
Я скажу тебе тайну зверя.

*Откр. 17:7*

### КОГДА НАЧАЛОСЬ ОДОМАШНИВАНИЕ ДИКИХ ЖИВОТНЫХ?

Около 15 тысячелетий назад, не зная понятия «эксперимент» и вообще располагая довольно ограниченным запасом слов, человечество приступило к величайшему биологическому опыту. Речь идет об одомашнивании животных и растений (доместикации) как процессе их исторического преобразования из диких в домашние. Это был первый этап науки и технологии в истории человечества, обеспечивший человека мощными продуцентами – породами животных, сортами растений и штаммами микроорганизмов.

И хотя сегодня достижения научно-технического прогресса значительно расширили рамки человеческих возможностей, тем не менее, механизмы этого процесса во многом загадочны, до сих пор они бросают вызов научной мысли.

Ученые прибегают к помощи всесильной генетики, но даже изученные ныне генетические механизмы не в состоянии пока ответить на вопросы: почему столь высоки темпы изменения домашних животных, откуда такое невообразимое количество их пород? Проблема остается открытой, хотя в свое время именно она привлекла внимание Ч. Дарвина и послу-

жила одним из стимулов к созданию теории естественного отбора.

Вопрос о том, когда началось одомашнивание диких животных, поднимается давно (Афанасьев, 1968, 1972). Чтобы на него ответить, необходимо обратиться к событию 15-тысячелетней давности; когда ледяной покров в Северном полушарии начал таять и уступать место лесам и степям; когда в убогих первобытных стойбищах, заваленных костями и другими отбросами, уже маячили тени предков домашних собак, а вокруг поселений начали складываться синантропная флора и фауна. Это пришлось на завершающий этап палеолитической эпохи – финал плейстоцена и ранние стадии голоцена, и венчающий докерамический период человеческой истории. Именно этот период относят к началу «неолитической революции» – переходу от собирательства и охоты к доместикации диких животных и растений, ведь 99,5 % времени из почти 2 млн лет пребывания на Земле человек занимался охотой и собирательством (Массон, 1996; Токарева, Чубур, 1997).

С той давней поры дикий животный и растительный мир является ареной нескончаемых экспериментов по одомашниванию, позволивших создать более 6 200 пород различных видов животных, а число сортов основных распространенных культурных растений (пшеницы, риса, кукурузы, бананов, хлопчатника и др.)

оценивается в сотни и даже тысячи по отдельным видам. Так, например, существует более 4000 сортов пшеницы, еще более значительно число сортов декоративных растений – тюльпанов, гладиолусов, бугенвиллий, роз и др. (The Global Strategy ..., 1999).

Поэтому происхождение домашних животных, как и происхождение культурных растений, уже более полутора веков является традиционной главой эволюционной биологии.

Считается, что переход от собирательства к возделыванию растений (их доместикации) произошел в мезолите (Bar-Yosef, 2002; Гончаров и др., 2007). Но если пересчитать число введенных в культуру растений и животных, живущих сейчас рядом с человеком и так или иначе служащих ему, то удивительно, как мало их одомашнено! На сегодня всего около 40 видов доместицированных растений обеспечивают наш основной белковый и энергетический баланс и только 8 видов основных злаковых растений составляют 66 % продовольственного потенциала человечества. Из многих сотен тысяч видов высших растений в настоящее время доместицировано в целом порядка 200 (Шумный, 1999).

Животных одомашнено также немного. Из многочисленных хищных представители лишь двух семейств – собака и кошка; непарнокопытных тоже два – осел и лошадь; парнокопытных и мозолоногих больше – корова, коза, овца, свинья, як, верблюд, лама, буйвол, олень; из зайцеобразных – лишь кролик; два насекомых – шелковичный червь и пчела; два обитателя вод – карп и золотая рыбка; более всего птиц – куры, утки, гуси, индюшки, цесарки, голуби, канарейки, японский перепел.

В течение XX века началась доместикация пушных зверей: лисиц, песцов, енотовидных собак, норок, хорьков, соболей, нутрий, сурков, шиншиллы (Колдаева, 2007).

Все эволюционные последствия одомашнивания наиболее ярко видны на примере собак, ископаемые костные останки которых оцениваются в 12–15 тыс. лет тому назад (Clutton-Brock, 1999; Savolainen, 2006). Достоверность нахождения истинно собачьих останков увеличивается начиная с 9 тыс. лет до н. э. – с этого времени их уже находят по всему миру. Собака – не только первый одомашненный вид, ее также

справедливо считают вершиной эволюционных преобразований, которым подверглись домашние животные. Поэтому характеризовать доместикацию как эволюционную научную проблему и иллюстрировать разные аспекты ее решения нагляднее всего на собаках (Трут, 2007).

В первую очередь глубокое наследственное преобразование у собак претерпело поведение: исчезли злобное отношение к человеку и страх перед ним, все поведение их основывается на доверии, привязанности и преданности. Собака приобрела целый комплекс новых способов коммуникации с человеком, уникальную способность понимать социальные сигналы человека (жесты, взгляды, слова) и использовать эти социальные подсказки в процессе адаптации к антропогенной среде. Возникла также широкая изменчивость других форм поведения, благодаря которым собаки работают пастухами, сторожами, охотниками, несут службу в уголовном розыске, помогают инвалидам быть социально адаптированными (Postel-Vinay, 2004).

Как удалось человеку оторвать от древа волчьей природы росток и «вынянчить» из него собаку – антагониста волка и верного друга людей? Что сделало собаку такой? Что происходило в течение ее тысячелетней эволюции? Ведь мутационная скорость большинства функциональных генов оценивается как  $10^{-5}$  мутаций на гамету на поколение (Hartl, Clark, 1997). Весьма дискуссионна и роль стохастических процессов в создании огромного разнообразия пород собак.

## О ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К ДОМЕСТИКАЦИИ И СЦЕНАРИИ ДОМЕСТИКАЦИИ

Существуют разные сценарии начала доместикации. В одних из них инициатива одомашнивания принадлежала человеку, на самых начальных этапах исторической доместикации диких животных решающую роль играл бессознательный отбор: человек сохранял наиболее контактных животных и пренебрегал другими без осознанного намерения изменить генетическую природу животных (Wistmann, 1977). В других мыслимых сценариях отдельные представители диких животных сами начинали осваивать новую экологическую нишу вблизи стоянок первобытного человека, т. е. происходи-

ла их «самодоместикация». Но каким бы ни был исторический сценарий начала domestikации, вполне вероятно, что это были достаточно редкие, не проявлявшие агрессивности к человеку или страха особи (Трут, 2007).

Многие исследователи процесса domestikации придавали большое значение поведения животных для их успешного одомашнивания. В условиях неволи, при которых животное оказывается на расстоянии вытянутой руки человека, способность адаптироваться к его присутствию является наиболее важным фактором. Вероятно, одним из широко применяемых прямых и эффективных способов осуществления самых первых шагов domestikации явилось пленение детенышей диких животных, у которых формировалась сильная привязанность к человеку в критические периоды импринтинга или социализации. Косвенным подтверждением этой мысли может служить предположение, основанное на наблюдении Ч. Дарвина о том, что первобытные люди во всех частях света могли без труда успешно приручать и выращивать диких животных (Дарвин, 1951. С. 759). В то же время бесспорно и то, что на самых начальных этапах domestikации решающую роль играл бессознательный отбор.

Изучение ранней domestikации традиционно основывается на косвенных данных. Основным источником для него служат археологические и культурно-исторические материалы, по которым трудно воссоздать начальный период одомашнивания. И все же смоделировать процесс domestikации в длительных экспериментах возможно, при вовлечении в него новых видов. При этом главным критерием возможности одомашнивания изначально дикого вида будет служить успешность его размножения в новой для него стрессующей антропогенной среде, когда дистанция между диким животным и человеком сокращается до расстояния вытянутой руки. Ведь в природной среде поведение диких животных при контакте с человеком характеризуется, как правило, «дистанцией избегания» (Geist, 1971).

Какие зримые черты сопровождают процесс domestikации животных? *Все одомашненные животные в той или иной степени изменили форму тела, окраску и поведение. Даже начальная стадия одомашнивания сразу что-то*

*меняет в облике животных.* Похож ли дикий белый карась на красного цвета рыбу вуалехвост, уже не способную выжить в среде, где обитает его дикий родственник. В окраске домашних животных обычно наблюдается неправильное распределение пятен различного цвета. Этого никогда не бывает у диких животных, у которых либо однотонная окраска, либо строго закономерное распределение седины в виде «серебра», полос или пятен. Однотонная окраска диких животных оказывается генетически весьма сложно обусловленной, и в основе ее развития лежит чрезвычайно сложный механизм, закономерно распределяющий различные пигменты по длине волоса. При одомашнивании диких животных в ряду поколений идет ускоренное накопление мутаций, приводящее к дезорганизации этого механизма, что обуславливает появление на их волосяном покрове пегостей. Некоторых домашних животных селекционная фантазия человека настолько «изуродовала», что в их облике трудно уловить черты дикого предка.

Возникает вопрос: что представляет собой способность или предрасположенность диких видов к domestikации? Определяется ли она только генетически, или животные, плененные в раннем возрасте, импринтируются путем ассоциации себя в определенном сообществе (Дарвин, 1951. С. 759)?

Следует уделить внимание рассмотрению поведения как одного из важнейших механизмов взаимодействия организма со средой. В начале адаптационного процесса именно поведение играет наиболее существенную роль. Первой попыткой адаптации организма к изменившимся условиям биотической или абиотической среды практически всегда является поведенческая реакция.

Для анализа генетических эффектов domestikации на поведение (так же, как и на другие морфологические и физиологические признаки) используются в основном два подхода: 1) сравнение существующих диких и домашних представителей определенных видов; 2) прослеживание в ряду поколений изменений в популяциях диких животных, попавших в условия разведения в неволе без направленного отбора по поведению.

Сравнение нынешних домашних животных с их дикими сородичами недостаточно надежно,

поскольку не до конца выяснена родословная большинства доместицированных видов (Numms, 1972). К тому же некоторые дикие предки ныне существующих домашних видов вымерли. Даже если и существует дикая предковая популяция, ее фенотипические характеристики невозможно экстраполировать на весь вид, а существование огромного количества пород одомашненных видов и географическое разнообразие существующих популяций осложняют выбор представителей для сравнительного изучения (Betty, 1978). Хотя к настоящему времени накоплен большой экспериментальный материал, пока нет достаточного объема информации о том, как происходили формообразовательные процессы в ходе доместикации, в лучшем случае только выявлены различия между дикими и домашними популяциями (Price, 1984).

В противоположность сравнительному методу пролонгированный подход при разведении в условиях неволи изъятых из природных популяций особей диких видов способен дать больше информации относительно эффектов доместикации и тех генетических механизмов, которые сопровождают ее ход. При этом открывается возможность регистрации изменений поведения и других фенотипических свойств в ряду поколений, для того чтобы выяснить, с какой скоростью идет доместикация при разных векторах искусственного отбора (Connor, 2005).

Наиболее показательным примером пролонгированного подхода является история доместикации пушных зверей, из которой известно, чем руководствовались первые звероводы, чтобы ответить на вопросы: какие звери были взяты человеком в культуру первыми? – Это были красные лисицы, которых начали содержать в неволе еще в XVII веке монахи Соловецкого монастыря. Где шел отбор? – Он связан с центрами доместикации лисиц, песцов, норок, соболей и нутрий в Северной Америке и России. С какой скоростью шел отбор? – Он связан с темпами доместикационных преобразований различных видов одомашниваемых пушных зверей, подробно зафиксированными в племенных книгах. Точно известно, по каким признакам преимущественно шел отбор, каковы его темпы, интенсивность, напряженность и направление (Афанасьев, 1968, 1972).

В дополнение к пролонгированному подходу в исследовании процесса доместикации была предпринята попытка выделить «гены доместикации», под которыми понимались плейотропные эффекты на поведение генов, затрагивающих окраску волосяного покрова. К примеру, было обнаружено, что ручное поведение у содержащихся в условиях вивария норвежских крыс связано с рецессивным аллелем *neaguti* (*black*), гомозиготность по которому обеспечивает лучшую приручаемость по сравнению с крысами *aguti* (Keeler, 1942). Позже этот же эффект был зафиксирован у лисиц разных окрасочных форм, выращиваемых в условиях звероводческих ферм. Было показано, что дистанция избегания, проявляемая по отношению к человеку лисицами, была обратной по отношению к количеству мутантных аллелей окраски в генотипе (Keeler, 1975).

В последние годы достигнут прогресс в исследованиях молекулярных механизмов доместикации.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА ДОМСТИКАЦИИ

Чарлз Дарвин (Darwin, 1859; Дарвин, 1867) говорил, что доместикация – это гораздо большее, чем обычное приручение диких животных, попавших в условия пленения. Одомашнивание – это не только разведение животных в неволе, помимо целенаправленной работы и бессознательного отбора животных, оно часто сопровождается увеличением показателей размножения, изменением пропорций органов и частей тела; у домашних животных вырабатываются сложные формы поведения; они беспрекословно подчиняются человеку и служат ему: например собаки могут пасти стада, охотиться, выслеживать, сторожить. По этим критериям все, что мы видим на животноводческих фермах или на сельском подворье, – существа домашние, в том числе и пчелы.

Со временем, уже в 1875 г., Дарвин рассматривает доместикацию как форму эволюционного процесса или видообразования, где большую роль играет искусственная, а не естественная селекция.

После Дарвина целая плеяда исследователей, отечественных и зарубежных, пытались

дать определение понятию «одомашнивание», исследуя палеонтологические и культурно-исторические материалы, проводя сравнение домашних животных с ныне живущими в природе их дикими сородичами.

Первая русская монография «Происхождение домашних животных» выпускника Московского университета, (сына зоолога и антрополога А.П. Богданова) биолога и животновода Еллия Анатольевича Богданова (1872–1931) вышла в 1914 г. в книгоиздательстве студентов Московского сельскохозяйственного института (Богданов, 1914). Следом в 1916 г. под таким же названием («Происхождение домашних животных») выходит книга крупнейшего русского генетика XX в., основателя первой в России кафедры генетики приват-доцента Санкт-Петербургского университета Юрия Александровича Филипченко (1882–1930) (Филипченко, 1916).

Для того чтобы дикое животное сделалось домашним, оно должно оставаться плодовитым при резко изменившихся условиях существования: в условиях специфического кормления, ограниченности занимаемой территории, снижения двигательной активности, а главное, в условиях присутствия человека на коротком расстоянии (Zeder, 2006). Иными словами, одомашнивание представляет собой процесс, при котором популяция животных адаптируется к антропогенной среде посредством комбинации генетических изменений (Ratner, Voice, 1975).

Американский генетик из Гарвардского университета Clyde Edgar Keeler (1900–1994) видел в процессе одомашнивания эффекты так называемых «*генов одомашнивания*» у отдельных особей в дикой популяции, под которыми понимаются плейотропные эффекты на поведение генов, затрагивающих окраску меха. В 1940-е, 1960-е и 1970-е годы он проводил большие исследования на американских зверофермах по выяснению связи между окраской меха и предрасположенностью к одомашниванию у лисиц, песцов и норок (Keeler, 1975).

В дальнейшем исследователи выделили следующие эффекты одомашнивания.

1. В основе всех изменений одомашниваемых диких животных лежит отбор, производимый исключительно по воле человека.

2. Наиболее важным признаком, приведшим к «ключевым» изменениям одомашниваемых

животных, является успешность размножения в антропогенных условиях. Примером тому служат результаты более чем полувекового разведения в неволе серебристо-черных лисиц. Если в 1933 г. их потенциальная плодовитость составляла 4,93 щенка на одну самку, то к 2003 г. она возросла в два раза и достигла  $7,91 \pm 0,66$  желтых тел беременности (Чекалова, 2007). Показатели размножения совсем еще недавно дикого соболя в условиях клеточного разведения изменились еще значительно: если в 1932 г. количество зарегистрированных щенков на одну основную самку составило всего лишь 0,03 щенка, то через 5 лет – 1,62, а в 1940 г. – почти 2 щенка (Казакова, Докукин, 2003). В 2006 г. показатели размножения по салтыковскому типу соболей достигли почти 2,9 щенка (Сайдинов, 2008).

3. У одомашниваемых животных резко усиливаются темпы и размах изменчивости по самым разным признакам.

4. В ходе одомашнивания регистрируется появление *de novo* признаков, не встречавшихся в прежней эволюционной истории, но гомологичных по своему характеру с ранее одомашненными видами (рис. 1).

5. Появление эффекта ювенилизации развития, проявляющейся в сохранении во взрослом состоянии признаков, свойственных молодым растущим особям. Такое сохранение ювенильных признаков у взрослых особей в биологии называют неотенией. Так, в многолетнем одомашнивательном эксперименте Д.К. Беляева и Л.Н. Трут показано, что сдвиги временных параметров развития при отборе на приручаемость носят неотенические черты: замедляется развитие некоторых поведенческих и соматических признаков (сохранение щенячьего поведения во взрослом состоянии, висячие щенячьи уши у взрослых животных, свернутый в кольцо хвост, расширенная и укороченная мопсообразная морда) при ускоренном половом созревании (Трут, 2007).

В анализе процессов стихийной промышленной одомашнивания *серебристо-черных* лисиц зафиксировано, что в фермерских популяциях этих пушных зверей постоянно возрастает доля половозрелых особей с «нежной» конституцией, сохраняющих экстерьер, свойственный молодым неполовозрелым лисятам 2–4-месячного





**Рис. 1.** В ходе доместикации американской норки регистрируется появление *de novo* окрасочных новшеств доминантной и полудоминантной природы, не встречавшихся в прежней эволюционной истории этого вида.

Слева – норка стандартной окраски дикого типа; справа – норка, несущая полудоминантную мутацию окраски меха.

возраста (Шумилина, 2007). Показано, что в ходе промышленной доместикации американских норок (она составляет уже 75 генераций) четко регистрируется неотенический эффект в виде задержки развития: у норчат в фермерских популяциях в сравнении с дикими сородичами половой диморфизм по живой массе тела обнаруживается на 40 дней позже – лишь в 50-дневном возрасте (Федорова, 2009).

Еще в 1933 г. Н.К. Кольцов в своей статье «Проблемы прогрессивной эволюции» показал широкую распространенность явлений неотении в животном царстве, а спустя 10 лет специалист по эволюционной морфологии и филогении высших растений А.Л. Тахтаджян показал роль неотении в происхождении высших растений, в том числе и цветковых (Кольцов, 1933; Тахтаджян, 1943). Неотения как механизм доместикации выявлена у таких важнейших для человечества хлебных злаков, как пшеница, одомашненные формы которой характеризуются наследственно закрепленной незавершенностью онтогенеза, его остановкой на одной из поздних фаз развития. Так, у

одомашненных голозерных видов пшеницы образование отдельного слоя в сочленениях колосового стержня прекращается в самом начале, колос при последующем созревании оказывается настолько прочным, что обеспечивает его неосыпаемость. А слабая суберинизация клеточных оболочек дерматогена колосковых чешуй обеспечивает легкий вымолот зерновок (Goncharov *et al.*, 2008).

6. У одомашниваемых животных появился так называемый «доместикационный синдром» – чрезмерное развитие у них некоторых полезных для человека признаков (Hammer, 1984). Несмотря на относительно короткие по эволюционным меркам временные сроки, разводимые в неволе пушные звери значительно отличаются по структуре опушения, окраске меха, размеру тела и морфологически от своих диких прародителей (см. рис. 1). Большинство признаков одомашниваемых пушных зверей, так ценимых человеком, в естественных условиях бесполезны для диких, более того, даже вредны.

В литературе, особенно зарубежной, признаки или их выраженность, по которым одомаш-

ненные виды отличаются от диких, называют «признаками, обусловленными domestikацией» (domestication related traits) (Ross-Ibarra, 2005).

7. У одомашненных животных утрачивается сезонность размножения, исчезает зависимость от фотопериодических условий, отсутствует приспособленность к определенному ритму суточной активности.

8. Среди одомашниваемых пушных зверей клеточного разведения (их domestikация насчитывает около 100 лет) американская норка (*Mustela vison* Schreber, 1777) в короткие исторические сроки не только распространилась с территории Северной Америки по странам северного полушария: США, Канаде, Европе, России, Монголии, Китаю, Японии, но и проникла в умеренную зону южного полушария: Аргентину, ЮАР (Mink Production, 1985). Она заняла в Евразии пространство от Ирландии до Камчатки; от Мурманского Заполярья до Узбекистана и Китая. Подобную распространённость при domestikации получили и сорта культурных растений. Так, голозерный гексаплоидный вид *мягкая пшеница* ( $2n = 42$ ) заполнил все континенты, кроме Антарктиды. Она возделывается на всем пространстве от Северного полярного круга (в Скандинавии) до Огненной Земли и поднялась в Гималаях до высоты 4 тыс. метров над уровнем моря и служит одной из основных продовольственных культур для трети населения планеты. Только тропическая зона разрывает на две части сплошной ареал пшениц, приуроченный к умеренным климатическим поясам обоих полушарий.

### ШКОЛА АКАДЕМИКА Д.К. БЕЛЯЕВА

В конце 1950-х–начале 1960-х годов под руководством академика Д.К. Беляева (1917–1985) в Новосибирске формируется школа, заложившая принципиально новое направление в изучении генетико-эволюционных механизмов domestikации. Была предложена новая парадигма – новый оригинальный подход, позволяющий ускорить темпы одомашнивания, соизмерив их с продолжительностью человеческой жизни, и благодаря этому увидеть исходные моменты в domestikационных преобразованиях диких животных (Беляев, 1972, 1974, 1979, 1981, 1983; Belyaev, 1969, 1979). Благодаря уникальному экс-

перименту по воспроизведению самого процесса domestikации и важным эволюционным выводам, которые были сделаны на основе анализа этих экспериментов, имя Д.К. Беляева вошло в историю мировой биологической науки.

Биологическую сущность domestikации Беляев рассматривал, прежде всего, как *наследственное изменение поведения* животных в условиях разведения в неволе (без этого domestikация немыслима), а многие морфофизиологические преобразования домашних животных – как коррелированные ответы на эти изменения. Коль скоро изменение поведения животных в процессе одомашнивания явилось результатом отбора, то можно говорить о *генетической компоненте*, лежащей в основе domestikации (Belyaev, Khvostova, 1974). Однако при этом Беляев имел в виду не те тривиальные коррелированные ответы, которые наблюдаются при отборе по любому количественному признаку и которые вполне объяснимы в традиционных рамках количественной генетики (Falconer, 1960, 1981). Он предполагал, что в условиях domestikации существенную роль играет наследственное изменение поведения, при котором происходит элиминация комплекса эмоционально отрицательных, агрессивных реакций на человека, свойственных диким животным, и наследственно формируются эмоционально положительные реакции на него, характерные для домашних животных. Он говорил о тех законах коррелятивной изменчивости, которые Ч. Дарвин с особенной ссылкой на domestikацию называл «таинственными» (Дарвин, 1951. С. 53) по той причине, что они вызывают слишком сложную цепь биологических последствий (Belyaev, 1969, 1979). В 15-м издании Британской энциклопедии (Encyclopaedia Britannica. Стр. 936–942) Д.К. Беляевым дано определение понятия «domestikация» (Belyaev, Khvostova, 1974). Это же определение domestikации изложено в докладе Д.К. Беляева «Дестабилизирующий отбор как фактор изменчивости при domestikации», сделанном им на XIV Международном генетическом конгрессе и опубликованном в журнале американской генетической ассоциации «The Journal of Heredity» (Belyaev, 1979).

К работе по экспериментальному воспроизведению процесса domestikации Д.К. Беляев

приступил в начале 1950-х годов, избрав в качестве объекта серебристо-черных лисиц. Опорной базой для первых опытов послужило одно из звероводческих хозяйств Эстонии – «Кохила» (впоследствии «Салатагузе»), где Дмитрий Константинович встретил не только понимание, но и активнейшую поддержку со стороны всего коллектива и особенно главного зоотехника Нины Федоровны Сорокиной (Беляев, Ивонин, 1951). А в полном объеме отбор животных по поведению развернулся в 1958 г. в зверосовхозе «Лесной» Алтайского края с последующей передислокацией уникального поголовья лисиц на специальную экспериментальную звероферму Института цитологии и генетики в новосибирском Академгородке.

Именно в тот период подключилась к этой работе и успешно продолжает ее вести выпускница кафедры высшей нервной деятельности Московского государственного университета Людмила Николаевна Трут (Trut, 1999; Трут, 2006).

За чрезвычайно короткое время экспериментального процесса воспроизведения доместикации в сопоставлении с тысячелетними историческими сроками одомашнивания известных нам животных были получены уникальные данные. В ходе целенаправленного отбора на доместикационное поведение зафиксирована перестройка целого комплекса приспособительных сезонных биологических функций, причем в том же направлении, в каком изменились эти функции у домашних животных. Природа дикого зверя не устояла, не смогла удержать своих, казалось бы, незыблемых позиций под напором доместикационного эффекта. Какие же рычаги приводят в действие этот могучий эффект? Д.К. Беляев высказал мысль: изменение поведения не может проходить бесследно для нервно-эндокринных механизмов, определяющих гормональный статус организма. Впервые в мире началось изучение действия эндокринных механизмов у животных, отбираемых в зависимости от характера оборонительного поведения по отношению к человеку. На протяжении нескольких лет у каждого животного периодически проводился анализ крови, в общей сложности тысячи проб. И на этот тысячекратно повторенный вопрос организмы животных дали однозначный ответ: при отборе на ручное

поведение происходит отбор именно тех генов, которые определяют менее агрессивную реакцию по отношению к человеку. Эти гены, в свою очередь, влияют на характер импульсов, зарождающихся в нервной системе и передающихся в гормональный аппарат. А перестройка этого аппарата есть следствие перестройки наследственных функций.

В начале 1960-х годов Д.К. Беляев высказал мысль о том, что для понимания механизма возникновения коррелятивных признаков необходимо искать регуляторы, контролирующие процесс доместикации (Беляев и др., 1971). Этими регуляторами являются нервная и гормональная системы. Впервые было установлено, что селекция на доместикационный тип поведения сопровождается изменениями метаболизма регулирующих агрессивность классических медиаторов мозга, серотонина и катехоламинов; меняет реакцию на стресс и функциональную активность половых гормонов (Попова, 2002. С. 109–110). В поиске влияния регулярного отбора по поведению животных на жизненно важные функции организма, в особенности на репродуктивную, Д.К. Беляев особое внимание придавал функциональной организации хромосом, благодаря которой осуществляется переход от активного состояния гена к неактивному и наоборот (Кикнадзе, 2002. С. 98–99). В сентябре 1979 г. Д.К. Беляев излагает свои работы по поведению и поведенческой селекции лисиц в большом докладе в Шотландии, в Эдинбурге, на Международной этологической конференции в присутствии знаменитых этологов Нико Тинбергена и Конрада Лоренца. Доклад вызвал оживленную дискуссию и большой резонанс (Аргутинская, 2002. С. 271).

Одомашнивание – процесс сложный. В нем играют свою роль и мутации (на сегодня понятие «мутация» объединяет весьма разнородные по своим механизмам события (Инге-Вечтомов, 2005)): и рекомбинации генов, и скрытый резерв наследственности, и прямой эффект отбора. Действие этого механизма проверяется и находит подтверждение на других пушных зверях, например на американских норках (*Neovison vison*). У ручных норок эффекты интенсивного отбора на одомашнивание идут по той же схеме, что и у лисиц, только поведение иное, чем у собак. У норки ручное поведение, созданное

селекционным путем, близко, скорее, к поведению домашних кошек (рис. 2).

Первым ответом отбора американской норки на одомашнивание (как и в аналогичном доместикационном эксперименте с лисицами) явилось изменение однородности исходной стандартной окраски мехового покрова в виде появления обширной белой пятнистости (пегостей). При этом также наблюдается удивительный окрасочный параллелизм с другими ранее одомашненными видами (рис. 3) (Трапезов, 1997).

Причем наследование такого доместикационного признака, как «проявление белой пятнистости или пегостей на меховом покрове зверей», в большинстве случаев часто бывает очень сложно обусловлено.

### СТРЕССИРУЕМОСТЬ И СТРЕССОУСТОЙЧИВОСТЬ В ДОМЕСТИКАЦИИ

В 1970-х годах модельные эксперименты Д.К. Беляева показывали, что резкие изменения среды при попадании диких животных в неволю, провоцируя состояние стресса, мобилизуют в популяциях животных скрытую генетическую изменчивость. Например, можно ли считать такой признак, как проявление белой пятнистости (пегостей) на воло-

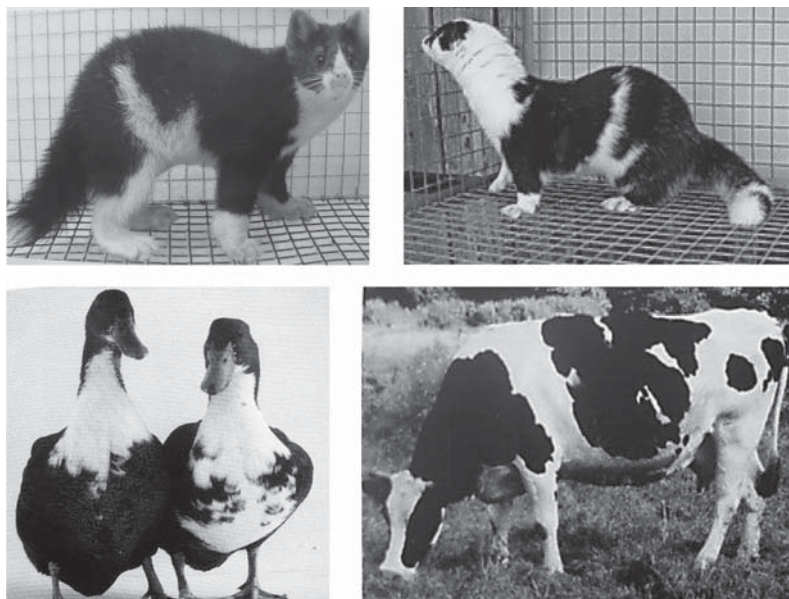


Рис. 2. Одомашненная норка.

сяном покрове в ходе доместикации самых разных таксономических групп животных (рис. 4), нейтральным, не адаптивным? Вряд ли, ведь он вполне может быть сцеплен в наследовании с адаптивным признаком – устойчивостью к психоэмоциональному стрессу, проживанию в условиях неволи, успешному размножению изначально диких животных (внезапно оказавшихся по эволюционным меркам) в условиях антропогенной среды на расстоянии вытянутой руки человека.



Рис. 3. Фенотипический параллелизм в окраске одомашненной американской норки в сравнении с другими исторически ранее одомашненными видами.



**Рис. 4.** Сходство в фенотипической изменчивости (наличие белой пятнистости) в условиях доместикации у видов, далеких по происхождению.

Конечно, внешнее сходство в расцветке волосяного покрова у совершенно отдаленных в таксономическом отношении видов, вовлеченных в процесс доместикации (рис. 4), не дает нам оснований судить о сходстве генотипического порядка. Но исходя из поразительного сходства в фенотипической изменчивости, обусловленной единством процесса доместикации у видов, достаточно далеких по происхождению, можно подразумевать наличие специфической генной компоненты, подпадающей под давление одного и того же вектора отбора.

Мы можем говорить наряду со спецификой видов и родов о наличии у них общей генной компоненты – «генов доместикации», а точнее «генов стрессоустойчивости», обеспечивающих в условиях доместикации устойчивость к психоэмоциональному стрессу, терпимость к пребыванию в условиях антропогенной среды.

И как одно из следствий такого отбора на одомашнивание у видов, вновь вовлекаемых в процесс доместикации, можно предсказать появление таких же окрасок волосяного покрова, как и у животных, одомашненных в исторически более ранние сроки, подобно тому как периодическая система Менделеева дает возможность предсказывать существование пока неизвестных элементов (см. рис. 3, 4).

## ЛИТЕРАТУРА

- Аргутинская С.В. Дмитрий Константинович Беляев: Книга воспоминаний. Новосибирск: Изд-во СО РАН. Филиал «Гео», 2002. 284 с.
- Афанасьев В.А. Изменения пушных зверей под влиянием одомашнивания // Совещ., посвящ. 100-летию выхода в свет книги Ч. Дарвина «Изменение животных и растений под влиянием одомашнивания» (1868). 18–20 декабря 1968 г. Изд-во Московского гос. ун-та, 1968. Тез. докл. С. 23–28.
- Афанасьев В.А. Изменение пушных зверей при разведении в клетках // Проблемы доместикации животных и растений. М.: Наука, 1972. С. 33–37.
- Беляев Д.К. Генетические аспекты доместикации животных // Проблемы доместикации животных и растений. М.: Наука, 1972. С. 39–45.
- Беляев Д.К. О некоторых вопросах стабилизирующего и дестабилизирующего отбора // История и теория эволюционного учения. Л.: Наука, 1974. С. 76.
- Беляев Д.К. Дестабилизирующий отбор как фактор изменчивости при доместикации // Природа. 1979. № 2. С. 36–45.
- Беляев Д.К. Дестабилизирующий отбор как фактор доместикации // Генетика и благосостояние человечества. М.: Наука, 1981. С. 53–66.
- Беляев Д.К. Дестабилизирующий отбор // Развитие эволюционной теории в СССР (1917–1970 годы) / Ред. С.Р. Миклулинский, Ю.И. Полянский. Л.: Наука. Ленингр. отд-ние, 1983. С. 266–277.
- Беляев Д.К., Ивонин Ф.М. Улучшить племенную работу в зверосовхозах // Каракулеводство и звероводство. 1951. № 5. С. 39–45.
- Беляев Д.К., Науменко Е.В., Трут Л.Н., Коршунов Е.А. Функция коры надпочечников и ее сезонные изме-

- нения у серебристо-черных лисиц // Докл. АН СССР. 1971. Т. 200. № 5. С. 1249–1251.
- Богданов Е.А. Происхождение домашних животных. М.: Книгоизд-во МСХИ, 1914. 406 с.
- Гончаров Н.П., Глушков С.А., Шумный В.К. Доместикация злаков Старого Света: поиск новых подходов для решения старой проблемы // Журн. общ. биологии. 2007. Т. 68. № 2. С. 126–148.
- Дарвин Ч. Изменения домашних животных и культурных растений. Соч. Т. 4. М.; Л.: АН СССР, 1951. 883 с.
- Дарвин Ч. Прирученные животные и возделанные растения: Пер. и изд-ние В.О. Ковалевского / Под ред. И.М. Сеченова, А. Герда. СПб., 1867.
- Инге-Вечтомов С.Г. Роль генетических процессов в модификационной изменчивости. Пророчество Б.Л. Астаурова // Онтогенез. 2005. Т. 36. № 4. С. 274–279.
- Казакова Т.И., Докукин Ю.М. Племязверосовхозу «Пушкинский» 75 лет // Кролиководство и звероводство. 2003. № 6. С. 6–10.
- Кикнадзе И.И. Учитель жив в своих учениках // Дмитрий Константинович Беляев: Книга воспоминаний. Новосибирск: Изд-во СО РАН. Филиал «Гео», 2002. 284 с.
- Колдаева Е.М., Колдаев Н.А. Доместикация и хозяйственно полезные признаки у пушных зверей // Информ. вестн. ВОГиС. 2007. Т. 11. № 1. С. 62–75.
- Кольцов Н.К. Проблемы прогрессивной эволюции // Биол. журнал. 1933. Т. 2. Вып. 4/5. С. 475–500.
- Массон В.М. Палеолитическое общество Восточной Европы. СПб.: Ин-т истории материальной культуры РАН, 1996. С. 1–71.
- Попова Н.К. Что определяет поведение? // Дмитрий Константинович Беляев: Книга воспоминаний. Новосибирск: Изд-во СО РАН. Филиал «Гео», 2002. 284 с.
- Сайдинов А.В. Еще одна вежа в истории соболеводства // Кролиководство и звероводство. 2008. № 3. С. 15–17.
- Тахтаджян А.Л. Соотношение онтогенеза и филогенеза у высших растений (Этюды по эволюционной морфологии) // Науч. тр. Ереван. гос. ун-та. 1943. Т. 22. С. 71–176.
- Токарева И.В., Чубур А.А. История изучения хотылевско-бетовского палеолитического района // Песоченский историко-археологический сборник. Археология. История промышленности и ремесел. Киров, 1997. Вып. 3. Ч. 1. С. 21–26.
- Трут Л.Н. Хищники становятся ручными // Наука в Сибири: Еженед. газета СО РАН. Ноябрь. 2006. № 43 (2578). <http://www-sbras.ru/HBC/>
- Трут Л.Н. Доместикация животных в историческом процессе и в эксперименте // Информ. вестн. ВОГиС. 2007. Т. 11. № 2. С. 273–289.
- Федорова О.И. Преобразование и изменчивость экстерьерных и интерьерных признаков у американских норок (*Mustela vison* Schreber, 1777) в ходе их промышленной доместикации // Информ. вестн. ВОГиС. 2009. Т. 13. № 3. С. 578–587.
- Филиппченко Ю.А. Происхождение домашних животных. Петроград: Изд-во Э.И. Блэкь, 1916.
- Чекалова Т.М. Эффективность селекции по воспроизводительной способности у песцов (*Alopex lagopus*) и лисиц (*Vulpes vulpes*) в условиях их клеточного разведения на специализированных зверофермах // Информ. вестн. ВОГиС. 2007. Т. 11. № 1. С. 195–204.
- Шумилина Н.Н. Доместикационные преобразования конституциональных особенностей серебристо-черных лисиц (*Vulpes vulpes*) в ходе их промышленного разведения // Информ. вестн. ВОГиС. 2007. Т. 11. № 1. С. 109–114.
- Шумный В.К. Проблемы биологии в XXI веке // Философия науки. 1999. № 1(5). С. 39–46.
- Bar-Yosef O. Natufian: a complex society of foragers // Beyond Foraging and Collecting: Evolutionary Change in Hunter-Gathering Settlement Systems. N.Y.: Kluwer Acad. & Plenum Publ., 2002. P. 91–149.
- Belyaev D.K. Domestication of animals // Sci. J. (UK). 1969. No. 5. P. 47–52.
- Belyaev D.K. Destabilizing selection as a factor in domestication // J. Hered. 1979. V. 70. P. 301–308.
- Belyaev D.K., Khvostova V.V. Domestication, Plant and Animal // Encyclopaedia Britannica. 1974. P. 936–942.
- Berry R.J. Genetic variation in wild house mice: where natural selection and history meet // Am. Sci. 1978. V. 66. P. 52–60.
- Clutton-Brock J. A natural history of domesticated mammals. 2nd ed. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1999.
- Connor S. A study in evolution: foxes turned into man's best friend // Independent. 2005.
- Darwin Ch. On the Origin of Species by Means of Natural Selection: or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life. London, John Murray, 1859. [1st ed.].
- Falconer D.S. Introduction to quantitative genetics. London: Oliver and Boyd, 1960.
- Falconer D.S. Introduction to quantitative genetics. London: Longman, 1981. 365 p.
- Hammer K. Das Domestikationssyndrom // Genet. Res. Crop Evol. 1984. Bd. 32. No. 3. S. 11–34.
- Hartl D.L., Clark A.G. Principles of population genetics. 3rd ed. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, 1997.
- Hyams E. Animals in the Service of Man: 10 000 Years of Domestication // J. Am. Vet. Med. Assoc. 1972. V. 174. P. 367–370.
- Geist V.A. A behavioral approach to the management of wild ingulates // The Scientific Managements of Animal and Plant Communities for Conservation / Eds E. Duffey, A.S. Watt. Oxford: Blackwell Sci. Publ., 1971. P. 413–424.
- Goncharov N.P., Golovkina K.A., Kilian B. Evolutionary history of wheats – the main cereal of mankind // Biosphere Origin and Evolution / Eds N. Dobretsov et al. Springer, 2008. P. 407–419.
- Keeler C.E. The association of the black (non-agouty) gene with behavior in the Norway rat // J. Heredity. 1942. V. 33. P. 371–384.
- Keeler C.E. Genetics of behavioral variations in color phases of the red fox // The Wild Canids: Their Systematics, Behavioral Ecology and Evolution / Ed. M.W. Fox. N.Y.: Van Nostrand-Reinhold, 1975. P. 399–413.
- Mink Production / Ed. G. Jørgensen // Scientifur. Danish Fur Breeders Association. 1985. 400 p.
- Postel-Vinay O. Le chien, une énigme biologique // La Recherche. 2004. No. 375. P. 30–37.
- Price E.O. Behavioural aspects of animal domestication //

- Quart. Rev. Biol. 1984. V. 59. No. 1. P. 1–32.
- Ratner S.C., Boice R. Effects of domestication on behavior // *The Behavior of Domestic Animals* / Ed. E.S.E. Hafez. 1975. 3rd ed. P. 3–19.
- Ross-Ibarra J. Quantitative trait loci and the study of plant domestication // *Genetica*. 2005. V. 123. No. 1/2. P. 197–204.
- Savolainen P. Mt-DNA studies of the origin of dogs // *Dog and its Genome* / Eds E.A. Ostrander, U. Giger, K. Lindblad-Toh. N.Y.: Cold-Spring Harbor, 2006. P. 119–140.
- The Global Strategy for the Management of Farm Animal Genetic Resources. Italy, Rome, 1999.
- Trapezov O.V. Black Crystal: A novel coat color mutant in the American Mink // *J. Hered.* 1997. V. 88. No. 2. P. 164–166.
- Trut L.N. Early canid domestication: the farm-fox experiment // *Amer. Sci.* 1999. V. 87. P. 160–169.
- Zeder M.A. Documenting domestication: the intersection of genetics and archaeology // *Trends Genet.* 2006. V. 22. No. 3. P. 139–155.
- Wistmann E. *Crao-indianer der Rotten Berge*. Leipzig, 1977. 135 p.

УДК 575.8:631.527.1:633.1

## ДОМСТИКАЦИЯ РАСТЕНИЙ

© 2013 г. Н.П. Гончаров

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,  
e-mail: gonch@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 30 апреля 2013 г. Принята к публикации 1 ноября 2013 г.

### ВВЕДЕНИЕ

История доместики растений тесно переплетена с историей человечества. Если не считать собаку, то растения были доместифицированы значительно раньше животных. Одомашнивание последних стало возможным только благодаря дополнительной кормовой базе, созданной посредством возделывания растений. Освоение человеком базовых навыков земледелия – событие революционное, коренным образом изменившее его существование (рис. 1). При этом доминирующее положение в истории человечества заняли культуры Востока, ориентированные на возделывание злаков. Селекция злаков – одно из самых ранних интеллектуальных достижений человечества. Она началась тогда, когда человек стал доместифицировать растения и выращивать их, отбирая формы, наиболее полно обеспечивающие его надежными источниками питания. Археологические данные позволяют сделать заключение, что злаковые растения ячмень (*Hordeum* L.) и пшеницы (*Triticum* L.) были доместифицированы первыми. Время начала занятия первобытного человека земледелием датируется очень приблизительно – около 10–12 тыс. лет назад, причем не календарных, а радиологических, которые подчас сложно перевести в первые ввиду отсутствия надежных точек отсчета (Шнирельман, 2012). Злаки начали широко возделывать на пороге эпохи шлифованного камня – неолита (Nesbitt, 2002). К 7500–6500 гг. до н. э. человек научился эффективно возделывать ячмень и пшеницу, причем уже на значительных территориях и при довольно интенсивном ведении растениеводства. Согласно археоло-

гическим данным, переход к земледелию, т. е. к производящим формам добычи пищи, был довольно длительным и охватывал от одного до трех тысячелетий. Исходя из имеющихся в настоящее время данных началом периода мотыжного земледелия считается ранний неолит, и уже Шумер и Аккад были цивилизациями с высокоразвитым земледелием (История..., 1983). Его последствия были столь важны, что он получил название неолитическая, или земледельческая, революция. Хотя и считается, что переход от собирательства к возделыванию произошел в мезолите<sup>1</sup> (рис. 2), в целом проблема происхождения и эволюции культурных растений является одной из интригующих тайн становления человечества. Почему занятие охотой и собирательством у части человеческой популяции отошли на второй план? Какие глобальные процессы этому предшествовали? Ведь 99,5 % времени из почти 2 млн лет пребывания на Земле человек занимался охотой и собирательством и только последние 10–12 тыс. лет он почему-то

<sup>1</sup> Остатки культурных растений, которыми располагают в настоящее время исследователи, очень скудны, хотя и имеют важное значение как ориентир, позволяющий представить основные этапы становления земледелия. Как правило, предположение о начале возделывания растений строится на археологических находках земледельческих орудий (например, вкладышей для серпов) или орудий переработки зерна (например, зернотерок). Обнаружение же следов собственно земледелия (мотыг) и остатков возделываемых растений датируется более поздним временем. Например, одна из хорошо изученных ранних земледельческих культур *Çağar Höyük* (вторая половина VII тыс. до н. э. – первая половина VI тыс. до н. э.) была уже достаточно хорошо развита: выращивалось 14 видов растений (История..., 1983). Таким образом, ко времени зарождения первых древневосточных цивилизаций их земледельцы опирались уже на многовековой опыт возделывания растений.



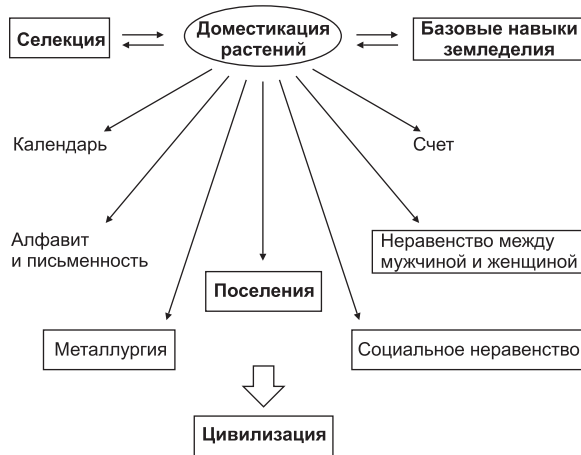


Рис. 1. Доместикация растений и ее последствия.

начал доместивать растения и приручать животных. К этому времени он покинул Африку и расселился на значительных территориях на всех континентах, кроме Антарктиды (рис. 3) (Cavalli-Sforza, Feldman, 2003), там, где было достаточно растительной и животной пищи. Прожив охотой и собирательством еще какое-то время, человек разумный начал возделывать растения и приручать животных.

Собирательство и охота, земледелие и скотоводство – это вполне устойчивые и самостоятельные способы производства. При этом собирательство – самый древний из них, так как охота есть в некоторой степени усложненная и технически усовершенствованная деятельность собирателей (Семенов, 1974). Переход от одного способа к другому требовал значительных социальных изменений. По оценке Н.И. Вавилова (1966), из 650 наиболее распространенных

**Злаки** (*Poaceae* Barnhart, или *Gramineae* Juss.) – семейство однодольных растений, к которому относятся все основные хлебные растения: пшеница, ячмень, рожь, кукуруза и рис, а также ряд важных кормовых культур.

**Селекция злаков** – одно из самых ранних интеллектуальных достижений человечества, так как освоение человеком базовых навыков земледелия – событие революционное, коренным образом изменившее его существование; при этом доминирующее положение в истории человечества заняли культуры Востока, ориентированные на возделывание злаков.

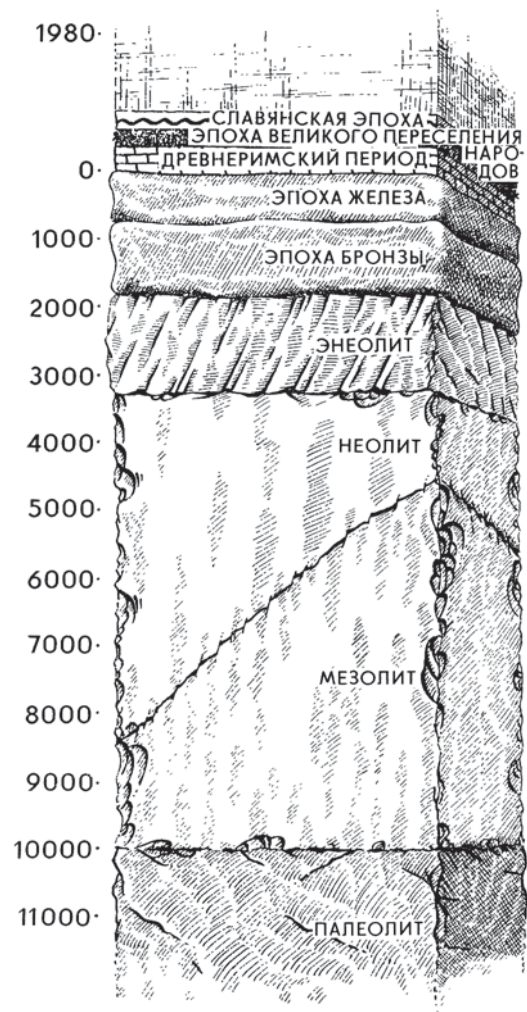


Рис. 2. Хронологический столб (Малинова, Малина, 1988).

возделываемых растений около 500 видов дала Южная Азия. На рис. 4 представлены данные распространения на Ближнем Востоке основных сельскохозяйственных культур. Развитие земледелия обусловило переход от кочевого образа жизни к оседлому, так как земледелец нуждается в стационарном (постоянном) жилье, поэтому, доместивая растения, человек неизбежно «одомашнивал» самого себя. В VIII в. до н. э. неолитические сельскохозяйственные общины Передней Азии<sup>2</sup> создали первые небольшие города-поселения, такие как Иерихон (см. рис. 4).

<sup>2</sup> Передняя Азия в широком понимании включает в себя Закавказье, северо-западный Иран, горный Туркменистан, Малую Азию, Аравию, Сирию, Йемен (некоторые исследователи к этому региону добавляют и Пенджаб).

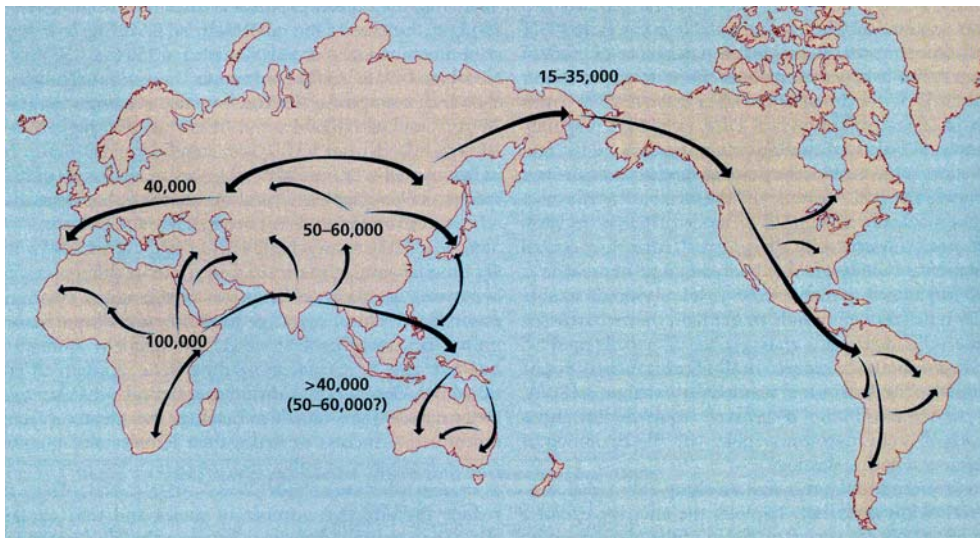


Рис. 3. Расселение *Homo sapiens* (Cavalli-Sforza, Feldman, 2003. P. 266–275).

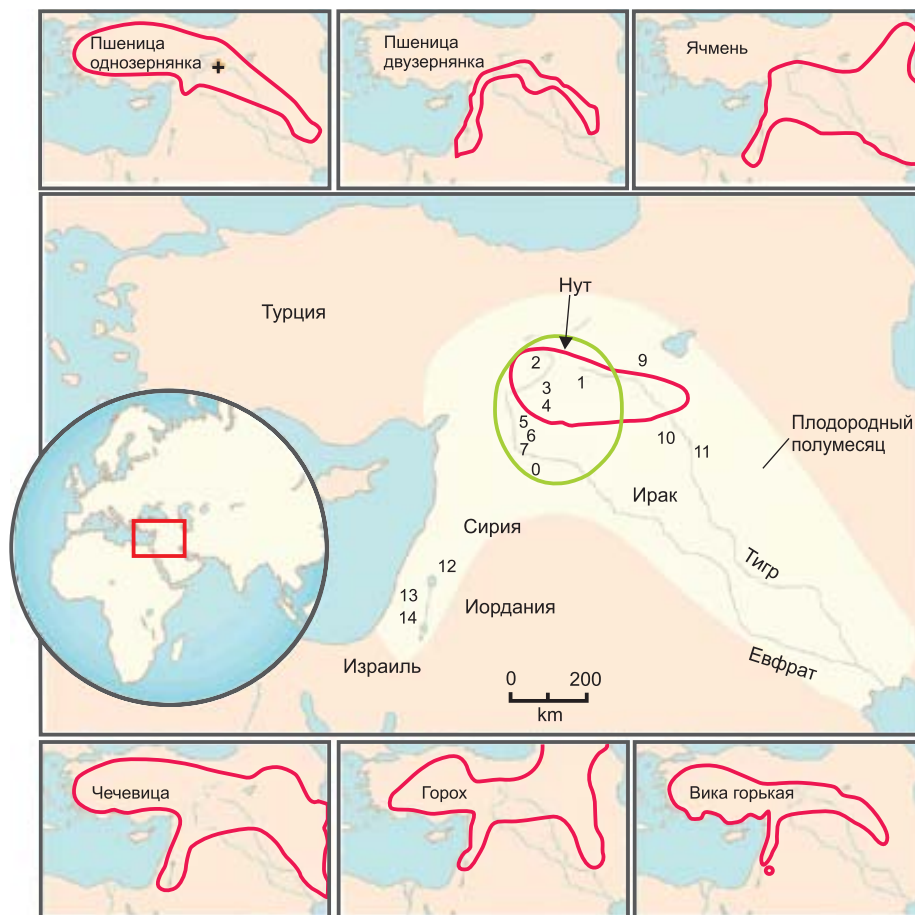


Рис. 4. Схема распространения на Ближнем Востоке 7 основных сельскохозяйственных культур (с модификациями из: (Lev-Yadun *et al.*, 2000. P. 1602–1603)).

В центре овалом оконтурен район их совместного произрастания; красным цветом обозначен район произрастания «турецкого» горошка (нута) в верховьях Тигра и Евфрата. На врезках – районы происхождения окультуренных растений. Числами обозначены древние стоянки: 1 – Чайёню, 2 – Чафер Хойюк, 3 – Навали Чори, 4 – Гёбекли Тепе, 5 – Джада, 6 – Джерф-эль-Ахмара, 7 – Телль-Музейбет, 8 – Телль-Абу-Хурейра, 9 – Халан Чеми Теписи, 10 – Кермез Дерё, 11 – Милефаат, 12 – Телль-Асвад, 13 – Йифтахэль, 14 – Иерихон. + – предполагаемое место введения в культуру *T. monococcum*. Ареал гороха уточнен по работе: О.Е. Kosterin *et al.* (2010).

## ПОЯВЛЕНИЕ ЗЕМЛЕДЕЛИЯ И НАЧАЛО ДОМЕСТИКАЦИИ РАСТЕНИЙ

Изучение истории земледелия представляет собой более трудную задачу, чем изучение истории техники, при исследовании которой «приложимы законы математики, физики, химии – законы точных наук» (Семенов, 1974. С. 4). Чаще всего исследователями обсуждаются три основные гипотезы происхождения земледелия: 1) увеличение народонаселения; 2) глобальное изменение климата в конце плейстоцена (около 11 тыс. лет назад), ставшее крахом мира охотников и собирателей; 3) религиозное (ритуальное) использование доместичированных растений. Рассмотрим их.

**Первая гипотеза.** Согласно археологическим данным, более вероятно, что увеличение народонаселения – следствие, а не первопричина возникновения земледелия (История ..., 1983). Постоянное жилище земледельца стало лучше и комфортабельнее и в нем женщины могли растить большее число детей. Следовательно, земледелие само вело к перенаселению и, как следствие, к колонизации все новых и новых земель. Оно распространилось с Ближнего Востока на Балканы, затем – на Дунайскую низменность и т. д. Предполагается, что в конце плейстоцена на Земле жило около 5 млн охотников и собирателей, тогда как в V тыс. до н. э. население планеты достигло численности почти 20 млн (Малинова, Малина, 1988).

**Вторая гипотеза.** Анализ пыльцы не позволяет сделать заключение о возможности значительного изменения климата в Передней Азии в интервале 40–12 тыс. лет назад (van Zeist, 1969). В настоящее время очевидно, что концепция «вызова-и-ответа» А. Дж. Тойнби (2006), согласно которой переход к земледелию был «ответом» древних охотников и собирателей на резкую аридизацию, обусловленную таянием позднплейстоценовых ледников, не нашла подтверждений. Более того, земледелие в Передней Азии возникло в фазу относительной гумидизации.

**Третья гипотеза.** Служители культов, вероятно, действительно имели достаточно власти для того, чтобы «ввести» земледелие посредством культивирования используемых в религиозных



**Рис. 5.** Богиня земледелия и ее дочь богиня плодородия из царства мертвых посылают Триптолема научить людей земледелию.

Справа налево Деметра, Триптолем и Персефона (Кора) (Элевсинский рельеф, сер. V в. до н. э.).

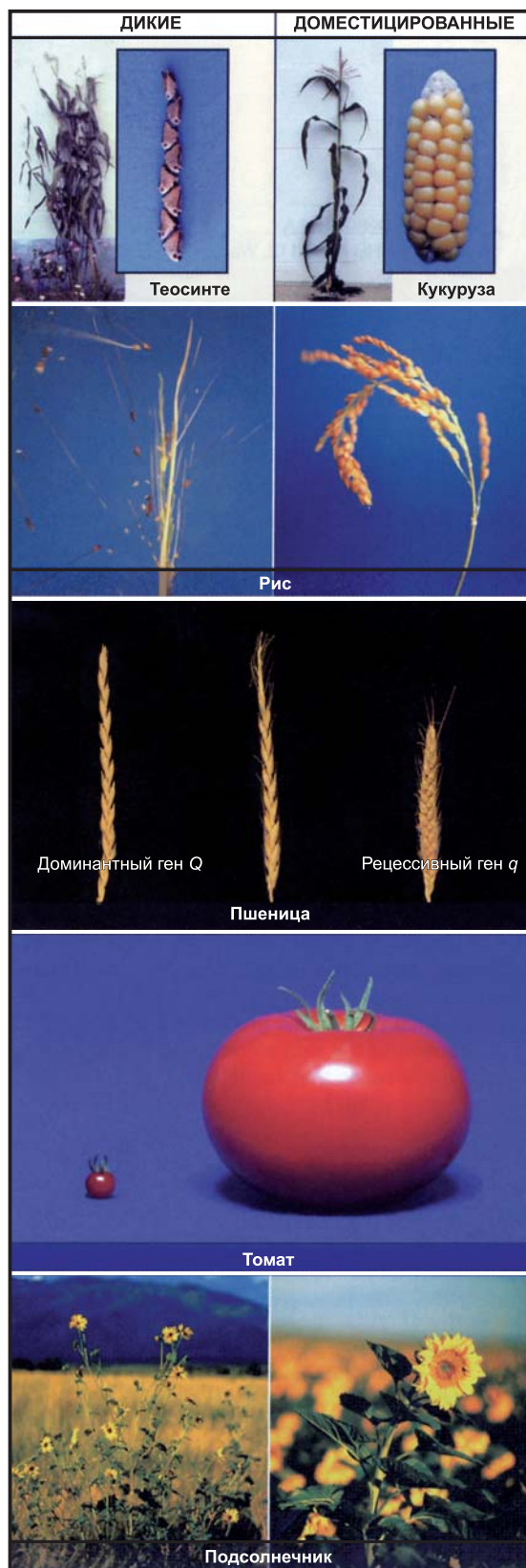
и ритуальных целях растений. Отголоски этих событий содержатся в мифах почти всех древних народов мира (рис. 5). Индусская цивилизация до сих пор придает растениям и их «индивидуальным свойствам» преимущественно религиозное значение (в «Законах Ману» указания, относящиеся к растениям, всегда имеют религиозный смысл). Очень вероятно, что эти традиции через халдеев перешли к народам Западной Азии, и растения классифицировались «по свойствам, которые им приписывались магией и тайными науками» (Бонье, 1909. С. 30). Исследовался процесс «селекции» окультуренных растений, имеющих магическое значение. Данные о религиозных и мистических мотивах первых этапов селекции связаны с информацией о возделывании кукурузы, главной зерновой культуры южно-американских цивилизаций. Очевидна ее центральность как символа местной религии. Более того, и ряд других возделываемых растений в Новом Свете, например кабачки и тыквы, до сих пор используются и в качестве церемониальных трещоток. Первобытные собиратели были кровно заинтересованы в том, чтобы ценные для них растения не изводились, а

**Доместикация** (от лат. domesticus – домашний) – это процесс изменения диких животных или растений под воздействием искусственного целенаправленного отбора на интересующие человека признаки и под определенные технологии воспроизведения.

процветали и чтобы возрастили занимаемые под ними площади. Кроме того, они могли «колдовскими» и «религиозными» средствами пытаться умножать растительные «пищевые ресурсы». Следовательно, возможно уже на ранних этапах становления человечества отношение к таким растениям как к «тотемным существам», поэтому своеобразный культ полезных растений мог возникнуть еще до появления земледелия как такового.

Возможно, доместикация растений – слишком глобальное и всеобъемлющее событие в истории человечества, чтобы быть единственно следствием религии. Довольно неплохо аргументировано мнение, что в результате систематического собирания определенного (конкретного) дикорастущего растения происходит его изменение. В первую очередь это может быть обусловлено его перенесением с одного типа почвы на другой (то же может происходить и при переносе семян растений птицами или грызунами). Таким образом, стоянки первобытного человека, вокруг которых почва удобрялась различными отходами и золой (Netolitzky, 1944)<sup>3</sup> и куда заносились семена употребляемых в пищу растений, могли играть существенную роль в «непреднамеренном» выращивании. Время от времени к таким заброшенным стоянкам снова возвращались кочующие группы людей, обнаруживая стимуляцию роста «рудеральной» флоры за счет остатков жизнедеятельности и изменение ее состава. Последующая собственно доместикация растений, кроме изменений в структуре человеческого общества, очень сильно, а часто и кардинально, изменила облик одомашненных растений. В настоящее время культурные растения отличаются особым разнообразием именно тех органов или частей (рис. 6), которые исполь-

<sup>3</sup> F.R. Kjellman (1882) описал среди окружающих яранги чукчей такие растения, которые следовало бы считать «одомашненными», так как они реально дополняли их рыбный и мясной рацион.



**Рис. 6.** Фенотипы некоторых из основных доместицированных растений и их предковых форм (Doebley *et al.*, 2006. P. 1309–1321).

зуются человеком. Эти изменения получили название «синдром доместикации».

Таким образом, несмотря на то что гипотеза о религиозном возникновении земледелия полностью не доказана, она подводит нас ближе к истинным причинам его зарождения и появления сельскохозяйственного производства как такового – этого нерационального способа человеческой деятельности, «культурной силы отчуждения», распространившейся в виде категорий времени, языка, числа и искусства (см. рис. 1) и в конце концов заключившей в тиски физическую и духовную жизнь человека-земледельца.

### ГДЕ ВПЕРВЫЕ БЫЛО НАЧАТО ВОЗДЕЛЫВАНИЕ РАСТЕНИЙ НА ЗЕМЛЕ И ГДЕ «РОДИНА» ПШЕНИЦ И ЯЧМЕНЯ?

Среди дикой степной растительности много злаков, зерна которых пригодны в пищу. Хотя они часто имеют горьковатый вкус, из них можно варить кашу и даже получать муку, пригодную для изготовления лепешек. Эти зерна по своим размерам значительно мельче, чем зерна диких пшениц и ячменя, и, вероятно, поэтому последние, согласно археологическим данным, были доместицированы одними из первых. Заметим, что собиратели, живущие на равнинах, имели возможность, когда к тому принуждали обстоятельства, переходить с одного вида пищи на другой. В горах же человек имел значительно меньший выбор и меньшую возможность для пищевого «маневра». Кроме того, если земледелие действительно зародилось в горных районах, то правдоподобна гипотеза В.Л. Комарова (1931), считавшего, что периодическое наступление здесь зимних холодов могло заставить древнего человека делать запасы на зиму. Первобытный земледelec, согласно Н.И. Вавилову (1926), жил в этих районах, как и живет здесь еще до сих пор, изолированными группами, и для введения в культуру растений горные тропики и субтропики имеют исключительно оптимальные условия: наличие разнообразных природных условий, богатой растительности и полноводных, бегущих с ледников, ручьев, пригодных для устройства примитивного «самотечного» полива полей (плантаций). Однако неясно, почему земледелие зародилось в горах

или в предгорьях, в то время как основные высокоразвитые цивилизации имеют равнинное происхождение. Собирательство, а затем и земледелие в юго-западной Азии могли возникнуть только в тех районах, где в достаточном количестве росли в диком состоянии злаки с довольно крупным, пригодным в пищу зерном. Со времен появления древнегреческих эпосов родиной диких и культурных видов пшениц традиционно считают Переднюю Азию. Причем древние культуры (цивилизации) Востока, ориентированные на возделывание хлебных злаков, заняли доминирующее положение в истории человечества (История ..., 1983). Н.И. Вавилов (1926) связывал центры происхождения пшениц с наличием–отсутствием их морфологического (позже – физиологического и биохимического) внутривидового разнообразия. Однако в некоторых случаях, как с Североафриканским центром происхождения тетраплоидных пшениц, гипотеза оказалась неверна.

В настоящее время имеются три основные гипотезы введения в культуру возделываемых растений – моноцентрическая, полицентрическая и диффузная. К сожалению, нет достаточного числа данных для того, чтобы отдать предпочтение какой-либо одной из них. Более того, вероятно, что в разных местах введение дикорастущих растений в культуру могло происходить по-разному. Выводы разных авторов о месте введения в культуру тетраплоидной ( $2n = 4x = 28$ ) пшеницы *T. dicocum* (Schrank) Schuebl. не совпадают, хотя N.H. Özkan с соавт. (2005) и V.-C. Luo с соавт. (2007) и указывают на область Dyiabakir в Турции как на более вероятное место их доместикации (см. рис. 4). Рядом с этой областью обнаружены древнейшие поселения докерамической эпохи В – Çafar Höyük, Nevali Çori и Çayönü, жители которых первыми на планете перешли от собирательства к земледелию (Nesbitt, 2002). Кроме того, здесь был расположен важный обрядовый центр Göbekli (Neef, 2003). Однако поселения докерамической эпохи В с находками полбы были выявлены и значительно южнее – в Tell Aswad около Дамаска (van Zeist, Bakker-Heeres, 1975) и в Jericho (Hopf, 1983) (см. рис. 4). Одновременность дат обнаружения доместицированной полбы на юго-востоке Турции и в Ливане означает либо очень быстрое распространение этой культуры с севе-

ра на юг вместе с быстрым распространением земледелия по всей территории Плодородного полумесяца, либо ее независимую одновременную доместициацию в нескольких местах. Оба сценария возможны. Хотя оценка величины генетических дистанций между популяциями диких и доместицированных пшениц (Mogi *et al.*, 2003; Özkan *et al.*, 2005; Luo *et al.*, 2007 и др.) и обнаружение в раскопках вместе с полбой в археологическом слое поселения Jericho, датированном эпохой докерамического неолита В, остатков культурной однозернянки (Hopf, 1983), которая очень вероятно была доместицирована в юго-восточной Турции (Heun *et al.*, 1997), кажется, более согласуется с первой гипотезой.

Таким образом, не очень интенсивное земледелие в течение последних столетий в горах, предгорьях и пустынях Передней Азии, где обнаружен центр биоразнообразия диких пшениц, а возможно, и происхождения их доместицированных видов, способствовало сохранению естественных ареалов дикорастущих сородичей пшениц. И хотя неизвестно, как последние выглядели 10 000 лет назад, их изучение поможет будущей реконструкции процессов доместициации, так как эволюция видов интересующего нас рода *Triticum* шла внутри первичного пула генов. В то же время в других местах Ойкумены не сохранилось значительных зарослей диких ди- и тетраплоидных пшениц.

### ТЕМПЫ ДОМСТИКАЦИИ ПШЕНИЦ И ЯЧМЕНЯ

Покрытосеменные растения возникли в мезозое. Их активное формирование происходило с середины юрского до середины мелового периодов, т. е. 60–100 млн лет назад. В меловой период происходило широкое их распространение и уменьшение ареалов голосеменных растений. Значительное изменение орографии планеты в третичный период, сопровождаемое похолоданием и аридизацией, привело к еще большему распространению первых. Последующее широкое распространение травянистых покрытосеменных способствовало завоеванию пространств суши травоядными млекопитающими. При переходе к современному климату на значительных территориях распространились однолетние самоопыляющиеся крупно-

зерные и крупносемянные растения. На рис. 7 представлена схема дивергенции основных родов доместицированных злаков (следует заметить, что даты эволюционных событий, полученные при помощи молекулярной филогении, в значительной степени зависят от взятых в анализ генов, что влечет за собой необходимость выработки критериев их согласования). Плоды злаков «удобны» для интенсивного собирательства и, что немаловажно, – для последующего длительного хранения. И хотя от собирательства полезных растений до их разведения один шаг, этот шаг растянулся на тысячелетия. И если переход к земледелию в Европе можно с некоторыми натяжками приурочить к окончанию периода последнего оледенения, а в Западной Сибири – к улучшению условий увлажнения в суббореальный период голоцена (2900–2700 лет назад) (Рябогина, 2006), то побудительные причины этого, несомненно, революционного события в Передней Азии не ясны. Собирательство было более стабильным способом производства, чем земледелие, которое во многом зависело, да и в настоящее время зависит, от количества и времени выпадения осадков, солнечной радиации, суховеев, вредителей и стихийных бедствий, обрекающих на голод целые регионы и даже страны. В то время как небольшие группы собирателей имели возможность благодаря разнообразию природных растительных ресурсов переходить с одного вида пищи на другой. Причем от некоторых дикорастущих растений, например дикого риса *Zizania aquatica* L. или *Triticum dicoccoides* (Körn. ex Aschers. et Graebn.) Schweinf., собиратели получали обильную пищу.

Параллельно с развитием географических связей земледельческих культур исчезает и изоляция культурной флоры. Введенные в культуру отдельными народами растения постепенно

«Только на основе эволюции двудольных и однодольных растений, – полагал П.М. Жуковский, – могло произойти развитие человечества и его культуры. Можно ли представить себе высокий уровень материальной обеспеченности, если бы мы принуждены были довольствоваться хвойными деревьями, папоротниками, хвощами и мхами?» (Жуковский, 1964. С. 6).

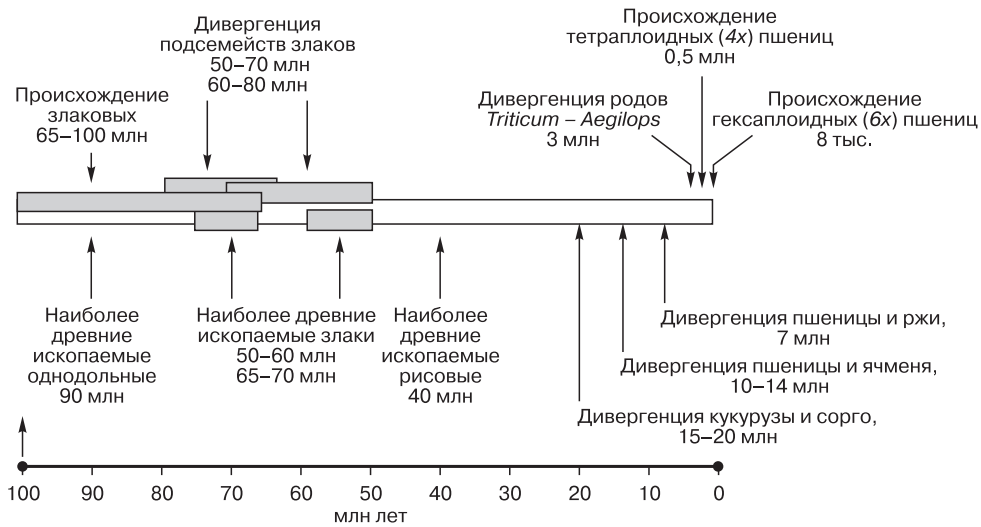


Рис. 7. Схема дивергенции родов доместицированных злаков (Gill *et al.*, 2004. P. 1087–1096).

становятся достоянием всего человечества. Считается, что в настоящее время под возделываемыми растениями занято около одной десятой части всей поверхности суши, причем ее большая часть занята всего несколькими десятками видов, большинство из которых — злаки. Пшеницы в силу ряда своих особенностей со временем стали основной возделываемой культурой и заняли все континенты, кроме Антарктиды. Они возделываются на всем пространстве от Северного полярного круга (в Скандинавии) до Огненной Земли и поднялись в горы до высоты 4000 м над уровнем моря (в Гималаях). Только тропическая зона разрывает сплошной ареал пшениц на две части, приурочивая его к умеренным климатическим поясам обоих полушарий. Преобладание мягкой пшеницы над остальными видами пшениц обусловлено ее экологической пластичностью — устойчивостью к низким и высоким температурам, избытку и недостатку влаги, разным болезням и вредителям. В настоящее время она разводится всюду, где только этому не препятствуют климат и почва, и является одной из основных продовольственных культур примерно для одной трети населения Земли. Ежедневно на нашей планете где-нибудь убирают ее урожай (табл. 1). С возделыванием зерновых, в том числе и пшеницы, связано появление плужного земледелия, которое отделилось от менее продуктивного палочно-мотыжного земледелия, сохранившего свое значение в овощеводстве и

садоводстве. Палочно-мотыжное земледелие связано с тропическим, плужное — с субтропическим и умеренным поясами. Плужное земледелие значительно преобразило сельское хозяйство и явилось его высшим достижением. Несомненно, что прямым результатом его применения было значительное увеличение поголовья крупного рогатого скота.

Имея три уровня ploидности (ди-, тетра- и гексаploидный) (рис. 8), пшеницы обладают значительным разнообразием и огромным потенциалом изменчивости. Из каждого уровня ploидности пшениц человек разумный (*Homo sapiens*) ввел в возделывание по одному или несколько видов, найдя для них подходящие экологические ниши или «специализацию». Из гексаploидной мягкой пшеницы ( $2n = 42$ ) пекут хлеб, из тетраploидной твердой ( $2n = 28$ ) делают макароны, тетраploидную полбу ( $2n = 28$ ) и диплоидную однозернянку ( $2n = 14$ ) используют как крупяные культуры.

Наиболее ранняя единичная находка следов сбора древним человеком зерновых злаков датируется в интервале от 23 до 19 тыс. лет назад. Устойчиво же следы зерновых культур в археологических слоях датируются только на 10 тыс. лет позднее этой ранней находки, поэтому первая находка рассматривается как артефакт. Самые ранние доместицированные формы пшеницы-однозернянки с неломкими колосьями были обнаружены в археологических слоях, датированных 9250 лет назад. Оценки

Таблица 1

Календарь сбора урожая пшеницы (по: (А.И. Купцов, 1975) с изменениями)

Месяц	Страна
Январь	Эфиопия, юг Индии, северная половина Новой Зеландии, юг Аргентины
Февраль	Средняя полоса Индии, южная половина Новой Зеландии
Март	Пакистан, северная Индия, «самый» юг Китая
Апрель	Египет, южная часть Китая
Май	Юг США, Сирия, Израиль, Южный Иран, средняя полоса Китая
Июнь	Средняя полоса США, Южная Европа, Турция, Средняя Азия, северный Китай, юг Японии
Июль	Север США, юг Канады, средняя Европа, северная Япония, северо-восточный Китай
Август	Север Канады, северная Европа, южный Казахстан, Россия, Украина
Сентябрь	Тропические страны, северный Казахстан, Сибирь
Октябрь	Северные области Южной Африки
Ноябрь	Север Аргентины, южная Африка, основная часть Австралии
Декабрь	Средняя полоса Аргентины, крайний юг Африки, юг Австралии



Рис. 8. Колосья ди- (а), тетра- (б) и гексаплоидных (в) возделываемых видов пшениц.

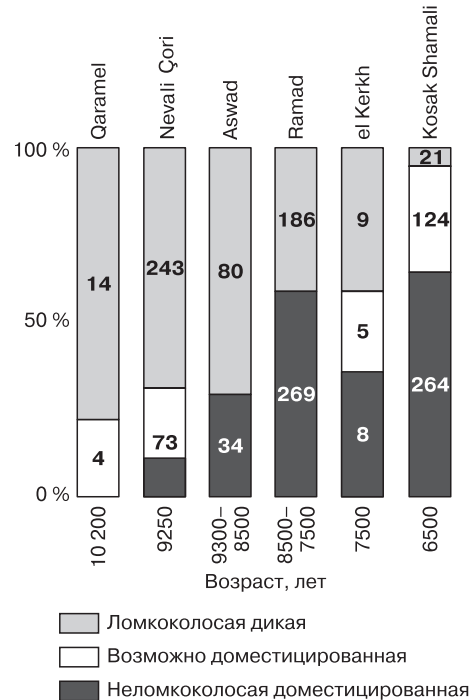
возможной продолжительности культивирования диких пшениц до этой даты варьируют от менее чем 200 лет до нескольких сотен лет. Для того чтобы оценить скорость доместикации диплоидных пшениц К. Tanno, G. Willcox (2006) проанализировали 9844 обуглившихся колоска

из четырех археологических слоев (раскопов) из северной Сирии и юго-восточной Турции, датированных в интервале от 10200 до 6500 лет назад. Большинство включенных в анализ фрагментов колосьев пшеницы было повреждено либо огнем, либо в процессе обмолачивания,



но 804 хорошо сохранившихся фрагмента были опознаваемы. Колоски доместицированной пшеницы-однозернянки не были выявлены в самом древнем из изученных слоев, в других их процент увеличивается: в следующих двух слоях их было соответственно 3 и 8 штук (рис. 9). Только в четвертом, наиболее позднем из изученных слоев, число фрагментов колосьев доместицированной однозернянки резко увеличивалось, причем значительно возрастает также количество концевых колосков колоса. Последнее наблюдение очень важно для интерпретации полученных данных: у диких пшениц концевые колоски опадают первыми, так как колос распадается сверху вниз, поэтому с уменьшением ломкоколосости у пшениц на стоянках должна возрастать частота находок концевых колосков колоса. Данные К. Tanno, G. Willcox (2006), касающиеся продолжительности отбора на неломкоколосость пшеницы-однозернянки, требуют дополнительных доказательств, но вместе с результатами изучения колосьев ячменя (число доместицированных форм которого в раскопках возрастает от 30 % из Aswad до 60 % в Ramad), полученными W. van Zeist, J.A.H. Bakker-Heeres (1975), они подтверждают гипотезу постепенной доместикации этих культур. На основании этих результатов авторами был сделан также вывод о том, что дикие ячмень и пшеница культивировались более тысячелетия, прежде чем появились их первые доместицированные формы.

Таким образом, выполненные исследования продемонстрировали, что для отбора на уменьшение ломкоколосости и «становление» нерассыпающегося колоса ячменя у древних земледельцев могло уйти более 1000 лет. Отбор на крупнозерность происходил еще медленнее: размеры ископаемых зерен пшеницы и ячменя оставались практически неизменными в изученных слоях в течение трех тысячелетий (с 9500 до 6500 лет назад) (Tanno, Willcox, 2006), т. е. до перехода от богарного земледелия к поливному (История..., 1983) и, вероятно, до прекращения селекции на большую скороспелость, необходимую при возделывании этих культур на богаре. И хотя некоторые исследователи считают, что отбор на крупнозерность предшествовал такому на неломкость колоса, для этого заключения нет достаточных оснований.



**Рис. 9.** Изменение частот фрагментов колосьев диплоидной пшеницы-однозернянки и ячменя в разных археологических слоях (Tanno, Willcox, 2006. P. 1886).

Столбцы 3 Aswad и 4 Ramad – анализ фрагментов колосьев ячменя из работы W. van Zeist, J.A.H. Bakker-Heeres (1975).

## ПРОИСХОЖДЕНИЕ ПОЛИПЛОИДНЫХ ВИДОВ ПШЕНИЦ

Происхождение полиплоидных пшениц – запутанная история, не все страницы которой прочитаны к настоящему времени. Процесс происхождения пшениц особенно важен при реконструкции (получении «заново») их полиплоидных видов, наиболее широко возделываемых в настоящее время. Неоднократно предпринимались попытки получения «улучшенных» полиплоидных видов пшениц с еще более необходимыми для удовлетворения потребностей современного земледельца параметрами, так как при «создании» мягкой пшеницы «природа использовала генетический потенциал родов *Triticum* L. и *Aegilops* L., не заботясь о подборе качественных исходных форм» (Мигушова, 1975. С. 3). Вообще природа «создала» только четыре вида диких пшениц двух уровней плоидности (ди- и тетраплоидного) – по два вида однозернянок и полб соответственно. Неиз-

вестно, как выглядела первая приглянувшаяся древнему земледельцу пшеница, которую он впервые ввел в культуру, так как уже в самых ранних археологических слоях одновременно встречаются доместцированные пшеницы двух уровней плоидности – одно- и двузернянки – и ни разу не были обнаружены пшеницы с промежуточным («полукультурным») типом. Более того, среди древних ископаемых возделываемых пшениц не выявлено никаких признаков, которые можно было бы признать за признаки дикорастущих форм. Интересно заметить, что однозернянка *T. monococcum* L. была основной возделываемой культурой в Шумере, тогда как тетраплоидная пшеница *T. dicoccum* – в Древнем Египте.

О происхождении возделываемых пшениц в течение последних полутора веков были предложены различные теории. А. Декандоль (1885) рассматривал вопрос о происхождении каждого из таких видов пшениц отдельно, не имея информации для решения вопроса о происхождении возделываемых видов пшениц в целом. В общих чертах происхождение пшениц напоминает процесс сборки конструкции из уже готовых блоков. В нашем случае – это объединение двух и/или даже трех геномов дикорастущих видов растений, а именно диплоидной пшеницы *T. urartu* Thum. ex Gandil. и двух диплоидных видов эгилопсов *Ae. speltooides* Tausch и *Ae. squarrosa* L. в один возделываемый вид, т. е. получение из двух–трех «малопригодных» для пропитания человека диких видов одного–двух суперпродуктивных. Достижения первобытного селекционера, проведшего титаническую работу по доместикации диких растений, являются уникальными. Не только пшеницы, но и почти все другие возделываемые продовольственные культуры представляют собой результат деятельности человека каменного века, и только несколько тысячелетий спустя при конструировании нужных ему генотипов растений человек перешел к целенаправленному использованию отдельных генов и/или их комплексов, причем только для «исправления» каких-либо единичных недостатков ранее введенных в культуру видов. Поскольку и доместикация, и селекция были осуществлены древним земледельцем до появления человеком письменных памятников, очень сложно реконструировать основные пути и

направления селекции и определиться с признаками, по которым он первоначально вел отбор. Однако мы можем попытаться реконструировать этот процесс исходя из фенотипа начального (дикие виды) и фенотипа конечного (современные сорта) (Гончаров, Сормачева, 2014).

Робкие попытки комплексного рассмотрения происхождения пшениц не были успешными из-за отсутствия репрезентативной коллекции ее видов. Именно коллекция пшениц ВНИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова (Санкт-Петербург), не только скрупулезно собранная, но и основательно и тщательно изученная в течение последних ста лет, дает в руки исследователей уникальную возможность разобраться в филогении рода *Triticum*. С другой стороны, современные сравнительно-генетические и молекулярно-биологические методы исследований позволяют установить реальные филогенетические взаимоотношения внутри рода *Triticum*, а также корректно оценить время возникновения (начала обособления) его видов (см. рис. 7). Отсутствие общепризнанной схемы происхождения пшениц затрудняет точное определение не только предков отдельных групп (секций) рода *Triticum*, но и всего рода в целом. В настоящее время очевидно, что гексаплоидные виды рода являются самыми эволюционно молодыми и что первичный гексаплоид получен присоединением генома *D* диплоидного дикорастущего злака эгилопса *Ae. squarrosa* L. (точнее, его подвида *ssp. strangulata* Eig) к тетраплоидной пшенице, имеющей геномом  $BBA^uA^u$  и, вероятно, возделываемой до этого событием человеком уже в течение несколько тысячелетий. «Дикие» гексаплоидные виды пшениц в природе не обнаружены, равно как и дикие голозерные (с легким обмолотом) тетраплоидные виды (Goncharov, 2011). Это позволяет сделать заключение о том, что возделываемые тетра- и гексаплоидные виды пшениц если и не являются в чистом виде производением рук человеческих, то, по крайней мере, являются результатом удачного обнаружения и отбора древним земледельцем случайно появившихся в природе «отклонений».

На рис. 10 представлена вероятная схема происхождения основного культивируемого в роде *Triticum* аллогексаполиплоида – мягкой пшеницы, возникшего путем естественной

гибридизации с последующей ступенчатой амфилоидизацией трех диплоидных видов, относящихся к родам *Triticum* и *Aegilops*. Полагают, что *T. dicoccoides* является древнейшим естественным, т. е. встречающимся в дикой природе, тетраплоидным видом, из которого в процессе доместикации человеком были выделены другие тетраплоидные виды пшениц, отличающиеся друг от друга не только морфологически. Один из таких тетраплоидных видов – культурная двузернянка–полба, *T. dicoccum*, которая за 7000 лет до н. э. выращивалась на полях в Старом Свете уже на значительных площадях.

Вероятно, дикая однозернянка *T. urartu* Thum. ex Gandil. послужила донором генома *A* как для пшениц секций *Dicoccoidea* Flaksb. и *Triticum*, так и для секции *Timopheevii* A. Filat. et Dorof. При этом первичный амфилоид секций *Dicoccoidea* и *Triticum* возник значительно раньше, чем первичный амфилоид секции *Timopheevii*. Древний земледelec и тот, и другой амфилоиды успешно обнаружил в природных условиях и/или своих посевах и смог приспособить для наиболее полного и наилучшего удовлетворения своих потребностей. Возделываемые виды секции *Timopheevii* имеют очень ограниченные, практически неперекрывающиеся с видами секции *Dicoccoidea* ареалы. Причем ареалы возделываемых видов секции

В настоящее время коллекция семян возделываемых растений ВНИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова (СПб) – одна из крупнейших в мире. Ее стоимость оценивается экспертами Всемирного генбанка (World Bank) в 8 трлн американских долларов (около 240 трлн рублей), и весь цивилизованный мир для удовлетворения все расширяющегося спектра потребностей своих граждан нуждается в ней все больше и больше.

*Timopheevii* – *T. timopheevii* Zhuk. (геном *GGAA*) и *T. zhukovskyi* Men. et Eridz. (геном *GGAAAA*) – ограничены пределами только Западной Грузии, в то время как гексаплоид из секции *Triticum* – мягкая пшеница (геном *BBAADD*) – в настоящее время является космополитом.

Дикие пшеницы в Европе не встречаются, и происхождение их возделываемых видов связывают с азиатским регионом. Исключение составляет происхождение европейского подвида *T. spelta* L., вероятно, произошедшего в результате скрещивания пленчатой тетраплоидной пшеницы *T. dicoccum* с гексаплоидным голозерным видом *T. aestivum* L.

Е.В. Вульф (1932) разделил культурные растения на три группы: 1) не имеющие никаких аналогов в диком состоянии; 2) имеющие такие

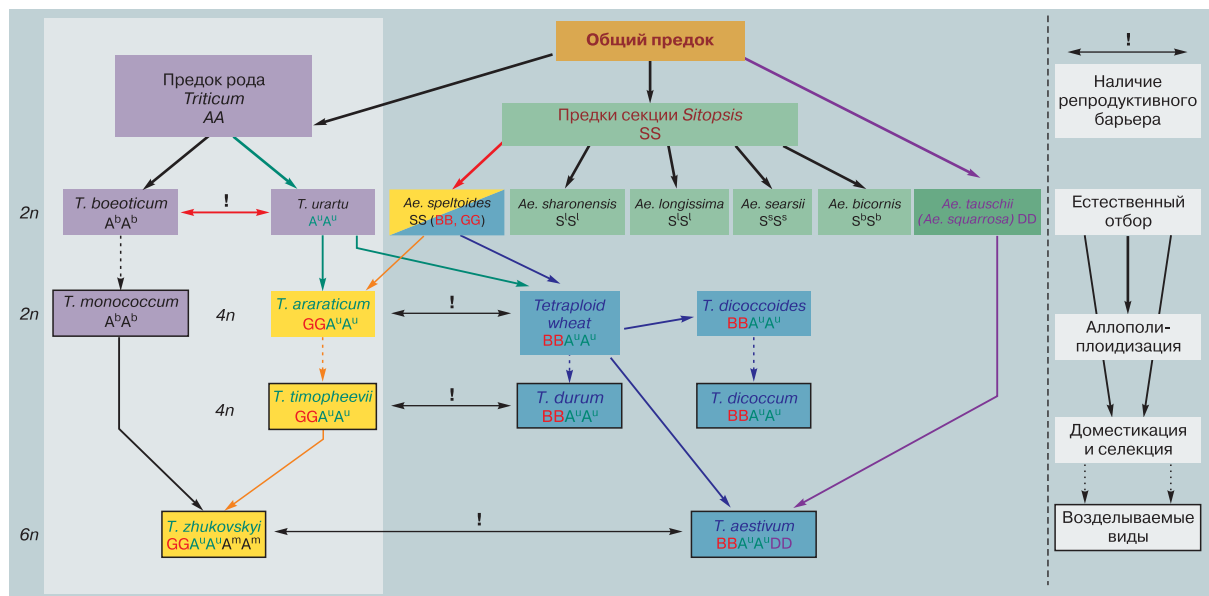


Рис. 10. Вероятная схема происхождения пшениц (Гончаров, 2012б).

**Амфиплоид** – межвидовой гибрид, полученный в результате объединения геномов обоих родительских видов.

аналоги, но сильно изменившиеся в культуре; 3) мало изменившиеся в культуре и дичающие в неблагоприятных условиях. Первые две группы автор назвал «подлинно культурные» виды, третью – «культивируемые» виды. Со времен А. Декандоля (1885) для изучения происхождения культурных растений используются четыре основных метода: а) ботанический; б) археолого-палеонтологический; в) исторический и г) лингвистический. Позже добавился этнографический метод и в последнее время интенсивно стали разрабатываться сравнительно-генетические и молекулярно-биологические подходы (см. обзоры: Doebley *et al.*, 2006; Гончаров и др., 2007), и исследователи как никогда близки к разгадке тайн происхождения и доместикации основных хозяйственно важных растений.

### РАСПРОСТРАНЕНИЕ ВОЗДЕЛЫВАЕМЫХ ВИДОВ ПШЕНИЦ

Археологические, а в последнее время молекулярно-биологические данные (рис. 11) позволяют сделать некоторые заключения о распространении возделываемых тетраплоидных видов пшениц.

Предполагаемые пути распространения *T. dicoccum* даны стрелками. Считается, что ее распространение могло идти двумя путями – посредством распространения вида без переселения людей и в результате переселения людей. Два равновероятных направления попадания полбы в Индию даны прерывистыми стрелками.

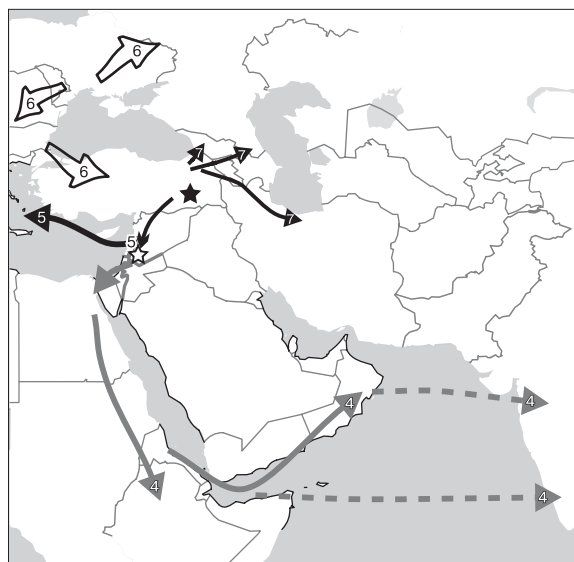
V.-C. Luo с соавт. (2007) по результатам молекулярно-биологического анализа разделили образцы *T. dicoccum* на две популяции: северную (с субпопуляциями 6 и 7) и южную (с субпопуляциями 4 и 5) (см. рис. 11). В субпопуляцию 6 вошли образцы из Греции, Балкан (Сербии, Боснии, Хорватии) и Ярославля (другие районы России не были представлены среди изученных образцов), в субпопуляцию 7 – образцы с северо-востока Турции, из Ирана и

бывшего Советского Закавказья. В субпопуляцию 5 вошли образцы из Ливана и Средиземноморья и по два образца из юго-восточной Турции и Армении; в субпопуляцию 4 – образцы из Эфиопии, Омана, южной Индии и Ливана и ряд образцов из других регионов. Образцы субпопуляции 4 были близки таковым субпопуляции 5 и субпопуляции 1 дикой полбы *T. dicoccoides* и, вероятно, произошли на юго-востоке Средиземноморья.

Таким образом, ко II тысячелетию до н. э. земледельческие народы завершили доместикацию всех основных злаковых культур – пшеницы, ячменя, риса и кукурузы, и они заняли значительные территории.

### «КЛЮЧЕВЫЕ» ГЕНЫ, КОНТРОЛИРУЮЩИЕ ВОВЛЕЧЕННЫЕ В ДОМЕСТИКАЦИЮ ПШЕНИЦ ПРИЗНАКИ

Сценарий доместикации пшениц представляется довольно простым: на ее первых этапах человек не создавал новых форм, а отбирал предоставленные природой полезные ему варианты, так как на ранних стадиях доместикации сам



**Рис. 11.** Происхождение и распространение культурной полбы *T. dicoccum* (Luo *et al.*, 2007. P. 947–959).

Нумерация субпопуляций 4–7 дана выше в тексте. Залитая звезда – первичное место происхождения (введения в культуру) *Triticum dicoccum*; незалитая звезда – вторичное или независимое от первого из *T. dicoccoides*.

еще не был способен целенаправленно создавать исходный материал для последующей селекции культивируемых им растений. Ответ на вопрос, «какие характерные признаки имели доместифицированные виды пшениц?» очевиден (табл. 2). Данные признаки были одними из решающих при доместикации большинства злаков, в том числе и пшениц. Однако у некоторых доместифицируемых видов они могут иметь не одинаковое значение (Komatsuda, Mano, 2002; Kosuge *et al.*, 2008). Кроме того, у части образцов возделываемых видов возможен возврат к «диким» признакам, например, к таким как ломкоколосость (Watanabe *et al.*, 2006). Очевидно, что многие характерные для культурных видов различия появились в результате интенсивной селекции (Matsuoka, 2011), следовательно, ключевые генетические изменения, связанные с характером контроля этих признаков, могут быть легко обнаружены. Представляет интерес изучение характера их генетического контроля. Принимая во внимание накопленные современной биологией факты, трудно представить, что хотя бы один из хозяйственно важных признаков возделываемых видов пшениц мог контролироваться одним геном. Несомненно, что на реализацию таких признаков и/или их выраженности работает значительная часть генома всего растения. Появление форм растений с мутациями в нескольких генах одновременно – событие крайне маловероятное, поэтому для древнего земледельца, имевшего дело с незначительными объемами культивируемого материала, шансы получить такую форму были ничтожны.

В то же время известно, что основные признаки, по которым шла доместикация растений, контролируются олигогенно. Недавние молекулярно-генетические исследования показали, что регуляторы транскрипции действуют как переключатели между дискретными программами развития (Simons *et al.*, 2006) и являются главной причиной морфологических изменений у растений в ходе их эволюции. Это подтверждает точку зрения, согласно которой морфологические изменения у доместифицированных видов растений возникают в результате изменений регуляторных генов или в их кодирующих районах (Kellogg, 2004). Реже происходят значительные геномные реорганизации (Chantret *et al.*, 2005).

Некоторые авторы считают, что при доместикации в процесс отбора был одновременно включен целый комплекс хозяйственно важных признаков (Evans, 1993; Dubcovsky, Dvorak, 2007). У злаков к ним относятся неломкость колоса, крупнозерность, высокое отношение крахмала к отрубям и физиологические изменения, ведущие к увеличению урожайности с единицы площади и возрастанию продуктивности одного растения. Чуть позже к вышеперечисленным признакам добавились хлебопекарные качества и чувствительность к длине дня (фотопериоду). Однако такая селекция – это уже использование разных стратегий отбора и предмет другого исследования.

Таким образом, для разрешения старой проблемы «внезапного» появления специфических признаков при доместикации растений исследователи получают возможность исполь-

Таблица 2

Важнейшие признаки «доместикации» у пшениц, контролируемые олигогенно

Признак, гены	Вид	Источник литературы
Компактность колоса, <i>C</i>	Пшеница карликовая	Nilsson-Ehle, 1911
Округлозерность, <i>s</i>	Пшеница округлозерная	Sears, 1947
Голозерность, <i>q*</i>	Пшеницы	Faris, Gill, 2002
Ломкоколосость, <i>Q*</i>	То же	Kajanus, 1923
Твердозерность	Пшеница мягкая	Symes, 1965
Чувствительность к фотопериоду, <i>Ppd1-Ppd3</i>	Пшеница мягкая	Гончаров, 1987
Яровость–озимость, <i>Vrn-A1-Vrn-D1</i>	То же	Pugsley, 1971, 1972

\* Дано современное обозначение символов генов. При этом доминантность–рецессивность признака приведена в соответствии с нашими новейшими данными (Гончаров, 20126).

зовать новые экспериментальные подходы. В последнее время они заняты поиском генов, «включенных» в неолитическую революцию (Doebley *et al.*, 2006).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Происхождение возделываемых растений, как и domestикация животных, – традиционная глава эволюционной биологии, основными вопросами которой являются постулирование факторов и поиск места происхождения возделываемых растений и области (областей) их domestикации и введения в культуру. Местами введения в культуру возделываемых растений исследователи традиционно считают районы произрастания их диких сородичей, поэтому поиск предковых форм возделываемых растений исследователи ведут в этих районах.

Возможность введения в культуру пшениц была реализована в крайне ограниченном числе мест, большинство из которых приурочено к территории так называемого «Плодородного полумесяца», расположенного на пространстве от Малой Азии до ирано-иракского пограничья (гор Загроса) и от Палестины до Турецкого Закавказья (см. рис. 4). В то время как ячмень мог быть domestцирован на значительных пространствах азиатского континента.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа частично финансировалась по Программам Президиума РАН № 30.30 подпрограммы II «Живая природа» и проекту РФФИ 12-04-01099. Автор считает приятным долгом поблагодарить к.б.н. А.Г. Блинова, Е.Я. Кондратенко и К.А. Головнину (ИЦИГ СО РАН, г. Новосибирск) за сотрудничество и проф. П.М. Бородину за бесценные советы.

### ЛИТЕРАТУРА

- Бонье Г. Растительный мир. М.: Типо-литография т-ва И.Н. Кушнерев, 1909. 321 с.
- Вавилов Н.И. Центры происхождения культурных растений // Тр. по прикл. ботан. и селекции. 1926. Т. 16. № 2. 248 с.
- Вавилов Н.И. Азия – источник видов // Раст. ресурсы. 1966. Т. II. Вып. 4. С. 577–580.
- Вульф Е.В. Введение в историческую географию растений. Л.: ВИР, 1932. 356 с. (Приложение 52-е к Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции).
- Головнина К.А., Гончаров Н.П., Кондратенко Е.Я., Блинов А.Г. Филогения А геномов диких и возделываемых видов пшениц // Генетика. 2009. Т. 45. № 11. С. 1540–1547.
- Гончаров Н.П. Генетический контроль фотопериодической чувствительности у мягкой пшеницы // Науч.-техн. бюлл. ВНИИ растениеводства, 1987. Вып. 174. С. 7–11.
- Гончаров Н.П. Сравнительная генетика пшениц и их сородичей. Изд. 2-е., испр. и доп. Новосибирск: Изд-во Гео, 2012а. 523 с.
- Гончаров Н.П. Экспедиции Н.И. Вавилова // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2012б. Т. 16. № 3. С. 560–578.
- Гончаров Н.П., Кондратенко Е.Я. Происхождение, domestикация и эволюция пшениц // Информ. вестн. ВОГиС. 2008. Т. 12. № 1/2. С. 159–179.
- Гончаров Н.П., Глушков С.А., Шумный В.К. Доместикация злаков Старого Света: поиск новых подходов для решения старой проблемы // Журн. общ. биологии. 2007. Т. 68. № 2. С. 125–147.
- Гончаров Н.П., Сормачева И.Д. Доместикация пшениц // Природа. 2014. № 2. С. 45–53.
- Декандоль А. Место происхождения возделываемых растений. СПб.: Изд-во К. Риккера, 1885. 490 с.
- Жуковский П.М. Культурные растения и их сородичи. (Систематика, география, экология, происхождение, использование). 2-е изд. М.: Колос, 1964. 791 с.
- История древнего Востока. Зарождение древнейших классовых обществ и первые очаги рабовладельческой цивилизации. Ч. 1. Месопотамия. М.: Наука, 1983. 534 с.
- Комаров В.Л. Происхождение культурных растений. М.; Л.: ОГИЗ-ГИЗ с.-х. и колх. кооп. лит-ры, 1931. 240 с.
- Купцов А.И. Введение в географию культурных растений. М.: Наука, 1975. 296 с.
- Малинова Р., Малина Я. Прыжок в прошлое: эксперимент открывает тайны прошлого. М.: Мысль, 1988. 271 с.
- Мигушова Э.Ф. К вопросу о происхождении геномов пшеницы // Тр. по прикл. ботан. генет. и селекции. 1975. Т. 55. Вып. 3. С. 3–26.
- Рябогина Н.Е. Очаги культивирования злаков в древности на территории Западной Сибири по палеонтологическим данным // Информ. вестн. ВОГиС. 2006. Т. 10. № 3. С. 572–579.
- Семенов С.А. Происхождение земледелия. Л.: Наука, 1974. 318 с.
- Тойнби А.Дж. Исследование истории. Т. 1. СПб.: Изд-во СПб. ун-та; изд-во Олега Абышко, 2006. 408 с.
- Трапезов О.В. Доместикация как самое раннее интеллектуальное достижение человечества // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2013. Т. 17. № 4/2. С.
- Фляксбергер К.А. О вхождении пшеницы в культуру // Природа. 1929. № 11. С. 965–971.
- Шнирельман В.А. Возникновение производящего хозяйства: Очаги древнейшего земледелия. Изд. 2-е, доп. М.: Книжный дом ЛИБРОКОМ, 2012. 448 с. (Серия: Академия фундаментальных исследований: история).
- Ammerman A.J., Cavalli-Sforza L.L. The Neolithic Transition and the Genetics of Populations in Europe. Princeton:

- Princeton Univ. Press, 1984.
- Cavalli-Sforza L.L., Feldman M.W. The application of molecular genetic approaches to the study of human evolution // *Nature Genet.* 2003. V. 33. P. 266–275.
- Chantret N., Salse J., Sabot T. *et al.* Molecular basis of evolutionary event that shared the Hardness locus in diploid and polyploidy wheat species (*Triticum* and *Aegilops*) // *Plant Cell.* 2005. V. 17. P. 1033–1045.
- Doebly J.F., Gaut B.S., Smith B.D. The molecular genetics of crop domestication // *Cell.* 2006. V. 127. P. 1309–1321.
- Dubcovsky J., Dvorak J. Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication // *Science.* 2007. V. 316. P. 1862–1866.
- Evans L.T. *Crop Evolution, Adaptation, and Yield.* Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1993. 512 p.
- Faris J.D., Gill B.S. Genomic targeting and high-resolution mapping of the domestication gene *Q* in wheat // *Genome.* 2002. V. 45. P. 706–718.
- Gill B.S., Appels R., Botha-Oberholster A. *et al.* A workshop report on wheat genome sequencing: international genome research on wheat consortium // *Genetics.* 2004. V. 168. P. 1087–1096.
- Goncharov N.P. Genus *Triticum* L. taxonomy: the present and the future // *Plant Syst. Evol.* 2011. V. 295. P. 1–11.
- Harlan J.R. *Crops and Man.* 2nd ed. Madison, Wisconsin: Amer. Soc. Agronomy, CSSA, 1992. 284 p.
- Heun M., Schäfer-Pregl R., Klawan D. *et al.* Site of Einkorn wheat domestication identified by DNA fingerprinting // *Science.* 1997. V. 278. No. 5341. P. 1312–1314.
- Hopf M. The plants found at Jericho // *Excavations at Jericho* V. L.: British School of Archaeology in Jerusalem, 1983. P. 580–621.
- Kajanus B. *Genetische Untersuchungen an Weizen* // *Bibliothica Genet.* 1923. Bd. 5. 187 s.
- Kamm A. Non-brittle types in a wild population of *Triticum dicoccoides* Körn in Israel // *Israel. J. Bot.* 1974. V. 23. P. 43–58.
- Kellogg E.A. Evolution of developmental traits // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2004. V. 7. P. 92–98.
- Kjellman F.R. Om Tschuktschernas Hushallväxter // *A.F. Nordenskiöld. Vega Expeditiones vetenskapliga iakttagelser.* Stockholm, 1882. S. 355–372.
- Komatsuda T., Mano Y. Molecular mapping of the intermediate spike-*c* (*int-c*) and non-brittle rachis 1 (*br1*) loci in barley (*Hordeum vulgare* L.) // *Theor. Appl. Genet.* 2002. V. 105. P. 85–90.
- Kosterin O.E., Zaytseva O.O., Bogdanova V.S., Ambrose M. New data on three molecular markers from different cellular genomes in Mediterranean accessions reveal new insights into phylogeography of *Pisum sativum* L. subsp. *elatuis* (Beib.) Schmahl. // *Genet. Res. Crop Evol.* 2010. V. 57. P. 733–739.
- Kosuge K., Watanabe N., Kuboyama T. *et al.* Cytological and microsatellite mapping of the genes for spherical grain, compact spike and awn inhibition in durum wheat // *Euphytica.* 2008. V. 159. No. 3. P. 289–296.
- Lev-Yadun S., Gopher A., Abbo S. The cradle of agriculture // *Science.* 2000. V. 288. No. 5471. P. 1602–1603.
- Luo V.-C., Yang Z.-L., You F.M. *et al.* The structure of wild and domesticated emmer wheat populations, gene flow between them, and the site of emmer domestication // *Theor. Appl. Genet.* 2007. V. 114. No. 6. P. 947–959.
- Matsuoka Y. Evolution of polyploid *Triticum* wheats under cultivation: the role of domestication, natural hybridization and allopolyploid speciation in their diversification // *Plant Cell Physiol.* 2011. V. 52. P. 750–764.
- Mori N., Ishii T., Ishido T. *et al.* Origin of domesticated emmer and common wheat inferred from chloroplast DNA fingerprinting // *Proc. 10th Intern. Wheat Genet. Symp.* (1–6 September 2003, Paestum, Italy). Rome: Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, 2003. P. 25–28.
- Neef R. Overlooking the steppe forest: preliminary report on the botanical remains from early Neolithic Göbekli Tepe (southern Turkey) // *Neo-lithics.* 2003. V. 2. P. 13–15.
- Nesbitt M. When and where did domesticated cereals first occur in southwest Asia? // *The Dawn of Farming in the Near East.* Berlin: Ex Oriente, 2002. P. 113–132.
- Netolitzky F. Fragestellung zur nacheiszeitlichen Geschichte heimischer Gewächse // *Berichte die Deutsche Botanisch Geselshaft.* 1944. Bd. 61. S. 219.
- Nilsson-Ehle H. Kreuzungsuntersuchungen an Hafer und Weizen. II // *Lunds Univ. Arsk. N. F. Afd.* 2. 1911. Bd. 7. No. 6. 84 s.
- Özkan H., Brandolini A., Pozzi C. *et al.* A reconsideration of the domestication geography of tetraploid wheats // *Theor. Appl. Genet.* 2005. V. 110. No. 6. P. 1052–1060.
- Pugsley A.T. A genetic analysis of the spring–winter habit of growth in wheat // *Austral. J. Agric. Res.* 1971. V. 22. P. 21–31.
- Pugsley A.T. Additional genes inhibiting winter habit in wheat // *Euphytica.* 1972. V. 21. P. 547–552.
- Sears E.R. The sphaerococcum gene in wheat // *Genetics.* 1947. V. 32. P. 232–246.
- Simons K.J., Fellers J.P., Trick H.N. *et al.* Molecular characterization of the major wheat domestication gene *q* // *Genetics.* 2006. V. 172. No. 1. P. 547–555.
- Symes K.J. The inheritance of grain hardness in wheat as measured by the particle size index // *Austral. J. Agric. Res.* 1965. V. 16. P. 113–123.
- Tanno K., Willcox G. How fast was wild wheat domesticated? // *Science.* 2006. V. 311. P. 1886.
- van Zeist W. Reflections on prehistoric environments in the Near East // *The domestication and exploitation of plants and animals.* London, 1969. P. 35–46.
- van Zeist W., Bakker-Heeres J.A.H. Archaeobotanical studies in the Levant. 1. Neolithic sites in the Damascus basin: Aswad, Ghoraife, Ramad // *Palaeohistoria.* 1975. V. 24. P. 165–256.
- Watanabe N., Fujii Y., Kato N. Microsatellite mapping of the genes for brittle rachis on homologous group 3 chromosomes in tetraploid and hexaploid wheats // *J. Appl. Genet.* 2006. V. 47. P. 93–98.

УДК 575.174:636

## ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СОХРАНЕНИЯ ГЕНОФОНДОВ ДОМЕСТИЦИРОВАННЫХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ

© 2013 г. Ю.А. Столповский

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия,  
e-mail: ustolpovsky@gmail.com

Поступила в редакцию 3 июня 2013 г. Принята к публикации 1 ноября 2013 г.

### ВВЕДЕНИЕ

Мировая тенденция индустриализации сельского хозяйства несет в себе множество рисков. Один из них – это сокращение национальных генетических ресурсов или генофондов животных и растений (доктрина продовольственной безопасности РФ, 2010). Включение в мировое сельское хозяйство транснациональных животноводческих индустрий создает опасность сокращения национальных генетических ресурсов сельскохозяйственных видов, зависимость от импорта продовольствия и селекционных достижений, а также угрозу глобализации распространения инфекций и скрытых генетических дефектов. Отсюда следует все возрастающая важность сохранения генофондов локальных сельскохозяйственных видов животных.

Впервые вопрос о сохранении редких и исчезающих пород сельскохозяйственных животных поднял отечественный генетик А.С. Серебровский (1928). Международное признание проблемы датируется 1946 г., когда первая сессия Консультативного комитета по сельскому хозяйству FAO (международная продовольственная и сельскохозяйственная организация Объединенных Наций) взяла на себя ответственность по оценке и консервации фонда животных и растений. Одно из значимых современных исследований данного вопроса было проведено в рамках рабочего семинара FAO/ILRI (ILRI, 1999) по идентификационным методологиям оценки ценности потенциальных

генетических ресурсов животных (AnGR) и последующих инициатив ILRI (Программы по экономике сохранения и устойчивому использованию – Economics of AnGR Conservation and Sustainable Use Programme).

В настоящее время проблемы контроля и управления породами сельскохозяйственных животных приобрели международное значение, поскольку затрагивают многие страны мира, особенно обладающие большой территорией, различными агроэкологическими и экономическими условиями. Свидетельство тому – международная конвенция о биоразнообразии, принятая на форуме «Повестка дня на XXI в.». В конвенции подчеркивается значение сохранения и регионального использования генетических ресурсов для продовольственной безопасности планеты (Конвенция ..., 2002).

Сохранение генетических ресурсов местных пород животных мировое сообщество тесно связывает с биологизацией и устойчивым развитием сельского хозяйства: необходимостью сохранения культурных традиций и агроландшафтов в мире и его отдельных регионах, а также здоровьем нации и качеством жизни в целом. В научном мире аргументы в пользу сохранения генофонда локальных пород делятся на экономико-биологические, культурно-исторические и научные. Последние связаны с исследованиями в области генетики, физиологии, биохимии, иммунологии, морфологии и т. д. Изучение местных пород с древним происхождением может вскрыть механизмы эволюции и



коэволюции, онтогенеза, поведения, естественного и искусственного отбора.

Отдельные ученые и научные коллективы отмечали опасность все ускоряющегося процесса эрозии генофонда и оскудения видового состава биосферы. Для того чтобы предотвратить исчезновение видов, в том числе пород животных и сортов растений одомашненных видов, и сохранить возможность их восстановления или использования в будущем, началось формирование проектов по созданию хранилищ семян растений, соматических и половых клеток различных животных и растений (Вепренцев, Ротт, 1991; Алексанян, 2003; FAO, 2000, 2009). Сегодня генные банки, преимущественно растений, имеют 140 стран мира; наиболее известный среди них международный арктический генбанк на о. Шпицберген. Если генетические ресурсы растений относительно легко сохраняются в генбанках, то задача сохранения ресурсов животноводства значительно более трудная, прежде всего из-за биологических и технических условий.

В 2007 г. международное сообщество приняло первый план глобальных действий и Интерлакенскую декларацию (ИД) о генетических ресурсах животных. ИД включает в себя 23 стратегических приоритета, направленных на борьбу с эрозией генетического многообразия животных и устойчивое использование их генетических ресурсов (FAO, 2007). Наиболее полная информация о генетическом разнообразии domesticированных видов на глобальном уровне собрана в базах данных FAO: DAD-IS и DAGRIS (<http://fao.org/dad-is>). На сегодняшний день известны данные о 7616 породах, из них 6536 определены как местные, а 1080 – как трансграничные. Среди всех пород domesticированных видов 38 % находятся вне зоны риска, 9 % исчезли, 20 % находятся в «состоянии опасности», т. е. численность самок находится в пределах 100–1000, а самцов 5–20 голов, не известно состояние у 36 % пород (FAO, 2010).

Очевидно, для того чтобы сохранить породы животных, фундаментальным условием становится определение методов и принципов выявления их генетического своеобразия. Исследования генетической структуры локальных пород различных видов сельскохозяйственных животных с помощью популяционно-генетических

**Генофонд** – совокупность всех генов скрещивающейся популяции (в англоязычной литературе – gene pool). Термин «генофонд» введен А.С. Серебровским (1928 г.). **Генетические ресурсы** – генетическое разнообразие, которое сохраняется внутри вида, включая разнообразие на уровне ДНК.

**Генетические ресурсы сельскохозяйственных животных** – это породы, породные группы, популяции, сформированные в процессе одомашнивания внутри каждого вида, используемого для производства продуктов питания, а также в сельском хозяйстве, вместе с их ближайшими дикими родственниками.

**Понятие «Устойчивое развитие»** введено в 1989 г. (sustainable development). Главный смысл этого термина заключается в обеспечении такого развития, которое не ставит под угрозу жизнеобеспечение будущих поколений, природные системы, водные ресурсы, почву и живые организмы, т. е. все системы, от которых зависит жизнь на Земле.

Впервые понятие о породе животных возникло в XII в., когда человек стал сознательно прибегать к скрещиванию животных. **Породой** следует называть целостную группу животных одного вида, созданную трудом человека в определенных социально-экономических условиях, имеющую общую историю развития и происхождения, общность к требованиям технологии производства и природным условиям и отличающуюся от других пород характерными признаками продуктивности, экстерьера, интерьера и стойко передающую свои качества потомству.

методов необходимы для создания генетически обоснованных программ по выявлению генетической изменчивости в целях дальнейшего сохранения и использования, в том числе для нужд как современного агропромышленного комплекса, так и традиционного животноводства. Мировой и отечественный опыт показывают, что потеря породного разнообразия оказывается не только утратой уникального и бесценного генетического разнообразия, но и сужением генетического потенциала, принципиально ограничивающего возможности селекционной работы, порообразовательного процесса в настоящем и будущем (Иванов, 1924, 1970; Серебровский, 1928; Лобашев, 1954; Maijala, 1970; Глембоцкий, Копыловская, 1972; FAO/UNER,

1981–2009; Жебровский и др., 1983; Simon, 1984; Беляев, 1987; Bodo, 1989; Уханов и др., 1993; Эрнст, Дмитриев, 1994; Алтухов, 1995; Столповский и др., 1997; Паронян, Прохоренко, 2008; Петрини и др., 2012; FAO, 1984–2012).

### **КОНЦЕПЦИИ СОХРАНЕНИЯ ГЕНОФОНДОВ ДОМСТИЦИРОВАННЫХ ВИДОВ**

Отсутствие фундаментальных знаний, стратегий и законов о сохранении генетических ресурсов животных препятствует согласованным действиям на региональном, федеральном и международном уровнях, формированию надежных и современных механизмов сохранения и управления породным разнообразием и пороодообразовательным процессом в мире и Российской Федерации в частности.

Главными условиями устойчивого сохранения национальных генетических ресурсов являются: наличие организационной структуры, отвечающей за сохранение отечественного породного разнообразия, федеральных законов, программы о генофондах пород животных и сортов растений. К основным задачам относятся: проведение генетического мониторинга, каталогизация и паспортизация, создание компьютерных баз данных, генофондных и коллекционных хозяйств, генетических банков, генетико-селекционных планов сохранения и управления породами, а также учреждение зон традиционного аграрного хозяйствования.

Современная стратегия при селекции местных (локальных, аборигенных, эндемичных, национальных, аутохтонных) пород животных сводится к двум направлениям.

1. Селекция на улучшение локальных пород с использованием различных вариантов скрещивания с коммерческими (заводскими) породами: вводное (грединг и апгрединг), межпородное (фесткроссинг, беккросс), породно-линейное (топкроссинг) создание синтетических популяций планируемой кровности.

2. Селекция, направленная на сохранение и поддержание генофонда породы с широкой изменчивостью. Основным методом при сохранении местных пород – чистопородное разведение. Критериями отбора в генофондном стаде (породе) должны быть признаки, которые не проти-

воречили бы сохранению данной популяции, ее генотипической и фенотипической структуре. Наиболее общими критериями при сохранении локальных пород являются: жизнеспособность, адаптивность, состояние здоровья, воспроизводительные способности, а также уникальный генетический полиморфизм на молекулярном и морфологическом уровнях.

При сохранении породы в качестве потенциального материала для последующего использования в селекции необходимо сберечь весь ее генофонд, поскольку мы либо не знаем, либо лишь предполагаем, какими именно генами или их сочетаниями определяются хозяйственно важные свойства породы, и тем более, что окажется полезным при появлении новых селекционных задач или при изменении технологических условий.

На рис. 1 представлен результат работы международных экспертов Продовольственной организации ООН (ФАО), посвященной сохранению и управлению генетическими ресурсами животных в отдельных государствах.

### **СОСТОЯНИЕ ГЕНОФОНДОВ ДОМСТИЦИРОВАННЫХ ВИДОВ И ПОРОДООБРАЗОВАТЕЛЬНЫЕ ЦЕНТРЫ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

Основателем современных представлений о центрах доместики растений и животных, зарождения аграрной цивилизации является Н.И. Вавилов. Он впервые определил как глобальную задачу необходимость мобилизации генетических ресурсов всех культурных растений и их сородичей для нужд селекции (Вавилов, 1935, 1965). В настоящее время на территории Российской Федерации разводится более 400 пород. Официально в МСХ РФ на 01.01.2011 зарегистрировано 412 пород, 126 типов, 162 кросса, 177 линий, относящихся к 44 видам сельскохозяйственных животных – млекопитающих, птиц, рыб и насекомых (Государственный реестр ..., 2011).

Наибольшее число пород в виде на территории России зарегистрировано у собак (56 пород), далее по убыванию: кур (53), лошадей (44), овец (44), рыб (36), крупного рогатого скота (35), гусей (25), свиней (22), американских норков (15). Доля исконно российских пород,



**Рис. 1.** Информация, необходимая для определения стратегии контроля над генетическими ресурсами животных (ФАО, 2007).

т. е. выведенных в России, среди общего количества разводимых в РФ (2010 г.) колеблется от 27 % (куры) до 70 % (овцы, лошади) и 85–91 % (козы и карпы) (см. рис. 2).

С 1990 г. по 2010 г. в России численность сельскохозяйственных животных уменьшалась. Так, поголовье крупного рогатого скота сократилось на 36 млн 21 тыс., или на 63,2 %, лошадей на 1 млн 269 тыс., или 49,5 %, свиней на 22 млн 151 тыс., или на 57,9 %, овец и коз на

36 млн 651 тыс., или на 63 %, птицы на 322 млн, или на 49 %.

Снижение численности привело к сокращению породного разнообразия: исчезли как малочисленные ранее завезенные импортные, так и отечественные породы, а также повысилась вероятность генетической эрозии за счет снижения внутри- и межпородного генетического разнообразия.

Для выявления отечественных центров породообразования проанализировано происхождение 198 пород российской селекции 33 сельскохозяйственных видов, представленных в Государственном реестре селекционных достижений, допущенных к использованию ФГУ «Государственная комиссия Российской Федерации по испытанию и охране селекционных достижений» МСХ Российской Федерации. Это позволило оценить географические закономерности распределения отечественных пород по 66 регионам Российской Федерации (см. рис. 3).

В результате анализа сформированных пород на территории Российской Федерации выделено 5 основных центров с наибольшим количеством выведенных пород:

– Северно-европейский (Ленинградская область);

**Генетический банк или банк генов:**

1) набор генов определенного организма, полученных в составе рекомбинантных ДНК;

2) коллекция клеточных культур, замороженной спермы, яйцеклеток, эмбрионов, ДНК и т. д., в наибольшей степени представляющая генотипы определенного вида и сохраняемая с этой целью.

**Два основных метода сохранения: *ex situ* и *in situ*.** Первый – криогенное хранение спермы, ооцитов, эмбрионов, ДНК, а также животных, содержащихся в лабораторных условиях или зоопарках. Второй – поддержание живущего поголовья локальных животных, главным образом в первоначальных условиях их среды обитания.

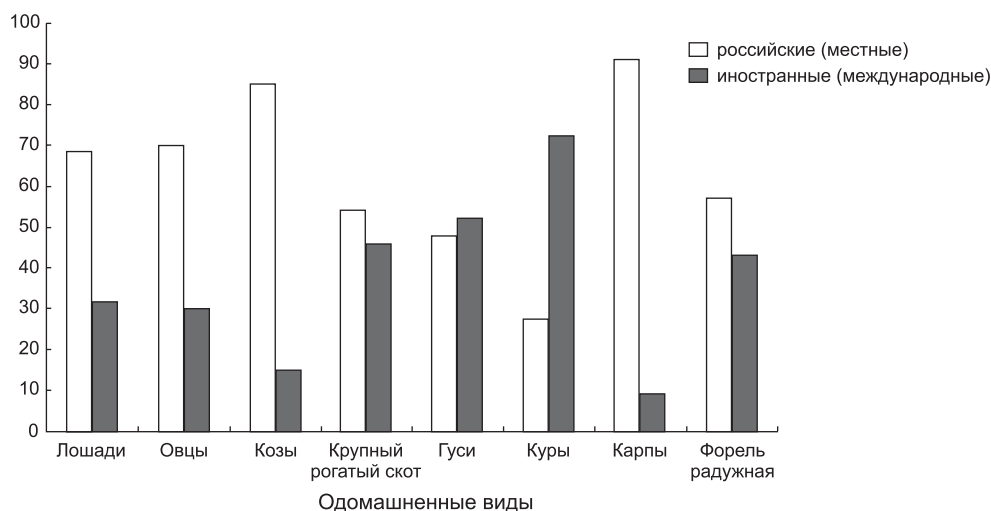


Рис. 2. Соотношение российских (местных) и иностранных (международных) пород, зарегистрированных в Госреестре РФ (%), 2011 г.



Рис. 3. Центры пороодообразования в России на основании данных по 33 domestцированным видам животных.

- Центрально-европейский (Московская, Воронежская, Кировская области);
- Южно-европейский (Краснодарский, Ставропольский край, Ростовская область);
- Кавказский (Дагестан, кавказские республики РФ);
- Западно-сибирский (Алтай и Тыва).

**Уникальность российского генофонда местных пород обусловлена тем, что среди 33 видов одомашненных животных 198 пород представлено породами российской селекции – около 2,5 % мирового породного разнообразия. В настоящее время доля российских местных пород среди всех domestцированных**

**Местные (локальные) породы** – породы, которые встречаются только в одной стране

**Трансграничные породы** – породы, которые встречаются более чем в одной стране. Они подразделяются на:

**региональные трансграничные породы:** трансграничные породы, которые встречаются только в одном из 7 регионов, определенных в SoW-AnGR;

**международные трансграничные породы:** трансграничные породы, которые встречаются в нескольких регионах по классификации SoW-AnGR.

**Регионы по классификации SoW-AnGR:** Африка, Азия, Европа и Кавказ, Латинская Америка и Карибский бассейн, Ближний и Средний Восток, Северная Америка, юго-западная часть Тихого океана (7 регионов).

видов, разводимых в РФ, составляет 49 %, международных трансграничных – 51 %. Выявленные условные центры породообразования являются исторически сложившимися «точками роста и сохранения» как породного разнообразия, так и скрытой генетической изменчивости.

### МОНИТОРИНГ И УПРАВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИМИ РЕСУРСАМИ ЖИВОТНЫХ

Сегодня нет достаточной информации относительно истинного уровня генетической изменчивости внутри большинства видов домашних животных, что затрудняет определение генетической ценности многочисленных популяций, поиск центров «скрытой» генетической изменчивости, а также принятие научно обоснованных решений по сохранению внутри- и межпородной изменчивости среди генофондов пород domesticированных видов. К наиболее

распространенным методам и способам мониторинга генетических ресурсов животных относятся: а) зоометрический; б) селекционный; в) генетический; г) популяционный.

**Генетический мониторинг** – долговременное слежение за состоянием популяционных генофондов вида (породы), оценка и прогнозирование их динамики во времени и пространстве, определение пределов допустимых изменений.

**Генетическая изменчивость** – изменчивость, обусловленная взаимодействием и различным проявлением генетических факторов. Изменчивость в генетическом составе особей между породами и видами; наследуемая генетическая изменчивость внутри и между популяциями.

**Биохимические маркеры** – маркеры определенного структурного гена, выявляемые с помощью методов гистохимического окрашивания.



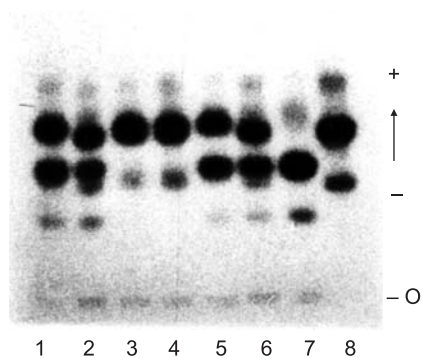
Рис. 4. Разнообразие мастей сельскохозяйственных животных на примере эфиопских коз.

Мониторинг генетической изменчивости занимает центральное место в проектах по сохранению пород одомашненных видов в течение длительного времени. Стада сельскохозяйственных животных обладают значительной изменчивостью. Морфологическая изменчивость (дискретная и непрерывная) по масти, телосложению, росту, массе и т. п. характеризуется огромным размахом. Особенно это разнообразие заметно у локальных животных, у которых индивидуальная изменчивость очень высока (рис. 4).

Если исследования метрических признаков имели широкое распространение, то исследования фенотипической изменчивости (фенов) не так популярны в животноводстве, но становятся весьма актуальными в программах сохранения (FAO, 2007). Для учета и первичного анализа генетически детерминированных альтернативных дискретных признаков (фенов) Н.В. Тимофеев-Ресовский, А.В. Яблоков (1973) предложили фенетический подход, который активно используется при изучении различных обитающих в природе видов, и может быть применен на сельскохозяйственных животных. Фены носогубного зеркала, краниологические, экстерьерные, окраски, этологические, биохимические и т. п. позволяют оценить генетические особенности группы особей, выявить изменчивость популяции на различных уровнях, реконструировать микрофилогенез популяций (Фенетика ..., 1988), что в конечном счете помогает эффективнее контролировать сохранение фенотипической и генетической структуры генофонда (Тимофеев-Ресовский, Яблоков, 1973, 2009; Яблоков, 1980).

Значительное количество данных по генетической изменчивости сельскохозяйственных животных получено на молекулярном уровне. Выявлен полиморфизм поверхностных антигенов эритроцитов, сывороточных белков и ферментов тканей, эритроцитов (биохимические маркеры) и др. (Hunter *et al.*, 1957; Nevo, 1987; Nevo, Beiles, 1989).

В настоящее время только у крупного рогатого скота описано 13 эритроцитарных систем групп крови, только в одной В-системе различают около 1000 фенотипов, 17 полиморфных белков и ферментов сыворотки крови и 23 полиморфных локуса в эритроцитах и лейкоцитах. Итого 40 полиморфных систем, не считая ло-



**Рис. 5.** Изофермент фосфоглюкомутаза I (PGM-I) серого степного (украинского) скота.

Фенотипы: 1 – ВХ; 2 – АВ; 3 – АА; 4 – АА; 5 – ВХ; 6 – АВ; 7 – ВВ; 8 – АА.

кусов главного комплекса гистосовместимости, белков молока, ферментов тканей, антигенов, белков, ферментов спермы, аллотипов сывороточных гликопротеинов, иммуноглобулинов, полиморфизма ДНК (рис. 5).

Перечисленные полиморфные системы успешно применяли для генетической паспортизации, контроля происхождения, при анализе генетической структуры и изменчивости популяции, оценке степени генетического сходства или различия пород, стад, линий животных, изучении их филогенеза (Сороковой и др., 1976; Глазко, 1985; Букаров, 1995; Попов, Иванов, 1999; Харченко, Глазко, 2006; Марзанов и др., 2008).

Важно подчеркнуть, что информация о генетической изменчивости существенна для разработки стратегий по оптимизации сохранения и использования генофондов животных. Принято считать, что новые молекулярные инструменты могут дать возможность идентифицировать гены, участвующие в формировании многих признаков, включая адаптивные признаки и полиморфизм, приводящий к функциональным генетическим вариантам (QTN – нуклеотиды количественных признаков – Quantitative Trait Nucleotides). Фенотипическое описание животных обеспечивает достаточно грубую оценку средних значений по функциональным вариантам генов, присутствующих у данных индивидуумов или популяций. При отсутствии для большинства пород надежных фенотипических и QTN данных, наиболее быстрой и рентабельной оценкой генетического разнообразия является генотипирование полиморфных участков

ДНК одновременно по многим локусам. Такой подход оказывается полезным при исследовании происхождения domesticированных видов, их последующей миграции, так же, как при получении информации по эволюционным взаимосвязям между их различными группами (филогенетические деревья) и установления географических областей скрещиваний между популяциями, имеющими разное генетическое происхождение.

В связи с вышесказанным мониторинг сельскохозяйственных популяций должен отвечать трем основным требованиям. Во-первых, способствовать сохранению качественного разнообразия и структуры генофондов пород (популяций). Во-вторых, иметь дело с генетическими системами, данные по изменчивости которых можно использовать при подборе генотипов таким образом, чтобы добиться их репрезентативности при минимальной численности. В-третьих, методы мониторинга должны дополнять друг друга, сочетать в себе относительную простоту и воспроизводимость с наибольшей результативностью.

**Сочетания фенотипов, аллелей структурных генов, полилокусных спектров последовательностей ДНК позволяют надежно дифференцировать породы, выделять породоспецифические признаки, породоспецифические аллели структурных генов, отслеживать изменения генетического разнообразия во времени и пространстве.**

### **ДНК-МАРКЕРЫ В ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ**

Новый класс генетических маркеров появился в середине 80-х годов XX столетия после разработки методов прямой оценки полиморфизма участков ДНК благодаря развитию методов выделения, клонирования и рестрикции генов. Решающую роль в становлении и развитии ДНК-маркеров сыграло открытие полимеразной цепной реакции (ПЦР – PCR). В популяционной генетике широкое использование получили методы прямого исследования полиморфизма различных участков ДНК. Совокупность этих методов, получивших название ДНК фингер-

принтинг, широко используется для решения задач в различных областях биологии. В ДНК фингерпринтинге предусматриваются две основные стратегии:

1) «классический» фингерпринтинг, основанный на ДНК гибридизации;

2) ПЦР-анализ, заключающийся в амплификации специфичных ДНК последовательностей *in vitro* с помощью специфичных или неспецифичных олигонуклеотидов (праймеров) и термостабильной ДНК-полимеразы с последующим электрофоретическим разделением амплифицированных фрагментов и определением молекулярного полиморфизма посредством различных методов окрашивания полученных ДНК фрагментов (Mullis, Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988).

Для оценки уровня полиморфизма генома, генетического разнообразия и паспортизации сельскохозяйственных животных используют мультилокусные и монолокусные ДНК-маркеры. К последним относятся микросателлиты и маркеры, основанные на тестировании однонуклеотидных замен, в частности:

STS (меченый сайт последовательности – Sequence Tagged Site) является ДНК последовательностью, которая встречается в геноме только один раз в известном месте. Они не обязательно бывают полиморфными и используются для построения физических карт.

**Полимеразно-цепная реакция** – метод получения большого числа копий (порядка миллиона) небольшого фрагмента матричной ДНК (размером от 5 до нескольких тысяч нуклеотидов).

**ДНК-фингерпринтинг**, или геномная дактилоскопия – идентификация на основе молекулярного генотипирования гипервариабельных участков генома.

**Генетический потенциал** – в селекции сельскохозяйственных животных под данным термином подразумевают способность особи проявлять высокий уровень развития признака в благоприятных условиях среды.

**Секвенирование** – расшифровка нуклеотидных последовательностей ДНК.

**Генетический маркер** – детерминирует фенотипический признак, используемый для генетического картирования и индивидуальной идентификации организмов или клеток.

Микросателлиты или SSR (Simple Sequence Repeats), или STR (Simple Tandem Repeats) состоят из участков ДНК длиной в 2–6 нуклеотидов (пар оснований – п.о., или base pairs – bp), повторенных много раз по типу тандема (например САСАСАСАСАСАСА). Они распространены по всему эукариотическому геному. Полиморфизмы могут быть визуализированы на секвенирующем геле и при наличии автоматического ДНК секвенатора, позволяющего анализировать с высоким выходом большое количество образцов (Litt, Luty, 1989). Микросателлиты гипервариабельны; они часто имеют десятки аллелей по одному локусу, отличающихся один от другого по количеству повторов. Они еще остаются маркерами выбора для изучения разнообразия, так же, как и для анализа происхождения и картирования локусов количественных признаков (QTL), хотя в настоящее время микросателлиты могут быть заменены в результате развития методов микроматриц (или чипов) для анализа SNP. ФАО опубликовала рекомендации по ряду микросателлитных локусов для их использования в целях изучения изменчивости главных сельскохозяйственных видов, которые были разработаны ISAG–FAO Консультативной группой по генетическому разнообразию животных (см. DAD-IS библиотеку <http://www.fao.org/dad-is/>).

Минисателлиты обладают теми же характеристиками, что и микросателлиты, но повторы по своей длине содержат от десяти до нескольких сотен пар оснований (bp). Микро- и минисателлиты известны также, как VNTR (варьирующее количество тандемных повторов – Variable Number of Tandem Repeats).

Согласно принятому определению (Brookes, 1999), SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), это однонуклеотидные позиции в геномной ДНК, для которых в популяции имеются различные варианты последовательностей (аллели). SNP являются вариантами по одному нуклеотиду, которые не меняют общую длину ДНК последовательности в этом регионе. SNP возникают по всему геному. Они находятся в изобилии и представлены с частотой один SNP на каждые 1000 п.о. в геноме человека. Большинство SNP локализуется в некодирующих областях и не имеют прямого влияния на фенотип индивидуума. Однако некоторые SNP, располагающиеся

в экспрессирующихся последовательностях или областях, влияющих на экспрессию генов (промоторы, энхансеры), могут индуцировать изменения в структуре белка или регуляции. Внедряя в практику животноводства ДНК-маркеры данного типа, можно проводить точную идентификацию генотипов животных, несущих желательные фенотипические особенности, и на их основе вести селекцию. Таким образом возможно более рационально использовать генетический потенциал сельскохозяйственных животных.

Большинство известных на сегодня молекулярно-генетических маркеров продуктивности выявлено у крупного рогатого скота (КРС). Многие из них связаны с показателями молочной продуктивности. С помощью ПЦР-ПДРФ, наиболее распространенного метода типирования SNP, анализируется полиморфизм генов: каппа-казеина (CSN3), пролактина (PRL), соматотропина (GH), бета-лактоглобулина (BLG), диацетил-глицерин О-ацилтрансферазы (DGAT1), гена рилизинг фактора (гипоталамического фактора транскрипции – PIT-1) и других генов у различных пород КРС.

В Польше подобные работы проводились на черно-пестрой и джерсейской породах (Dybus *et al.*, 2005; Komisarek, Dorynek, 2006), в Германии – на немецкой голштинской породе КРС (Kaure *et al.*, 2007), в Италии – на нескольких итальянских породах (Fontanesi *et al.*, 2007). В России изучается связь полиморфизма генов гормона роста и пролактина с содержанием жира в молоке (Лазебная и др., 2011), а также аллельный полиморфизм гена каппа-казеина CSN3 (Sulimova *et al.*, 2007). В Индии исследовали местный скот по генам DGAT1 и ABCG2 (Tantia *et al.*, 2006). *Bos indicus* был генотипирован в Бразилии по генам DGAT1 и LEP (Souza *et al.*, 2010). Подобные работы по генотипированию различных пород проводятся учеными других стран: Бельгии (Grisart *et al.*, 2004), Иордании (Jawasreh *et al.*, 2009), Ирана (Mohammadabadi *et al.*, 2010), Словацкой Республики (Moravčiková *et al.*, 2012), Турции (Akis Akad *et al.*, 2012).

Ген лептина исследуют на взаимосвязь с мясной продуктивностью и репродуктивными показателями (Lusk, 2007; Sharifzadeh, Doosti, 2012). Также в связи с ассоциацией с показателями качества мяса у различных сельскохо-



зайственных животных изучаются гены *RORC*, *SCD*, *GH*, *TG* (Ward *et al.*, 1998; Matsushashi *et al.*, 2011).

С помощью данного типа маркеров ведутся исследования широко распространенного заболевания КРС – комплексного порока позвоночника (CVM), проявление которого связано с миссенс-мутацией в гене *SLC35A3* крупного рогатого скота, и BLAD-синдрома КРС, проявляющегося при наличии точечной мутации в кодирующей части аутосомного гена *CD 18* (Kehrli *et al.*, 1990; Kanael *et al.*, 2005; Марзанов и др., 2013).

Изучается полиморфизм ДНК-маркеров и их влияние на показатели мясной продуктивности у свиней различных пород. Изучаются гены гамма-субъединицы протеинкиназы А (*PRKAG3*), гипофизарного транскрипционного фактора (*POUIF1*), рецептора меланокортина 4 (*MC4R*), инсулиноподобного фактора роста 2, гены наследственных заболеваний (*Ryr1* и *KPL2*) (Kim *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2005).

Значимым показателем при разведении сельскохозяйственных животных являются их репродуктивные качества, которые оцениваются генотипированием по гену *ESR* (Szreder, Zwierzchowski, 2004; Santana *et al.*, 2006).

У овец породы австралийский меринос был выявлен однонуклеотидный полиморфизм на 10-й хромосоме, коррелирующий с комолым фенотипом (Dominik *et al.*, 2011).

С помощью другого метода детекции SNP – SSCP, эффективного, в частности, для поиска новых однонуклеотидных замен в ДНК, изучался ген лептина у овец и азиатского буйвола (Barzehkar *et al.*, 2009; Kale, Yadav, 2013).

В 2004 г. в США стартовал проект по геномной селекции крупного рогатого скота. С помощью генетического анализатора Illumina был осуществлен ресиквенс геномов 392 животных 14 пород КРС. В результате ресиквенса было выявлено 444792 SNPs, из которых отобрали 54000 SNPs с высокой степенью детектирования. С 2007 г. началось практическое использование SNP-чиповой технологии, после того как удалось сконструировать чип под названием SNP50 Bead Chip (Matukumalli *et al.*, 2009). Так, с использованием вышеуказанного микрочипа был проведен анализ 14 пород лошадей и 18 эволюционно родственных видов, было выяв-

лено более 54000 полиморфных SNP (McCue *et al.*, 2012).

За последние пять лет опубликован обширный материал по геномной селекции (Wiggans *et al.*, 2011; Dekkers, 2012). Мировой тренд – замена существующих SNP-чипов на чипы, включающие каузальные SNP, что повысит точность и упростит методы геномной селекции (Bauer, 2011; Liu *et al.*, 2013).

Среди мультилокусных ДНК-маркеров наиболее известны AFLP (Amplified fragment length polymorphisms) и ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Vos *et al.*, 1995). Микросателлитные последовательности окружают многие гены и могут быть использованы как якорные последовательности к этим генам. AFLP и ISSR маркеры не требуют предварительного клонирования и секвенирования фрагментов для подбора праймеров, сочетают в себе высокую информативность, относительную простоту и оперативность анализа.

Использование мультилокусного межмикросателлитного анализа (ISSR-PCR) совместно с методом к-кластеризации популяционных структур стало основой для создания ряда тестов молекулярно-генетической экспертизы и исследования популяционной структуры domesticированных видов животных. С помощью ISSR-маркеров показаны возможности анализа сходства и различия генофондов видов, пород (внутрипородных групп), их идентификации и наглядной оценки консолидированности, чистопородности и генеалогических связей (Столповский и др., 2010).

На рис. 6 показаны полилокусные спектры ISSR маркеров с использованием двух праймеров, (AG)<sub>9</sub>C и (GA)<sub>9</sub>C, у 9 отечественных пород крупного рогатого скота.

Информацию о популяционных частотах фрагментов ДНК изученных пород можно использовать в целях выяснения филогении пород. Согласно принципу популяционных систем, сформулированному в работах Ю.П. Алтухова и Ю.Г. Рычкова (1970), генетическое разнообразие современных популяций соответствует некоторой предковой «прапопуляции», генофонд которой можно условно назвать «протогенофондом». Для реконструкции протогенофонда предложено использовать усреднение частот генов по всем изученным популяциям. В со-

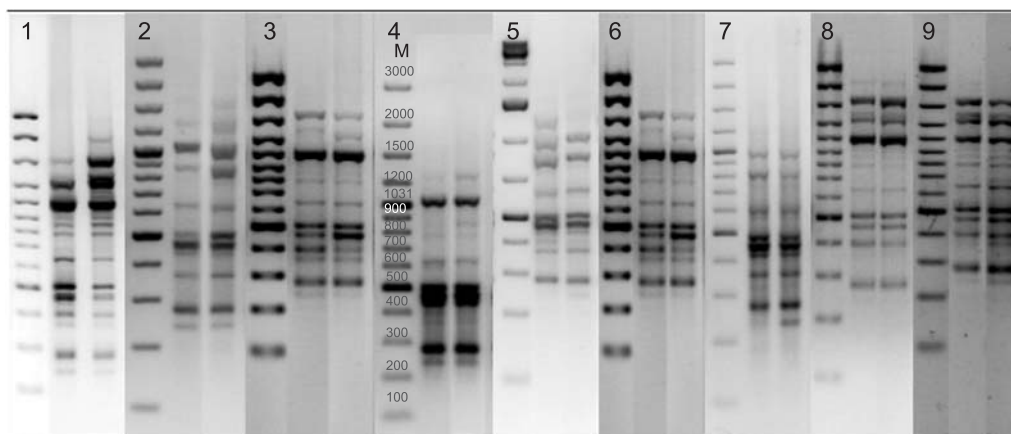


Рис. 6. ISSR-фингерпринт 9 пород крупного рогатого скота.

1 – бестужевская; 2 – бурая швицкая (кавказский тип); 3 – голштинофризская; 4 – калмыцкая; 5 – костромская; 6 – черно-пестрая; 7 – серый степной скот; 8 – ярославская; 9 – якутская.

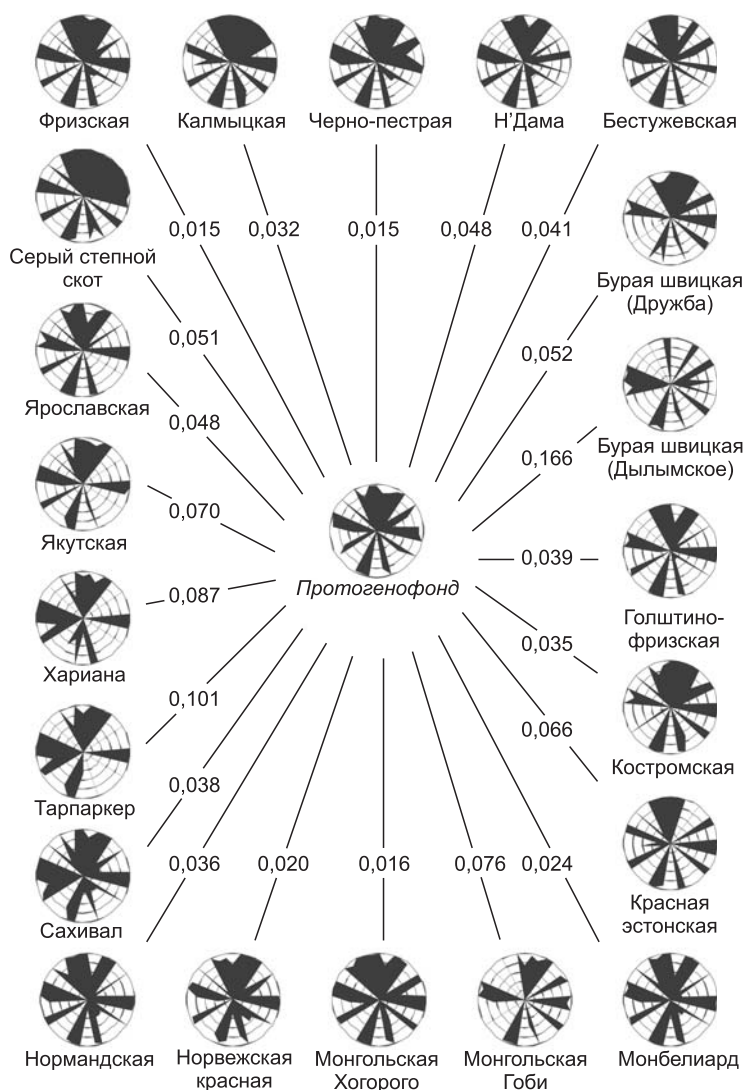


Рис. 7. Полигоны, построенные на основании полиморфизма, выявленного по праймеру  $(AG)_n C$  у 19 пород и одного селекционного типа крупного рогатого скота.

ответствии с этим принципом был построен протогенофонд крупного рогатого скота, куда включены породы *Bos taurus* и *Bos indicus*.

На рис. 7 показаны полигоны изученных пород крупного рогатого скота, полученные на основании полиморфизма, выявленного по AG-ISSR маркерам. Из всех исследуемых популяций наибольшее сходство с протогенофондом имеют породы: фризская (0,015), черно-пестрая (0,015) и монгольская порода хогорого (0,016). Полученный результат соответствует филогенезу вышеуказанных пород.

Сравнительный анализ полиморфизма ISSR-маркеров позволил обнаружить группы фрагментов ДНК, дифференцирующие виды одомашненных животных (рис. 8). Совокуп-

ность выделенных фрагментов может рассматриваться как ДНК «штрихкод» геномов шести видов domestцированных животных (верблюдов, коз, овец, свиней, яков, крупного рогатого скота), а также использоваться для описания генофондов видов, их внутривидового разнообразия.

На основании данных по ISSR-маркерам с помощью программы Structure v2.2. была показана возможность для проведения кластеризации 6 одомашненных видов: верблюда (тувинский верблюд), козы (советская мясошерстная порода), овцы (романовская), яка (тувинский сарлык), крупного рогатого скота (серая украинская), свиньи (дюрок), а также 4 пород крупного рогатого скота (рис. 9)

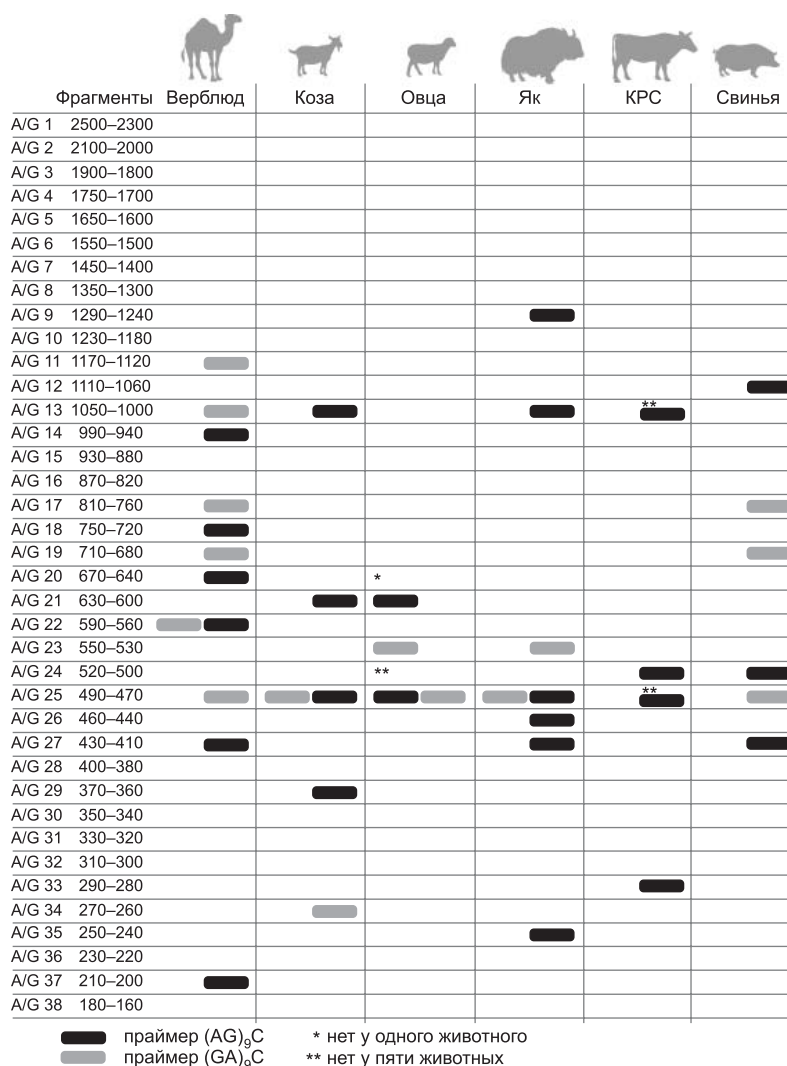
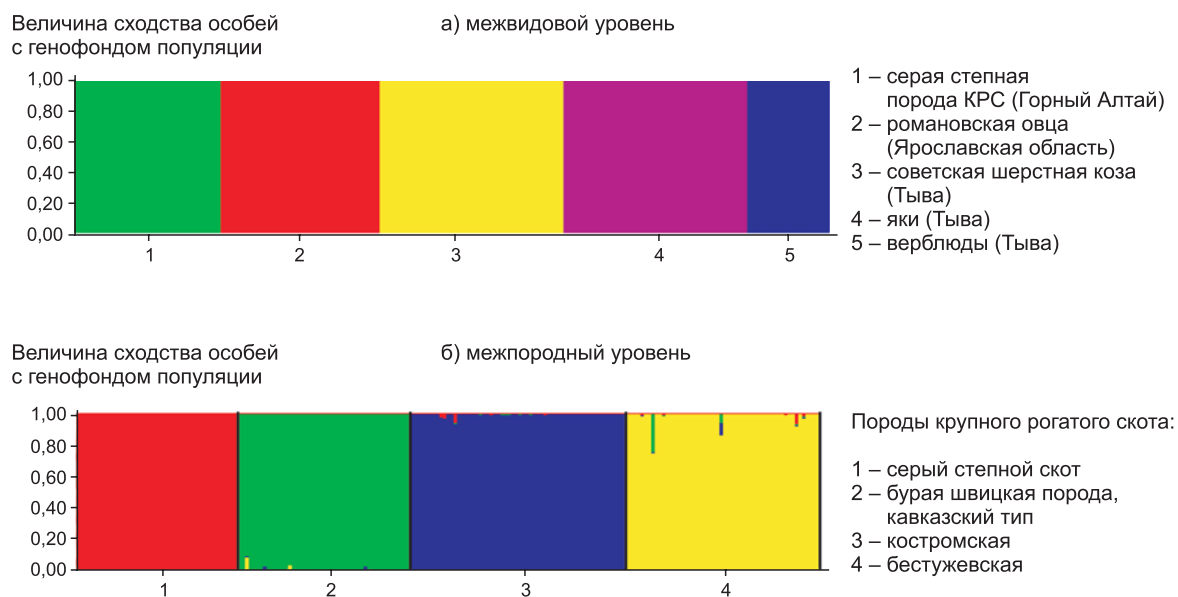


Рис. 8. Межвидовые различия по ISSR-маркерам у 6 сельскохозяйственных видов.

Приведены результаты, полученные с помощью праймеров (AG)<sub>n</sub>C и (GA)<sub>n</sub>C.



**Рис. 9.** Результаты анализа генофондов на основе популяционно-статистической обработки данных ISSR-фингерпринтинга с использованием программы Structure v2.2.

а – на межвидовом уровне, для 5 domesticированных видов животных; б – на межпородном уровне, для 4 пород крупного рогатого скота.

Каждая особь представлена на гистограмме единственным вертикальным столбиком. Во всех случаях особь или группа животных после анализа Structure v2.2 присоединялась к популяционной структуре своего вида и породы. Предложенный метод оценки популяционной структуры имеет универсальный характер при условии выявления достаточно информативного мультилокусного спектра ДНК-маркеров.

**На примере ISSR-фингерпринтинга показано, как можно использовать полилокусные ДНК-маркеры для молекулярно-генетической экспертизы, оценки популяционной структуры, идентификации, установления сходства и сохранения генофондов domesticированных видов животных.**

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сохранение и управление биоразнообразием, в том числе генофондами одомашненных видов, требует системного контроля определенных популяционно-генетических параметров. На примере сельскохозяйственных животных показан алгоритм действий для анализа меж- и внутрипопуляционной генетической изменчивости, который позволяет осуществлять:

- проведение молекулярно-генетической экспертизы по видовой и породной принадлежности животных;
- определение характеристик генетических структур породы, популяции: их однородности, консолидированности, «чистоты», а также соответствия отдельных особей генофонду породы;
- выявление совокупности животных, наиболее близких как к «прагенофонду», так и к современному генофонду породы;
- определение генеалогических связей между популяциями, оценка их внутри- и межпопуляционных взаимоотношений;
- проведение генетической оценки для различных признаков продуктивности.

Сохранение многообразия пород, внутрипородной генетической изменчивости сельскохозяйственных животных связано с проблемой продовольственной безопасности как отдельного государства, так и всего мира в целом. На современном этапе развития общества формируется международная система защиты, контроля, исследования и управления ресурсами генофондов domesticированных видов животных. Потеря генетического разнообразия и снижение адаптивной пластичности – два краеугольных камня

при сохранении локальных пород животных. Теоретическое и практическое решение этой научно-социальной проблемы связано с необходимостью использования методов различных научных дисциплин, от молекулярной и популяционной генетики до зоотехнии геномной и традиционной селекции.

## ЛИТЕРАТУРА

- Алексян С.М. Государство и биоресурсы. СПб.: РАСХН, ВНИИР им. Н.И. Вавилова, 2003. 180 с.
- Алтухов Ю.П. Внутривидовое генетическое разнообразие: мониторинг и принципы сохранения // Генетика. 1995. Т. 31. № 10. С. 1333–1357.
- Алтухов Ю.П., Рычков Ю.Г. Популяционные системы и их структурные компоненты. Генетическая стабильность и изменчивость // Журн. общ. биологии. 1970. Т. XXXI. № 5. С. 507–526.
- Беляев Д.К. Проблемы и перспективы исследований по генетике и селекции животных // Генетика. 1987. Т. 23. № 6. С. 937–946.
- Букаров Н.Г. Использование полиморфизма антигенов эритроцитов и главного комплекса тканевой совместимости в разведении и совершенствовании крупного рогатого скота: Дис. ... д-ра биол. наук. Дубровицы, 1995. 300 с.
- Вавилов Н.И. Избранные труды. М.; Л., 1965.
- Вавилов Н.И. Селекция как наука. Теоретические основы селекции растений. М.; Л., 1935.
- Вепринцев Б.Н., Ротт Н.Н. Стратегия сохранения животного и растительного мира земли // Консервация генетических ресурсов. Пушино, 1991. С. 5–18.
- Глазко В.И. Биохимическая генетика овец. Новосибирск: Наука, 1985. 167 с.
- Глембоцкий Я.Л., Копыловская Г.Я. Проблемы сохранения генофонда сельскохозяйственных животных // Животноводство. 1972. № 6. С. 59–61.
- Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. МСХ РФ. Т. 2. Породы животных / Отв. Х.А. Амерханов. М.: МСХ РФ, 2011. 151 с.
- Жебровский Л.С., Бабуков А.В., Иванов К.М. Генофонд сельскохозяйственных животных и его использование в селекции. Л.: Колос, 1983. 350 с.
- Иванов М.Ф. Избранные сочинения. М.: Сельхозгиз, 1970. 350 с.
- Иванов М.Ф. Породы сельскохозяйственной птицы. М.: Экон. жизнь, 1924. 40 с.
- Конвенция о биологическом разнообразии. Текст и приложения. Женева: Швейцария, Секретариат КБР, 2002. 34 с.
- Лазебная И.В., Лазебный О.Е., Рузина М.Н. и др. Полиморфизм генов гормона роста bGH и пролактина bPRL и изучение его связи с процентным содержанием жира в молоке у коров костромской породы // С.-х. биология. 2011. № 4. С. 46–51.
- Лобашев М.Е. Очерки по истории русского животноводства / Отв. ред. И.Ф. Шульженко. М.; Л., 1954. 342 с.
- Марзанов Н.С., Канатбаев С.Г., Марзанова Л.К. Генетические маркеры у коз. Уральск, 2008. 111 с.
- Марзанов Н.С., Ескин Г.В., Турбина И.С. и др. Генодиагностика и распределение аллеля иммунодефицита, или BLAD-синдрома, у черно-пестрой породы КРС. М.: ГЦВ с.-х. животных, 2013. 105 с.
- Паронян И.А., Прохоренко П.Н. Генофонд домашних животных России. СПб.; М.; Краснодар: Лань, 2008. 351 с.
- Петрини К., Больотти К., Рава Р., Скаффиди Ч. Центральная роль пищи. Итоговый документ международного конгресса по биоразнообразию Slow Food (Слоу фуд). Slow Food, 2012. 27 с.
- Попов Н.А., Иванов В.А. Пути разведения крупного рогатого скота малочисленных пород с использованием аллелей групп крови. Дубровицы: Всерос. ин-т животноводства, 1999. 70 с.
- Серебровский А.С. Геногеография и генофонд с/х животных // Науч. слово. 1928. № 9. С. 3–22.
- Сороковой П.Ф., Машуров А.М., Будникова А.В. и др. Результаты изучения групп крови и полиморфных белков у скота холмогорской породы племзавода «Холмогорский» // Бюл. науч. работ ВИЖ. 1976. Вып. 48. С. 24–30.
- Столповский Ю.А. Консервация генетических ресурсов сельскохозяйственных животных: проблемы и принципы их решения / Под ред. И.А. Захарова. М.: Эрбус, 1997. 112 с.
- Столповский Ю.А., Лазебный О.Е., Столповский К.Ю., Сулимова Г.Е. Применение метода ISSR-PCR для оценки популяционной структуры идентификации и сходства генофондов пород и видов domesticированных животных // Генетика. 2010. Т. 46. № 6. С. 1–9.
- Тимофеев-Ресовский Н.В. Избранные труды. М.: Наука, 2009. 510 с.
- Тимофеев-Ресовский Н.В., Яблоков А.В. Фены, фенетика и эволюционная биология // Природа. 1973. № 5. С. 40–51.
- Уханов С.В., Столповский Ю.А., Банникова Л.В. и др. Генетические ресурсы крупного рогатого скота / Под ред. И.А. Захарова. М.: Наука, 1993. 170 с.
- Фенетика природных популяций / А.В. Яблоков. М.: Наука, 1988. 201 с.
- Харченко П.Н., Глазко В.И. ДНК-технологии в развитии агробиологии / Ред. Б.Ф. Ванюшин. М.: Воскресенье, 2006. 473 с.
- Эрнст Л.К., Дмитриев Н.Г., Паронян И.А., Истомин А.А. Генетические ресурсы сельскохозяйственных животных в России и сопредельных государствах. СПб., 1994. 473 с.
- Яблоков А.В. Фенетика, эволюция, популяция, признак. М.: Наука, 1980. 137 с.
- Akis Akad I., Mengi A., Oztabak K.O. A determination of growth hormone receptor gene polymorphisms in East Anatolian Red cattle, South Anatolian Red cattle, and Turkish Grey cattle // Turk. J. Vet. Anim. Sci. 2012. V. 36. No. 1. P. 27–33.
- Barzehkar R., Salehi A., Mahjoubi F. Polymorphisms of the ovine *leptin* gene and its association with growth and carcass traits in three Iranian sheep breeds // Iranian J. Biotechnol. 2009. V. 7. No. 4.

- Bauer M., Vasicek D., Vasickova K. *et al.* Detection of DGAT-1 gene polymorphism in Holstein and Slovak spotted cattle breeds using a microchip electrophoresis // *Slovak J. Anim. Sci.* 2011. V. 44. P. 85–89.
- Bodo I. Methods and experiences with *in situ* preservation of farm animals // *Dep. Anim. Husbandry Univ. of Vet. Sci. Budapest. Manuscript.* 1989. 29 p.
- Brookes A.J. The essence of SNP // *Gene.* 1999. V. 234. P. 177–186.
- Dekkers J.C.M. Application of genomics tools to animal breeding // *Curr. Genomics.* 2012. V. 13. P. 207–212.
- Dominik S., Henshall J.M., Hayes B.J. A single nucleotide polymorphism on chromosome 10 is highly predictive for the polled phenotype in Australian Merino sheep // *Anim. Genet.* 2011. V. 43. P. 468–470.
- Dybus A., Grzesiak W., Kamieniecki H. *et al.* Association of genetic variants of bovine *prolactin* with milk production traits of Black-and-White and Jersey cattle // *Arch. Tierz. Dummerstorf.* 2005. V. 48. No. 2. P. 149–156.
- FAO. Animal genetics resources conservation and management. Rome: FAO, 1981–2009. 388 p.
- FAO. Marker assisted selection current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish / Ed. P. Elcio. Guimaraes *et al.* Rome, 2007. 470 p.
- FAO. The state of Food Security in the World. Rome: FAO, 2000. 329 p.
- FAO. Положение дел в области продовольствия и сельского хозяйства. Животноводство: в поисках баланса. Рим: FAO, 2009. 187 p.
- FAO/UNEP. Animal Genetic Resources Conservation by Management data banks and training. Rome: FAO/UNEP, 1984. 185 p.
- FAO/UNEP. World Watch List for domestic animal diversity 3rd ed. / Ed. Beate D. Scherf. Rome: FAO/UNEP, 2000. 726 p.
- Fontanesi L., Scotti E., Tazzoli M. *et al.* Investigation of allele frequencies of the growth hormone receptor (*GHR*) *F279Y* mutation in dairy and dual purpose cattle breeds // *Ital. J. Anim. Sci.* 2007. V. 6. P. 415–420.
- Grisart B., Farnir F., Karim L. *et al.* Genetic and functional confirmation of the causality of the DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. No. 8. P. 2398–2403.
- Hunter R.L., Markert C.L. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels // *Science.* 1957. V. 125. No. 3261. P. 1294–1295.
- ILRI. Economic valuation of animal genetic resources // *Proc. of an FAO/ILRI Workshop Held at FAO Headquarters, Rome, Italy, 15–17 March 1999.* Nairobi. International Livestock Res. Institute.
- Jawasreh K.I.Z., Awawdeh F., Rawashdeh I. *et al.* The allele and genotype frequencies of bovine pituitary specific transcription factor and leptin genes in Jordanian cattle population by using PCR-RFLP // *Austral. J. Basic and Appl. Sci.* 2009. V. 3. No. 3. P. 1601–1606.
- Kale D.S., Yadav B.R. Anupama mukherjee, jagdish prasad exploring DNA polymorphisms of leptin gene within indian water buffaloes // *J. Adv. Vet. Res.* 2013. V. 3. P. 20–26.
- Kanael Y., Endoh D., Nagahata H., Hayashi M. A method for detecting complex vertebral malformation in Holstein calves using polymerase chain reaction–primer introduced restriction analysis // *J. Vet. Diagn. Invest.* 2005. V. 17. P. 258–262.
- Kaube B., Brandt H., Prinzenberg E.-M., Erhardt G. Joint analysis of the influence of CYP11B1 and DGAT1 genetic variation on milk production, somatic cell score, conformation, reproduction, and productive lifespan in German Holstein cattle // *J. Anim. Sci.* 2007. V. 85. P. 11–21.
- Kehrli M.E.Jr., Smalsteig F.C., Anderson D.C. *et al.* Molecular defenition of the bovine granulocytopeny syndrome: Identification of deficiency of the Mac-1 (CD11b/CD18) glycoprotein // *Am. J. Vet. Res.* 1990. V. 51. P. 1826–1836.
- Kim K.S., Reecy J.M., Hsu W.H. *et al.* Functional and phylogenetic analyses of a melanocortin-4 receptor mutation in domestic pigs // *Domestic Anim. Endocrinol.* 2004. V. 26. P. 75–86.
- Komisarek J., Dorynek Z. The relationship between the T945M single nucleotide polymorphism in the leptin receptor gene (*LEPR*) and milk production traits in Jersey cows // *Anim. Sci. Papers Rep.* 2006. V. 24. No. 4. P. 271–277.
- Litt M., Luty J.A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene // *Amer. J. Hum. Genet.* 1989. V. 44. No. 3. P. 397–401.
- Liu J., Li Zhang, Lingyang Xu. *et al.* Lixin Du Analysis of copy number variations in the sheep genome using 50K SNP BeadChip array // *BMC Genomics.* 2013. V. 14. P. 229. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/14/229>
- Lusk J.L. Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with body weight and backfat growth curve parameters for beef cattle // *J. Anim. Sci.* 2007. V. 85. P. 1865–1872.
- Maijala K. Need and methods of gene conservation in animal breeding // *Ann. Genet. Sel. Anim.* 1970. V. 2. P. 403–415.
- Matsushashi T., Maruyama S., Uemoto Y. *et al.* Effects of bovine fatty acid synthase, stearoyl-coenzyme A desaturase, sterol regulatory element-binding protein 1, and growth hormone gene polymorphisms on fatty acid composition and carcass traits in Japanese Black cattle // *J. Anim. Sci.* 2011. V. 89. P. 12–22.
- Matukumalli L.K., Lawley C.T., Schnabel R.D. *et al.* Development and characteristics of a high density SNP genotyping assay for cattle // *PLoS ONE.* 2009.
- McCue M.E., Bannasch D.L., Petersen J.L. *et al.* A high density SNP array for the domestic horse and extant Perissodactyla: utility for association mapping, genetic diversity, and phylogeny studies // *PLoS Genet.* 2012.
- Mohammadabadi M.R., Torabi A., Tahmourespoor M. *et al.* Analysis of bovine growth hormone gene polymorphism of local and Holstein cattle breeds in Kerman province of Iran using polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) // *African J. Biotechnol.* 2010. V. 9. No. 41. P. 6848–6852.
- Moravčíková N., Trakovická A., Kasarda R. Polymorphism within the intron region of the bovine leptin gene in Slovak pinzgau cattle // *Anim. Sci. Biotechnol.* 2012. V. 45. No. 1. P. 211–214.
- Mullis K.B., Faloona F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction // *Meth. Enzymol.* 1987. V. 155. P. 335–350.

- Nevo E. Genetic variation in natural populations: patterns and theory // *Theor. Pop. Biol.* 1987. V.13. No. 1. P. 121–177.
- Nevo E., Beiles A. Genetic diversity of wild emmer wheat in Israel and Turkey. Structure, evolution, and application in breeding // *Theor. Appl. Genet.* 1989. V. 77. No. 3. P. 421–455.
- Sakiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Higuchi R. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase // *Science.* 1988. V. 239. No. 2. P. 487.
- Santana B.A., Biase F.H., Antunes R.C. Association of the estrogen receptor gene *Pvu II* restriction polymorphism with expected progeny differences for reproductive and performance traits in swine herds in Brazil // *Genet. Mol. Biol.* 2006. V. 29. No. 2. P. 273–277.
- Sharifzadeh A., Doosti A. Investigation of leptin gene polymorphism in Iranian native cattle // *Bulgar. J. Vet. Med.* 2012. V. 15. No. 2. P. 86–92.
- Simon D.L. Conservation of animal genetic resources a review // *Livestock Prod. Sci.* 1984. V. 11. No. 1. P. 23–36.
- Song C., Gao B., Teng Y. *et al.* Msp I polymorphisms in the 3rd intron of the swine POU1F1 gene and their associations with growth performance // *J. App. Genet.* 2005. V. 46. No. 3. P. 285–289.
- Souza F.R.P., Mercadante M.E.Z., Fonseca L.F.S. *et al.* Assessment of *DGAT1* and *LEP* gene polymorphisms in three Nelore (*Bos indicus*) lines selected for growth and their relationship with growth and carcass traits // *J. Anim. Sci.* 2010. V. 88. P. 435–441.
- Sulimova G.E., Ahani Azari M., Rostamzadeh J. *et al.* κ-Casein gene (CSN3) allelic polymorphism in Russian cattle breeds and its information value as a genetic marker // *Rus. J. Genetics.* 2007. V. 43. No. 1. P. 73–79.
- Szreder T., Zwierzchowski L. RFLP- TspRI polymorphism within exon 1 of the bovine estrogen receptor-α (ER-α) gene // *Anim. Sci. Papers Rep.* 2004. V. 22. P. 543–549.
- Tantia M.S., Vijn R.K., Mishra B.P. *et al.* DGAT1 and ABCG2 polymorphism in Indian cattle (*Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) breeds // *BMC Vet. Res.* 2006. V. 2. P. 32.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M. *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting // *Nucl. Acids Res.* 1995. V. 23. No. 21. P. 4407–4414.
- Ward R.J., Travers M.T., Richards S.E. *et al.* Stearoyl-CoA desaturase mRNA is transcribed from a single gene in the ovine genome // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. 1391. P. 145–156.
- Wiggans G.R., VanRaden P.M., Cooper N.A. The genomic evolution system in the United States: Past, present, future // *J. Dairy Sci.* 2011. V. 94. P. 3202–3211.
- Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification // *Genomics.* 1994. V. 20. P. 176–183.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А., Курбатова О.Л. и др. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / Под ред. Ю.П. Алтухова. М.: Наука, 2004. 618 с.
- Глазко В.И., Дунин И.М., Глазко Г.В., Калашникова Л.А. Введение в ДНК-технологии. М.: ФГНУ Росинформ-агротех, 2001. 434 с.
- Моисеева И.Г., Уханов С.В., Столповский Ю.А. и др. Генофонды сельскохозяйственных животных: генетические ресурсы животноводства России / Под ред. И.А. Захарова. М.: Наука, 2006. 466 с.
- Эрнст Л.К., Зиновьева Н.А. Биологические проблемы животноводства в XXI веке. М., 2008. 505 с.
- Состояние Всемирных генетических ресурсов животных в сфере продовольствия и сельского хозяйства. Продовольственная и сельскохозяйственная организация Объединенных наций и Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства РАСХН. Рим-Москва, 2010. 512 с.
- Microsatellites. Evolution and Application / Eds D.B. Goldstein, C. Slotterer. N.Y.: Oxford Univ. Press Inc., 1999. 352 p.

УДК 575.1/8+577.2+58

## ПОЛИПЛОИДИЯ И МЕЖВИДОВАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ В ЭВОЛЮЦИИ ЦВЕТКОВЫХ РАСТЕНИЙ

© 2013 г. А.В. Родионов

Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН;  
кафедра цитологии Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург,  
Россия, e-mail: avrodionov@mail.ru

Поступила в редакцию 30 сентября 2013 г. Принята к публикации 1 ноября 2013 г.

Спонтанно возникающие природные гибриды между двумя видами растений известны ботаникам с начала XVIII в. В 1716 г. К. Мэзер (Cotton Mather) наблюдал естественную гибридизацию между двумя видами тыкв; в 1717 г. Т. Файрчайлд (T. Fairchild) впервые получил искусственные гибриды между двумя видами гвоздики (*Dianthus carioophyllus* и *D. barbatus*) (Вульф, 1940. С. 42). Открытие пола у растений и последовательное экспериментальное исследование феномена межвидовой и межлинейной гибридизации у растений, начатое в Ботаническом саду Академии наук в Санкт-Петербурге Йозефом Кёлрейтером и продолженное затем О. Нодэном, Г. Менделем, Г. де Фризом, К.Э. Корренсом, У. Бэтсоном, закономерно привело к появлению генетики. Примечательно, что само название нашей науки впервые было обнародовано и принято на конференции, посвященной проблеме гибридизации у растений. А именно на III конференции по гибридизации и селекции растений в Лондоне в июле 1906 г. У. Бэтсон, президент конференции, в своем обращении к участникам, названном «The Progress of Genetic Research», ярко и убедительно продемонстрировал, что уже появилась наука, направленная на изучение явлений наследственности и изменчивости, подразумевающая выходы на проблемы эволюции и систематики, на решение практических проблем селекции животных и растений – новая наука, у которой еще нет короткого и ясного названия, – и предложил назвать ее

«genetics»<sup>1</sup>. Выступление Бэтсона было настолько убедительным, что редактор трудов этой конференции У. Уилкс (W. Wilks), подготовив к изданию том с материалами конференции, дал ему название «Report of the Third International Conference 1906 on Genetics; Hybridization (the cross-breeding of genera or species), the cross-breeding of varieties, and general plant-breeding» (Report ..., 1906). Напомним, что официальное название конференции было «International Conference on Hybridisation and Plant Breeding». Открывался том трудов этой конференции портретом Г. Менделя.

### ГОМОПЛОИДНЫЕ ГИБРИДЫ И АЛЛОПОЛИПЛОИДЫ

Природные расы, которые в ботанике принято считать «хорошими» видами, отличаются от других природных рас морфологически и имеют особые ареалы. Само наличие дискретных морфологических различий между особями из разных географических рас заставляет предполагать, что между расами существуют репродуктивные барьеры. При работе с гербарным материалом существование таких

<sup>1</sup> Само слово «genetics» появилось годом ранее. У. Бэтсон в письме А. Сэдживу (Adam Sedgwick) от 18 апреля 1905 г. отметил, что в современном английском языке нет термина, который бы позволил односложно и обобщенно назвать науку, занимающуюся исследованием наследственности и изменчивости: «Такое слово крайне желательно, и, если угодно, это могло бы быть “Genetics” – выражение, ясно включающее в себя и изменчивость и связанные феномены» (Bateson, 1928).



барьеров можно только предполагать, однако с учетом привязанности растений к субстрату, сочетание неперекрывающихся ареалов и различий в морфологии (образе) растений обычно полагается в ботанике достаточным, чтобы считать две сравниваемые природные расы «хорошими» видами. Взгляд ботаников-систематиков на то, что такое вид, можно выразить известным афоризмом В.Л. Комарова: «Вид – это морфологическая система, помноженная на географическую определенность». На этом основан так называемый морфолого-географический критерий вида в систематике растений (Камелин, 2004).

Наряду с этим в природе существуют более или менее морфологически обособленные расы, которые способны скрещиваться друг с другом, некоторые из них рассматриваются систематиками как подвиды, другие как вариации.

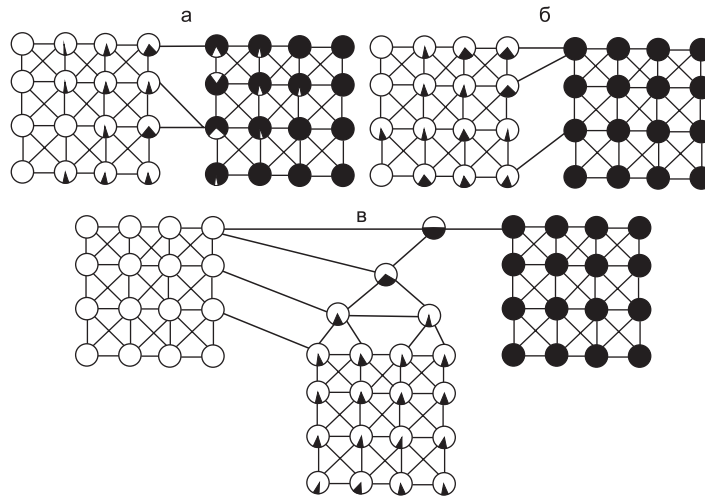
Как и следовало ожидать, способность давать жизнеспособное и плодовитое потомство прогрессивно уменьшается с увеличением времени дивергенции между скрещивающимися природными расами (видами) растений – заметное снижение фертильности пыльцы у межвидовых гибридов растений обычно наблюдается у таксонов, дивергировавших 4–5 млн лет назад и более. Так, общий предок западноевропейского вида *Senecio vernalis* (крестовник весенний) и видов *S. leucanthemifolius* и *S. squolidus* существовал примерно 2,4–4,8 млн лет назад, но при скрещивании этих видов получаются плодородные гибриды. Примерно в это время дивергировали и виды рода водосбор (*Aquilegia*) – у межвидовых гибридов *A. flabellata* × *A. viridiflora* и *A. ecalcarata* × *A. sibirica* фертильность пыльцы снижена до 45–64 %. Но гибриды дивергировавших 5–6 млн лет назад *Arabidopsis thaliana* и *A. arenosa* бесплодны (Levin, 2012).

Особенно долго сохраняют способность давать плодовые гибриды древесные формы растений. Так, два вида платанов, американский *Platanus occidentalis* и средиземноморский *P. orientalis*, дивергировали около 50 млн лет назад, однако они способны давать жизнеспособные и плодовые гибриды. В XVII в. в Западной Европе в результате спонтанной или искусственной гибридизации возник гибридный

вид платан кленолистный *Platanus* × *acerifolia*, который по морозостойкости и скорости роста превосходит оба родительских вида и хорошо размножается семенами, давая при этом очень неоднородное, уклоняющееся в сторону одного или другого родительского вида, потомство.

Приведенные примеры подчеркивают важную особенность видообразования у растений, у которых быстрые темпы морфологической и экологической дивергенции популяций (понимаемых здесь как темпы видообразования) имеют место на фоне длительного сохранения фертильности гибридов. По-видимому, это обусловлено тем, что для растений с их «прикрепленным образом жизни» начальные этапы видообразования часто связаны с географической изоляцией. Постепенно накапливающиеся в разделившихся популяциях мутации и хромосомные перестройки способствуют появлению и совершенствованию иных презиготических и постзиготических барьеров между видами, однако последние возникают у растений значительно позже (в эволюционных масштабах времени). В результате давно (миллионы и десятки миллионов лет назад) дивергировавшие виды растений при естественном или рукотворном ослаблении перзиготических барьеров для скрещивания часто сохраняют возможность при скрещивании давать плодородное или способное размножаться вегетативно жизнеспособное потомство (Levin, 2012).

В большинстве случаев отдаленные межвидовые и даже межродовые гибриды у растений возникают там, где ареалы родительских видов, изменяющиеся с течением времени, соприкасаются или перекрываются. Последствия такой гибридизации могут быть различны (рис. 1). Если гибрид способен скрещиваться с родительскими видами и обладает признаками и свойствами, дающими ему преимущество перед родительскими видами, это может привести к тому, что гибрид заместит один или оба родительских вида и сформирует новый гибридогенный вид. Если гибрид менее жизнеспособен, но может скрещиваться с родительскими видами, это способствует интрогрессии отдельных генов в геномы «родительских» видов, что сохраняет исходные виды, но в новом качестве. Если гибрид жизнеспособен и плодороден, но есть хотя бы частичные проблемы



**Рис. 1.** Таксономические последствия межвидовой гибридизации.

а – два вида (расы) скрещиваются, на границе ареалов (в гибридной зоне) появляются особи с промежуточными признаками; б – то же, что и в случае а, но поток генов однонаправлен; в – в результате межвидовой гибридизации возникла раса, не скрещивающаяся с родительскими видами. Варианты а и б могут рассматриваться как один полиморфный вид, как два вида и подвид, как три подвиды одного вида; вариант в – как три «хороших» вида или как два вида, у одного из которых («белого») есть подвид. (С модификацией рис. 4–1 из: (Rieseberg, Wendel, 1993. P. 70–110)).

в скрещивании с родительскими видами, это может привести к формированию расы с промежуточными свойствами – таксономически результат может трактоваться как единый полиморфный вид или как 3 подвида, или как 2 вида и подвид. Если гибриды полностью стерильны, но способны к вегетативному размножению, они могут давать длительно существующие клоны (Камелин, 2004).

Генетические последствия гибридизации зависят от того, сохранился ли у гибрида тот же набор хромосом, который он получил от родителей, или у него произошло изменение плоидности. В этом отношении различают два типа гибридов (рис. 2):

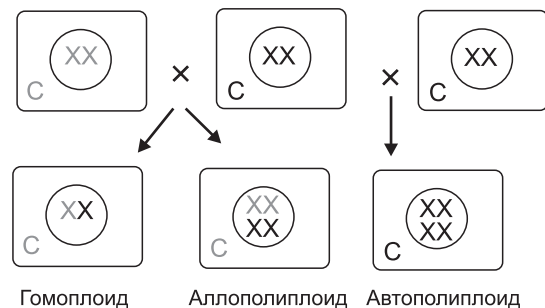
1) с сохранением у гибрида числа хромосом в кариотипе, характерного для родительских видов (гомоплоидный гибрид);

2) с кратным изменением числа хромосом у потомства от межвидовых скрещиваний (аллополиплоид).

Если в результате гибридизации возник жизнеспособный гибрид 1-го типа (гомоплоид), но родительские кариотипы в известной степени различались, такие гибриды будут продуцировать гаметы с несбалансированным хромосомным набором, но и могут дать начало длительно существующему отличному от родителей и

имеющему свой отдельный ареал вегетативно или апомиктически размножающемуся клону (рис. 1). Некоторые из таких гибридов получили у систематиков статус видов, например эндемик Картлийской равнины (Грузия) – вегетативно размножающийся пион, гибрид между *Paenonia caucasica* и *P. tenuifolia*, носящий имя пиона Майко (*P. × majkoe*), или близкий к нему и тоже бесплодный эндемик Крыма пион Малеева (*P. × maleevii*), предками которого являются *P. daurica* и *P. tenuifolia* (Пунина и др., 2011).

Если кариотипы родителей существенно не различались, такие гибриды были обычно



**Рис. 2.** Два типа гибридов (гомоплоид и аллополиплоид) и два типа полиплоидов (аллополиплоид и автополиплоид). С-цитоплазма, включая митохондрии и хлоропласты.

плодовиты и сохраняли способность к возвратному скрещиванию с родительскими видами. Примером может быть еще один пион-эндемик Грузии – *Paonia × chamaeleon*, вид гибридного происхождения, дающий всхожие семена как при самоопылении, так и при скрещивании с «родителями» *P. caucasica* и *P. mlokosewitschii* (Пунина и др., 2011).

Этот тип гибридизации назван «интрогрессивной гибридизацией», поскольку, как правило, сопровождается включением некоторой части генов одного вида в геном другого, что ведет к увеличению генетического разнообразия и появлению у родительских видов новых, ранее не присущих им черт. Иногда интрогрессивная гибридизация захватывает огромные пространства. Так, в Восточной Европе после отступления ледника сомкнулись и частично перекрылись ранее разделенные ледником ареалы ели европейской (*Picea abies*) и ели сибирской (*P. obovata*). Природные гибриды между этими двумя видами, уклоняющиеся в сторону то одного, то другого предка, распространены на пространстве, протянувшемся с запада на восток на 1000 км и с севера на юг на 300–500 км. Гибридные расы носят название ели финской (*P. fennica*), считается, что это молодой, не до конца сформировавшийся гибридогенный вид (Орлова, Егоров, 2011).

В зоне гибридизации двух видов лиственниц, *Larix sibirica* и *L. gmelinii*, сформировался гибрид, носящий название *L. × czekanowskii* и занимающий в Прибайкальской Сибири и Забайкалье полосу шириной 400–600 км.

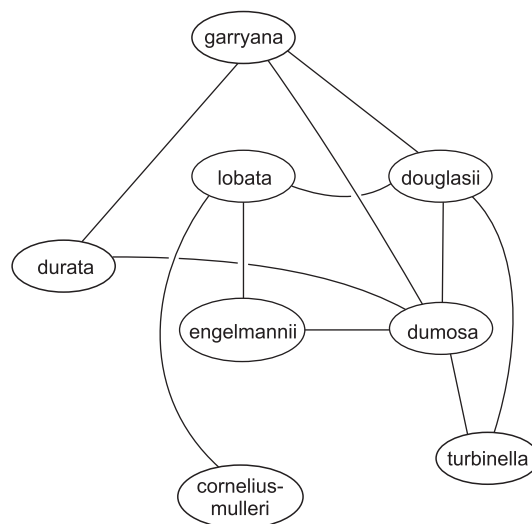
В ряде случаев возникшие на границах ареалов интрогрессанты приобретают черты и качества, дающие им преимущества перед родителями. Так, на Кавказе гибридные, в разной степени схожие с родительскими видами ежевики осваивают новые местообитания: родительские виды ежевики – лесные, а гибриды приурочены к открытым местообитаниям (Камелин, 2004).

Подобные случаи описаны у европейских и североамериканских дубов, осин, берез, у некоторых родов злаков – для всех них характерны более или менее протяженные гибридные зоны, где идет более или менее интенсивный обмен генами между особями разных видов и гибриды в той или иной степени отличны от родителей. Фактически эволюционирующей

единицей здесь является не вид, а дву- или многовидовой комплекс из нескольких видов одного рода и разных сочетаний их гибридов, изолированных друг от друга факультативно преодолемыми презиготическими (обычно географическая изоляция и/или разные опылители) репродуктивными барьерами (Камелин, 2009). В. Грант (1984), последовательный сторонник генетической концепции вида, при описании таких комплексов из более или менее свободно гибридизирующих между собой видов использовал предложенный Р. Лотси термин «сингамеон» (рис. 3), полагая при этом, что сингамеоны есть отражение динамичности протекающего на наших глазах процесса видообразования и составляющие сингамеон природные расы есть все-таки не виды, а «полувиды» (*semispecies*).

### КАК ЧАСТО ВСТРЕЧАЮТСЯ МЕЖВИДОВЫЕ ГИБРИДЫ В ПРИРОДЕ?

К началу 1970-х годов в литературе имелись сведения о 23 675 межвидовых гибридах у растений (природных и искусственно полученных), 2 993 (12,6 %) из них были гибриды между видами разных родов (Knobloch, 1972). По мнению



**Рис. 3.** Сингамеон – система скрещивающихся между собой видов (полувидов) североамериканских белых дубов (*Quercus alba sensu lato*).

Линии отражают наблюдавшиеся в природе случаи гибридизации (интрогрессии) (Из: Grant, 1981. P. 237).

агростолога Н.Н. Цвелёва (1976), не менее трети видов злаков имеют гибридное происхождение. По подсчетам J. Маллета (Mallet, 2005), 25 % видов растений Британских островов имеют гибридное происхождение. Около 3 % от 605 видов растений Британской Колумбии (Канада) – диплоиды гибридного происхождения, кроме того, 12,3 % видов – гибриды-аллополиплоиды (Vamosi, McEwen, 2013). К. Уитни с соавт. (Whitney *et al.*, 2010) собрали сведения о встречаемости гибридов среди 37 тыс. видов флоры Европы, Северной Америки и части Австралии, относящихся к 3212 родам 282 семейств сосудистых растений. Виды гибридного происхождения были отмечены в 40 % семейств и 16 % родов со средней частотой 9 гибридов на 100 видов негибридного происхождения. Частота встречаемости гибридогенных видов в природе была разной в разных филогенетических ветвях растений. Большинство зарегистрированных гибридов были гибриды между видами одного рода, межродовых гибридов зарегистрировано 3,5 % (чаще других – в семействах Poaceae, Asteraceae и Orchidaceae).

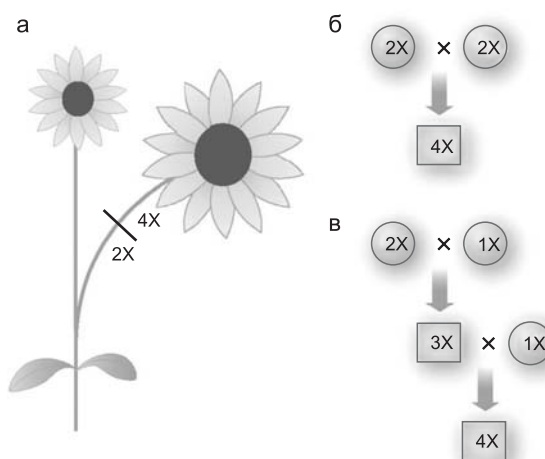
Размышляя над вышеприведенными цифрами о частоте встречаемости гибридогенных видов в природе, надо помнить, что в цитируемых исследованиях определение того, является ли вид гибридогенным или нет, было сделано на основе экспертной оценки морфологии природных образцов, т. е. учитывались гибриды, которые выглядят, как гибриды, а это чаще всего гибриды относительно недавнего происхождения. Принципиально иные результаты, говорящие об определяющей роли отдаленной гибридизации в эволюции растений, были получены при исследовании происхождения аллополиплоидов методами сравнительной геномики.

### АЛЛОПОЛИПЛОИДИЯ КАК СПОСОБ САЛЬТАЦИОННОГО ВИДООБРАЗОВАНИЯ

Кариотипы отдаленных видов, как правило, различаются разного рода хромосомными перестройками. Как показал Г.Д. Карпеченко (Карпеченко, 1927, цит. по: Карпеченко, 1968), жизнеспособные и плодовитые гибриды между такими видами получаются лишь тогда, когда

потомок получает нередуцированное число хромосом от каждого из родителей, т. е. в результате аллополиплоидии. Впрочем, аллополиплоиды (амфидиплоиды) плодовиты не всегда. Согласно правилу Дарлингтона (Darlington, 1937), чем ниже плодовитость диплоидных (гомоплоидных) потомков от гибридизации двух видов, тем более плодовиты и жизнеспособны тетраплоидные (аллополиплоидные) потомки от скрещивания между этими видами. Правило Дарлингтона основано на принципиально важном хромосомном механизме поддержания видоспецифичного единообразия кариотипов: генетически сбалансированные гаметы возникают только при условии правильной попарной конъюгации и упорядоченного расхождения родительских хромосом в мейозе (Карпеченко, 1927, цит. по: Карпеченко, 1968). Если плодовит гомоплоид, можно ожидать, что у аллотетраплоида в мейозе будут возникать квадрилваленты и, как следствие, несбалансированные гаметы.

Несколько механизмов ведут к появлению аллополиплоидов (рис. 4), среди которых основные – диплоидизация соматических тканей и формирование особями «родительского» поколения или гибридами в F1 нередуцированных гамет. Нередуцированные гаметы возникают



**Рис. 4.** Механизмы, ведущие к появлению аллополиплоида (из: (Rieseberg, Willis, 2007. P. 910–914)).

а – соматическая мутация у гомоплоида; б – слияние диплоидных гамет при межвидовой гибридизации; в – слияние диплоидной гаметы одного вида с гаплоидной другого вида дает гибридный триплоид, нередуцированные гаметы которого, сливаясь с гаплоидными гаметами одного из родителей, дают аллополиплоид.

несколькими способами: 1) благодаря нарушению ориентации веретена в мейозе II при микроспорогенезе; 2) вследствие отсутствия второго деления (в микро- и в макроспорогенезе); 3) в результате формирования гамет непосредственно из соматических клеток (апоспория) или вследствие трансформации мейоза в митоз (чаще при микроспорогенезе, но иногда и при макроспорогенезе) (Crismani *et al.*, 2013).

Частота формирования нередуцированных гамет у разных видов варьирует, она находится под генетическим контролем (может быть изменена отбором) и сильно зависит от окружающих условий (Ramsey, Schenks, 1998; Crismani *et al.*, 2013).

Сразу обратим внимание читателя на одно из обстоятельств, объясняющее, почему аллополиплоидия – один из основных путей видообразования у растений. Возникнув, аллополиплоиды сразу оказываются репродуктивно изолированы от своих диплоидных предков, помимо очевидных затруднений с упорядоченным расхождением хромосом в мейозе у триплоидов потомки от возвратного скрещивания диплоидного «родителя» и аллополиплоида часто гибнут на ранних стадиях развития из-за дисбаланса «отцовских» и «материнских» хромосом в эндосперме (Scott *et al.*, 2013).

#### КАК ЧАСТО ВСТРЕЧАЮТСЯ АЛЛОПОЛИПЛОИДЫ В ПРИРОДЕ

Исследуя кариотипы цветковых растений, Мюнцинг (Münzing, 1936) и Дарлингтон (Darlington, 1937) пришли к выводу, что кариотипы около половины видов цветковых растений полиплоидные. Стеббинс (Stebbins, 1950) полагал, что таких кариотипов примерно 30–35 %. В. Грант (Grant, 1963) предложил считать все растения, в кариотипе которых 28 и более хромосом, полиплоидами, такой расчет дал 47 % полиплоидов. По мнению Гольдблатта (Goldblatt, 1980), предложенный Грантом порог был неоправданно высок, а полиплоидами можно считать все растения, в кариотипах которых  $2n$  более 18 хромосом, – таких около 70 %.

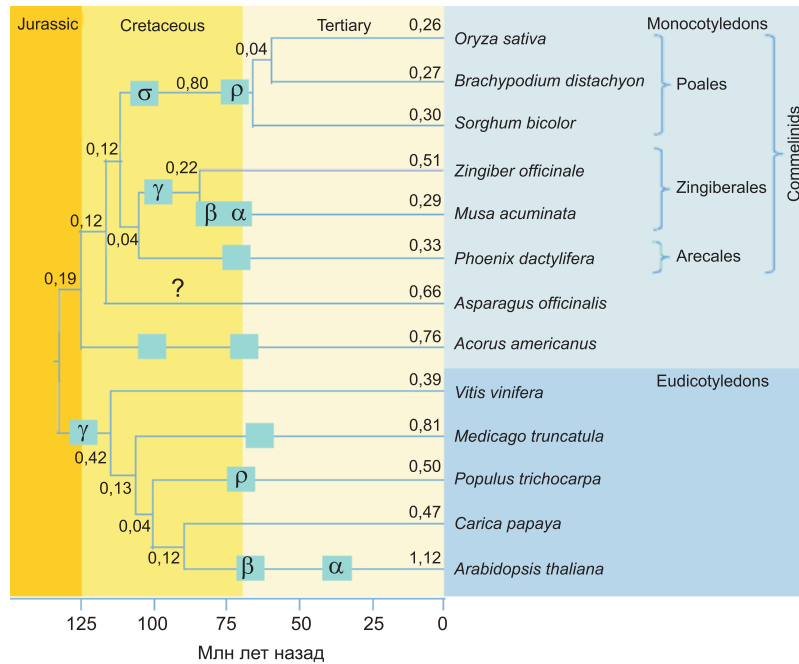
Эти оценки частоты встречаемости полиплоидов среди цветковых растений, со ссылками на авторов и без них часто цитируются ботаниками и генетиками. Но, очевидно, что строятся они

на предположениях, справедливость которых трудно обосновать. Результаты сравнительного исследования полностью секвенированных геномов, представляющих основные филогенетические ветви цветковых растений, показали, что все они имели в своей истории несколько актов полиплоидизации (рис. 5), сопровождавшей, как правило, межвидовую гибридизацию (Soltis P.S., Soltis D.E., 2009). Более того, общий предок всех цветковых уже имел геном полиплоидного происхождения! Следы по крайней мере двух обще-геномных дупликаций обнаруживаются в геноме современных голосеменных, причем первый зафиксированный акт дупликации их генома имел место не позднее чем 350 млн лет назад – т. е. до разделения предков современных сосудистых растений (Spermatophyta) на филогенетические ветви голосеменных и покрытосеменных, а второй – уже у предка собственно голосеменных, но до разделения филогенетических ветвей елей и сосен (около 100 млн лет назад) (Pavy *et al.*, 2012).

Расчет времени, когда происходили акты полиплоидизации генома цветковых растений (рис. 5), показывает, что более половины из них связаны с экологическими кризисами или приходятся на периоды смены геологических эпох (Fawcett *et al.*, 2009; D'Hont *et al.*, 2012). Если эти расчеты верны, можно предполагать, что аллополиплоиды имели больше шансов освоить новые экологические ниши, именно потомки аллополиплоидов смогли выжить в изменившихся экологических условиях.

#### СЕМЕЙСТВО КАПУСТНЫЕ КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ РОЛИ МЕЖВИДОВОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ И ПОЛИПЛОИДИИ В ЭВОЛЮЦИИ РАСТЕНИЙ

Роль и место полиплоидии и межвидовой гибридизации в эволюции цветковых растений прекрасно видны на примере растений из процветающего семейства Brassicaceae, к которому относятся 338 родов и 3709 видов, в том числе такие, как *Arabidopsis thaliana*, горчица, капуста, редька, репа, брюква и рапс. Геномы видов этого семейства, включая миниатюрный геном и кариотип *A. thaliana* (в гаплоидном геноме 100 млн п.н.,  $n = 5$ ), несут следы 5–6 и более

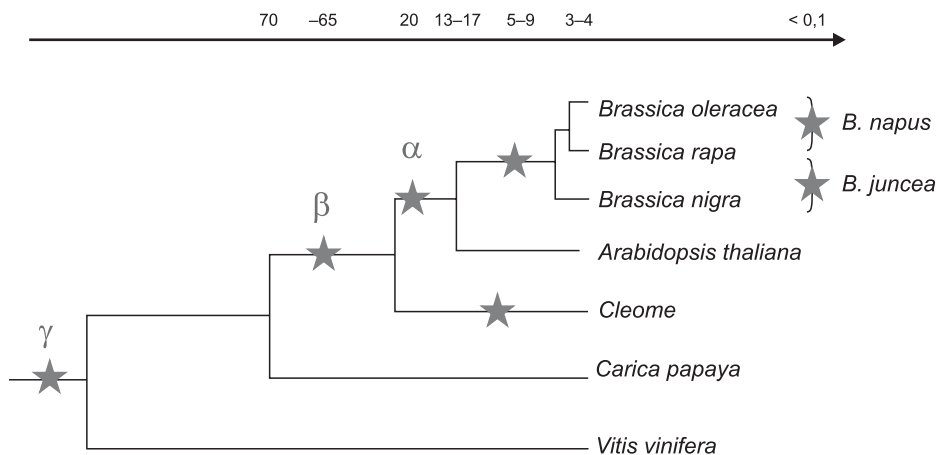


**Рис. 5.** Акты полиплоидизации геномов в эволюции цветковых растений, выявленные методами сравнительной геномики.

Каждый цветной прямоугольник на древе – единичный акт дупликации всего генома, чаще всего связанный с межвидовой гибридизацией (аллополиплоидизацией) (из: (D’Hont *et al.*, 2012. P. 213–217)).

раундов полиплоидизации. Первый зафиксированный акт полиплоидизации имел место, как уже сказано, около 350 млн лет назад. Второй (на рис. 5 и 6 обозначен как  $\gamma$ ) – около 125 млн лет назад;  $\beta$ - и  $\alpha$ -дупликации имели место около 65 млн и 25–40 млн лет назад соответственно. Их следы обнаружены в геномах всех капустных, но после их дивергенции с предками папайи и клеомовых. Предполагается, что  $\alpha$ - и

$\beta$ -дупликации резко увеличили адаптивную радиацию видов *Brassicaceae*. Время, когда произошли  $\beta$ - и  $\alpha$ -дупликации, совпадает с экологическими катастрофами на границе мела и четвертичного периода (около 65 млн лет назад) и в конце эоцена (30–40 млн лет назад) – эти дупликации, вероятно, дали возможность *Brassicaceae* быстро адаптироваться к новым экологическим нишам (Jenczewski *et al.*, 2013).



**Рис. 6.** Предковые и недавние дупликации генома (акты полиплоидизации) в геномах *Brassica* и родственных родов (из: (Jenczewski *et al.*, 2013. P. 171–186)).

Таким образом, можно говорить о том, что ранние этапы дифференциации видов *Brassicaceae* происходили на основе генома, который уже претерпел в своей истории не менее 4 актов полиплоидизации. При этом хромосомный набор прото-*Brassicaceae* был мало похож на полиплоидный – в нем было всего 8 пар хромосом, состоявших из 24 консервативных геномных блоков. У современных видов капустных число хромосом в геноме варьирует от  $n = 4$  у физарии (*Physaria*), до  $n =$  около 123 у *Cardamine concatenata*; к предковому кариотипу ближе всего кариотипы *Arabidopsis lyrata* и *Capsella rubella* (Lysak *et al.*, 2007; Mandáková *et al.*, 2010). Геномы и кариотипы, полиплоидная природа которых может быть установлена только при сравнительном геномном исследовании, называют палеополиплоидами.

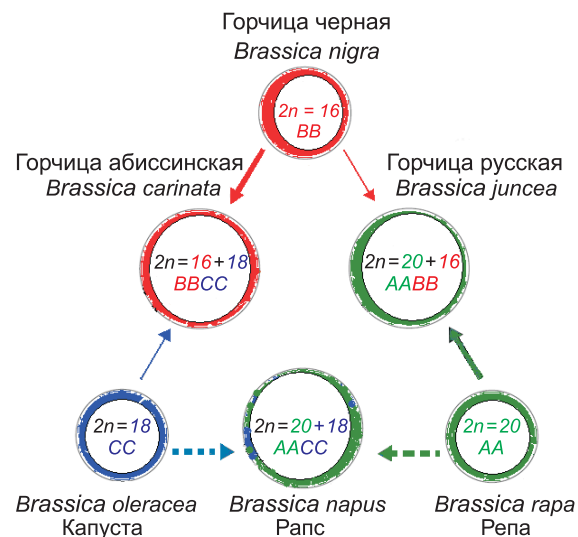
Род *Brassica* возник после дубликации генома прото-*Brassica* вскоре после расхождения филогенетических ветвей *Brassica* и *Arabidopsis*, произошедшего примерно 13–17 млн лет назад, после чего началась дивергенция видов рода *Brassica*, сопровождавшаяся хромосомными перестройками и межвидовой гибридизацией (судя по хлоропластной ДНК, род полифилетичен), число хромосом в кариотипах разных видов шаг за шагом менялось, часть генов терялась, шла постепенная диплоидизация кариотипов, давшая более 10 видов с разным числом хромосом в геноме ( $x = 7, 8, 9, 10, 11, 12$ ), в частности, три широко известных диплоидных вида – репу и пекинскую капусту (*B. rapa*) (AA,  $2n = 20$ ), черную горчицу *B. nigra* (BB,  $2n = 16$ ) и капусту огородную *B. oleracea* (CC,  $2n = 18$ ) (Arias, Pires, 2012; Jenczewski *et al.*, 2013). Сравнение геномов этих видов показало, что А и С геномы более близки друг к другу, чем к В-геному *B. nigra* (Chen *et al.*, 2011). Хлоропластные геномы *B. oleracea* и *B. rapa* также ближе друг к другу, чем к геному хлоропластов *B. nigra* (Arias, Pires, 2012).

Наконец, несколько раундов геномных дубликаций произошло в роде *Brassica* совсем недавно, менее 10 тыс. лет назад (рис. 8), когда в результате серии межвидовых гибридизаций возникли 3 аллополиплоида: горчица русская или сарептская *B. juncea* (AABB,  $2n = 36$ ), рапс *B. napus* (AACC,  $2n = 38$ ) и горчица абиссинская или эфиопская *B. carinata* (BBCC,  $2n = 34$ )

(U, 1935; Jenczewski *et al.*, 2013). Судя по сходству рДНК, сначала на Ближнем Востоке возникла *B. juncea*, постепенно, двумя потоками, попавшая в Индию и Китай (Chen *et al.*, 2013), затем, ближе к нашему времени, – *B. carinata* и совсем недавно – *B. napus* (Gómez-Campo, Prakash, 1999; Allender, King, 2010). Аллогексаплоидные *Brassica* с геномной формулой AABBCC в природе до сих пор не встречались, однако они могут быть получены экспериментально. Поскольку тетраплоидные *Brassica* появились в природе только недавно, природные гексаплоиды *Brassica*, возможно, просто еще не успели появиться (Chen *et al.*, 2011).

Сравнение хлоропластных геномов показывает, что вид *B. nigra* был донором цитоплазмы для *B. carinata*, *B. rapa* – для *B. juncea*, а *B. napus*, по-видимому, возникал неоднократно, причем в качестве материнского растения могли быть и репа, и капуста (Gómez-Campo, Prakash, 1999; Allender, King, 2010).

Ресинтезированные аллополиплоиды из рода *Brassica* оказались прекрасной моделью для исследования ранних этапов эволюции



**Рис. 7.** В результате межвидовой гибридизации капусты (*B. oleracea*), репы (*B. rapa*) и черной (французской) горчицы (*B. nigra*) возникли аллополиплоидные виды *B. carinata* (абиссинская или эфиопская горчица), *B. juncea* (русская или сарептская горчица) и *B. napus* (рапс) (U, 1935).

Толстые стрелки показывают происхождение хлоропластов и митохондрий (Gómez-Campo, Prakash, 1999. P. 33–58; Allender, King, 2010. P. 54).

геномов и кариотипов у видов, возникших путем межвидовой гибридизации. Эксперименты показали, что *B. juncea* с трудом, но может быть ресинтезирована путем скрещивания *B. rapa* и *B. nigra*. Жизнеспособное потомство получается редко (из тысячной доли семян), причем гибридизация идет более успешно, если *B. rapa* выступает в качестве материнского растения. В свою очередь, *B. carinata* легче получить, если в скрещивании *B. nigra* и *B. oleracea* первый из этих видов выполняет роль материнского растения. Реципрокные скрещивания этих видов редко бывают успешны (Chen *et al.*, 2011). Напротив, скрещивания *B. rapa* и *B. oleracea* (предки *B. napus*) обычно успешны в обоих направлениях, что вполне согласуется с данными о происхождении хлоропластной ДНК у «натуральной» *B. napus*, в клетках которой обнаруживаются варианты, ранее найденные в цитоплазматических геномах и *B. rapa*, и *B. oleracea* (Gómez-Campo, Prakash, 1999; Allender, King, 2010).

У ресинтезированных аллополиплоидов из рода *Brassica* (*B. napus*, *B. carinata*, *B. juncea*) наблюдается такое характерное для гибридов первых поколений явление, как увеличение общей массы растений. Причина здесь именно в сочетании разных геномов, а не в полиплоидии: у искусственно полученных автотетраплоидных *B. oleracea* и *B. rapa* увеличение размеров не наблюдается. В первых поколениях ресинтезированные гибриды полиморфны: даже в разных линиях, происходящих от одного гибрида 1-го поколения, наблюдаются разное время цветения, разные размеры и морфология цветка и листьев; могут сильно различаться рост и вес растений (Pires, Gaeta, 2011).

#### ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ АДАПТИВНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ И ПОЛИМОРФИЗМА ПОТОМСТВА У АЛЛОПОЛИПЛОИДОВ

Морфологические изменения аллополиплоидов в сравнении с родительскими видами могут быть связаны как с аддитивными, пропорциональными увеличению числа копий гена у аллополиплоида в сравнении с диплоидными предками, так и с неаддитивными изменениями протеома гибрида в сравнении с родителями

(Albertin *et al.*, 2006; te Beest *et al.*, 2012). При этом отмечается, что у ресинтезированных *B. napus* экспрессия генов обще клеточного действия («генов домашнего хозяйства») не изменена в сравнении с «родителями», в то время как набор белков листьев сильно изменен (Kong *et al.*, 2011). О том, что именно процесс слияния отдаленно родственных геномов является первопричиной изменения уровня экспрессии многих генов, говорит то, что у автополиплоидов *Brassica* транскриптом не меняется или меняется незначительно (Gaeta *et al.*, 2009).

У аллополиплоидных гибридов *Arabidopsis* около 5 % генов изменяют уровень экспрессии, причем в большинстве случаев это изменение связано с репрессией генов одного из родителей. Чаще репрессируются гены, полученные гибридом от *A. thaliana*, т. е. вида, морфологические признаки которого подавлены у гибрида. Это относится как к белок-кодирующим генам, так и к генам рРНК (Pikaard, 2001).

Две характеристики транскриптома аллополиплоидов заслуживают внимания. Во-первых, нужно отметить, что вклад родительских геномов в общий пул транскриптов гибрида обычно разный и, во-вторых, у разных объектов примерно треть генов одного из родителей увеличивает или снижает уровень своей экспрессии до уровня, при котором суммарный уровень транскрипции у аллополиплоида будет таким же, каким был у одного из предков (Yoo *et al.*, 2013). Относительный уровень экспрессии одних и тех же генов, полученных аллополиплоидом от родителей, может отличаться в разных тканях, при этом в одних тканях могут быть активны гены, полученные от одного родителя, а в других тканях – аллели того же гена, полученные от другого родителя (Pikaard, 2001).

Изменение транскрипции многих генов после слияния двух разных геномов может быть обусловлено тем, что аллельные гены каждого из родительских субгеномов аллополиплоида различаются последовательностями промоторов, энхансеров, сайленсеров и мотивами, располагающимися на 3'- и 5'-нетранслируемых участках генов, которые как раз определяют скорость транскрипции, время жизни и положение транскриптов в клетке. С другой стороны, в геноме аллополиплоидов существует общий



пул трансфакторов (таких как факторы транскрипции и микроРНК), регулирующих работу генов предтранскрипционно и посттранскрипционно. Поскольку у возникшего в результате отдаленной гибридизации аллополиплоида аллели генов разного происхождения с вероятностью, пропорциональной эволюционному расстоянию между «родительскими» видами, различаются мутациями в структурных и регуляторных районах гомеологичных аллелей, это открывает возможность для 1) дифференциальной экспрессии гомеологичных генов, 2) разной продолжительности жизни колируемых ими РНК и белков, 3) разной локализации транскриптов и протеинов в клетке и в эволюционной перспективе, 4) возможность дифференциации их функций.

Среди трансфакторов, влияющих на изменение паттерна транскрипции у аллополиплоида в сравнении с родительскими видами, существенную роль играют различия в метилировании геномов «родительских» видов, причем в большей степени задействовано метилирование цитозина, чем гистонов (He *et al.*, 2010). Неаддитивная экспрессия родительских геномов у аллополиплоидных *Arabidopsis* связана с разной эффективностью взаимодействия с мишенями miRNA (Ha *et al.*, 2009).

#### **ОБЪЕДИНЕНИЕ В ОДНОМ ЯДРЕ НЕСКОЛЬКИХ РАЗНЫХ ГЕНОМОВ ВЕДЕТ К ГЕНОМНОМУ ШОКУ И ВСПЛЕСКУ МУТАЦИОННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ**

Исследование ресинтезированных аллотетраплоидов *Brassica* показало высокую скорость перестроек геномов и кариотипов у вновь возникших аллополиплоидов. Сонг с соавт. (Song *et al.*, 1995), а затем и другие исследователи (Gaeta *et al.*, 2007; Szadkowski *et al.*, 2011; Xiong *et al.*, 2011 и др.) показали, что в геномах первых пяти поколений ресинтезированных гибридов *B. napus* (размножавшихся затем самооплодотворением) происходят множественные перестройки генома, выявляемые при анализе паттерна рестрикции геномной ДНК. Важно, что в разных линиях гибридов накапливаются разные изменения генома. Накапливаются они не совсем случайно – некоторые районы гено-

ма более подвержены изменениям, чем другие (Gaeta *et al.*, 2007). Число хромосом у гибридов в последующих поколениях может в некоторой степени меняться, но проявляется отчетливая тенденция к сохранению баланса генов: утрата одной хромосомы или пары хромосом, происходящих от одного родителя, как правило, компенсируется добавлением соответствующего количества гомеологичных хромосом из другого родительского генома (Szadkowski *et al.*, 2011; Xiong *et al.*, 2011).

Утрата хромосом одного из родителей у аллополиплоидов чаще всего связана с центромерами. Некоторые из центромеров гибрида не способны функционировать, не связаны с веретеном и потому не способны расходиться к полюсам или расходятся недопустимо медленно. На некоторых хромосомах у гибрида, наоборот, могут возникнуть *de novo* вторые центромеры, что также затрудняет правильное расхождение хроматид (Gernand *et al.*, 2005; Ishii *et al.*, 2013).

Проблемы с сегрегацией хромосом у гибридов связаны с тем, что в ходе дивергенции видов у растений очень быстро изменяются как последовательности центромерной ДНК, так и те домены центромерных белков CENH3, которые с этой ДНК взаимодействуют (Lermontova, Schubert, 2013). Предполагается, что быстрая эволюция центромерной ДНК и взаимодействующих с ДНК доменов центромерных белков – явления связанные. По-видимому, комплементарная комбинация видоспецифичной центромерной ДНК и видоспецифичного гистона CENH3 способствует быстрому расхождению хромосом в мейозе, в результате чего лучшие по качеству центромеры с большей вероятностью попадают в клетки макроспоры и передаются потомству (Lermontova, Schubert, 2013). С другой стороны, «плохие» центромерные комплексы, в которых, например, центромерные ДНК и протеины CENH3 не очень подходят друг другу, будут недостаточно хорошо работать или не будут формироваться вовсе, как это происходит у межвидовых гибридов *Hordeum vulgare* × *H. bulbosum* (Sanei *et al.*, 2011) или у гибридов, полученных от скрещивания злаков, дивергировавших 50–60 млн лет назад, таких как *Triticum* × *Pennisetum* (Gernand *et al.*, 2005) или *Avena* × *Pennisetum* (Ishii *et al.*, 2013).

На частоту и спектр возникающих в геноме аллополиплоидов генных мутаций влияют ядерно-цитоплазматические отношения. Исследование реципрокных гибридов *B. rapa* и *B. oleraceae* показало, что в синтетической линии, имеющей А-цитоплазму, изменения А-субгенома происходят реже, чем изменения С-субгенома (Song *et al.*, 1995; Jenczewski *et al.*, 2013). У аллополиплоидов, возникших в результате соматического удвоения хромосом (рис. 4, а), частота хромосомных перестроек между гомеологами меньше, чем частота перестроек в мейозе у аллополиплоидов, возникших из нередуцированных гамет (рис. 4, б) (Szadkowski *et al.*, 2011).

Одним из механизмов, ведущих к мутационным изменениям в гибридном геноме на начальном этапе его существования, пока он находится в состоянии геномного стресса, может быть мутагенез, связанный с активностью транспозонов. Явление это хорошо изучено на примере гибридов подсолнечника: *Helianthus annuus* ( $2n = 18-20$ ) и *H. petiolaris* ( $2n = 18$ ) – диплоидные родительские виды подсолнечника. В результате гомоплоидной гибридизации они дали три вида: *H. anomalus* ( $2n = 20$ ), *H. deserticola* ( $2n = 20$ ) и *H. paradoxus* ( $2n = 12$ ), при этом размер генома у гибридных видов увеличился более чем в полтора раза, а число копий транспозона *Ty3/gypsy* в геномах гибридогенных видов больше, чем в «родительских» геномах в 5–24 раза (Ungerer *et al.*, 2006).

Исследования последнего времени показали, что центральную роль в процессах, ведущих к экспансии транспозонов у первых поколений гибридов, в изменениях транскрипции и трансляции геномов и в развитии гибридной стерильности играют эпигенетические изменения, модулируемые тремя классами малых ядерных РНК (miRNA, ta-siRNA и siRNA) (Ha *et al.*, 2009; He *et al.*, 2010; Ng *et al.*, 2012). Многие из них консервативны, но некоторые быстро эволюционируют. Так, сравнение геномов *Arabidopsis thaliana* и *A. lyrata*, видов, дивергировавших около 10 млн лет назад, показало, что два этих вида различаются по 24–32 % локусов miRNA, которые появились или были утрачены за время дивергенции (Fahlgren *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2010). Кроме различий по набору генов малых РНК, различия между видами и конф-

ликт геномов у гибридов могут быть связаны с модификацией разрезания предшественников miRNA, проходящего при участии DICER-подобных протеинов (Cuperus *et al.*, 2011; Ng *et al.*, 2012).

Процесс видообразования завершается, когда возникают жесткие репродуктивные барьеры между дивергировавшими видами. В некоторых случаях их становление определенно связано с мутагенезом, индуцированным нарушением геномного инпринтинга в результате конфликта геномов (Ng *et al.*, 2012). Например, у гибридов между диплоидным *A. thaliana* и тетраплоидом *A. arenosa* обычно молчащие транспозоны *Athila* экспрессируются с отцовского субгенома; экспансия *Athila* коррелирует с нарушением развития семян (Josefsson *et al.*, 2006).

Замечательно, что гены, удвоившиеся после возникновения аллополиплоидного генома, часто имеют асимметричную скорость эволюции, когда одна копия остается похожей на «предковый» ген, а вторая быстро эволюционирует и в долговременной перспективе способна приобрести новые функции (Levy *et al.*, 2013).

Геном полиплоидов постепенно теряет часть дублированных генов. Так, геном бананов *Musa accuminata* ( $2n = 22$ ), который 75–100 млн лет назад прошел через три раунда полиплоидизации, состоит сейчас из 36 542 протеин-кодирующих генов. Теоретически каждый из генов должен бы быть представлен 4 копиями разного происхождения. Но в геноме бананов только 10 % генов представлено 4 копиями, а большинство (65,4 %) генов представлено в геноме лишь одной копией (D’Hont *et al.*, 2012). Сохраняются гены, продукты которых работают в составе мультипротеиновых комплексов, и регуляторные гены, т. е. гены, для которых существенным является баланс дозы продуктов транскрипции и трансляции.

**ЦИКЛ: ГИБРИДИЗАЦИЯ –  
ГЕНОМНЫЙ ШОК –  
СТАБИЛИЗАЦИЯ ГЕНОМА –  
ДИПЛОИДИЗАЦИЯ –  
ГИБРИДИЗАЦИЯ В ЭВОЛЮЦИИ  
ЦВЕТКОВЫХ РАСТЕНИЙ**

Постепенная утрата части генов и части хромосом одного из субгеномов неополплоида

стабилизирует геном гибрида. На этой стадии кариотип аллополиплоида выглядит как кариотип типичного полиплоида, у которого можно более или менее надежно идентифицировать гомологичные и гомеологичные хромосомы. Мы предлагаем называть такие кариотипы эуполиплоидами (Родионов и др., 2010). Стабилизация эта относительна – некоторые хромосомы эуполиплоида могут быть вовлечены в хромосомные перестройки (транслокации и инверсии). Постепенно за счет транслокаций и инверсий кариотип перестраивается, причем в разных филогенетических ветвях по-разному, однако, как правило, постепенно идет редукция числа хромосом. При этом в геноме можно выделить горячие точки хромосомных перестроек в центромерных и субтеломерных районах и такие районы, где группы сцепления (геномные блоки) относительно константны. Наиболее часты транслокации, захватывающие целое плечо хромосомы и инсерции целых хромосом в центромерные районы других хромосом (Lysak *et al.*, 2007; International Brachypodium Initiative ..., 2010; Родионов и др., 2013).

Постепенная диплоидизация генома эуполиплоида за счет транслокаций и инсерций превращает его в кариотип, с кариологической точки зрения не отличимый от диплоидного, с некоторым, характерным для рода, базисным основным числом хромосом  $x$ . Например, в кариотипе *Zingiber biebersteiniana* с  $n = 2$ ,  $x = 2$ , а в кариотипе *Brassica rapa* с  $n = 10$ ,  $x = 10$ . Исходно полиплоидная природа этих кариотипов может быть выявлена только в сравнительных геномных исследованиях. Такие геномы и такие кариотипы, как уже сказано, называют палеополиплоидными.

Достигшие уровня эуполиплоида и/или уровня палеополиплоида виды вновь вступают в гибридизацию.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, можно утверждать, что в истории всех таксонов современных цветковых растений неоднократно повторялся цикл:

1) межвидовая гибридизация. Результат: возникает гибридный геном, часто аллополиплоидный, для которого характерно состояние геномного шока, сопровождающееся множест-

венными генетическими и эпигенетическими изменениями, экспансией транспозонов и утратой части генов;

2) стабилизация гибрида на уровне гомополиплоида или, чаще, аллополиплоида вследствие постепенной утраты части генов и хромосом – состояние эуполиплоида;

3) постепенная диплоидизация аллополиплоидного генома, переход его в состояние палеополиплоида.

И далее эта последовательность событий повторяется.

## ЛИТЕРАТУРА

- Вульф Е.В. Иозеф Кельрейтер, его жизнь и научные труды // Кельрейтер И. Ученые о поле и гибридизации растений. М.; Л.: ОГИЗ-Сельхозгиз, 1940. С. 9–46.
- Грант В. Видообразование у растений. М.: Мир, 1984. 528 с.
- Камелин Р.В. Лекции по систематике растений. Главы теоретической систематики растений. Барнаул: Изд-во «Азбука», 2004. 228 с.
- Камелин Р.В. Особенности видообразования у цветковых растений // Тр. Зоол. ин-та РАН. Приложение № 1. 2009. С. 141–149.
- Карпаченко Г.Д. Полиплоидные гибриды *Raphanus sativus* L. × *Brassica oleraceae* L. (К проблеме экспериментального видообразования) // Классики советской генетики 1920–1940 / Ред. П.М. Жуковский. Л.: Наука, 1968. С. 461–511.
- Орлова Л.В., Егоров А.А. К систематике и географическому распространению ели финской (*Picea fennica* (Regel) Kom., Pinaceae) // Новости систематики высших растений / Ред. Н.Н. Цвелев. Т. 42. М.; СПб.: Товарищество научных изданий, 2011. С. 5–23.
- Пунина Е.О., Мордак Е.В., Тимухин И.Н., Литвинская С.А. Конспект нотовидов рода *Paeonia* L. (Paeoniaceae) Кавказа и Крыма // Новости систематики высших растений / Ред. Н.Н. Цвелев. Т. 42. М.; СПб.: Товарищество научных изданий, 2011. С. 120–131.
- Родионов А.В., Носов Н.Н., Ким Е.С. и др. Происхождение полиплоидных геномов мятликов (*Poa* L.) и феномен потока генов между Северной Пацификой и субантарктическими островами // Генетика. 2010. Т. 46. № 12. С. 1598–1608.
- Родионов А.В., Коцеруба В.В., Ким Е.С. и др. Эволюция геномов и хромосомных наборов злаков // Цитология. 2013. Т. 55. № 4. С. 225–229.
- Цвелёв Н.Н. Злаки СССР. Л.: Наука, 1976. 788 с.
- Albertin W., Balliau T., Brabant P. *et al.* Numerous and rapid nonstochastic modifications of gene products in newly synthesized *Brassica napus* allotetraploids // Genetics. 2006. V. 173. P. 1101–1113.
- Allender C.J., King G.H. Origins of the amphiploid species *Brassica napus* L. investigated by chloroplast and nuclear molecular markers // BMC Plant Biol. 2010. V. 10. P. 54.

- Arias T., Pires J.C. A fully resolved chloroplast phylogeny of the brassica crops and wild relatives (Brassicaceae: Brassicaceae): Novel clades and potential taxonomic implications // *Taxon*. 2012. V. 61. P. 980–988.
- Bateson B. William Bateson, F.R.S. *Naturalist: His Essays & Addresses, Together With a Short Account of His Life*. Cambridge: The Univ. Press, 1928. P. 93.
- Chen S., Nelson M.N., Chèvre A.-M. *et al.* Trigenomic bridges for *Brassica* improvement // *Critical Rev. Plant Sci.* 2011. V. 30. P. 524–547.
- Chen S., Wan Z., Nelson M.N. *et al.* Evidence from genome-wide simple sequence repeat markers for a polyphyletic origin and secondary centers of genetic diversity of *Brassica juncea* in China and India // *J. Hered.* 2013. V. 104. P. 416–427.
- Crismani W., Girard C., Mercier R. Tinkering with meiosis // *J. Exp. Botany*. 2013. V. 64. P. 55–65.
- Cuperus J.T., Fahlgren N., Carrington J.C. Evolution and functional diversification of miRNA genes // *Plant Cell*. 2011. V. 23. P. 431–442.
- D'Hont A., Denoeud F., Aury J.-M. *et al.* The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants // *Nature*. 2012. V. 488. P. 213–217.
- Darlington C.D. *Recent Advances in Cytology*. Philadelphia: Blakiston, 1937.
- Fahlgren N., Jogdeo S., Kasschau K.D. *et al.* MicroRNA gene evolution in *Arabidopsis lyrata* and *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell*. 2010. V. 22. P. 1074–1089.
- Fawcett J.A., Maere S., Van de Peer Y. Plants with double genomes might have had a better chance to survive the Cretaceous-Tertiary extinction event // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. P. 5737–5742.
- Gaeta R.T., Pires J.C., Iniguez-Luy F. *et al.* Genomic changes in resynthesized *Brassica napus* and their effects on gene expression and phenotype // *Plant Cell*. 2007. V. 19. P. 1–15.
- Gaeta R.T., Yoo S.Y., Pires J.C. *et al.* Analysis of gene expression in resynthesized *Brassica napus* allopolyploids using *Arabidopsis* 70 mer oligo microarrays // *PLoS One*. 2009. V. 4. P. e4760.
- Gernand D., Rutten T., Varshney A. *et al.* Uniparental chromosome elimination at mitosis and interphase in wheat and pearl millet crosses involves micronucleus formation, progressive heterochromatinization, and DNA fragmentation // *Plant Cell*. 2005. V. 17. P. 2431–2438.
- Goldblatt P. Polyploidy in angiosperms: monocotyledons // *Polyploidy: Biological Relevance* / Ed. W.H. Lewis. N.Y.: Plenum Press, 1980. P. 219–239.
- Gómez-Campo C., Prakash S. Origin and domestication // *Developments in Plant Genetics and Breeding*. V. 4. Biology of *Brassica* Coenospecies / Ed. C. Gomez-Campo. Amsterdam: Elsevier, 1999. P. 33–58.
- Grant V. *The Origins of Adaptations*. N.Y.: Columbia Univ. Press, 1963.
- Ha M., Lu J., Tian L. *et al.* Small RNAs serve as a genetic buffer against genomic shock in *Arabidopsis* interspecific hybrids and allopolyploids // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. P. 17835–17840.
- He G., Zhu X., Elling A.A. *et al.* Global epigenetic and transcriptional trends among two rice subspecies and their reciprocal hybrids // *Plant Cell*. 2010. V. 22. P. 17–33.
- International *Brachypodium* Initiative 2010. Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon* // *Nature*. 2010. V. 463. P. 763–768.
- Ishii T., Tanaka H., Eltayeb A.E., Tsujimoto H. Wide hybridization between oat and pearl millet belonging to different subfamilies of Poaceae // *Plant Reprod*. 2013. V. 26. P. 25–32.
- Jenczewski E., Chevre A.M., Alix K. Chromosomal and gene expression in *Brassica* allopolyploids // *Polyploids and hybrid genomics* / Ed. Z.J. Chen, J.A. Bichler. Ames: Wiley-Blackwell, 2013. P. 171–186.
- Josefsson C., Dilkes B., Comai L. Parent-dependent loss of gene silencing during interspecies hybridization // *Curr. Biol*. 2006. V. 16. P. 1322–1328.
- Knobloch I.W. Intergeneric hybridization in flowering plants // *Taxon*. 1972. V. 21. P. 97–103.
- Kong F., Mao S., Jiang J. *et al.* Proteomic changes in newly synthesized *Brassica napus* allotetraploid and their early generations // *Mol. Biol. Rep.* 2011. V. 29. P. 927–935.
- Lermontova I., Schubert I. CENH3 for establishing and maintaining centromeres // *Plant Centromere Biology* / Ed. J. Jiang, J.A. Bichler. Oxford: Wiley-Blackwell, 2013. P. 67–82.
- Levin D.A. The long wait for hybrid sterility in flowering plants // *New Phytol*. 2012. V. 196. P. 666–670.
- Levy A.A., Tirosh I., Reikhav S. *et al.* Yeast hybrids and polyploids as models in evolutionary studies // *Polyploids and hybrid genomics* / Ed. Z.J. Chen, J.A. Bichler. Ames: Wiley-Blackwell, 2013. P. 3–14.
- Lysak M.A., Cheung K., Kitzschke M., Bureš P. Ancestral chromosomal blocks are triplicated in Brassicaceae species with varying chromosome number and genome size // *Plant Physiol*. 2007. V. 145. P. 402–410.
- Ma Z., Coruh C., Axtell M.J. *Arabidopsis lyrata* small RNAs: transient miRNA and small interfering RNA loci within the *Arabidopsis* genus // *Plant Cell*. 2010. V. 22. P. 1090–1103.
- Mallet J. Hybridization as an invasion of the genome // *Trends Ecol. Evol.* 2005. V. 20. P. 229–237.
- Mandáková T., Joly S., Krzywinski M. *et al.* Fast diploidization in close mesopolyploid relatives of *Arabidopsis* // *Plant Cell*. 2010. V. 22. P. 2277–2290.
- Müntzing A. The evolutionary significance of autopolyploidy // *Hereditas*. 1936. V. 21. P. 263–378.
- Ng D. W.-K., Lu J., Chen Z.J. Big roles for small RNAs in polyploidy, hybrid vigor, and hybrid incompatibility // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2012. V. 15. P. 154–161.
- Pavy N., Pelgas B., Laroche J. *et al.* A spruce gene map infers ancient plant genome reshuffling and subsequent slow evolution in the gymnosperm lineage leading to extant conifers // *BMC Biol.* 2012. V. 10. P. 84.
- Pikaard C.S. Genomic change and gene silencing in polyploids // *Trends Genet.* 2001. V. 17. P. 675–677.
- Pires J.C., Gaeta R.T. Structural and functional evolution of resynthesized polyploids // *Genetics and Genomics of the Brassicaceae* / Ed. R. Schmidt, I. Bancroft. N.Y., Dordrecht, Heidelberg, London: Springer, 2011. P. 195–214.
- Ramsey J., Schemske D.W. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants // *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 1998. V. 29. P. 467–501.

- Report of the Third International Conference 1906 on Genetics; Hybridization (the cross-breeding of genera or species), the cross-breeding of varieties, and general plant-breeding / Ed. W. Wilks. L.: Sportiswoode & Co., 1906. 492 p.
- Rieseberg L.H., Wendel J.F. Introgression and its consequences in plants // Hybrid Zones and the Evolutionary Process / Ed. R.G. Harrison. N.Y.: Oxford Univ. Press, 1993. P. 70–110.
- Rieseberg L.H., Willis J.H. Plant speciation // Science. 2007. V. 317. P. 910–914.
- Sanei M., Pickering R., Kumke K. *et al.* Loss of centromeric histone H3 (CENH3) from centromeres precedes uniparental chromosome elimination in interspecific barley hybrids // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. P. 498–505.
- Scott R.J., Tratt J.L., Bolbol A. Seed development in inter-ploidy hybrids // Polyploid and Hybrid Genomics / Ed. Z.J. Chen, J.A. Bichler. Ames: Wiley-Blackwell, 2013. P. 271–290.
- Soltis P.S., Soltis D.E. The role of hybridization in plant speciation // Annu. Rev. Plant Biol. 2009. V. 60. P. 561–588.
- Song K., Lu P., Tang K., Osborn T.C. Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for polyploidy evolution // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 7719–7723.
- Stebbins G.L. Variation and Evolution in Plants. N.Y.: Columbia Univ. Press, 1950.
- Szadkowski E., Eber F., Huteau V. *et al.* Polyploid formation pathways have an impact on genetic rearrangements in resynthesized *Brassica napus* // New Phytol. 2011. V. 191. P. 884–894.
- te Beest M., Le Roux J.J., Richardson D.M. *et al.* The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions // Ann. Botany. 2012. V. 109. P. 19–45.
- U N. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization // Jap. J. Bot. 1935. V. 7. P. 389–452.
- Ungerer M.C., Strakosh S.C., Zhen Y. Genome expansion in three hybrid sunflower species is associated with retrotransposon proliferation // Curr. Biol. 2006. V. 16. P. R872–R873.
- Vamosi J.C., McEwen J.R. Origin, elevation, and evolutionary success of hybrids and polyploids in British Columbia, Canada // Botany. 2013. V. 91. P. 182–188.
- Whitney K.D., Ahern J.R., Campbell L.G. *et al.* Patterns of hybridization in plants // Perspectives Plant Ecol. Evol. Syst. 2010. V. 12. P. 175–182.
- Xiong Z., Gaeta R.T., Pires J.C. Homoeologous shuffling and chromosome compensation maintain genome balance in resynthesized allopolyploid *Brassica napus* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. P. 7908–7913.
- Yoo M.-J., Szadkowski E., Wendel J.F. Homoeolog expression bias and expression level dominance in allopolyploid cotton // Heredity. 2013. V. 110. P. 171–180.

УДК 575.8:612.6.05

## ГЕНЕТИКА И ГЕНОМИКА ЧЕЛОВЕКА. ПОПУЛЯЦИИ И ЭТНОСЫ В ПРОСТРАНСТВЕ И ВРЕМЕНИ: ЭВОЛЮЦИОННЫЕ И МЕДИЦИНСКИЕ АСПЕКТЫ

© 2013 г. С.А. Боринская, Н.К. Янковский

Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия,  
e-mail: nick.yankovsky@vigg.ru

Поступила в редакцию 9 августа 2013 г. Принята к публикации 1 ноября 2013 г.

Генетическая адаптация популяций человека к локальным условиям среды может быть представлена как возникновение новых аллелей в результате мутаций и последующее изменение частот аллелей в поколениях вследствие естественного отбора признаков, ассоциированных с этими аллелями и важных для выживания и успешной репродукции человека. Помимо процессов адаптации, на изменение частот аллелей влияют генетический дрейф и миграции. Исследование генетической адаптации человека занимает одно из центральных мест в биологической антропологии, генетике человека и эволюционной биологии и уже дало значительный вклад в понимание взаимодействия средовых и генетических факторов, влияющих на здоровье человека.

Ниже будут описаны подходы к поиску аллелей, определяющих приспособленность человека к действию факторов окружающей среды. Эти подходы потенциально приложимы не только к человеку, но и к другим животным и растениям. Исходной посылкой для применения этих подходов является перекрывание ареала действия конкретного фактора среды и ареала повышенной популяционной частоты аллеля, что позволяет предполагать их связь, хотя и не доказывает ее. Такое совпадение ареалов, после вычитания вклада случайных причин (генетический дрейф, генетическая подразделенность популяций), является основой для выдвижения и дальнейшей проверки гипотезы о роли данного фактора отбора в повышении частоты данного аллеля в популяциях человека. Прямое доказа-

тельство таких гипотез может быть получено, если удастся показать связь генотипа и фенотипа с приспособленностью к данному фактору отбора (выживаемость или репродуктивный успех) (Hancock *et al.*, 2008, 2010a).

Мы привыкли сравнивать генетические особенности индивидов друг с другом. Индивид как единица учета был и остается необходимым, но позволяет установить лишь наличие аллеля, но не его частоту. Для придания «смысла» гену и конкретному аллелю нужно применить эволюционный подход. Для этого единицей учета должна стать популяция, а учитываемым признаком станет частота аллеля. При этом сравнивать друг с другом нужно признаки популяций (условия среды и частоты аллелей), а не признаки индивидов.

### ИСТОРИЯ ВОПРОСА

Исследования генетических причин адаптации к локальной среде ведутся уже более 60 лет. Для этого сравнивали распределение частот встречаемости фенотипов по отношению к величине значений средовых переменных, предположительно являющихся факторами отбора. Такой подход был использован в классических исследованиях географического распределения аллелей бета-талассемии (Haldane, 1949), серповидноклеточной анемии (Allison, 1954) и дефицита глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы человека (более детально описанного ниже), придающих устойчивость к малярии. Путь от гипотезы о протективном действии аллеля,

выдвинутой на основе совпадения ареалов распространения аллеля с ареалом эндемичной инфекции, до четкого доказательства, включающего понимание молекулярных механизмов, занимает порой десятки лет. Рассмотрим этот путь на примере гена глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (*G6PD*).

В начале 1950-х годов во время корейской войны американским солдатам в обязательном порядке выдавался примахин. Это лекарство должно было защитить солдат от малярии, но у части из них прием препарата вызывал тяжелое побочное действие – острую гемолитическую анемию. Внезапно развивавшееся заболевание крови приводило даже к гибели. Исследование показало, что смертность от «примахиновой» анемии различалась у представителей разных этнических групп. Особенно высокой (до 10–15 %) она была среди солдат, предки которых имели средиземноморское происхождение (выходцы из северной Африки, Италии, Испании, Ближнего Востока). Вскоре были открыты причины «примахиновой» анемии. Она возникала у людей с наследственным дефицитом фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (*G6PD*) (Carson *et al.*, 1956). Фермент *G6PD* участвует в гексоз-монофосфатном пути, единственном процессе, генерирующем НАДФ в зрелых эритроцитах, в которых отсутствует цикл Кребса. Этот фермент катализирует окисление глюкозо-6-фосфата в 6-фосфоглюконат. В этой реакции образуется восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФН), который в дальнейшем используется для восстановления глутатиона (при участии глутатионредуктазы), а также частично метгемоглобина в гемоглобин. Восстановленный глутатион защищает гемоглобин и тиоловые ферменты, поддерживающие нормальную проницаемость мембран эритроцитов, от окислительного действия различных веществ, в том числе и лекарственных препаратов. При недостаточности *G6PD* прием некоторых лекарственных средств (примахин, сульфаниламиды и др.) или продуктов питания (бобы) ведет к массивному разрушению эритроцитов (гемолитические кризы) вследствие падения содержания в них восстановленного глутатиона и дестабилизации мембран. Размножение малярийного плазмодия в эритроцитах также дестабилизирует их мембраны. Сочетание на-

следственного дефекта и инфекции приводит к гибели зараженных эритроцитов, и паразит не успевает развиваться. В результате у людей с дефицитом фермента малярия протекает в более легкой форме. Показано, что в культуре клеток эритроциты, дефицитные по *G6PD*, поддерживают рост малярийного плазмодия в 3 раза хуже, чем нормальные клетки (Roth *et al.*, 1983). Эпидемиологические данные показали, что распространенная в Африке форма дефицита *G6PD* ассоциирована со снижением риска тяжелой малярии в 2 раза, причем как у гемизиготных мужчин, имеющих дефектный ген в своей единственной X-хромосоме, так и у гетерозиготных женщин, носительниц одного нормального и одного дефектного гена (Ruwando *et al.*, 1995). Мутации в гене *G6PD*, ведущие к дефициту фермента, возникали неоднократно и широко распространились в малярийных зонах под действием отбора на устойчивость к этой инфекции.

#### ГЕНОМ ЧЕЛОВЕКА И БАЗЫ ДАННЫХ ЧАСТОТ АЛЛЕЛЕЙ

Для проверки гипотез о вовлечении определенного фенотипа в процесс адаптации и выявлении факторов среды, вызывающих эту адаптацию, необходим сбор фенотипических данных, что дорого и требует значительного времени, а также экспериментальный анализ больших выборок для достижения статистически значимых показателей (Hancock *et al.*, 2008, 2010a). В то же время в последнее десятилетие интенсивно развиваются подходы к выявлению особенностей геномов людей, указывающих на действие отбора. Участки генома, подверженные действию отбора, отличаются по ряду характеристик от участков с нейтральными генетическими вариациями (Gillespie *et al.*, 1991). Недавнее развитие технологий и ресурсов (проекты HarMap, «1000 геномов» и др.) для исследования генетических вариаций человека в беспрецедентном масштабе позволяют исследователям сканировать полные геномы человека в поиске сигналов позитивного отбора (см обзор: Hancock *et al.*, 2008, 2010b).

Созданы базы данных, описывающие разнообразие генома человека. Состав и частоты аллелей отражают специфику популяции, ее

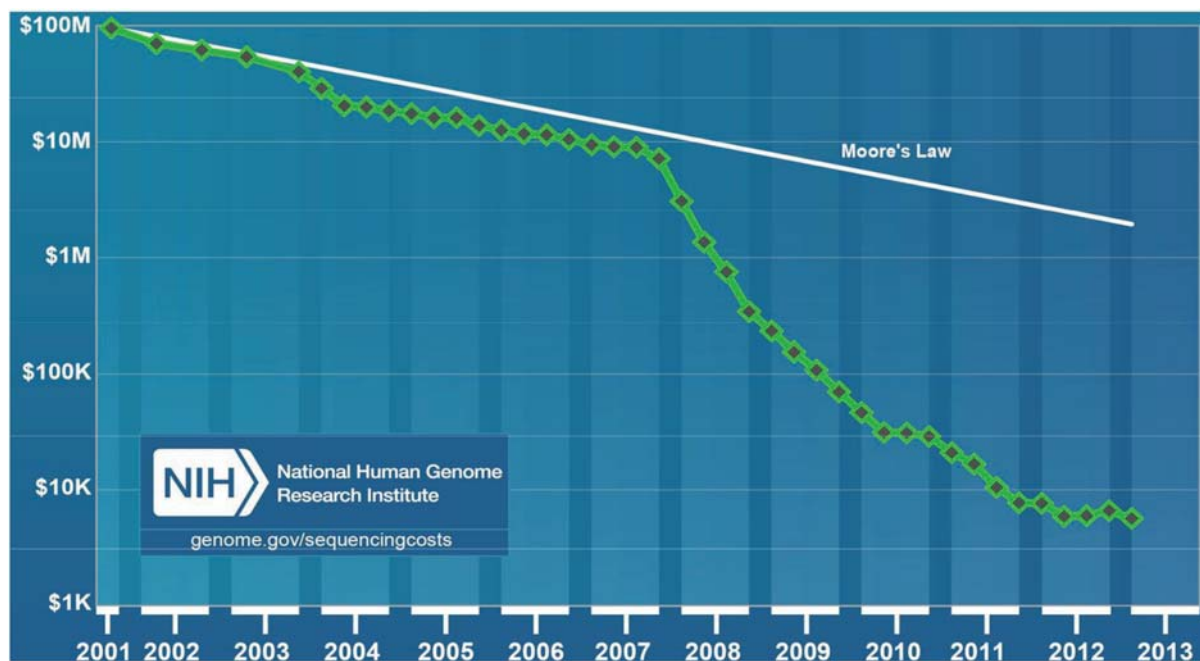


Рис. 1. Изменение стоимости секвенирования генома человека (genome.gov/sequencingcosts).

происхождение, историю, миграции и родство с другими популяциями. Выявление новых аллелей в геноме человека происходит сейчас в основном в результате секвенирования. Это секвенирование отдельных участков генома, представляющих интерес для исследователя, и секвенирование всего генома индивида целиком. Стоимость секвенирования генома человека составляет около 5000 дол. на июль 2013 г. и продолжает быстро падать (рис. 1). Для человека частоты аллелей и гаплотипов всех популяций мира будут, вероятно, установлены в представимом будущем полногеномным секвенированием.

Для многих локусов, выявленных методом геномного сканирования как предполагаемых мишеней отбора, связь с фенотипическими признаками пока не известна (Coop *et al.*, 2009). Неизвестны и факторы отбора аллелей в этих локусах. Наиболее очевидными факторами является адаптация к геоклиматическим условиям, особенностям традиционного питания, эндемичным инфекциям и особенностям образа жизни.

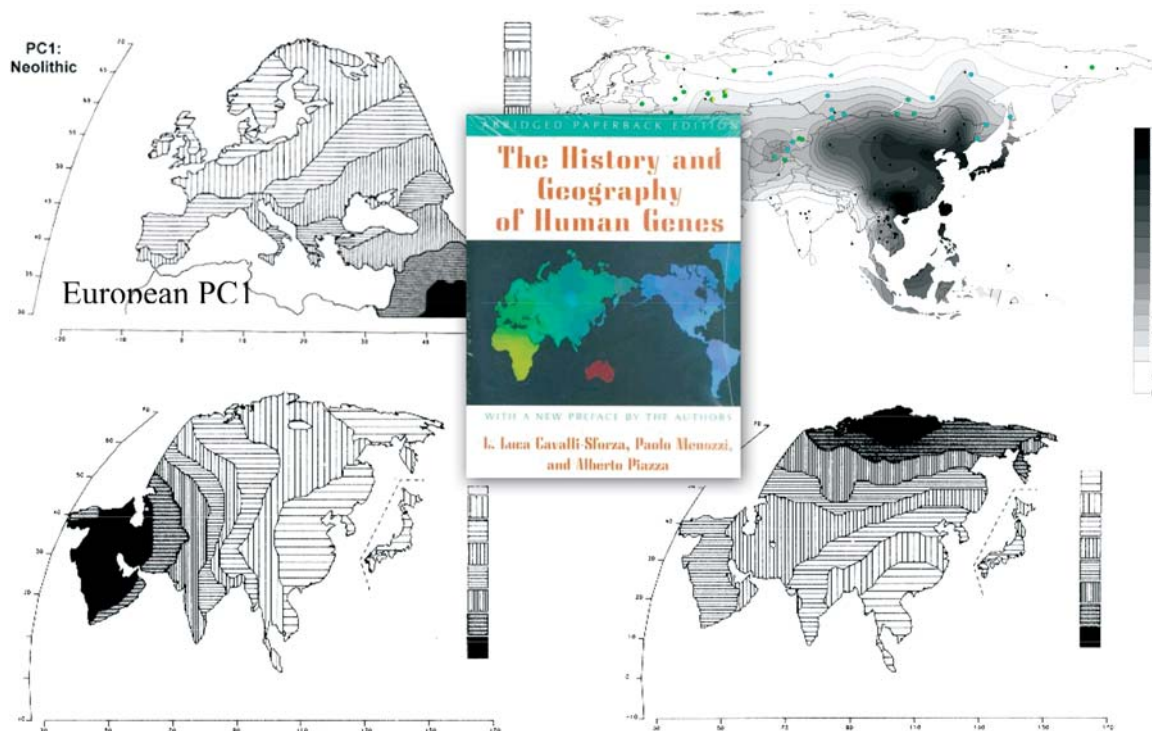
Для выявления таких факторов необходимо сопоставление вариаций частот аллелей в популяциях и присутствия или наличия потенциального фактора отбора в среде, либо интенсивности его действия. Различия между

популяциями по составу и частоте аллелей формируются либо в результате локус-специфичных процессов (различные виды отбора, направленные на один или несколько локусов, определяющих адаптивный фенотип), либо в результате событий популяционного уровня (колебания численности и экспансия популяций, метисация и др.), которые затрагивают множество локусов одновременно (рис. 2).

Средовые факторы, отбор, популяционные факторы (миграции, дрейф) действуют одновременно на многие гены в популяции. Чтобы приписать аллель адаптивную и медицинскую роль, нужно уметь: 1) отличить действие отбора от действия стохастических факторов (дрейф, серфинг аллеля – серия «бутылочных горлышек») и 2) выявить аллель, причинный для заболевания, среди всех аллелей причинного гаплотипа, подхваченного отбором (Gene lifting).

К указаниям на возможное действие отбора на аллель и ген, к которому он принадлежит, относят высокую популяционную частоту либо гомозиготность по эволюционно «молодым» аллелям, присутствие в популяции протяженных гаплотипов с частотой, превышающей ожидаемую для случайного распределения размеров гаплотипов, экстремально высокий уровень





**Рис. 2.** Различные главные компоненты в распределении частот аллелей в Евразии, формирующиеся под действием природных факторов и миграций (Cavalli-Sforza *et al.*, 1994; Excoffier, Ray, 2008; Slatkin, Excoffier, 2012).

Карта частот аллеля гена *ADH1B* приведена по: (Borinskaya *et al.*, 2009. P. 89–92).

Профили географического распределения популяционных частот аллелей различны для разных аллелей и гаплотипов (набор сцепленных аллелей). Исходным источником генетического разнообразия являются мутации, например SNP. Новый аллель может накопиться в поколениях и сформировать уникальную географическую карту распределения частоты встречаемости, которая определяется как случайными причинами (генетический дрейф) так и отбором (адаптация).

межпопуляционных различий по частоте аллеля (высокий уровень  $F_{st}$ ) (Sabeti *et al.*, 2006). Совпадение ареалов действия конкретных факторов среды и высокой частоты тех или иных аллелей позволяет предполагать их связь, но не доказывает. Однако именно такое совпадение после контроля возможных причин корреляции на популяционном уровне (контроля генетической структурированности популяций) является основой для выдвижения и дальнейшей проверки гипотез о факторах отбора, влияющих на частоты аллелей в популяциях человека. Следует подчеркнуть, что геномный анализ может указать на гаплотип, ген или даже его аллель, который подвержен действию отбора, но этот анализ не способен указать на фактор среды, который определил адаптивность данного аллеля и явился причиной его накопления в данной популяции.

### КАКОВ ВКЛАД МУТАЦИЙ РАЗНОГО ЭВОЛЮЦИОННОГО ВОЗРАСТА В БОЛЕЗНИ ЧЕЛОВЕКА И В ЧАСТОТУ СООТВЕТСТВУЮЩЕГО АЛЛЕЛЯ В ПОПУЛЯЦИИ?

Считается, что чем чаще встречается данный аллель в популяции, тем меньше величина его вклада в развитие заболевания (рис. 3).

Подавляющее большинство одиночных мутаций не имеют морфологического проявления и не приводят к менделирующим заболеваниям человека. Мутации, принадлежащие к генам менделирующих наследственных заболеваний человека, немногочисленны и составляют порядка одной сотысячной от всех десятков миллионов мутаций человека, зарегистрированных в базах данных.

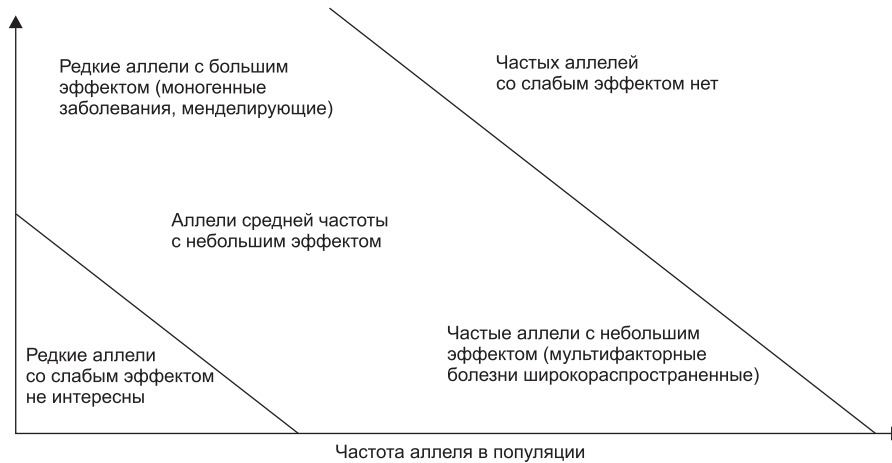


Рис. 3. Вклад аллеля в формирование признака и частота его встречаемости в популяции.

Ребенка от родителей отличают 63 новых генеративных мутации (по данным секвенса, 78 триад ребенок + оба родителя) (Kong *et al.*, 2012). То есть вероятность возникновения мутации в данной позиции генома в данном поколении составляет  $1,2 \times 10^{-8}$ . Другими словами, чтобы хотя бы один индивид стал носителем новой генеративной мутации в данной позиции генома, численность популяции должна составлять  $10^8$  человек (а в расчете на белок-кодирующую часть данного гена – около  $10^5$  человек). Таким образом, мутации *de novo* не дают большого вклада в частоту встречаемости наследственных болезней человека.

Из 3 млрд позиций в нашем геноме примерно каждая тысячная полиморфна (Venter *et al.*, 2001; Venter, 2010, 2011). Каждый из нас несет 2–3 млн мутаций (сумма различий папиных и маминых хромосом индивида), т. е. 4–6 млн аллелей. Напомним, что в данном поколении в геноме возникает менее 100 новых генеративных мутаций и никакие даже самые ужасные условия внешней среды не способны увеличить эту частоту хотя бы в 10 раз. Таким образом, более чем 99,99 % генеративных мутаций (аллелей) в геноме каждого из нас уже существовали в геномах наших предков и возникли давно – иногда миллионы лет назад (например, группы крови человека и приматов). Именно эти «старые» мутации и их сочетания, генотипы, определяют практически все генетически контролируемые особенности людей.

Какую долю от разнообразия всех закрепившихся в популяциях генеративных мута-

ций несет каждый из нас, один из миллиардов людей, живущих сейчас на Земле? Эта доля совсем не одна миллиардная, а на несколько порядков больше. Число всех описанных на сегодня однонуклеотидных полиморфных участков генома (SNP) составляет несколько десятков миллионов мутаций, а геном каждого из нас несет несколько миллионов мутаций. То есть каждый из нас несет заметную долю всех мутаций, описанных для всех обследованных на данный момент людей.

Основная часть мутаций в генофонде человечества присутствует уже давно, возможно, до времени выхода наших предков из Африки, и большинство аллелей присутствуют в большинстве популяций мира, хотя и с очень разной частотой. «Старые» мутации – это основной потенциал и нашей устойчивости, и чувствительности к болезням, в том числе к мультифакторным.

### ФАКТОРЫ ОТБОРА, ДЕЙСТВУЮЩИЕ В ПОПУЛЯЦИЯХ ЧЕЛОВЕКА, И ПОДХОДЫ К ИХ ВЫЯВЛЕНИЮ

Как вид *Homo sapiens* уникален в том, что имеет широчайший ареал расселения и за счет биологических и культурных адаптаций приспособлен к самым различным экорегионам, использованию различных стратегий ведения хозяйства и источников пищи. На протяжении большей части своего существования как вида человек вел образ жизни охотника-собирателя. С появлением производящего хозяйства возникли

новые векторы давления отбора – переход на новый тип питания, изменение демографических характеристик обществ, появление новых источников инфекций в результате перехода к оседлому образу жизни, развитию технологий хранения продуктов, одомашнивания животных.

Возможно, что у охотников-собирателей отбор действовал в пользу сохранения аллелей генов, обеспечивших наиболее эффективное использование дефицитных нутриентов (сахаров, жиров и соли). Таков постулат гипотезы об «экономичных генах», точнее – экономичных аллелях («thrifty» гипотеза (Neel, 1999)), которые, после развития производства доступных продуктов в индустриализованных обществах, стали аллелями риска соответствующих заболеваний (диабета, атеросклероза, гипертонии).

Выявление аллелей генов, являющихся факторами риска развития широко распространенных заболеваний в одних условиях среды и протективных или нейтральных в других условиях среды, актуально как с точки зрения генетики человека и эволюционной биологии, так и для фундаментальных аспектов антропологии и практического здравоохранения.

Для исследования влияния природных и антропогенных факторов на частоты аллелей в популяциях человека и их связь с важными для здоровья признаками актуальными являются междисциплинарные исследования, дающие новые подходы к пониманию путей и механизмов адаптации популяций человека к изменяющимся условиям среды. Сравнение частот аллелей в популяциях и условий их проживания начаты более полувека тому назад профессором Л. Кавалли-Сфорца (сводка дана: Cavalli-Sforza *et al.*, 1994). Наиболее интенсивно велись исследования адаптации к климатическим условиям (см. краткий обзор: Соор *et al.*, 2010; Hancock *et al.*, 2011).

Ранее для таких сравнений нужно было, исходя из функций гена, предположить, по каким параметрам среды следует сравнивать популяции, различающиеся по частотам аллелей этого гена. В настоящее время можно сравнивать базы данных частот аллелей (даже если функциональная значимость аллеля неизвестна) с базами данных, описывающих различные характеристики среды, которые могут служить факторами отбора.

Новые возможности открываются при использовании массивов данных о факторах среды, влияющих на организм человека (помимо климата – особенности диеты, распространение инфекций и многие другие), которые сформированы исследователями в различных областях наук (эпидемиологии, антропологии, этнографии и др.).

Этнографы описывают не популяции, а этнические группы, выделяемые на основе не биологических, а культурных признаков. Популяция не эквивалентна этнической группе. Но популяции, которые представляют один этнос, имеют ряд общих признаков (регион проживания, традиции питания, другие хозяйственно-культурные особенности), и эти признаки формировались на протяжении многих веков адаптации к локальным условиям – адаптации как культурной, так и биологической. Поэтому некоторые особенности, зафиксированные этнографами, отражают влияние факторов среды, к которым проходила генетическая адаптация популяций.

Для проведения анализа корреляций необходимо, чтобы словесное описание было формализовано, т. е. представлено в бинарном виде (фактор присутствует или отсутствует) или в виде численной характеристики, отражающей вклад или интенсивность действия фактора. Такие формализованные этнографические описания были созданы Дж.П. Мердоком на основе картотеки этнографических описаний «Human Relations Area Files» – основного центра аккумуляции этнографической информации в мире. Созданный Дж.П. Мердоком «Этнографический атлас» был опубликован в виде серии статей в журнале «Ethnology» в период с 1960 г. по 1973 г. и дополнен описаниями народов России с участием одного из авторов (Korotayev *et al.*, 2004). «Атлас» не имеет аналогов по полноте описания народов мира и широко используется не только для кросс-культурных и этнографических исследований, но и для исследований в других научных областях, включая медико-антропологические. «Атлас» ранее использовался в популяционно-генетических исследованиях, но лишь как компендиум сведений о языковой принадлежности или экологической классификации среды (Guglielmino *et al.*, 1995) либо наличия отдельного признака (например, молочного животноводства) (Bersaglieri *et al.*, 2004).

В последние годы введены в обращение формализованные описания эпидемиологической нагрузки (Murray, Schaller, 2010), созданные на основе эпидемиологических атласов (Rodenwaldt, Bader, 1952–1961; Simmons *et al.*, 1944).

Это новый подход к поиску факторов отбора, которые могли привести к увеличению популяционной частоты аллеля, обеспечивающего повышенную приспособленность к описанным условиям среды.

Экспериментально доступно определение аллельного состояния для сотен тысяч SNPs (панель Illumina). Такое число аллелей достаточно, чтобы маркировать основные группы неравновесия по сцеплению у европейцев.

Но столь детальные данные в открыто доступных базах данных относятся лишь к нескольким десяткам популяций (HGDP-CEPH populations, 1000 Genomes Project) из тысяч существующих популяций. По единичным генам частоты аллелей известны для сотен популяций (например, > 300 популяций для генов *APOE*, *ADH1B*, для сотен популяций известны частоты аллелей групп крови и других «классических» генетических маркеров).

Сопоставление массивов этих данных имеет ряд ограничений, в частности при наличии сотен популяций, для которых доступны генетические данные, и тысяч этнических групп, для которых доступны базы данных с этнографическими и эпидемиологическими характеристиками, эти массивы перекрываются по немногим десяткам популяций.

Исходным источником генетического разнообразия являются мутации, например SNP. Новый аллель может накопиться в поколениях и сформировать уникальную географическую карту распределения частоты встречаемости, которая определяется как случайными причинами (генетический дрейф в сочетании с миграциями), так и отбором (адаптация).

Средовые факторы, отбор, популяционные факторы (миграции, дрейф) действуют одновременно на многие гены в популяции. Чтобы приписать аллелю адаптивную роль и медицинскую роль, нужно уметь отличить действие отбора от действия стохастических факторов (дрейф, аллель-серфинг – серия «бутылочных горлышек») (Excoffier, Ray, 2008; Slatkin, Excoffier, 2012), а также уметь выявить аллель,

который является причиной заболевания среди всех аллелей гаплотипа, связанного с заболеванием и подхваченного отбором (такое явление называется Gene lifting).

### КАКОВЫ КЛЮЧЕВЫЕ ФАКТОРЫ СРЕДЫ, К КОТОРЫМ ПРОХОДИЛА ГЕНЕТИЧЕСКАЯ АДАПТАЦИЯ ПОПУЛЯЦИЙ ЧЕЛОВЕКА?

Это прежде всего климат, инфекции, тип хозяйствования, особенности питания (Cavalli-Sforza *et al.*, 1994; Гончарова и др., 2006; Hancock *et al.*, 2008, 2010 a, b; Coop *et al.*, 2009; Fumagalli *et al.*, 2011). Наиболее обширная сводка сведений об этих факторах содержит база данных Мердока «Этнографический атлас» (рис. 4) (Murdoch, 1967). Такие базы пока очень мало использовались в популяционно-генетических исследованиях человека. Они содержат информацию о более чем 1000 этнических групп, которые в случае географической компактности обитания могут рассматриваться как популяции. Использование данных «Этнографического атласа» для выявления корреляций с частотами аллелей популяций, обитающих в тех же регионах, может дать информацию о генах, аллели которых важны для адаптации к факторам среды. Рассмотрим пример такого анализа в следующем разделе.

### ГЕНЫ, КОНТРОЛИРУЮЩИЕ МЕТАБОЛИЗМ АЛКОГОЛЯ

Основной способ окисления (до 80–90 % экзогенного алкоголя) связан с действием печеночных ферментов. На первом этапе этанол превращается в ацетальдегид под действием алкогольдегидрогеназы (АДГ), кодируемой геном *ADH1B*. Затем и ацетальдегид окисляется до ацетата под действием ацетальдегиддегидрогеназы (АльДГ), кодируемой геном *ALDH2*.

Оба гена полиморфны. Замена аминокислоты аргинин в позиции 48 полипептидной цепи АДГ на гистидин (аллель *48His*) приводит к 100-кратному увеличению в скорости работы фермента (Jornvall *et al.*, 1984; Matsuo *et al.*, 1989). В результате при потреблении алкоголя происходит более быстрое накопление токсичного альдегида, что связано с неприятными

Факторы среды (природной и культурной) описаны в базах данных

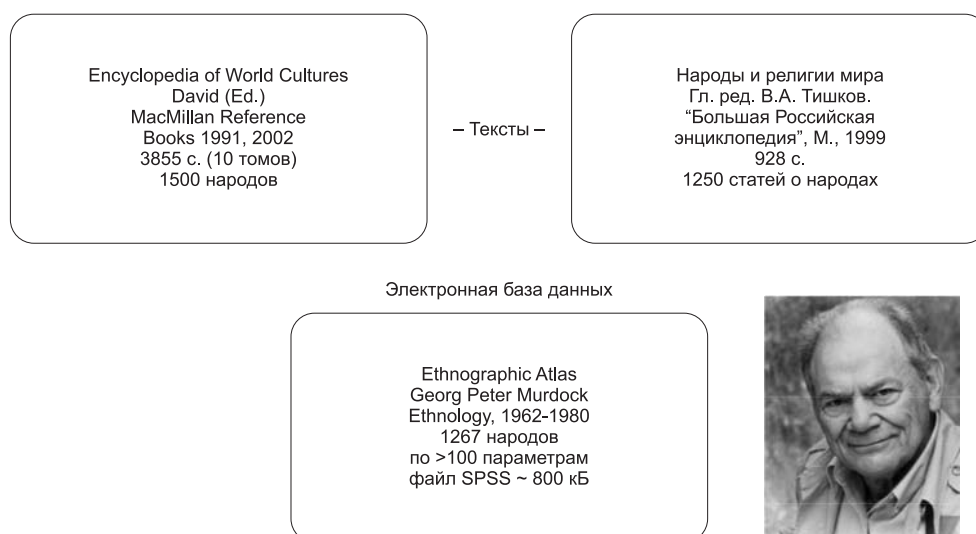
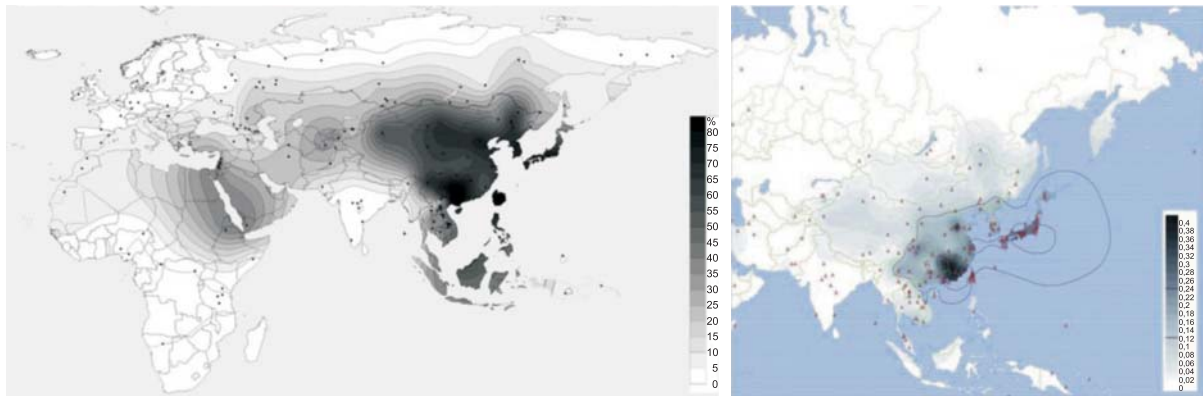


Рис. 4. Сопоставление объема сводок по этнографии народов.

ощущениями. Носители аллеля *48His* в среднем потребляют меньше алкоголя и реже страдают алкоголизмом (Osier *et al.*, 1999; Tolstrup *et al.*, 2008). Еще более сильный эффект дает аллель гена *ADLH2*, у носителей которого имеется замена глутамина на лизин *Glu504Lys*. Аллель *504Lys* определяет синтез неактивного фермента. У гомозигот по данному аллелю фермент нефункционален, а у гетерозигот активность составляет лишь около 6 % от уровня активности данного фермента у гомозигот по эволюционно более древнему аллелю *504Glu* (Crabb *et al.*, 1989). При потреблении даже небольших доз алкоголя у носителей аллеля *ALDH2\*504Lys* часто развивается комплекс симптомов (головкружение, учащение сердцебиений, пототделение, тошнота, покраснение кожи лица), препятствующий продолжению приема алкоголя. Частота аллеля *ALDH2\*504Lys* снижена у алкоголиков, а гомозиготы по данному аллелю среди них крайне редки. Гетерозиготные носители аллеля *ALDH2\*504Lys* потребляют меньше алкоголя, чем те индивиды, у которых аллель отсутствует (Wall *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2008). Популяционные различия по частотам этих аллелей довольно велики (карты распределения частот представлены на рис. 5). Частоты аллеля *48His* варьируют от 80 % в популяциях Восточной Азии до практически полного отсутствия в европейских популяциях. Имеется также локальный максимум (30–40 % частота) в популя-

циях Ближнего Востока (Vorinskaya *et al.*, 2009). Аллель *ALDH2\*504Lys* представлен с частотой до 40 % в популяциях Китая и Японии и менее 1 % – в Европе, Западной Азии и Африке (Li *et al.*, 2009) (рис. 5). У коренного населения Нового Света оба аллеля отсутствуют.

В ряде работ показано, что в популяциях Юго-Восточной Азии оба аллеля – *ADH1B\*48His* и *ALDH2\*504Lys* – находятся под действием отбора (Oota *et al.*, 2004, 2007). Предположения о том, что частоты этих аллелей в популяциях Юго-Восточной Азии возросли под действием отбора, были выдвинуты вскоре после того, как было установлено, что различия между «типичными» *ADH1B\*47Arg* и *ALDH2\*504Glu* и «атипичными» (*ADH1B\*48His* и *ALDH2\*504Lys*) вариантами обусловлены единичными аминокислотными заменами, и что «атипичные» варианты являются эволюционно более поздними, чем распространенные у европеоидов «типичные» изоформы ферментов. Доводом в пользу отбора было то, что повышена частота производных аллелей, расположенных на разных хромосомах генов, которые контролируют одно звено метаболизма, и оба атипичных варианта ферментов повышают концентрацию ацетальдегида (Ikuta *et al.*, 1986). В качестве фактора отбора предполагались особенности диеты, в частности потребление содержащих алкоголь напитков и пищи. При этом подразумевалось, что адаптивную ценность этим аллелям обеспечивал именно их протектив-



**Рис. 5.** Географическое распределение частот аллелей генов метаболизма алкоголя.

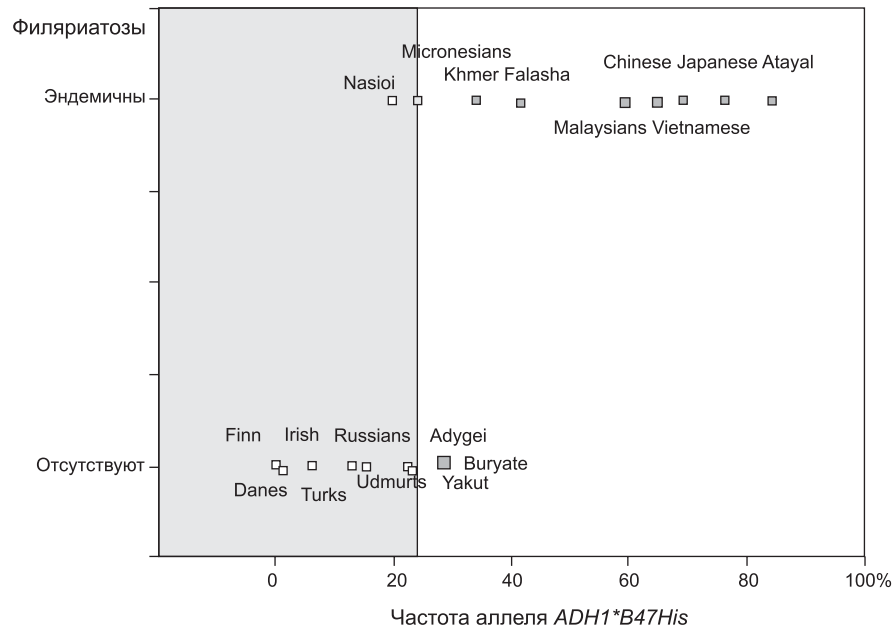
Аллель *ADH1B\*48His* отвечает за быстрое накопление токсичного альдегида в популяциях на Ближнем Востоке и особенно в Юго-Восточной Азии (> 80 %). Аллель *ALDH2\*504Lys* – за медленное разрушение этого яда в популяциях Юго-Восточной Азии (> 40 %).

ный эффект в отношении развития алкоголизма (Ikuta *et al.*, 1986). Гипотеза о том, что фактором отбора аллелей *ADH1B\*47His* и *ALDH2\*504Lys* могла быть какая-либо тропическая инфекция по типу малярии и серповидноклеточной анемии, была выдвинута Дж. Лонгом (Liberles, 2001). Сходное предположение было выдвинуто группой К. Кидда (Oota *et al.*, 2004).

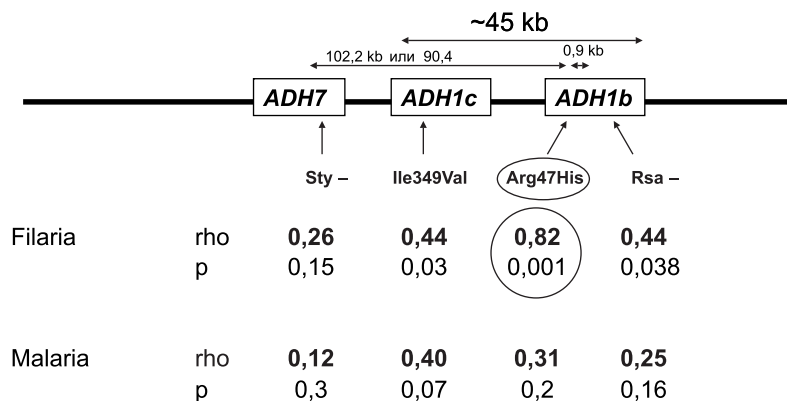
Если какой-либо из перечисленных факторов среды влияет на частоту аллеля, то можно ожидать, что в популяциях, в среде обитания которых фактор присутствует, частоты аллеля будут в среднем выше, чем в тех, в которых фактор отсутствует. Чтобы проверить эту гипотезу, мы провели анализ корреляций частот аллеля *ADH1B\*48His* с наличием эндемичных инфекций, скотоводства (одомашнивание скота послужило распространению инфекций) и земледелия. В качестве источника описаний факторов среды использовали «Этнографический атлас» (Murdock, 1967). Для двух переменных (скотоводство и филяриоз) получены значимые корреляции, но лишь для филяриоза корреляция остается значимой после поправки на множественное тестирование. Корреляционный анализ показывает, что частота аллеля *ADH1B\*48His* повышена в популяциях, в которых филяриозы эндемичны (рис. 6).

В тех популяциях, для которых филяриозы эндемичны, частота аллеля *ADH1B\*47His* составляет от 20 до 80 %. В тех популяциях, где эта инфекция не представлена, частота аллеля не превышает 25–30 % (рис. 6).

Полученные результаты позволяют выдвинуть гипотезу о том, что аллель *ADH1B\*48His* может быть протективным в отношении развития филяриозной инфекции у человека. Для того, чтобы проверить, что именно аллель *ADH1B\*48His* обеспечивает корреляцию с наличием филяриозов в среде проживания, мы определили корреляции частот аллелей, сцепленных с данным SNP (рис. 7). Соответствующие коэффициенты корреляции убывают по обе стороны от *ADH1B\* Arg48His* (рис. 7). Это позволяет заключить, что если отбор на устойчивость к филяриозам действовал на locus *ADH*, то именно функциональный полиморфизм *ADH1B\* Arg48His* был его мишенью. Для проверки этой гипотезы необходимо сравнить частоты данного аллеля в группе больных филяриозами и группе индивидов, проживающих в том же регионе, но не инфицированных на протяжении длительного времени. Если аллель обладает протективным эффектом, то частота его у здоровых людей будет выше, чем у больных. Возможна проверка предложенной гипотезы на животных моделях филяриозов (например на крысах) с применением ингибиторов АльДГ (например дисульфурама), так как блокирование работы АльДГ приведет к тому же фенотипическому эффекту, что и ускорение работы АДГ. В мире инфицировано филяриями более 120 млн человек (Taylor *et al.*, 2010), и выявление молекулярных основ природной устойчивости к инфекциям может открыть новые пути лечения и профилактики.



**Рис. 6.** Распределение частот аллеля *ADH1B\*48His* в популяциях в зависимости от наличия филяриозов в регионе их проживания.



**Рис. 7.** Коэффициенты корреляции частот аллелей локуса ADH с наличием филяриозов в регионе проживания.

Для сравнения приведены аналогичные коэффициенты для малярии. Источник данных для частот аллелей – база ALFRED.

### ИССЛЕДОВАНИЯ КОРРЕЛЯЦИЙ ЧАСТОТ АЛЛЕЛЕЙ В ПОПУЛЯЦИЯХ С УСЛОВИЯМИ СРЕДЫ

Сопоставление частот аллелей из генетических баз данных с кодированными описаниями среды из «Этнографического атласа» Мердока было предложено нами в 2002 г. (Borinskaya, 2002, 2003; Borinskaya, Korotaev, 2002; Yankovsky *et al.*, 2002; Боринская, Коротаев, 2003). Реализация такого подхода применена

в масштабах полногеномного анализа в исследованиях группы Анны ди Риенцо (Hancock *et al.*, 2010a, b). Эти исследования были основаны на предсказаниях модели отбора количественных признаков в том отношении, что такой отбор будет приводить к небольшим сдвигам в частоте аллелей по многим локусам до тех пор, пока популяция не достигнет своего оптимума частот аллелей по отношению к давлению данного фактора отбора. Примененный подход позволил выявить SNP, которые демонстрируют согласо-

ванные сдвиги частот аллелей в популяциях в соответствии с условиями среды их обитания. Внутригенные (особенно несинонимичные) SNP, а также SNP в регуляторных участках генов оказались избыточно представлены в подвыборке аллелей, проявляющих корреляцию с определенными условиями среды обитания популяции.

Наиболее четкие сигналы выявлены при адаптации к особенностям питания и климатическим условиям. Так, в популяциях, где основными продуктами питания являются корни и клубни, выявлены сигналы адаптации в генах, вовлеченных в метаболизм крахмала и сахарозы. Еще одна группа аллелей, адаптированных к диете, выявлена в популяциях, основой питания которых являются зерновые. Среди этих аллелей выявлены и те, которые имеют отношение к диабету второго типа. Выявлены аллели адаптации к холоду, влияющие на терморегуляцию организма человека (Hancock *et al.*, 2010a, b).

Аналогичный подход использован в широкомасштабном исследовании генов, вовлеченных в адаптацию к эндемичным инфекциям (Fumagalli *et al.*, 2011). Авторы использовали интегрированный индекс нагрузки патогенами, но не анализировали отдельные инфекции. При сопоставлении локальных адаптаций к особенностям питания, климату и нагрузке патогенами выяснилось, что именно патогены являются наиболее сильными факторами адаптации. Сигналы адаптации, ассоциированные с нагрузкой патогенами, выявлены в более чем 100 генах. Эта фракция генов обогащена генами, ассоциированными с аутоиммунными заболеваниями, такими как целиакия, диабет типа 1, рассеянный склероз. На основе этого авторы предполагают, что распространенность в популяциях человека аллелей предрасположенности к аутоиммунным заболеваниям может быть следствием отбора на устойчивость к инфекциям в прошлом (Fumagalli *et al.*, 2011).

Вклад конкретных генетических факторов в адаптацию к условиям среды зависит от числа генов, которые влияют на формирование селективируемого признака, степени вклада конкретного аллеля в адаптивность, а также от интенсивности и длительности действия фактора отбора. В популяциях человека частоты аллелей многих генов, важных для здоровья, на-

ходятся в движении под воздействием факторов среды, значительная часть которых возникла в результате развития производящего хозяйства и преобразования природной среды.

Пока в поиске причин заболеваний человека доминирует молекулярно-генетический подход. Популяционно-генетический подход в сочетании с биоинформатическим анализом, использованием медицинских и этнографических электронных баз данных, разработкой новых статистических подходов к выявлению сигналов адаптации станет очень важным дополнением для понимания генетических и средовых факторов, влияющих на здоровье человека. Эти подходы позволяют выявить функциональные SNP, вовлеченные в адаптацию к условиям среды, даже для тех генов и иных участков генома, функции которых не известны. Эти подходы могут быть усилены анализом генных сетей, различные звенья которых могут влиять на один и тот же фенотипический признак, методы анализа которых разработаны при исследовании заболеваний (см. например, Подколотная и др., 2010).

Генетика помогает подтвердить или опровергнуть гипотезы, сформулированные в пределах других наук, или выдвинуть новые гипотезы для их проверки этими науками. Поэтому генетика начинает выступать как «мост» между науками.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития», подпрограммы «Динамика и сохранение генофондов» и проекта РФФИ 13-04-02095.

## ЛИТЕРАТУРА

- Боринская С.А., Коротаев А.В. Количественный подход к изучению ген-культурных взаимодействий // Антропология на пороге III тысячелетия. М.: Старый Сад, 2003. Т. 1. С. 503–517.
- Гончарова И.А., Фрейдин М.Б., Рудко А.А. и др. Геномные основы подверженности к инфекционным заболеваниям // Информ. вестн. ВОГиС. 2006. Т. 10. № 3. С. 540–552.
- Подколотная О.А., Яркова Е.Э., Деменков П.С. и др. Использование компьютерной системы ANDCell



- для реконструкции и анализа ассоциативных сетей потенциальных механизмов взаимосвязи миопии и глаукомы // *Информ. вестн. ВОГиС*. 2010. Т. 14. № 1. С. 106–115.
- Allison A.C. The distribution of the sickle-cell trait in East Africa and elsewhere, and its apparent relationship to the incidence of subtertian malaria // *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1954. V. 48. No. 4. P. 312–318.
- Bersaglieri T., Sabeti P.C., Patterson N. *et al.* Genetic signatures of strong recent positive selection at the lactase gene // *Am. J. Hum. Genet.* 2004. V. 74. No. 6. P. 1111–1120.
- Borinskaya S., Korotaev A. Correlations between Genetic and Cultural Traits in Populations of Humans *Bioinformatics of Genome Regulation and Structure* / Ed. N.A. Kolchanov *et al.* Novosibirsk: BGRS, 2002. V. 4.
- Borinskaya S. Dopamine receptor gene allele and sociocultural characteristics: cross-cultural test // *Abstr. of 31st Annual Meeting Society for Cross-Cultural Research*. Santa Fe, 2002.
- Borinskaya S. Gene-culture relationships: cross-cultural tests of population genetic traits // *32nd Annual Meeting of Soc. for Cross-Cultural Research*. Charleston, SC, USA. Feb 19–24 2003. P. 13.
- Borinskaya S., Kal'ina N., Marusin A. *et al.* Distribution of alcohol dehydrogenase ADH1B\*48His allele in Eurasia // *Am. J. Hum. Genet.* 2009. V. 84. No. 1. P. 89–92.
- Carson P.E., Flanagan C.L., Ickes C.E., Alving A.S. Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes // *Science*. 1956. V. 124. P. 484–485.
- Cavalli-Sforza L.L., Menozzi P., Piazza A. *History and Geography of Human Genes*, Princeton. N.J.: Princeton Univ. Press, 1994.
- Coop G., Pickrell J.K., Novembre J. *et al.* The role of geography in human adaptation // *PLoS Genet.* 2009. V. 5. No. 6. e1000500.
- Coop G., Witonsky D., Di Rienzo A., Pritchard J.K. Using environmental correlations to identify loci underlying local adaptation // *Genetics*. 2010. V. 185. P. 1411–1423.
- Crabb D.W., Edenberg H.J., Bosron W.F., Li T.K. Genotypes for aldehyde dehydrogenase deficiency and alcohol sensitivity. The inactive ALDH2(2) allele is dominant // *J. Clin. Invest.* 1989. V. 83. P. 314–316.
- Excoffier L., Ray N. Surfing during population expansions promotes genetic revolutions and structuration // *Trends Ecol. Evol.* 2008. V. 23. No. 7. P. 347–351.
- Fumagalli M., Sironi M., Pozzoli U. *et al.* Signatures of environmental genetic adaptation pinpoint pathogens as the main selective pressure through human evolution // *PLoS Genet.* 2011. V. 7. No. 11. e1002355.
- Gillespie J. *The causes of molecular evolution*. N.Y., 1991.
- Guglielmino C.R., Viganotti C., Hewlett B., Cavalli-Sforza L.L. Cultural variation in Africa: role of mechanisms of transmission and adaptation // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1995. V. 92. No. 16. P. 7585–7589.
- Haldane J.B.S. Disease and evolution // *Ricercha. Sci.* 1949. V. 19. (Suppl.). P. 68–76.
- Hancock A.M., Alkorta-Aranburu G., Witonsky D.B., Di Rienzo A. Adaptations to new environments in humans: the role of subtle allele frequency shifts // *Philos. Trans. Roy. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2010a.
- Hancock A.M., Witonsky D.B., Alkorta-Aranburu G. *et al.* Adaptations to climate-mediated selective pressures in humans // *PLoS Genet.* 2011. V. 7. No. 4. e1001375.
- Hancock A.M., Witonsky D.B., Ehler E. *et al.* Colloquium paper: human adaptations to diet, subsistence, and ecoregion are due to subtle shifts in allele frequency // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2010b.
- Hancock A.M., Witonsky D.B., Gordon A.S. *et al.* Adaptations to climate in candidate genes for common metabolic disorders // *PLoS Genetics*. 2008. V. 4. No. 2. P. 32.
- Ikuta T., Szeto S., Yoshida A. Three human alcohol dehydrogenase subunits: cDNA structure and molecular and evolutionary divergence // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1986. V. 83. P. 634–638.
- Jornvall H., Hempel J., Vallee B.L. *et al.* Human liver alcohol dehydrogenase: amino acid substitution in the beta-2 beta-2 Oriental isozyme explains functional properties, establishes an active site structure, and parallels mutational exchanges in the yeast enzyme // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1984. V. 81. P. 3024–3028.
- Kim D.J., Choi I.G., Park B.L. *et al.* Major genetic components underlying alcoholism in Korean population // *Hum. Mol. Genet.* 2008. V. 17. P. 854–858.
- Kong A., Frigge M.L., Masson G. *et al.* Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk // *Nature*. 2012. V. 488. No. 7412. P. 471–475.
- Korotayev A., Kazankov A., Borinskaya S. *et al.* *Ethnographic Atlas XXX: peoples of Siberia* // *Ethnology*. 2004. V. 43. No. 1. P. 83–92.
- Li H., Borinskaya S., Yoshimura K. *et al.* Refined geographic distribution of the oriental ALDH2\*504Lys (nee 487Lys) variant // *Ann. Hum. Genet.* 2009. V. 73. No. 3. P. 335–345.
- Liberles D. SNPing variation from genomes (Meeting report) // *Genome Biol.* 2001. V. 3. No. 1. 4001. 1–3.
- Matsuo Y., Yokoyama R., Yokoyama S. The genes for human alcohol dehydrogenases beta-1 and beta-2 differ by only one nucleotide // *Europ. J. Biochem.* 1989. V. 183. P. 317–320.
- Murdock G.P. *Ethnographic Atlas: A Summary*. Pittsburgh: The Univ. of Pittsburgh Press, 1967.
- Neel J.V. The thrifty genotype in 1998 // *Nutr. Rev.* 1999. V. 57. P. S2–S7.
- Oota H., Dunn C.W., Speed W.C. *et al.* Conservative evolution in duplicated genes of the primate Class I ADH cluster // *Gene*. 2007. V. 1. No. 5. P. 64–76.
- Oota H., Pakstis A.J., Bonne-Tamir B. *et al.* The evolution and population genetics of the ALDH2 locus: random genetic drift, selection, and low levels of recombination // *Ann. Hum. Genet.* 2004. V. 68. P. 93–109.
- Osier M., Pakstis A.J., Kidd J.R. *et al.* Linkage disequilibrium at the ADH2 and ADH3 loci and risk of alcoholism // *Am. J. Hum. Genet.* 1999. V. 64. P. 1147–1157.
- Rodenwaldt E., Bader R.E. *World-atlas of epidemic diseases*. Hamburg, Germany: Falk-Verlag, 1952–1961.
- Roth E.F., Raventos-Suarez C., Rinaldi A., Nagel R. L. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency inhibits in vitro growth of *Plasmodium falciparum* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1983. V. 80. P. 298–299.
- Ruwando C., Khea S.C., Snow R.W. *et al.* Natural selection

- of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria // *Nature*. 1995. V. 376. P. 246–249.
- Sabeti P., Schaffner S., Fry B. *et al.* Positive natural selection in the human lineage // *Science*. 2006. V. 312. P. 1614–1620.
- Simmons J.S., Whayne T.F., Anderson G.W. Horack H.M. *Global epidemiology*. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1944.
- Slatkin M., Excoffier L. Serial founder effects during range expansion: a spatial analog of genetic drift // *Genetics*. 2012. V. 191. No. 1. P. 171–181.
- Taylor M.J., Hoerauf A., Bockarie M. Lymphatic filariasis and onchocerciasis // *Lancet*. 2010. V. 376. No. 9747. P. 1175–1185.
- Thornhill R., Fincher C.L., Murray D.R., Schaller M. Zoonotic and non-zoonotic diseases in relation to human personality and societal values: support for the parasite-stress model // *Evol. Psychol.* 2010. V. 8. No. 2. P. 151–169.
- Tolstrup J.S., Nordestgaard B.G., Rasmussen S. *et al.* Alcoholism and alcohol drinking habits predicted from alcohol dehydrogenase genes // *Pharmacogenomics J.* 2008. V. 8. P. 220–227.
- Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W. *et al.* The sequence of the human genome // *Science*. 2001. V. 291. No. 5507. P. 1304–1351.
- Venter J.C. Genome-sequencing anniversary. The human genome at 10: successes and challenges // *Science*. 2011. V. 331. No. 6017. P. 546–547.
- Venter J.C. Multiple personal genomes await // *Nature*. 2010. V. 464. No. 7289. P. 676–677.
- Wall T.L., Horn S.M., Johnson M.L. *et al.* Hangover symptoms in Asian Americans with variations in the aldehyde dehydrogenase (ALDH2) gene // *J. Stud. Alcohol*. 2000. V. 61. P. 13–17.
- Yankovsky N., Borinskaya S., Rogaev E., Korotaev A. *et al.* Change of population genetic traits under different natural and cultural environment: new dimension in understanding of human diseases // *Abstr. of Human Origin and Disease Meeting*. Cold Spring Harbor, 2002.

УДК 575.174:599.9

## ЭТНОГЕНОМИКА

© 2013 г. Э.К. Хуснутдинова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия, e-mail: elzakh@mail.ru; ФГБОУ ВПО Башкирский государственный университет, Уфа, Россия

Поступила в редакцию 26 апреля 2013 г. Принята к публикации 1 ноября 2013 г.

### ВВЕДЕНИЕ

Этногеномика – это раздел популяционной генетики, изучающий особенности геномного полиморфизма и геномного разнообразия отдельных популяций, этносов и реконструкция на этой основе их генетической истории.

Эволюция популяций человека, их происхождение, родство, историческое развитие всегда были в центре внимания многих наук. Для решения этих проблем необходимо исследовать множество полиморфных признаков в большом числе популяций и этно-территориальных групп. В качестве таких признаков в распоряжении исследователей в течение долгого времени находились полиморфные белки, которые использовались как генетические маркеры в популяционных исследованиях. С помощью таких маркеров получено довольно много интересных сведений о популяциях различных регионов мира. Подлинный переворот в популяционных исследованиях произошел при появлении нового инструмента в виде полиморфных маркеров ДНК.

Огромное множество полиморфных ДНК-маркеров, выявленных при расшифровке генома человека, стало мощным инструментом для описания на новом уровне генетических особенностей народов; восстановления истории их формирования, а также становления человека как биологического вида в целом. На основе развития этих исследований в рамках геномики возник новый раздел науки – этногеномика. Геном человека, состоящий примерно из 3 млрд нуклеотидных пар, расшифрован почти полностью. Однако завершение гигантского по

замыслу и грандиозного по реализации международного научного проекта по расшифровке структуры генома человека отнюдь не означает, что процесс познания генома завершен. Скорее, это только начало. Уже сейчас очевидно, что не существует какого-то «усредненного» генома человека: каждый геном, как и каждый человек, сугубо индивидуален. Эта индивидуальность генома проявляется на уровне не только отдельной личности, но и этнических групп, отдельных сообществ и рас. Различия между двумя людьми на уровне ДНК составляют в среднем 1 нуклеотид на 1000. Именно эти различия обуславливают наследственные индивидуальные особенности каждого человека. Заметим, что различия между ДНК человека и шимпанзе – его ближайшего сородича в животном мире – на порядок больше.

### ОСНОВНЫЕ СИСТЕМЫ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ЭВОЛЮЦИОННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В исследованиях по эволюции популяций человека используются различные системы генетических маркеров, отличающиеся локализацией в геноме, уровнем варибельности и характером мутирования.

Преимущества изучения генетического полиморфизма на уровне ДНК по сравнению с белковым уровнем колоссальны. Наиболее важным преимуществом ДНК является наличие в ней полиморфизма разного типа, каждый из которых имеет свои особенности. Это однонуклеотидные замены (SNPs), инсерционно-

**Этнос** – исторически сложившаяся общность людей с общими культурой, языком и самосознанием.

**Генетический дрейф** – изменение частот гена в популяции в результате случайных колебаний в выборке гамет, образующих следующее поколение популяции.

**Эффект основателя** – один из видов генетического дрейфа, обусловленный возникновением новой популяции от относительно небольшого числа основателей, из-за чего генетическая изменчивость в новой популяции оказывается суженной.

**Эффект «горлышка бутылки»** – сокращение генетического разнообразия популяции вследствие прохождения периода, во время которого по различным причинам происходит критическое уменьшение ее численности, в дальнейшем восстановленное. Сокращение генетического разнообразия приводит к изменению относительных и абсолютных частот аллелей генов.

**Гаплотип** – совокупность аллелей на локусах одной хромосомы, обычно наследуемых вместе.

**Гаплогруппа** – группа схожих гаплотипов, имеющих общего предка, у которого в обоих гаплотипах имела место одна и та же мутация – однонуклеотидный полиморфизм.

**Время коалесценции/дивергенции** – время существования наиболее близкого общего предка для группы последовательностей.

**Alu-повторы** – семейство коротких повторяющихся элементов с числом копий порядка 500 тыс. на гаплоидный геном.

**Микросателлиты** – фрагменты ДНК с большим количеством tandemно повторяющихся «мотивов», или «повторов» – коротких последовательностей из нескольких пар нуклеотидов.

делеционный полиморфизм, мини- и микросателлиты (short tandem repeats, STR). Спектр селективных свойств ДНК-маркеров намного шире, чем классических маркеров белкового полиморфизма: он варьирует от истинно селективно нейтральных генов до генов, подверженных самому мощному отбору, как стабилизирующему, так и дифференцирующему. Кроме того, по ДНК-маркерам можно исследовать гаплотипы – сочетания аллелей тесно сцепленных полиморфных локусов. Такие хромосомные участ-

ки весьма невелики, поэтому обнаруживают очень малую степень рекомбинаций и ведут себя как единые блоки, мало меняющиеся во времени и поэтому имеющие довольно древнее происхождение. Таким образом, размер сохранившегося неизменным гаплотипа может служить мерой времени, которое прошло от какого-то момента в прошлом. В общем случае суть метода состоит в поиске неравновесного сцепления между собой локусов вследствие эффекта основателя. Анализ частоты и возраста появления в популяции хромосомы-основателя позволяет проследить ее историю, а вместе с ней и популяционные события, сопутствующие ее распространению. Очевидно, что подобные данные представляют несомненный интерес и огромную научную значимость для изучения истории современных народов, характеристики генофондов и оценки основных направлений эволюции всего человечества.

Для исследований геномов людей используют разные системы ДНК-маркеров: маркеры, расположенные на парных хромосомах (аутосомные), на митохондриальной ДНК и непарной Y-хромосоме.

Изучение **аутосомных маркеров**, которые наследуются по обеим (женской и мужской) линиям и в которых представлена подавляющая часть генома человека, чрезвычайно важно, ибо это дает исследователям маркеры для изучения сочетанной изменчивости, одновременно привносимой и с отцовской, и с материнской сторон. Данные маркеры ДНК характеризуют сообщества в целом, не выделяя генетического вклада каждого из полов. Использование определенных типов полиморфизма ДНК позволяет оценить те или иные временные события, происходившие в истории данной популяции. В настоящее время для изучения генофонда и генетической истории популяций человека наиболее широко применяют однонуклеотидные замены (SNPs), микросателлиты (STR) и Alu-повторы.

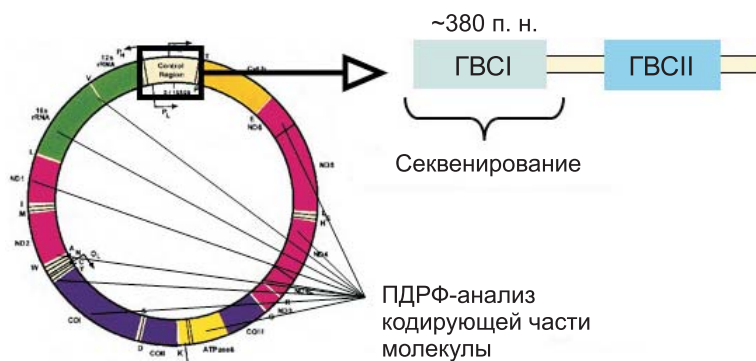
Особую роль играют маркеры митохондриальной ДНК (мтДНК) и ДНК Y-хромосомы, поскольку они позволяют проследить генетическую историю человечества отдельно по женской и мужской линиям. Это дает новые, несуществовавшие раньше возможности в этногенетических исследованиях: проследить

и сопоставить историю женской и мужской части популяции и оценить их вклад в популяционный генофонд. Передаваясь из поколения в поколение только по одной из родительских линий и не участвуя в рекомбинации, данные маркеры позволяют, по крайней мере теоретически, реконструировать генетические события от наиболее популярных предков современного человека – «Y-хромосомного Адама» и «митохондриальной Евы» до современных популяций. Полиморфизм этих маркеров определяется факторами микроэволюции (миграция, отбор, мутации), однако характер их варибельности по-разному отражает действие и результат этих процессов.

**Митохондриальная ДНК (мтДНК)** представляет собой небольшую молекулу кольцевой формы размером 16569 п.н., содержащуюся в митохондриях эукариотических клеток (рис. 1). Число копий мтДНК в соматической клетке достигает 10 тыс. Митохондриальная ДНК построена по принципу максимальной экономии: она практически лишена интронов, а кодирующие последовательности почти соприкасаются или даже слабо перекрываются. МтДНК характеризуется рядом особенностей в сравнении с ядерной: материнским характером наследования, отсутствием рекомбинации (обмен участками гомологичных хромосом в процессе мейоза) и относительно высокой скоростью накопления мутаций. В митохондриальном геноме мутации возникают в десятки раз быстрее, чем в ядерном. Наиболее варибельной частью митохондриального генома человека является главная некодирующая область или контрольный регион, имеющий протяженность 1122 п.н., в котором расположены гиперварибельные сегменты I (ГВС1) и

2 (ГВС2) мтДНК. По сравнению с аутосомными локусами мтДНК имеет в 4 раза меньшую эффективную численность в популяции, что определяет большую подверженность случайным флуктуациям и воздействию генетического дрейфа. Соответственно, мтДНК позволяет уловить эффекты основателя или «бутылочного горлышка» в популяции, неразличимые на уровне аутосомных локусов. Передача мтДНК по материнской линии без рекомбинации (от матери ко всем ее потомкам и далее – только дочерью) определяет то, что мутации, возникшие в мтДНК однажды, сохраняются и передаются неизменными в ряду поколений как единый locus, представленный множеством аллелей – гаплотипов. Определенные группы гаплотипов соответствуют определенным группам сцепления между конкретными мутациями (т. е. гаплогруппам).

Изучение изменчивости митохондриального генома в настоящее время проводится с использованием комбинированного подхода – выявления однонуклеотидных замен мтДНК классическим методом анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов ДНК (ПДРФ) в сочетании с изучением нуклеотидной последовательности ГВС1 и ГВС2 главной некодирующей области мтДНК. Такой подход выявил важную особенность мтДНК, имеющую значение для изучения молекулярной эволюции. В частности, установлено, что определенным группам рестрикционных типов мтДНК, ключевые мутации которых расположены в различных участках молекулы, соответствуют вполне определенные типы нуклеотидных последовательностей гиперварибельного участка мтДНК. Эта особенность молекул мтДНК имеет важное значение для изучения молекулярной



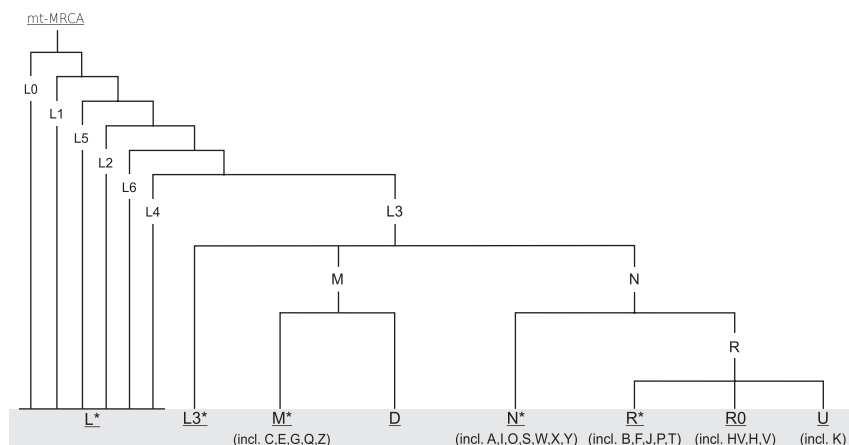
**Рис. 1.** Карта мтДНК человека (<http://www.mitomap.org>).

эволюции, поскольку разнообразие митохондриального генофонда хранит в себе множество их комбинаций, по которым можно проследить изменения молекул мтДНК во времени и классифицировать молекулярные изменения в приложении к эволюции популяций. Последовательное накопление мутаций позволяет отслеживать историю индивидов к так называемой точке коалесценции, т. е. некоему общему предку. Зная скорость мутирования, можно рассчитать время коалесценции – время, когда у индивидов был общий предок. По спектру гаплотипов мтДНК в популяции можно проследить эволюционные взаимосвязи между древними и вновь возникающими гаплотипами и более того, реконструировать генетическую историю женского генофонда популяции. В отличие от локусов ядерной ДНК, где эволюционные изменения прослеживаются главным образом по вариабельности частот различных аллелей в популяциях, митохондриальная ДНК дает возможность восстановить действительную филогению, т. е. последовательность возникновения носителей различных мт-гаплотипов в эволюционном ряду. Филогенетические взаимосвязи между гаплотипами изображаются в виде дерева, имеющего корень, ствол, более древние большие ветви и мелкие веточки, возникшие в относительно недавнем прошлом. Корень гаплотипов мтДНК человека был выявлен исходя из сравнения с последовательностью мтДНК шимпанзе. Для большего удобства отсчет ведется не от предполагаемой предковой популяции, а от последовательности митохондриального генома человека, так называемой кембриджской референсной последовательности (rCRS – Cambridge reference sequence). Дальнейшее построение сети зависит от числа гаплотипов. Реконструкция эволюционного древа с учетом времени коалесценции линий и в совокупности с географическими, палеонтологическими и археологическими данными составляет основу филогеографического подхода, который в последнее время получил широкое распространение в исследованиях происхождения человека, рас и отдельных этносов.

Основы универсальной номенклатуры мтДНК были заложены в 1993 г. в работах А. Торрони с соавторами, посвященных изучению происхождения коренного населения

Америки. Тогда же было предложено использовать буквенную номенклатуру для построения филогенетических деревьев. Сегодня буквенная номенклатура, основанная на использовании как ПДРФ-анализа, так и прямого поиска мутаций в ГВС1 и ГВС2 путем секвенирования, является общепринятой и широко используется генетиками. Мутации, определяющие гаплогруппы, обозначаются буквенным и цифровым индексами. При этом основные ветви с обнаружением новых мутаций в митохондриальном геноме разделяются на более мелкие, что позволяет выявлять специфические особенности популяций человека в тех или иных регионах мира, отличающие их друг от друга по женской линии. Субклады, располагающиеся внутри мажорных гаплогрупп, обозначаются цифрами. Надежность классификации зависит от количества имеющейся информации об изменчивости мтДНК, и, естественно, в идеале необходима информация о нуклеотидных последовательностях целых митохондриальных геномов, относящихся к разным филогенетическим группам. Накопленные к настоящему времени данные в области популяционной митохондриальной геномики (секвенировано уже около 17 тыс. митохондриальных геномов) позволили существенно улучшить представления о топологии филогенетического дерева мтДНК человека и детализировать классификацию мтДНК с учетом данных о региональных особенностях эволюции митохондриального генома. К настоящему времени разработана детальная классификация гаплогрупп мтДНК (van Oven, Kayser, 2009) (рис. 2).

Согласно современным данным, филогенетическое дерево мтДНК человека представлено двумя крупными дочерними ветвями – L0 и L1'2'3'4'5'6 (L1'5). L1'5 распространена более широко, в нее входят почти все обнаруженные линии мтДНК. Все разнообразие неафриканских гаплогрупп, за исключением тех, что были привнесены миграциями в течение последних нескольких тысяч лет, в том числе с интенсивной работоторговлей, сводится к вариациям внутри базальной гаплогруппы L3, разделившейся впоследствии на две ветви: гаплогруппы M и N. От последней в свою очередь почти сразу же отделилась гаплогруппа R. Эти события произошли, предположительно, около 60000–65000 лет



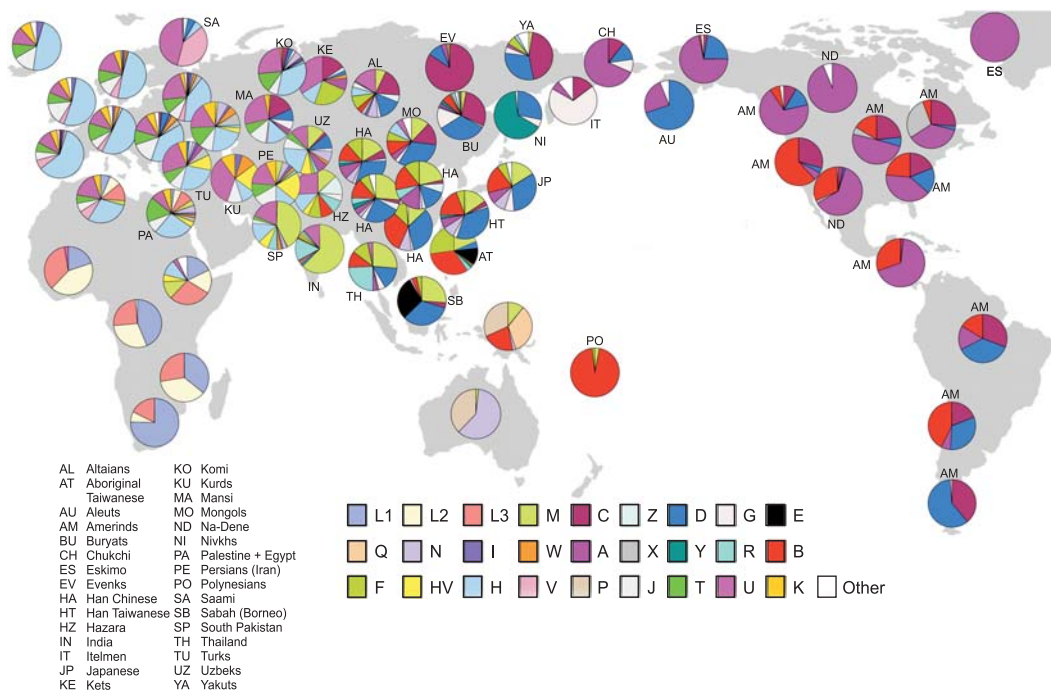
**Рис. 2.** Филогенетическое дерево мтДНК человека.

Показан порядок появления гаплогрупп мтДНК в процессе эволюции (приведено согласно (<http://www.phylotree.org>) с модификацией).

назад в районе между Восточной Африкой и Персидским заливом. Важно отметить, что в распределении гаплогрупп мтДНК наблюдается выраженная региональная специфичность (рис. 3). Ветви R0, U и JT, а также минорные ветви гаплогруппы N (N1, N2 и X) объясняют большую часть разнообразия мтДНК в Европе, в то время как в восточно-евразийский пул мтДНК-гаплогруппа N и специфичная для

Азии макрогаплогруппа M приносят примерно одинаковый вклад. Данная классификация постоянно обновляется, что позволяет рассматривать различия между популяциями с высокой степенью филогенетического разрешения.

**Y-хромосома** – самая маленькая в геноме человека – имеет размер около 60 млн п.н., половина приходится на эухроматиновые домены, а другая – на гетерохроматиновый блок,



**Рис. 3.** Карта распространения гаплогрупп мтДНК в популяциях мира (<http://www.scs.illinois.edu/~mcdonald/WorldHaplogroupsMaps.pdf>).

который может сильно варьировать по размеру у разных индивидов. Уникальным отличием Y-хромосомы является то, что она определяет пол, специфична для мужчин и передается от отца к сыновьям без рекомбинации большей ее части. Нерекombинирующая часть Y-хромосомы (NRY) не подвергается обмену участками с X-хромосомой в процессе мейоза и составляет 95 % от общей длины. Мутации, возникшие в Y-хромосоме, сохраняются и передаются единым блоком в интактном виде от поколения к поколению. Нерекombинирующая часть и последовательность накопления в ней мутаций поддаются расшифровке, подобно записи исторических событий на древнем пергаменте, описывающей происхождение и эволюцию отцовских линий. В отличие от мтДНК Y-хромосома имеет гораздо большие размеры, потенциально является более полиморфной и, как следствие, более информативной системой. Генетические маркеры в нерекombинирующей части Y-хромосомы можно разделить на две основные категории – диаллельные и мультиаллельные, которые различаются по темпам эволюции и уровню генетического разнообразия и позволяют выявить дифференциацию популяций и филогеографию линий Y-хромосомы на различных уровнях иерархии. К первой категории относятся SNP (точечные мутации, замены оснований) и более редкие инсерции и делеции. Темп мутирования таких локусов низок:  $5 \times 10^{-7}$  на сайт на поколение. Диаллельные маркеры используются для выделения гаплогрупп. Вторая категория маркеров – мультиаллельные полиморфизмы – включает микросателлиты, или короткие tandemные повторы (STR), эволюционирующие на несколько порядков быстрее. Темп их мутирования гораздо выше: для Y-сцепленных STR он составляет примерно  $2 \times 10^{-3}$  на locus на поколение. Сейчас на Y-хромосоме описано несколько десятков микросателлитов. Мультиаллельные маркеры удобно использовать для анализа разнообразия гаплотипов внутри гаплогрупп и для более детальной реконструкции филогении и происхождения линий.

Помимо вышеперечисленных особенностей еще одной является то, что численность Y-хромосом в популяции по сравнению с аутосомами составляет 1 : 4 и по сравнению с X-хромосомами – 1 : 3. Поэтому Y-хромосомы так же, как

и мтДНК, более подвержены эффекту генетического дрейфа, сильно меняющего частоты различных гаплотипов в популяциях с малой эффективной численностью. Как следствие, степень генетической подразделенности популяций по Y-хромосоме намного выше, чем по аутосомным локусам.

На географическое распределение вариантов Y-хромосомы помимо генетических факторов (дрейф генов, эффект основателя в популяциях) сильное влияние оказывают демографические и социальные факторы. Примерно 70 % современных обществ характеризуются патрилокальностью. Это означает, что мужчины живут ближе к месту их рождения, чем женщины: при заключении брака, как правило, женщина переезжает на местожителство мужа, а не наоборот. Со временем этот фактор увеличивает различия в распределении вариантов Y-хромосом и может приводить к градиентному распределению линий в стабильных популяциях большого размера. Следствием патрилокальности объяснялись данные распределения типов Y-хромосомы в Европе и на островах Юго-Восточной Азии. Влияние социальных факторов может иметь прямо противоположный эффект. Например, поток генов при экспансии европейцев на территорию Америки или Океании за последние 500 лет происходил в основном за счет мужчин и сильно повлиял на спектр вариантов Y-хромосомы, но не мтДНК в популяциях Полинезии, Гренландии и Южной Америки.

В 2002 г. Консорциумом по Y-хромосоме была предложена единая классификация на основе диаллельных маркеров. Дерево, предложенное Консорциумом, включало 237 полиморфных сайтов. Всего, включая обратные мутации в различных ветвях дерева, для определения 153 гаплогрупп было использовано 245 мутационных событий. Определение корня дерева было произведено исходя из сравнения NRY человека с гомологичными последовательностями близкородственных видов: шимпанзе, гориллы, орангутанга. Для удобства номенклатура была представлена с помощью прописных латинских букв, обозначающих базальные ветви, начиная с буквы А, приданной ветви, наиболее близко находящейся к корню, и далее по алфавиту до буквы R. Буквой Y была обозначена наиболее крупная ветвь, включающая все гаплогруппы



от А до R. Порядок букв отражает последовательность возникновения мутаций. Эти клады в свою очередь разветвляются на гаплогруппы, которые нумеруются цифрами и буквами. Следует заметить, что использованные до сих пор термины – «клады», «ветви», «линии», «базальные линии», «субклады» и т. д. – применимы ко всем ветвям древа, зачастую относящимся к различным иерархическим уровням. Субклады, располагающиеся внутри мажорных гаплогрупп, обозначаются цифрами, а в более мелких ветвях к цифре прибавляется строчная латинская буква. Так, внутри гаплогруппы R можно выделить субклады R1 и R2, а внутри R1 – R1a. Для дальнейшего обозначения применяется чередование цифр и строчных букв, например: R1b1b1. Консорциумом по Y-хромосоме была принята терминология, по которой термин «гаплогруппа» означает линии NRY, определенные на основе диаллельных маркеров, а «гаплотип» подразумевает линии

гаплогрупп, выявленные различными вариациями микросателлитных локусов NRY. Мутации, определяющие диаллельные гаплогруппы, обозначаются буквенным и цифровым индексом. В 2003 г. принятая Консорциумом классификация была немного модифицирована, а в 2008 г. подверглась существенной переработке. При этом, однако, принципы классификации и основная номенклатура остались неизменными. Недавно опубликованное Т. Карафет (Karafet *et al.*, 2008) филогенетическое древо Y-хромосомы человека содержит 20 основных макрокластеров, 311 гаплогрупп, определенных с использованием 600 диаллельных маркеров (рис. 4).

Полиморфизм Y-хромосомы изучен уже в нескольких сотнях популяций по всему миру, и результаты этих исследований свидетельствуют о том, что гаплогруппы Y-хромосомы имеют вполне определенное географическое распространение, причем точность географической характеристики той или иной гаплогруппы во

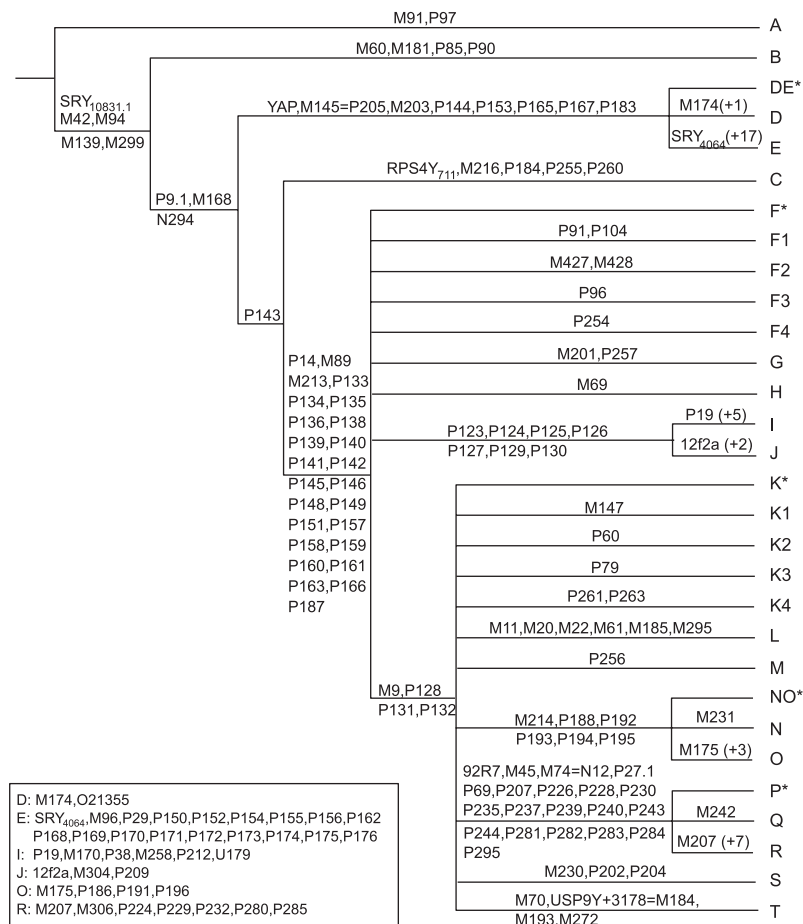


Рис. 4. Филогенетическое древо основных гаплогрупп Y-хромосомы (Karafet *et al.*, 2008. P. 830–838).

многим зависит от использования маркеров с определенной степенью филогенетического разрешения. Однако анализ одних только частот гаплогрупп Y-хромосомы имеет существенный недостаток: высокая частота гаплогруппы может быть не следствием ее происхождения на данной территории, а результатом иных событий в истории популяции (дрейф, эффект основателя, эффект «бутылочного горлышка»). В результате оценка распределения гаплогрупп только на основе их частот может привести к некорректным выводам. Ввиду этого целесообразно использовать комплексный анализ как однонуклеотидных замен в нерекombинирующей области Y-хромосомы, так и микросателлитных локусов (STR). Они обладают достаточно высокой степенью изменчивости для выявления места и времени происхождения определенной гаплогруппы. Ожидаемо, что в том регионе или в популяции, где возникла данная гаплогруппа, ее частота и микросателлитная изменчивость будут максимальны по сравнению с другими популяциями.

Изучение полиморфизма ДНК за последние годы приобрело широкий размах и проводится во многих странах мира. Эти исследования позволили выявить значительные внутри- и межпопуляционные различия в частотах полиморфных маркеров ДНК во многих географических районах мира, что стало одной из важнейших характеристик генетической структуры человеческих сообществ. За последнее десятилетие генетиками собраны и проанализированы коллекции мтДНК и Y-хромосом представителей народов почти всего мира. По ним восстановлены последовательность и время появления мутаций в ДНК человека. В достаточно полной мере на сегодняшний день классифицированы митохондриальные и Y-хромосомные гаплотипы у населения Западной и Восточной Евразии, Африки, Австралии и Америки. Накоплен большой массив данных об изменчивости мтДНК и Y-хромосомы в различных популяциях и этнических группах в глобальном масштабе. Установлено, что в распределении гаплогрупп Y-хромосомы также наблюдается выраженная региональная специфичность, что позволяет определять соотношения генетических компонентов различного происхождения в смешанных популяциях (рис. 5).

В России работы по этногеномике – одно из самых продуктивных генетических направлений, которое активно развивается в ряде научных центров. Разработками в области этногеномики и молекулярной филогеографии в России занимается целый ряд известных научных коллективов в Москве, Новосибирске, Томске, Магадане, Уфе и Якутске. Ими получены фундаментальные данные по изменчивости и эволюции мтДНК, Y-хромосомы и аутомсомных ДНК-локусов в популяциях Волго-Уральского региона, Кавказа, Центральной России, Сибири, Средней Азии. Кроме того, результаты исследований позволили охарактеризовать структуру генофонда популяций России, получить генетические портреты отдельных этносов, сопоставить генетические реконструкции с историческими данными о происхождении и миграции коренных народов России и получить однозначную генетическую оценку по некоторым спорным вопросам этногенеза (Хуснутдинова, 1999; Лимборская и др., 2002; Степанов, 2002; Балановская, Балановский, 2007; Федорова, 2008; Деренко, Малярчук, 2010; Хуснутдинова, Федорова, 2010; Кутуев, Хуснутдинова, 2011).

Таким образом, для глубокого понимания эволюции популяций человека, их происхождения и миграции, а также этногенеза различных народов необходимо использовать все три системы генетических маркеров: аутомсомные локусы, маркеры мтДНК и Y-хромосомы. Различные системы маркеров значительно дополняют друг друга, особенно в тех случаях, когда вследствие стохастических процессов в популяциях и/или особенностей их формирования та или иная система маркеров не может в достаточно полной мере ответить на поставленные вопросы.

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИСТОРИЯ ПОПУЛЯЦИЙ ЧЕЛОВЕКА

Первым значительным вкладом ДНК-маркеров в решение проблемы происхождения и расселения современного человека явились исследования Ребекки Канн, Марка Стоункинга и Алана Уилсона (Cann *et al.*, 1987) мтДНК представителей различных рас: африканцев, европейцев, азиатов, австралийцев и жителей Новой Гвинеи. По количеству замен нуклео-

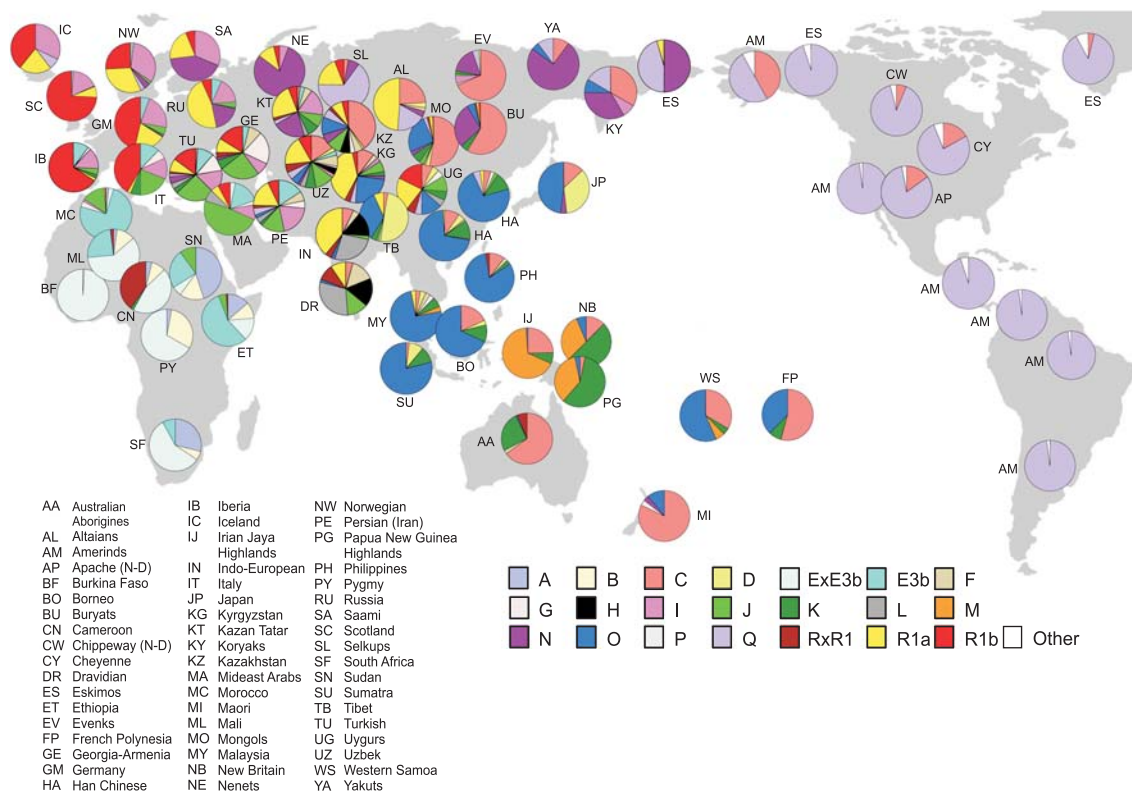


Рис. 5. Карта распространения гаплогрупп Y-хромосомы в популяциях мира (<http://www.scs.illinois.edu/~mcdonald/WorldHaplogroupsMaps.pdf>).

тидов в мтДНК определена степень родства различных групп людей и построено эволюционное дерево человечества (рис. 6). Самая ранняя точка ветвления на этом дереве отделяет от остальных людей группу африканцев, что указывает на африканское происхождение *Homo*

*sapiens*. Именно в Южной Африке у койсанов были найдены самые древние мутации и самое высокое разнообразие мтДНК. Митохондриальные ДНК у населения других континентов менее разнообразны, и сравнение их с мтДНК аборигенов Южной Африки показало, что они

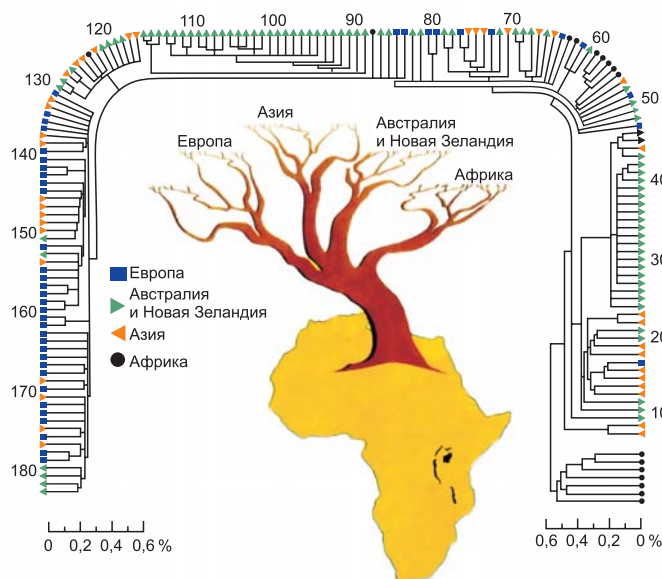


Рис. 6. Эволюционное дерево человечества, построенное по результатам исследований митохондриальной ДНК (Cann *et al.*, 1987. Р. 31–36).

возникли как мутационные изменения африканских типов после того, как человечество распространилось за пределы Африки.

Второй вывод Сана с соавт. касался времени коалесценции (схождения к общему предку) мтДНК. Учитывая даты отделения ветви шимпанзе (5–7 млн лет назад) и приняв темп мутационной дивергенции равным 2–4 % за 1 млн лет, они вычислили продолжительность существования последней предковой мтДНК, общей для всех ныне живущих людей, примерно 185 тыс. лет. Последующие работы с использованием разных методов (секвенирование контрольного региона мтДНК и анализ полногеномной изменчивости мтДНК) подтвердили африканские корни дерева мтДНК современного человечества, хотя и остаются еще отдельные спорные моменты. По независимым оценкам нескольких групп исследователей, «митохондриальная Ева» жила в период резкого сокращения численности наших предков (до 10 тыс.), вызванного, по-видимому, изменениями климата. Именно этот период считают временем появления *Homo sapiens* как биологического вида. Сравнительное исследование мтДНК разных популяций современных людей позволило выдвинуть предположение, что еще до выхода из Африки, около 60–70 тыс. лет назад, предковая популяция разделилась по крайней мере на 3 группы, давшие начало трем расам: африканской, монголоидной и европеоидной.

Чуть позже, чем работы по мтДНК, появились данные по генеалогическим деревьям Y-хромосомы. Изучение небольшого участка Y-хромосомы свидетельствует о, возможно, гораздо более позднем происхождении «Y-хромосомного Адама» (140–175 тыс. лет). Все исследования указывают на его африканское происхождение. Различия между оценками, базирующимися на мтДНК и Y-хромосоме, могут быть объяснены как несходством демографической истории популяций по мужской и женской линиям, различным поведением женщин и мужчин при переселениях, завоеваниях и колонизациях, так и различиями этих геномов, например, в интенсивности отбора вариантов мтДНК и Y-хромосомы.

Гипотезу африканского происхождения современного человека подтверждают и наибольший уровень наследственного разнообразия в

Африке по сравнению с другими континентами по большей части типов полиморфизма ДНК, а также малые различия между популяциями (на долю межпопуляционного разнообразия приходится 10–15 % геномной вариабельности, а большая ее часть (85–90 %) сосредоточена внутри популяций), что отражает недавнее происхождение биологического вида. Результаты исследования мтДНК костных останков неандертальцев (уже более 20 индивидуумов) также свидетельствуют в пользу гипотезы африканского происхождения человека и о том, что неандертальцы не являлись предками анатомически современного человека. **Однако результаты секвенирования ядерного генома неандертальцев показали, что 2–4 % генома всех представителей современного населения за пределами Африки имеет неандертальское происхождение. Это свидетельствует о вкладе неандертальцев в генофонд современных людей вследствие их предполагаемой гибридизации.** Кроме того, полученные данные свидетельствуют о том, что дивергенция между людьми и неандертальцами произошла примерно  $660 \pm 140$  тыс. лет назад.

В целом массив геномных данных наиболее соответствует гипотезе недавнего африканского происхождения современного человека и доказывает справедливость моноцентрической гипотезы. В то же время ни одна из групп генетических данных не является исчерпывающим и бесспорным доказательством этой гипотезы. Наряду с моноцентрической гипотезой существует и другая – полицентрическая, или гипотеза межрегиональной эволюции человека. Среди наиболее интересных результатов, полученных в последнее время в изучении формирования человека современного физического типа, выделяются материалы палеолитических стоянок российского Алтая. При изучении антропологических останков из Денисовой пещеры было сделано предположение о существовании ранее неизвестной группы древних людей (Krause *et al.*, 2010). Геном денисовского человека отклонился от генома человека на 11,7 %, а для неандертальца из пещеры Виндия (Хорватия) отклонение составило 12,2 %, т. е. среднее отклонение ядерного генома денисовца от современных людей такое же, как и неандертальцев. Анализ генома ископаемого человека из Дени-

совой пещеры показал его принадлежность к группе гоминидов, имеющей общего предка с неандертальцами, но разную историю развития популяции – их эволюционное расхождение произошло около 640 тыс. лет назад. Вместе с тем установлено, что отделение этой популяции от линии развития человека современного анатомического типа произошло в среднем около 800 тыс. лет назад. Новая популяция гоминидов – денисовцы, возможно, была широко распространена в восточной части Азии в период верхнего плейстоцена. Полученные результаты показывают, что на континенте Евразия в период верхнего плейстоцена вместе с человеком современного физического типа, возможно, существовали еще как минимум две формы гоминидов: форма Западной Евразии, которая обозначается как неандертальская, и восточная форма, к которой относятся денисовцы (Деревянко, 2011). Эти результаты требуют дальнейшего подтверждения.

Таким образом, результаты исследования полиморфизма аутосомных, митохондриальных и Y-хромосомных ДНК-маркеров в большей степени свидетельствуют в пользу гипотезы недавнего африканского происхождения современного человека и о том, что неандертальцы не являлись предками анатомически современного человека.

**Заселение Евразии по данным мтДНК.** Дальнейший путь расселения анатомически современного человека рассматривался в основном через призму двух гипотез. Согласно первой гипотезе, на основе исследования ископаемых останков предполагалось его проникновение из Северной Африки в Левант около 100 000 лет назад и дальнейшее расселение на Ближний Восток около 45 000 лет назад. Согласно второй, так называемой гипотезе «южного пути», первое расселение *Homo sapiens* из Африки шло через Эфиопию и Сомали на восток вдоль южного побережья Евразийского континента в Индию и далее – в Юго-Восточную Азию и Австралию. Предположение о двух, независимых друг от друга, путях противоречило наблюдаемому географическому распределению производных базальных гаплогрупп мтДНК M и N, а также наблюдаемому разнообразию гаплогрупп мтДНК в Центральной Азии, свидетельствовавшему о смешении

в данном регионе различных западно-евразийских, восточно-евразийских и юго-азиатских гаплогрупп, многообразие которых сводилось к гаплогруппам M, N и R. Изучение коренного населения Юго-Восточной Азии, в частности оранг-асли Малайзии, показало наличие в данных популяциях не встречающихся более нигде в мире «реликтовых» линий мтДНК, принадлежащих, тем не менее, к тем же трем основным гаплогруппам. Это привело исследователей к выводу о верности гипотезы «южного пути», причем скорость расселения анатомически современного человека по этому сценарию оказалась очень быстрой: расчеты, основанные на «традиционно используемой частоте мутаций», показали его прибытие в Индию около 66 тыс. лет назад и в Австралию около 63 тыс. лет назад. С учетом того что возраст линий мтДНК Западной Евразии близок к возрасту таковых в Индии, возникло предположение о том, что заселение Западной Евразии было результатом раннего ответвления от колонизации вдоль южного побережья на север и дальше – в Левант и Европу. Последнему событию, вероятно, после ответвления предшествовала затяжная пауза в расселении до улучшения климатических условий в данных регионах.

На основе распределения у разных народов частот различных мутаций в Y-хромосоме и мтДНК составлена карта расселения людей с африканской прародинной (Cavalli-Sforza, 2000) (рис. 7). Первые волны расселения человека современного типа прошли из Африки через Азию в Австралию и Европу. Удивительно то, что эти данные в целом соответствуют археологическим находкам, которые сделаны раньше или делаются сейчас. Например, появление человека в Австралии и Новой Гвинее датируется 50–60 тыс. лет назад, согласно генетическим данным. Анализ изотопного состава химических элементов археологических находок показывает примерно то же самое время. В Центральной и Юго-Восточной Азии люди появились примерно 70 тыс. лет назад. Заселение Европы произошло позже, ~ 39–40 тыс. лет назад. Наиболее спорны оценки времени заселения Америки. Люди появились там гораздо позже, чем на других континентах, потому что нужно было пройти через Сибирь, добраться до Чукотки и воспользоваться тем моментом, когда

уровень моря в период оледенения позволял перейти нынешний Берингов пролив. Случилось это в промежутки времени от 12 до 35 тыс. лет назад. Позже под натиском ледника палеолитические европейцы несколько раз отступали на юг и юго-восток, возможно, даже возвращаясь обратно в Африку, о чем свидетельствуют результаты исследования гаплотипов Y-хромосомы в популяциях Африки. При сравнении спектра мутаций в ДНК современных европейцев и их азиатских соседей удалось установить, что 10–20 % генов было привнесено в Европу неолитическими переселенцами с Ближнего Востока около 10 тыс. лет назад. Вместе с ними в Европе появилось земледелие.

Разные расы и народы возникли после разделения предковых популяций. Эволюция вновь образовавшихся групп шла независимо. В каждой группе накапливались свои мутации, увеличивалась генетическая дистанция между группами. Сообщества приспосабливались к своим климато-географическим условиям и типу питания. В изолированных группах независимо шла также эволюция языка и культуры. На формирование современных народов влияли не только процессы разделения популяций, поскольку народы могут образовываться и при смешении нескольких исходных сообществ с разной расовой и языковой принадлежностью. При этом возникает генетически разнородная, но с единым типом культуры и общим языком этническая общность. В связи с этим все большую актуальность приобретают работы, связанные с изучением генетической истории популяций отдельных регионов, расово-этнических групп, генетической родословной современных этносов.

Таким образом, исследования полиморфизма митохондриальных и Y-хромосомных ДНК-маркеров внесли важный вклад в понимание путей происхождения человека и рас, расселения *Homo sapiens* по планете, а также в генетическую и демографическую историю отдельных этносов и популяций.

### СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ В ЭТНОГЕНОМИКЕ

Несмотря на существенный прогресс в этногеномных исследованиях, остается ряд

**Полногеномный анализ SNPs** – генотипирование от сотен тысяч до нескольких миллионов однонуклеотидных полиморфных локусов в больших группах.

**Секвенирование полных геномов** – определение последовательности нуклеотидов ДНК всех хромосом.

нерешенных проблем: исследована лишь малая часть генома на небольших популяционных выборках, отсутствуют маркеры Y-хромосомы с достаточной разрешающей способностью и методы более точной калибровки молекулярных часов для разного набора маркеров мтДНК и Y-хромосомы. Решению некоторых из перечисленных проблем может помочь применение нового подхода в этногеномике – полногеномного генотипирования. В 2008 г. появились первые статьи, посвященные полногеномному анализу однонуклеотидных полиморфных локусов (SNPs), благодаря интенсивной разработке чиповых технологий разными компаниями. Всего известно около 47 млн SNPs. В настоящее время созданы микрочипы, которые позволяют одновременно анализировать от 96 тыс. до 5 млн SNPs в одном образце.

Изучение 650 000 SNPs у 1064 индивидов из 51 популяции мира – Африки, Европы, Ближнего Востока, Южной/Центральной Азии, Восточной Азии, Океании и Америки – позволило детально охарактеризовать генетическое разнообразие *Homo sapiens* в мире, дифференцировать все популяции по отдельным континентам и регионам и отнести индивидов к определенным популяциям (Li *et al.*, 2008) (рис. 8). Результаты анализа SNPs согласуются с моноцентрической гипотезой о последовательном эффекте основателя с единственным центром происхождения в Африке. Данные авторы первыми показали возможность оценки генетического предка каждого индивида без знания его популяционной принадлежности.

Несмотря на низкие средние уровни различий между европейскими популяциями было найдено полное соответствие между генетическими и географическими расстояниями при анализе генома 3192 человек по 500 000 SNPs. Индивиды из одного и того же географического региона образовывали один кластер, и основ-

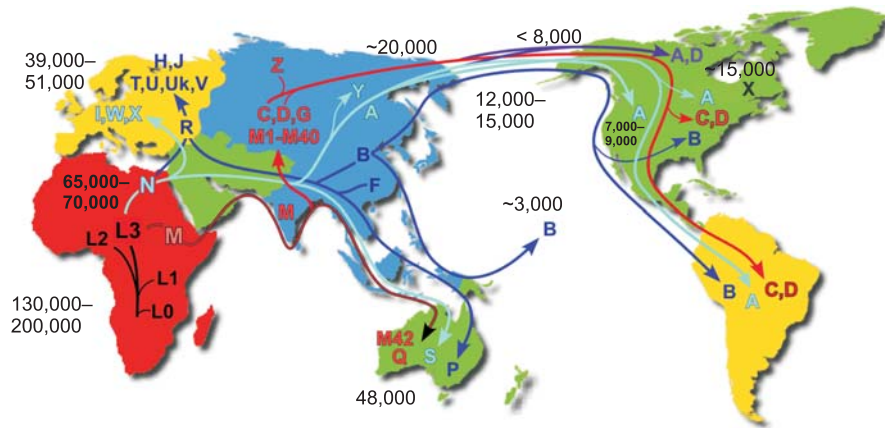


Рис. 7. Карта расселения современного человека с африканской прародины (<http://www.mitomap.org>).

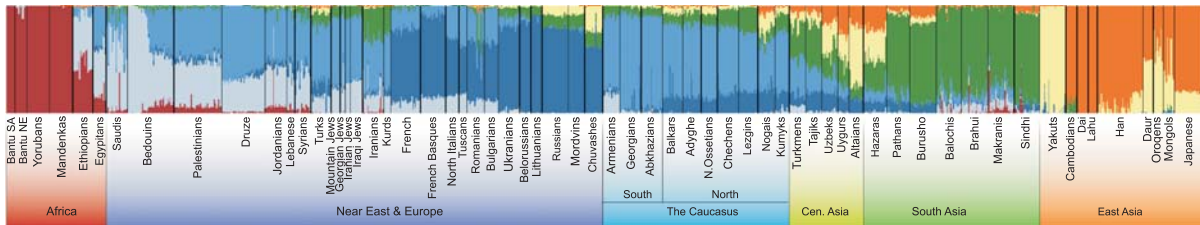


Рис. 8. Полногеномный анализ 610 000 SNPs в популяциях мира.

Различными цветами обозначены различные этнические компоненты (Yunusbayev *et al.*, 2012. P. 359–365).

ные популяции четко разделялись. Различия по генетической структуре были обнаружены даже между группами людей, говорящими на французском, немецком и итальянском языках и проживающими в одном регионе – Швейцарии. Кроме того, было показано, что результаты в перспективе важны для индивидуального генетического тестирования предков. ДНК индивидов может быть отнесена к их географическому происхождению или положению с удивительной точностью – в пределах нескольких сотен километров.

Полногеномное генотипирование небольших популяционных выборок с использованием сотен тысяч SNPs становится важным для более глубокого изучения эволюционной и демографической истории отдельных регионов и этносов.

В результате полногеномного анализа 610 000 SNPs в 24 этнических группах Кавказа получено наиболее детальное и подробное представление об их генетической структуре и установлено, что их формирование происходило на основе гетерогенного генетического субстрата перед-

неазиатского происхождения с последующим существенным дрейфом генов в изолированных популяциях (рис. 8). Впервые показано существование отчетливого потока генов из популяций Восточной Европы в популяции Кавказа (Yunusbayev *et al.*, 2012).

Изучение генетических различий между популяциями является также чрезвычайно важным для проведения ассоциативных исследований (при поиске генов предрасположенности к определенным болезням), так как полученные ассоциации могут оказаться ложными в результате различий в частотах аллелей между популяциями.

Уже сегодня становится доступным **ресеквенирование полных геномов** человека. Это даст возможность изучать аллели с низкой частотой, и дальнейшее развитие статистических методов позволит нам использовать паттерны гаплотипического разнообразия. Прогресс в технологиях секвенирования, его скорости и стоимости колоссален. Если затраты на секвенирование генома человека в 2003 г. составили 300–400 млн долларов, то геномы, секвенируемые на платформах

второго поколения, стоили 200–500 тыс. долларов, а последние работы по ресеквенированию полных геномов довели стоимость анализа всего лишь до 1500 долларов США. В перспективе стоимость секвенирования индивидуального генома – 1000 долларов за один день.

В ближайшее время завершится проект «1000 геномов», ставящий своей целью получить полные геномы 2000 индивидов из различных популяций основных географических регионов мира – Африки, Европы, Азии и Америки. В первой фазе этого проекта уже секвенировано 1092 образца из разных популяций ([www.1000genomes.org](http://www.1000genomes.org)). Данные по ресеквенированию полных геномов подтверждают уровень индивидуальной вариабельности генома, оцененной в проекте «Геном человека»: 3 млн SNPs в среднем на геном из 3 млрд нуклеотидов дают уровень различий 1 нуклеотид на 1000 п.н. Полногеномное секвенирование индивидов из различных популяций мира позволит более глубоко изучить эволюционную и демографическую историю популяций и этносов отдельных регионов мира, а также поможет в разработке подходов в персонифицированной медицине.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, изучение геномного разнообразия в популяциях человека внесло значительный вклад в популяционную генетику в целом и позволило обнаружить неизвестные ранее факты и явления в области эволюционного развития вида. Изучение генетической структуры популяций человека необходимо для понимания эволюционной истории человека и для тщательного дизайна медико-генетических исследований. Дальнейшее развитие этногеномики в сочетании с палео- и археогеномикой, а также с усовершенствованием современного оборудования и биоинформатических подходов значительно расширит наши представления о генофонде человека, внесет весомый вклад в понимание вопросов исторического развития и эволюции человечества.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование поддержано грантами РГНФ № 13-11-02014 и РФФИ № 11-04-00652\_а.

## ЛИТЕРАТУРА

- Балановская Е.В., Балановский О.П. Русский генофонд на Русской равнине. М.: ООО Луч, 2007. 415 с.
- Деренко М.В., Мальярчук Б.А. Молекулярная филогеография населения Северной Евразии по данным об изменчивости митохондриальной ДНК. Магадан: СВНЦ ДВО РАН, 2010. 376 с.
- Деревянко А.П. Верхний палеолит в Африке и Евразии и формирование человека современного анатомического типа. Новосибирск: Изд-во ИАЭТ СО РАН, 2011. 560 с.
- Кутуев И.А., Хуснутдинова Э.К. Генетическая структура и молекулярная филогеография народов Евразии. Уфа: Гилем, 2011. 240 с.
- Лимборская С.А., Хуснутдинова Э.К., Балановская Е.В. Этногеномика и геногеография народов Восточной Европы. М.: Наука, 2002. 261 с.
- Степанов В.А. Этногеномика населения Северной Евразии. Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2002. 243 с.
- Федорова С.А. Генетические портреты народов Республики Саха (Якутия): анализ линий митохондриальной ДНК и Y-хромосомы. Якутск: Изд-во ЯИЦ СО РАН, 2008. 235 с.
- Хуснутдинова Э.К. Молекулярная этногенетика народов Волго-Уральского региона. Уфа: Гилем, 1999. 238 с.
- Хуснутдинова Э.К., Федорова С.А. Этногеномика населения Евразии: состояние, проблемы и перспективы // Вестн. биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2010. Т. 6. № 1. С. 40–49.
- Cann R.L., Stoneking M., Wilson A.C. Mitochondrial DNA and human evolution // *Nature*. 1987. V. 325. P. 31–36.
- Cavalli-Sforza L.L. *Genes, Peoples, and Languages*. N.Y.: North Point Press, 2000. 215 p.
- Karafet T.M., Mendez F.L., Meilerman M.B. *et al.* New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree // *Genome Res*. 2008. V. 18. P. 830–838.
- Krause J., Fu Q., Good J. *et al.* The complete mitochondrial DNA genome of unknown hominin from southern Siberia // *Nature*. 2010. V. 464. P. 894–897.
- Li J.Z., Absher D.M., Tang H. *et al.* Worldwide human relationships inferred from genome-wide patterns of variation // *Science*. 2008. V. 319. P. 1100–1104.
- Oven van M., Kayser M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation // *Hum. Mutat*. 2009. V. 30 P. E386–E394.
- Yunusbayev B., Metspalu M., Järve M. *et al.* The Caucasus as an asymmetric semipermeable barrier to ancient human migrations // *Mol. Biol. Evol*. 2012. V. 29. No. 1. P. 359–65.



УДК 569.9:572.1:575.1:575.8

## ПАЛЕОГЕНЕТИКА ЧЕЛОВЕКА

© 2013 г. А.С. Пилипенко

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,  
e-mail: alexpil@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 24 июня 2013 г. Принята к публикации 1 ноября 2013 г.

### ВВЕДЕНИЕ

Человек был и остается одним из наиболее интенсивно и разносторонне исследуемых объектов. Среди научных направлений, занятых изучением человека, в последние десятилетия ключевую роль играет молекулярная генетика, исследующая генетическое разнообразие популяций человека, принципы организации и функционирования генома человека. Геном представляет собой совокупность наследственного материала (ДНК), заключенного в клетке человека: ядерный геном, включающий 23 пары хромосом, и митохондриальную ДНК (мтДНК) (всего ~ 3 млрд пар оснований). Расшифровка полной последовательности генома человека в рамках международной программы «Геном человека» позволила молекулярной генетике стать ведущим направлением биомедицинских исследований человека. Несмотря на интенсивные исследования, огромное количество молекулярно-генетических проблем, связанных с происхождением и эволюцией человека как вида, историей популяций человека, функционированием генома, развитием заболеваний, все еще остаются до конца не решенными. Для их решения в рамках комплексного молекулярно-генетического исследования человека формируются и получают развитие все новые направления и подходы. Непрерывное совершенствование методов получения и анализа структуры образцов ДНК позволило не только полноценно использовать молекулярно-генетические методы для анализа материалов, полученных от ныне живущих людей, но и включить в число объектов исследования ДНК

из останков человека различного возраста, т. е. проводить генетическое исследование древних людей. Рассмотрению этого направления молекулярной генетики, получившего название палеогенетики человека, посвящена данная статья.

### ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ ПАЛЕОГЕНЕТИКИ. СПЕЦИФИКА И МЕТОДИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПАЛЕОГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ОСТАНКОВ ЧЕЛОВЕКА

К категории объектов палеогенетических исследований в широком смысле относится весь комплекс биологических останков различного возраста, потенциально содержащих эндогенную ДНК и не прошедших предварительно целенаправленную процедуру консервации (Kaestle, Horsburgh, 2002). Объектами палеогенетики человека являются останки человека (и продукты его жизнедеятельности) различного возраста, потенциально содержащие человеческую ДНК (Willerslev, Cooper, 2005).

Первое исследование в области палеогенетики было посвящено выделению и анализу последовательности фрагмента митохондриальной ДНК (мтДНК) из музейных останков вымершего представителя рода лошадей/зебр – квагги (*Equus quagga*) возрастом около 140 лет (Higuchi *et al.*, 1984). Уже в следующем году была опубликована первая работа по анализу ДНК из древних останков человека – египетской мумии возрастом около 2400 лет (Paabo, 1985). Ее автор, Сванте Паабо, является

основателем палеогенетики человека и до настоящего времени остается одним из мировых лидеров в этой области. Первые исследования продемонстрировали принципиальную возможность экстракции и анализа структуры ДНК из ископаемых останков животных и человека различного возраста. Вскоре было показано, что эндогенная ДНК в древних останках преимущественно представлена короткими фрагментами мультিকопийных локусов, таких как митохондриальная ДНК, в чрезвычайно низкой концентрации (Paabo *et al.*, 1989).

Внедрение во второй половине 1980-х годов в практику молекулярно-генетических исследований вместо малоэффективного клонирования в бактериальных векторах нового метода – полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяющей получать практически неограниченное число копий короткого целевого фрагмента ДНК даже при его чрезвычайно низкой концентрации, – существенно расширило спектр источников, пригодных для выделения и анализа древней ДНК. В конце 1980-х–начале 1990-х годов появились многочисленные работы, посвященные исследованию структуры ДНК, выделенной из ископаемых останков человека и разнообразных животных, растений, микроорганизмов, относящихся к широким хронологическим рамкам: от нескольких сотен или тысяч лет и до «геологически древней ДНК» (ДНК из окаменелых останков возрастом в миллионы лет, например, в случае с останками динозавров и насекомых из янтаря) (Thomas *et al.*, 1989; Golenberg *et al.*, 1990; Cano *et al.*, 1992).

Первоначальный оптимизм в отношении палеогенетических исследований, вызванный очевидной перспективностью направления и кажущейся простотой методов, был быстро развеян работами по изучению процессов деградации ДНК и распространенности контаминации (загрязнения) древних образцов современной ДНК. Было экспериментально продемонстрировано сильное влияние загрязнения современной ДНК на результаты палеогенетических исследований (особенно при исследовании древней ДНК человека и микроорганизмов).

При использовании для амплификации древней ДНК высокочувствительных вариантов ПЦР присутствие даже незначительного количества современной ДНК часто приводит

к получению ложных результатов. При этом исследователь получает последовательность загрязняющей ДНК вместо аутентичной древней. Явление контаминации представляет собой наиболее серьезную проблему при проведении палеогенетических исследований. На раннем этапе развития палеогенетики эти проблемы недооценивались исследователями. Результаты многих ранних работ могли быть искажены вследствие влияния контаминации. В результате в научном сообществе на некоторое время распространяется скептическое отношение к возможности получения достоверных результатов методами палеогенетики (Richards *et al.*, 1995; Stoneking, 1995).

Одним из основных направлений развития палеогенетики становится исследование биохимии процессов деградации ДНК после смерти организма, их воздействие на результаты анализа структуры древней ДНК, влияние различных условий среды на потенциал сохранности ДНК в останках. Главными достижениями этого направления палеогенетики стали доказательство возможности сохранения ДНК, пригодной для анализа (даже в условиях умеренного климата), по крайней мере, в останках возрастом в несколько тысяч лет (Poinar *et al.*, 1996); совершенствование методов извлечения ДНК из останков; создание системы критериев аутентификации (верификации) результатов палеогенетических исследований; разработка протоколов проведения палеогенетических экспериментов, обеспечивающих получение достоверных результатов анализа структуры древней ДНК (Cooper, Poinar, 2000). С этого момента первостепенной задачей любого палеогенетического исследования является доказательство достоверности полученных экспериментальных результатов, а уже затем их интерпретация (Paabo *et al.*, 2004; Willerslev, Cooper, 2005). Некоторые меры верификации палеогенетических данных приведены в табл. 1.

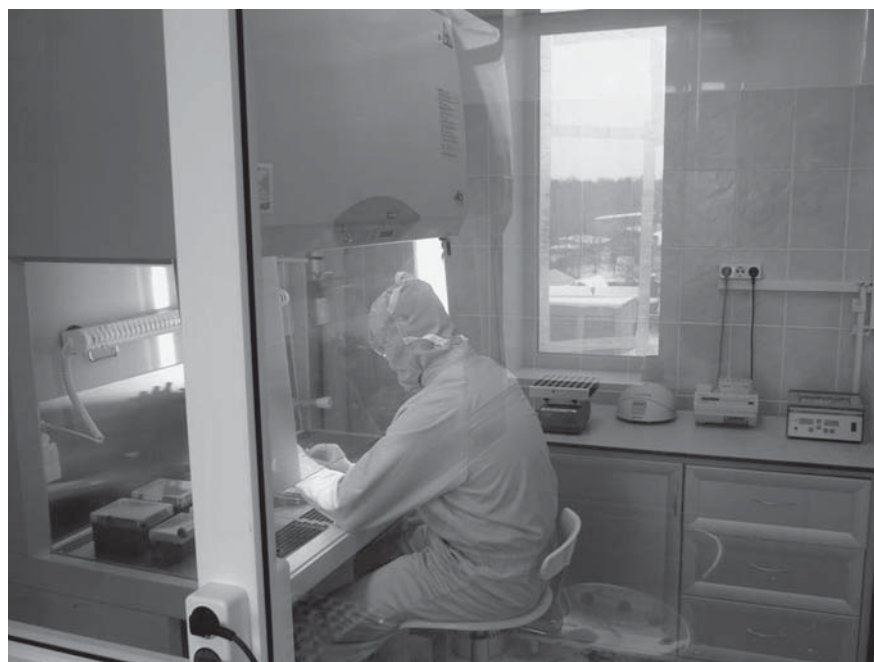
Обязательным условием для проведения исследований древней ДНК являются правильная планировка и оснащение лаборатории, обеспечивающие изоляцию «чистых» экспериментальных работ и снижение уровня потенциальной контаминации (рис. 1).

Таким образом, с начала 2000-х годов появилась возможность проведения полноценного

Таблица 1

Наиболее распространенные процедуры верификации данных в палеогенетике

Метод верификации	Проблема, решаемая с помощью данного метода
Повторные экстракции ДНК из материала одного образца	Спорадическое загрязнение в процессе предварительной обработки образца и выделения ДНК
Повторные ПЦР из одного экстракта	Спорадическая контаминация в процессе предварительной обработки и выделения ДНК; случайные ошибки в ПЦР; загрязнение реактивов для ПЦР
Отрицательные контроли экстракции и ПЦР (пробирки без добавления древнего материала)	Спорадическая и систематическая контаминация в процессе эксперимента
Клонирование продуктов ПЦР, секвенирование нескольких клонов	Спорадическая контаминация в процессе эксперимента; ошибки полимеразы; искажение полученной последовательности ДНК вследствие ее деградированного состояния
Выделение и анализ ДНК из разных частей одного скелета (например зубы и кости конечностей)	Загрязнение палеоматериала до его попадания в генетическую лабораторию
Анализ ДНК из сопутствующих останков животных	Косвенный показатель возможной сохранности ДНК в останках человека в условиях конкретного археологического памятника
Воспроизведение результатов в независимой палеогенетической лаборатории	Систематическая внутрилабораторная контаминация
Идентификация признаков деградированного состояния древней ДНК с помощью методов высокопроизводительного секвенирования	Универсальный метод доказательства аутентичности полученных образцов мтДНК (за исключением проблемы контаминации образцов в древности)



**Рис. 1.** Процесс проведения эксперимента в одном из чистых боксов межинститутского сектора молекулярной палеогенетики ИЦиГ СО РАН (г. Новосибирск). Работа проводится в чистом боксе под ламинарным шкафом, обеспечивающим сверхчистую рабочую зону. Персонал использует комплекты спецодежды для работы в чистых помещениях.

анализа древней ДНК с помощью методов, включающих ее амплификацию в ПЦР и последующий анализ последовательности различными методами. Наступил новый период интенсивного развития палеогенетических исследований, продолжающийся в настоящее время.

Важной вехой в развитии палеогенетики стало создание методов высокопроизводительного параллельного секвенирования ДНК. Новые высокопроизводительные подходы уже нашли свое применение в различных областях палеогенетики (Green *et al.*, 2010; Krause *et al.*, 2010a, b и др.), и в палеогенетике человека в первую очередь, благодаря нескольким их свойствам: 1) возможности получения большого объема генетической информации о древнем индивиде (вплоть до секвенирования полного генома индивида) по сравнению со стандартными ПЦР-подходами; 2) возможности работы с минимальным количеством исходного ДНК-содержащего материала, что имеет большое значение ввиду деструктивного характера палеогенетических исследований, связанных с необходимостью разрушения образца; 3) меньшей подверженности влиянию контаминации современной ДНК; 4) возможности объективной оценки ряда характеристик древней ДНК, отличающих ее от современной (небольшая средняя длина фрагментов, уровень дезаминирования цитозина и др.).

Высокопроизводительные методы позволяют практически уравнивать потенциальную информативность образцов древней и современной ДНК. Их пока ограниченное использование связано с незавершенностью протоколов, учитывающих специфику древнего материала (или их отсутствием в свободном доступе), а также с дороговизной таких экспериментов. Методы, основанные на использовании ПЦР, продолжают играть важную роль в палеогенетике человека и будут сохранять свою значимость впоследствии. Однако можно уверенно прогнозировать все более широкое использование в этой области высокопроизводительных подходов (Kirsanow, Burger, 2012).

Таким образом, в настоящее время палеогенетика является полноценным разделом молекулярной генетики человека, обладающим арсеналом методов, позволяющим решать

практически любые задачи, связанные с достоверным анализом последовательности древней ДНК человека.

## НАПРАВЛЕНИЯ ПАЛЕОГЕНЕТИКИ ЧЕЛОВЕКА

Спектр областей применения палеогенетики человека определяется такими факторами, как методические возможности (экспериментальные и аналитические), уровень развития соответствующих разделов молекулярной генетики человека в целом, наличие палеоантропологических материалов с адекватным археологическим контекстом.

Современный уровень развития методов получения и анализа структуры образцов древней ДНК в значительной степени снял методические ограничения молекулярно-генетического исследования останков человека. Быстрыми темпами также развиваются методы анализа и интерпретации молекулярно-генетических данных инструментами статистики и биоинформатики. Таким образом, доступные направления палеогенетического исследования останков человека охватывают почти весь спектр исследований, связанных с определением и анализом последовательности ДНК, осуществляемых в рамках молекулярной генетики человека.

На фоне решения многих технических экспериментальных и аналитических проблем существенным фактором, ограничивающим области применения палеогенетических методов, на данном этапе является достигнутый мировым научным сообществом уровень понимания принципов организации, функционирования и регуляции работы генома человека, механизмов реализации генетической информации, закономерностей формирования и распространенности генетического полиморфизма в популяциях человека, т. е. уровень концептуального развития соответствующих направлений молекулярной генетики человека в целом. Очевидно, что на древнем материале, работа с которым значительно осложнена, приемлемыми являются задачи, концептуальная база которых в минимально необходимой степени разработана на современном материале. В качестве примера можно привести формирование спектра молекулярно-генетических

маркеров, используемых в палеогенетических исследованиях: в палеогенетике подвергаются анализу маркеры, которые являются наиболее изученными (следовательно, наиболее информативными) в современных популяциях в рамках исследований по этногеномике. Как правило, справедлива общая схема: открытие маркера – проведение широкомасштабных исследований на современном человеке (популяциях) – применение маркера в палеогенетических исследованиях. Это одинаково справедливо и для маркеров, являющихся филогенетически информативными, таких как мтДНК и Y-хромосома, и для локусов генома, определяющих фенотипические характеристики, физиологические свойства индивида или патологические процессы в организме. Даже в тех случаях, когда исследователям доступен полный геном древнего индивида, аналитическая обработка и интерпретация данных осуществляются исходя из ранее накопленной информации о современных индивидах (популяциях).

Одним из серьезных ограничений в палеогенетике человека является наличие палеоантропологических материалов, которые не только отвечают минимальным требованиям сохранности в них ДНК, но и являются адекватными для решения той или иной палеогенетической задачи. За многие десятилетия, в течение которых осуществляется целенаправленное исследование археологических памятников, были накоплены большие коллекции останков человека с различными географическим происхождением, хронологией (возрастом) и культурной принадлежностью, т. е. с разным археологическим контекстом. Представители многочисленных групп древнего населения в той или иной степени хорошо охарактеризованы с точки зрения особенностей материальной и духовной культуры, демографических параметров, фенотипических признаков и по ряду других направлений. Этот огромный массив материалов остается практически неисследованным с точки зрения молекулярной генетики. Таким образом, на первый взгляд, нет недостатка в материалах для проведения палеогенетических исследований. Тем не менее опыт многих палеогенетиков (и автора статьи в том числе) свидетельствует о том, что выбор материала, адекватного для решения конкретных научных

задач методами палеогенетики, является одной из сложнейших и принципиальных задач. В большинстве случаев правильный выбор материала возможен только при корректном соотношении конкретной задачи, особенностей палеогенетических методов и археологического контекста имеющихся материалов. В полной мере осуществление такого предварительного анализа под силу только междисциплинарному коллективу из палеогенетиков, археологов и других специалистов, работающих с останками человека (Пилипенко, Молодин, 2010).

Большая часть материалов в палеоантропологических коллекциях представлена костными останками – костями посткраниального скелета и черепа. Наиболее пригодными для проведения молекулярно-генетического анализа считаются зубы и длинные кости конечностей. Реже в коллекциях встречаются остатки мягких тканей, волосы, изредка сохраняющиеся в археологических памятниках в особенно благоприятных условиях среды (в мерзлоте, очень сухом климате и т. д.). Первоначально именно такие редкие образцы привлекали внимание палеогенетиков. В настоящее время мягкие ткани, в отличие от костей и волос, не считаются хорошими источниками для выделения древней ДНК. Информативными объектами палеогенетического исследования могут быть копролиты, хотя они относятся к категории редких материалов.

Из всего современного спектра палеогенетических исследований останков человека можно выделить наиболее распространенные и значимые. На уровне отдельно взятого древнего индивида палеогенетическое исследование может включать: 1) анализ филогенетически и филогеографически информативных локусов (чаще всего мтДНК, нерекombинируемый участок Y-хромосомы (для индивидов мужского пола), реже некоторые аутосомные локусы генома). Полученная информация о положении индивида в общей системе генетического разнообразия человека может быть использована для эволюционных и этногенетических реконструкций; 2) анализ маркеров половой принадлежности останков; 3) определение индивидуального профиля высоковариабельных локусов (чаще всего STR-маркеров) – молекулярно-генетическая идентификация индивида; 4) молекулярно-палеопатологический анализ –

подразумевает поиск в геноме древнего индивида маркеров генетической предрасположенности к заболеваниям или детекцию в останках ДНК возбудителей инфекционных заболеваний; 5) изучение полиморфизма функционально значимых локусов генома, определяющих конкретный фенотип или физиологическую черту. Отдельно взятые исследования в большинстве случаев связаны с одним из перечисленных направлений. В случае секвенирования полного генома индивида возможна реализация всего спектра исследований.

Большинство палеогенетических работ связано с анализом не индивидуального, а серийного материала. В этом случае перечисленные направления исследований образцов могут быть использованы для решения широкого круга вопросов в области генетической истории других групп населения, характера их взаимоотношений друг с другом и связи с современными популяциями (т. е. для этногенетических реконструкций); анализа особенностей погребальной практики и специфических обрядов, связанных с погребением людей; реконструкции половой, семейной и социальной структуры древних сообществ человека; реконструкции молекулярно-генетических механизмов адаптации человека к разнообразным условиям среды; анализа структуры заболеваемости и многих других. Примеры реализации некоторых из этих направлений будут рассмотрены ниже.

#### **Палеогенетические исследования останков гоминид эпохи позднего плейстоцена: происхождение анатомически современного человека**

Проблема происхождения анатомически современного человека является одним из наиболее ярких примеров ключевой роли палеогенетического подхода в решении сложной и масштабной научной проблемы. Этой проблематике посвящена большая серия работ, связанных с получением и анализом образцов ДНК из останков населения Евразии эпохи позднего плейстоцена (возраст останков составляет несколько десятков тысяч лет). Именно эти работы являются наиболее известными в настоящее время в палеогенетике человека и выводят это направление в разряд «горячих точек» моле-

кулярной генетики. Останки человека такого возраста (как анатомически современного, так и близких форм, например неандертальцев) являются редкими находками. По сути, исследователь имеет дело с немногочисленными единичными индивидами, удаленными друг от друга как по географической локализации их местонахождений, так и по хронологии. Это связано как с относительно небольшой численностью населения в рассматриваемые периоды времени, так и с отсутствием устойчивой практики погребения умерших индивидов. В результате практически все известные находки сохраняются случайно (в отличие от более поздних погребальных памятников). Многие из них представлены отдельными фрагментами скелета. Научная значимость каждой такой находки огромна. В связи с этим 1) возрастает ценность любых палеогенетических данных о плейстоценовых индивидах, ввиду того что другие методы получения их биологической характеристики (такие, как морфологическое исследование скелета) часто затруднены и дают фрагментарную информацию; 2) остро стоит проблема получения максимально возможного количества генетической информации при минимально возможной деструкции материала, неизбежной при проведении палеогенетического анализа. В связи с этим именно на исследование людей позднего плейстоцена направлены усилия многих палеогенетических центров. Часто эти работы служат своеобразным «полигоном» для отработки новых высокопроизводительных методов и подходов.

Необходимо уточнить, что пока палеогенетические данные непосредственно касаются лишь поздних этапов эволюции, когда происходило формирование анатомически современного человека. Реконструкция ранних этапов эволюции человека осуществляется методами палеонтологии и археологии. Общепринятым является представление об Африке как прародине человека. С территории Африки ранние гоминиды расселялись по планете, по-видимому, в составе двух волн миграции (происходивших 1,8–2,0 и 0,6–0,4 млн лет назад соответственно). Речь идет о ранних представителях рода *Homo* – эректусах (*H. erectus*). Ранние волны миграции прослежены главным образом на основании анализа распространенности типов каменных

орудий (каменных индустрий) по территории Евразии (Деревянко, 2012). Генетика, в частности палеогенетика человека, играет одну из ключевых ролей в исследовании более поздних событий, связанных с возникновением современного человека.

Рассмотрим палеогенетические данные о населении позднего плейстоцена и их роль в реконструкции процессов формирования анатомически современного человека. На протяжении последних десятилетий XX в. происходила непрерывная дискуссия между сторонниками двух основных теорий происхождения современного человека – теории недавнего африканского происхождения (Stringer, 2002) и полицентрической теории (Thorne, Wolpoff, 1992). Сторонники первой теории утверждают, что анатомически современный человек сформировался на территории Африки менее 200 тыс. лет назад, мигрировал за пределы Африки менее 70 тыс. лет назад и, расселившись по планете, сформировал все группы анатомически современного населения (Stringer, 2002). Эта точка зрения предполагает, что генетический состав населения был целиком сформирован за счет генетического материала мигрантов из Африки (и его последующей эволюции) без какого-либо генетического вклада других поздних форм древнего человека (неандертальцев, эректоидных форм). Другими словами, мигрировав из Африки, наши предки полностью вытеснили существовавших в Евразии поздних гоминид без гибридизации с ними. Альтернативная точка зрения, напротив, предполагает независимое формирование групп анатомически современного населения на территории различных регионов планеты на основе нескольких форм поздних гоминид с последующим их смешением в пограничных зонах (т. е. в формирование генофонда современного человека внесли существенный вклад несколько локальных подвидов) (Thorne, Wolpoff, 1992). Существенный вклад в эту дискуссию был внесен молекулярной генетикой: в середине–второй половине 1980-х годов были получены результаты, свидетельствующие о том, что все разнообразие митохондриальной ДНК современного человека за пределами Африки имеет африканское происхождение, и именно в Африке наблюдается наибольшее разнообразие мтДНК, обусловленное более

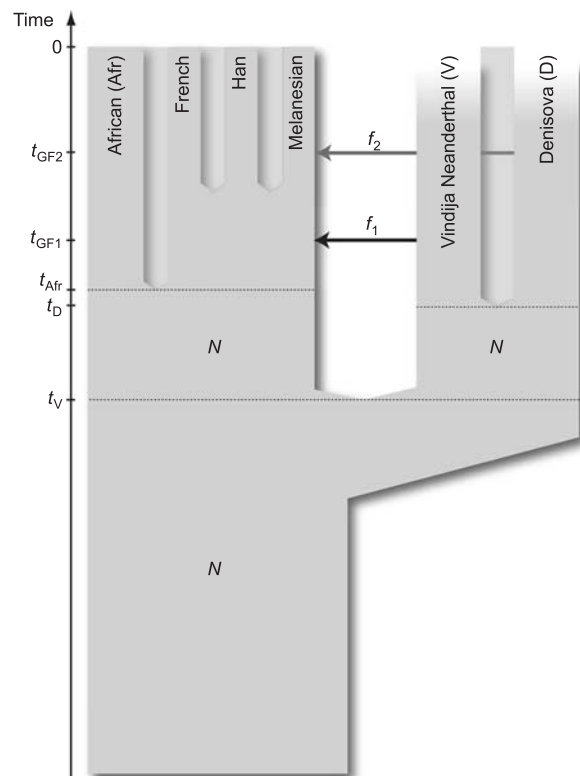
протяженной эволюцией популяций (Cann *et al.*, 1987). Таким образом, генетические данные надолго склонили чашу весов в сторону теории недавнего африканского происхождения. В последующие два десятилетия был получен огромный массив данных по разнообразию мтДНК в современных популяциях, на его основе реконструированы маршруты расселения человека из Африки (Torroni *et al.*, 2006; Малайчук, Деренко, 2006). Подтверждение этой точки зрения было получено при изучении полиморфизма Y-хромосомы (Underhill, Kivisild, 2007). В конце 1990-х–начале 2000-х годов позиции теории недавнего африканского происхождения анатомически современного человека казались незыблемыми. На этом фоне во второй половине 1990-х годов были проведены первые исследования ДНК из останков гоминид позднего плейстоцена – неандертальцев. Эти работы, посвященные анализу контрольного района мтДНК, показали, что мтДНК неандертальцев лежит за пределами вариативности мтДНК, установленной для популяций современного человека (Krings *et al.*, 1997, 2000). Это открытие служило дополнительным аргументом в пользу теории африканского происхождения. Появление методов высокопроизводительного параллельного секвенирования ДНК позволило осуществить более масштабные работы по анализу ДНК неандертальцев. Сначала был секвенирован полный митохондриальный геном неандертальца (Green *et al.*, 2008). В результате был подтвержден вывод о его локализации за пределами видового разнообразия современного человека. Однако работы по секвенированию ядерного генома привели к получению неожиданных результатов. Оказалось, что 2–4 % генома всех представителей современного населения за пределами Африки имеет неандертальское происхождение (Green *et al.*, 2010). Другими словами, было получено свидетельство вклада неандертальцев в генофонд современных людей, которое может объясняться их гибридизацией. Эта гибридизация, по-видимому, происходила после выхода *Homo sapiens* из Африки, на территории Евразии. Это открытие коренным образом изменило существовавшее представление о происхождении человека. Вместо одной из рассмотренных выше крайних точек зрения на этот процесс наиболее

вероятным представляется промежуточный вариант, предполагавший как существенную роль поздней миграции человека из Африки, так и некоторый вклад других форм (по крайней мере неандертальцев) в генофонд современного человека. Эту модель можно условно назвать гибридной.

Другим громким достижением палеогенетики плейстоценовых гоминид было открытие ранее неизвестного науке вида поздних гоминид: результаты секвенирования ДНК из дистальной фаланги мизинца ребенка (девочки), обнаруженной в слоях возрастом около 50 тыс. лет в Денисовой пещере (Горный Алтай, Россия) (рис. 2), показали ее генетическое отличие как от современного человека, так и от неандертальца. Были секвенированы полный митохондриальный (Krause *et al.*, 2010b), а затем и ядерный геномы нового вида, что подтвердило первоначальные выводы (Reich *et al.*, 2010). Это первый случай в научной практике, когда вид древнего человека выделен на основании анализа ДНК, а не морфологии останков (ввиду крайней фрагментарности последних). Сравнение с современными популяциями показало, что представители нового вида, получившего название «денисовский человек» (по месту обнаружения его останков), также внесли вклад в генофонд современного населения. Однако этот вклад, по-видимому, был более локальным: следы генетического влияния денисовского человека (до 5 % генетического материала) были выявлены только у ряда аборигенных популяций Австралии. Для объяснения такой специфической картины была предложена модель двух поздних миграций человека из Африки (Rasmussen *et al.*, 2011). Мигранты первой ранней волны (~ 60–70 тыс. лет назад), выйдя из Африки, расселились по побережью Индийского океана и далее в Юго-Восточной Азии и Австралии. Эти мигранты подверглись гибридизации с денисовцами. Потомки этих ранних мигрантов сохранились в Австралии. Мигранты второй волны (~ 30 тыс. лет назад) заселили континентальную Евразию, уже не испытав генетического влияния денисовского человека. Следует отметить, что в настоящее время инициированы исследовательские проекты по поиску следов денисовского человека в генофонде континентальных популяций Азии,

как Южной, так и Северной. Таким образом, неандертальцы, по-видимому, не были единственными гоминидами, внесшими наряду с африканскими популяциями вклад в генофонд современного человека (рис. 2).

Безусловно, необходимо продолжение исследований в этом направлении (как археологических, так и палеогенетических), для того чтобы сформировать полную и непротиворечивую картину процессов формирования современного человека. Многие детали остаются неясными. Тем не менее уже сейчас, опираясь на данные палеогенетики, можно констатировать, что ни одна из крайних точек зрения на происхождение человека не является полностью справедливой. Реально происходившие процессы выглядят существенно более сложными: наряду с основополагающим вкладом африканских популяций в них, по-видимому, играло роль сложное



**Рис. 2.** Схема модели, отражающей популяционную историю происхождения анатомически современного человека.

$N$  – эффективный размер популяции;  $t$  – время дивергенции популяций;  $f$  – поток генов между популяциями;  $t_{GF}$  – время существования потока генов между популяциями (из: (Reich *et al.*, 2010. P. 1053–1060)).



взаимодействие между локальными группами (подвидами) гоминид, населявших различные регионы планеты.

### **Палеогенетические исследования людей эпохи голоцена**

В период голоцена, охватывающий последние ~ 12 тысячелетий, наблюдалось существенное увеличение численности населения во многих регионах планеты. Начиная с периода неолита (10–6 тыс. лет назад) многие группы древнего населения на постоянной основе практикуют различные варианты погребения умерших соплеменников. Появляются довольно многочисленные погребальные памятники – могильники, содержащие останки древних людей, в том числе и серийные погребения представителей конкретной древней группы. Массовость и более высокая сохранность палеоантропологического материала обуславливают развитие нескольких направлений исследования останков человека методами палеогенетики. Основные из них кратко рассмотрены в следующих разделах статьи.

### **Реконструкция этногенетических процессов**

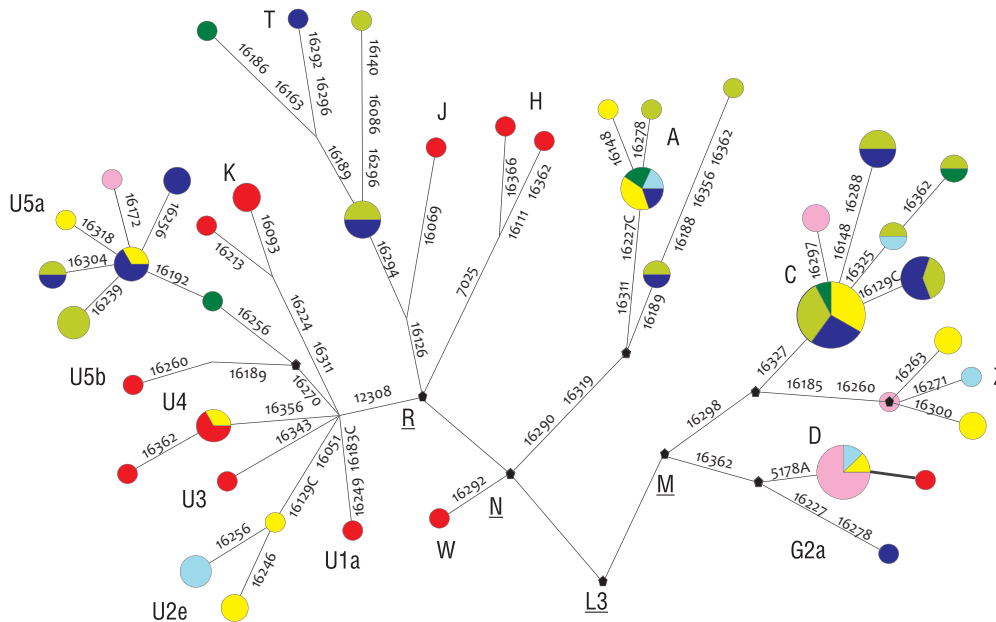
Под реконструкцией этногенетических процессов понимается комплекс исследований, направленных на получение данных об истории популяций человека как с точки зрения формирования их генетического состава, так и с позиций становления и развития особенностей материальной и духовной культуры. Эти процессы отражают историю населения различных регионов планеты и приводят в конечном счете к формированию современных этнических групп. Традиционные подходы к реконструкции этногенеза включают, с одной стороны, комплекс исследований древних групп человека методами археологии (анализ элементов материальной и духовной культуры) и физической антропологии (морфологический анализ останков), а с другой – исследование особенностей генетического состава современных популяций человека методами этногеномики и реконструкцию по структуре современного генофонда процессов его формирования в про-

шлом. Корректное сопоставление данных этих направлений было достаточно затруднительно из-за невозможности получения разнотипных характеристик для одних и тех же исследуемых групп. С развитием палеогенетики появилась возможность непосредственного исследования генетического состава древних популяций человека, выявления его динамики во времени и сопоставления молекулярно-генетических данных с археологическими и антропологическими характеристиками. Это выводит область этногенетических реконструкций на принципиально новый доказательный уровень и позволяет полноценно объединить все задействованные в этой области научные направления в рамках единого комплексного подхода.

Исследование генетического разнообразия в древних популяциях человека методами палеогенетики направлено на решение таких частных задач, как реконструкция генетических связей групп древнего населения, процессов миграции, этнокультурного взаимодействия, смены состава групп и других феноменов, определяющих генезис населения исследуемой территории. Выбор соответствующих информативных маркеров осуществляется с учетом опыта этногеномики. Наиболее исследованными маркерами в этногеномике до сих пор остаются митохондриальная ДНК (мтДНК) и нерекombинируемый участок Y-хромосомы. Для этих маркеров построены классификации структурных вариантов, отражающие последовательность их возникновения и филогенетические взаимоотношения (Karafet *et al.*, 2008; van Oven, Kayser, 2009). Наличие классификации структурных вариантов и накопленная информация об особенностях их распространения в современных популяциях человека являются уникальными инструментами, позволяющими определить филогенетическое положение любого палеогенетического образца и провести его филогеографический анализ, как в случае с современными образцами. Таким образом, существует возможность использования аналитического аппарата этногеномики для интерпретации палеогенетических данных. Наибольшей «популярностью» у палеогенетиков пользуется мтДНК, что обусловлено, помимо ее информативности, более высоким уровнем сохранности в древнем материале из-за ее многокопийности в клетках и

удобства анализа структуры. Появились также работы по анализу полиморфизма Y-хромосомы в древних группах. Отдельной проблемой является вопрос формирования репрезентативных выборок для проведения исследования. Помимо адекватного поставленным задачам выбора материалов, который может быть осуществлен при корректном учете их археологического контекста, важным становится вопрос о том, насколько полно исследуемые, как правило, очень ограниченные по численности выборки, представляют генетическое разнообразие изучаемых древних групп. Обычной практикой последних лет являются анализ незначительного по численности материала и его интерпретация с целью реконструкции масштабных и сложных по своей природе популяционных процессов. Безусловно, любые объективные данные об исследуемых древних популяциях имеют большую научную ценность. Однако многие опубликованные работы являются лишь первым шагом в решении рассматриваемых вопросов, а их результаты и интерпретации носят предварительный характер. В настоящее

время палеогенетика человека проходит этап накопления минимально необходимого объема информации о генофонде древних популяций, который позволит осуществлять обоснованные детальные реконструкции их истории. Перспективным направлением является реализация масштабных региональных программ, в рамках которых исследованию подвергаются многочисленные палеоантропологические материалы от древнего населения исследуемого региона. Одна из таких программ реализуется при участии автора данной статьи для территории юга Западной и Восточной Сибири (Molodin *et al.*, 2012). В рамках этой программы формируются представления о динамике генетического состава населения южнотаежной, лесостепной и степной зон перечисленных регионов Сибири на протяжении последних 8–10 тыс. лет (в эпоху голоцена), основанные на анализе полиморфизма мтДНК и Y-хромосомы (рис. 3). Исследование к настоящему моменту охватывает десятки разновременных групп древнего населения юга Сибири с общей численностью в несколько сотен исследуемых образцов.



**Рис. 3.** Филогенетическое дерево мтДНК древних этнокультурных групп лесостепной зоны Западной Сибири (Барабинская лесостепь) эпохи бронзы.

Цветом маркируются древние этнокультурные группы Барабы: желтый – усть-таргасская культура (IV тыс. до н. э.); розовый – одиновская (III тыс. до н. э.); голубой – кротовская (конец III–начало II тыс. до н. э.); синий – позднекротовская (начало II тыс. до н. э.); светло-зеленый – андроновская (первая половина II тыс. до н. э.); темно-зеленый – культура эпохи поздней бронзы (конец II тыс. до н. э.); красный – население городища Чича-1 (переходный период от эпохи бронзы к эпохе железа, начало I тыс. до н. э.).

Уже сейчас, на стадии первичного накопления материала о генофонде древних популяций, при корректном выборе материала, грамотной постановке задач и полноценном использовании имеющихся экспериментальных и аналитических методов палеогенетические исследования позволяют решать конкретные задачи в области этногенетических реконструкций. Среди наиболее удачных примеров можно назвать серию работ по изучению популяционно-генетических процессов, сопровождавших так называемую неолитизацию Европы – начавшийся порядка 7,5–8 тыс. лет назад процесс появления и стремительного распространения в Южной и Центральной Европе неолитических культур (и их носителей), демонстрирующих наличие навыков ведения сельского хозяйства (Haak *et al.*, 2005, 2010; Bramanti *et al.*, 2009). Неолитизация – один из ключевых факторов формирования генетического состава населения Европы. С ней связаны сразу несколько вопросов: сопровождалось ли распространение навыков сельского хозяйства миграцией на территорию Европы их носителей или преимущественно имело место распространение культурных и экономических навыков без существенной миграции населения; в случае существования масштабной миграции в неолите каким был вклад аборигенных охотников-собирателей и пришлых неолитических групп в генофонд современного населения Европы. Результаты исследования носителей первых неолитических культур Центральной и Северной Европы с признаками производящего сельского хозяйства и охотников-собирателей показали, что эти две группы населения существенно различаются между собой. Их генетическая контрастность свидетельствует о миграции первых носителей навыков сельского хозяйства в неолите в Центральную Европу, по-видимому, с территории Ближнего Востока (процесс неолитизации отличался в различных регионах Европы. Так, на юге Европы распространение сельского хозяйства не сопровождалось миграцией генетически контрастного населения). В то же время вклад неолитических мигрантов в современную структуру генофонда европейцев не был значительным. По-видимому, не являлся определяющим и вклад ранних аборигенных для Европы групп охотников-собирателей. Таким образом, структура генофонда мтДНК

современного населения Европы не может быть полностью объяснена вкладом аборигенных групп охотников-собирателей и неолитических мигрантов. Очень важную роль в формировании современного генетического состава населения Европы играли более поздние этногенетические процессы, протекавшие на протяжении последних 5–6 тысячелетий.

В этом контексте особый интерес приобретает исследование состава линий мтДНК населения северо-восточной Европы эпохи позднего неолита и бронзы, в результате которого было показано раннее генетическое влияние населения Сибири на восточно-европейские популяции (Der Sarkissian *et al.*, 2013).

Помимо Европы и юга Сибири в настоящее время интенсивные исследования древнего населения методами палеогенетики ведутся и в других районах планеты. Быстро накапливаются данные о древнем населении различных районов Китая, Центральной и Средней Азии, Южной и Северной Америки. В ближайшем будущем можно прогнозировать существенное усиление роли палеогенетических исследований в этногеномике; расширение спектра используемых для реконструкции генетических маркеров; масштабное применение высокопроизводительных экспериментальных методов и развитие новых эффективных подходов к анализу результатов.

#### **Реконструкция молекулярных механизмов адаптации человека и молекулярная палеопатология**

Перспективным направлением палеогенетики является анализ полиморфизма локусов, ответственных за формирование конкретных признаков, физиологических параметров или имеющих регуляторную функцию, т. е. локусов, играющих важную роль в формировании определенных фенотипов или функций организма человека. Это направление исследований позволяет реконструировать молекулярные механизмы адаптации человека к условиям среды, историю появления и распространения различных заболеваний, а также молекулярные механизмы эволюции человека в широком смысле. Последний из перечисленных аспектов с наибольшим успехом может быть реализован

по мере накопления данных по геномам древних (и современных) анатомически современных людей и поздних гоминид – неандертальцев, денисовцев и, возможно, других, еще не исследованных. Эти данные представляют собой уникальную модель, в рамках которой мы можем сравнивать геномы очень близких человеку филогенетически организмов, по-разному реализовавших адаптативные возможности. Сравнительный анализ геномов поможет выявить наиболее важные генетические звенья адаптативных процессов. Такая работа уже проводится и получены первые данные (Reich *et al.*, 2010; Meyer *et al.*, 2012).

На более поздних (голоценовых) материалах могут быть изучены механизмы адаптации к конкретным факторам внешней среды, которые претерпевали изменения в силу естественных причин или в результате развития материальной культуры и экономики человека на протяжении последних тысячелетий, а также адаптации популяций человека к локальным, иногда экстремальным условиям, например условиям Крайнего Севера. Интересным примером такого исследования является исследование полиморфизма гена фермента лактазы, ответственного за способность взрослого населения усваивать молочный сахар, в древнем населении Европы. В серии работ было показано, что появление и распространение в Европе аллельных вариантов этого гена, позволяющих усваивать лактозу, произошли в тесной связи с распространением практики производства молока, появившейся в период неолитизации Европы (Burger *et al.*, 2007; Itan *et al.*, 2009). Это один из наиболее ярких случаев непосредственной демонстрации прямого действия отбора на структуру генофонда популяций древнего человека.

Молекулярная палеопатология – область палеогенетики человека, связанная с оценкой статуса полиморфных локусов генома, ассоциированных с возникновением заболеваний (или определяющих генетическую предрасположенность к ним), или выявлением в останках человека ДНК возбудителя заболевания (в случае инфекционной или вирусной природы заболеваний). Примерами могут служить работы по оценке распространенности в некоторых древних популяциях делеции 32 п.н. в гене хемокинового рецептора CCR5 (Witas, Zawicki,

2006) и выявлению ДНК возбудителей заболеваний в останках людей, умерших во время массовых эпидемий в Европе в средние века (Drancourt *et al.*, 1998).

### **Реконструкция родственной и социальной структуры древних групп человека, элементов погребальных традиций и обрядов**

Еще одним специализированным направлением палеогенетики человека является определение степени родства древних индивидов, в частности, помещенных в коллективные погребения, или в группах погребений, совершенных с учетом той или иной степени родства индивидов. Это направление тесно интегрировано в археологические исследования. Значение таких исследований для археологии огромно, поскольку они позволяют поставить на объективную основу такую область археологии, как реконструкция социального устройства древних сообществ, их семейно-брачной структуры и т. д. До появления палеогенетических методов в этой области исследования древнего человека часто допускались необоснованные заключения. Примером такой палеогенетической работы могут служить исследование могильника рядовых хунну с территории Монголии, в результате которых удалось установить степень родства между погребенными в могильнике людьми, порядок и принципы формирования пространства могильника (Keyser-Tracqui *et al.*, 2003). Аналогичную работу осуществляет автор данной статьи на материалах из предположительных родовых кладбищ скифо-сибирской пазырыкской культуры (IV–III вв. до н. э.).

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В настоящее время палеогенетика, преодолев имевшиеся ранее методические ограничения, стала полноценным и высокоинформативным направлением молекулярной генетики человека, позволяющим получать данные о разнообразных генетических характеристиках представителей древнего населения нашей планеты. Спектр вопросов, на решение которых направлены исследования ДНК древних людей,

уже чрезвычайно широк и будет увеличиваться в дальнейшем за счет использования новых высокопроизводительных экспериментальных и аналитических методов. При этом палеогенетика играет и будет играть роль звена, связывающего разноплановые направления

исследований человека, в единый комплексный междисциплинарный подход.

Работа выполнена в рамках Междисциплинарного интеграционного проекта СО РАН № 32 (2012–2014); грантов РФФИ 13-06-12063-ОФИ-м; 12-04-31818-мол-а.

### Основные понятия

**Древняя ДНК человека** – ДНК, содержащаяся в останках людей (или продуктах их жизнедеятельности) различного возраста, не прошедших через специальные процедуры, направленные на консервацию в них нуклеиновых кислот после смерти организма.

**Проблема контаминации** – явление загрязнения древних палеоантропологических материалов современной ДНК. На фоне деградированного состояния древней ДНК современная ДНК замещает ее, в результате чего полученные в палеогенетическом исследовании данные могут оказаться искаженными (ложными), так как характеризуют последовательность загрязняющей современной ДНК вместо древней.

**Верификация палеогенетических результатов** – система мер и критериев, реализация которой при проведении палеогенетического исследования позволяет обосновать достоверность полученных данных о последовательности исследуемых образцов древней ДНК.

**Полимеразная цепная реакция (ПЦР)** – экспериментальный метод молекулярной генетики, позволяющий осуществлять целенаправленную амплификацию (увеличение концентрации) интересующего исследователя фрагмента ДНК в биологической пробе путем ее искусственного синтеза *in vitro*.

**Высокопроизводительные методы секвенирования** – методы определения нуклеотидной последовательности нуклеиновых кислот (ДНК, РНК), которые, в отличие от классического секвенирования, позволяют параллельно (единовременно) определять структуру большого числа участков генома (от нескольких фрагментов до миллиардов участков).

**Плейстоцен** – эпоха четвертичного периода, начавшаяся около 2,5 млн лет назад, завершившаяся ~12 тыс. лет назад. **Поздний плейстоцен** – заключительная эпоха плейстоцена, охватывающая период 125–12 тыс. лет назад. Предшествует голоцену.

**Голоцен** – наиболее поздняя эпоха четвертичного периода, охватывающая последние ~12 тыс. лет.

**Гипотеза недавнего африканского происхождения человека** – точка зрения на происхождение анатомически современного человека, подразумевающая участие в формировании генофонда современного человека исключительно африканских анатомически современных популяций, начавших расселение по планете из Африки менее 70 тыс. лет назад, и отсутствие значимого вклада в генетическую структуру современного человека других видов поздних гоминид.

**Мультирегиональная гипотеза происхождения человека** – точка зрения на происхождение анатомически современного человека, подразумевающая независимое происхождение локальных групп анатомически современных людей в различных регионах планеты в результате эволюции нескольких форм поздних гоминид.

**«Гибридизационная» гипотеза происхождения человека\*** – точка зрения на происхождение анатомически современного человека, допускающая существенное участие нескольких видов поздних гоминид в формировании генофонда человека при определяющем вкладе анатомически современных популяций, мигрировавших из Африки менее 70 тысяч лет назад.

**Этногенетические реконструкции** – комплекс исследований в рамках нескольких научных направлений (молекулярная генетика, археология, физическая антропология, лингвистика), направленных на получение объективной информации об истории формирования населения исследуемого региона. Конечной целью этногенетических реконструкций является формирование комплексной картины генезиса населения (этногенеза), включая его биологические (популяционно-генетические) и культурогенетические аспекты.

\* Термин «гибридизационная» не является устоявшимся, выбран автором статьи как наиболее соответствующий сути гипотезы.

**Неолитизация Европы** – распространение на территории Европы неолитических культур (и их носителей), демонстрирующих навыки сельскохозяйственного производства (земледелия и животноводства), происходившее в различных районах Европы в VI–V тысячелетиях до н. э.

**Молекулярная палеопатология** – область палеогенетики человека, в задачи которой входят анализ полиморфных локусов генома, ассоциированных с возникновением заболеваний (или определяющих генетическую предрасположенность к ним) в древних популяциях человека, и/или выявление в останках человека ДНК возбудителей заболеваний.

## ЛИТЕРАТУРА

- Деревянко А.П. Новые археологические открытия на Алтае и проблема формирования *Homo sapiens*. Новосибирск: Изд-во ИАЭТ СО РАН, 2012. 132 с.
- Малярчук Б.А., Деренко М.В. Филогеографические аспекты изменчивости митохондриального генома человека // Информ. вестн. ВОГиС. 2006. Т. 10. № 1. С. 41–56.
- Пилипенко А.С., Молодин В.И. Палеогенетический анализ в археологических исследованиях // Информ. вестн. ВОГиС. 2010. Т. 14. № 2. С. 280–311.
- Bramanti B., Thomas M.G., Haak W. *et al.* Genetic discontinuity between local hunter-gatherers and Central Europe's first farmers // *Science*. 2009. V. 326. P. 137–140.
- Burger J., Kirchner M., Bramanti B. *et al.* Absence of the lactase-persistence-associated allele in early Neolithic Europeans // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. P. 3736–3741.
- Cann R.L., Stoneking M., Wilson A.C. Mitochondrial DNA and human evolution // *Nature*. 1987. V. 325. No. 1. P. 31–36.
- Cano R.J., Poinar H.N., Poinar Jr G.O. Isolation and partial characterisation of DNA from the bee *Proplebeia dominicana* (Apidae: Hymenoptera) in 25–40 million year old amber // *Med. Sci. Res*. 1992. V. 20. P. 249–251.
- Cooper A., Poinar H. Ancient DNA: do it right or not at all // *Science*. 2000. V. 289. P. 1139.
- Der Sarkissian C., Balanovsky O., Brandt G. *et al.* Ancient DNA reveals prehistoric gene-flow from Siberia in the complex human population history of North East Europe // *PloS Genet*. 2013. V. 9. No. 2. e1003296.
- Drancourt M., Aboudharam G., Signoli M. *et al.* Detection of 400-year-old *Yersinia pestis* DNA in human dental pulp: an approach to the diagnosis of ancient septicemia // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. P. 12637–12640.
- Golenberg E.M., Giannassi D.E., Clegg M.T. *et al.* Chloroplast DNA from a Miocene *Magnolia* species // *Nature*. 1990. V. 344. P. 656–658.
- Green R.E., Krause J., Briggs A.W. *et al.* A draft sequence of the Neanderthal genome // *Science*. 2010. V. 328. P. 710–722.
- Green R.E., Malaspina A.S., Krause J. *et al.* A complete Neanderthal mitochondrial genome sequence determined by high-throughput sequencing // *Cell*. 2008. V. 134. P. 416–426.
- Haak V., Balanovsky O., Sanchez J.J. *et al.* Ancient DNA from European early Neolithic farmers reveals their near eastern affinities // *PLoS Biol*. 2010. V. 8. No. 11. e1000536.
- Haak W., Forster P., Bramanti B. *et al.* Ancient DNA from the first European farmers in 7500-year-old neolithic sites // *Science*. 2005. V. 305. P. 1016–1018.
- Higuchi R., Bowman B., Freiberger M. *et al.* DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family // *Nature*. 1984. V. 312. P. 282–284.
- Itan Y., Powell A., Beaumont M.A. *et al.* The origins of lactase persistence in Europe // *PLoS Comput. Biol*. 2009. V. 5. No. 8. e1000491.
- Kaestle F.A., Horsburgh K.A. Ancient DNA in anthropology: methods, applications, and ethics // *Yearbook of Phys. Anthropol*. 2002. V. 45. P. 92–130.
- Karafet T.M., Mendez F.L., Meilerman M.B. *et al.* New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree // *Genome Res*. 2008. V. 18. P. 830–838.
- Keyser-Tracqui C., Crubezy E., Ludes B. Nuclear and mitochondrial DNA analysis of a 2,000 year-old necropolis in the egin gol valley of Mongolia // *Am. J. Hum. Genet*. 2003. V. 73. P. 247–260.
- Kirsanow K., Burger J. Ancient human DNA // *Ann. Anat*. 2012. V. 194. P. 121–132.
- Krause J., Briggs A.W., Kircher M. *et al.* A complete mtDNA genome of an early modern human from Kostenki, Russia // *Curr. Biol*. 2010a. V. 20. P. 1–6.
- Krause J., Fu Q., Good J.M. *et al.* The complete mitochondrial DNA genome of an unknown hominin from southern Siberia // *Nature*. 2010b. V. 464. P. 894–897.
- Krings M., Stone A., Schmitz R.W. *et al.* Neanderthal DNA sequences and the origin of modern humans // *Cell*. 1997. V. 90. P. 19–30.
- Krings M., Capelli C., Tschentscher F. *et al.* A view of Neanderthal genetic diversity // *Nat. Genet*. 2000. V. 26. P. 144–146.
- Meyer M., Kircher M., Gansauge M.T. *et al.* A high-coverage genome sequence from an archaic Denisovan individual // *Science*. 2012. V. 338. P. 222–226.
- Molodin V.I., Piliipenko A.S., Romaschenko A.G. *et al.* Human migrations in the southern region of the West Siberian Plain during the Bronze Age: archaeological, palaeogenetic and anthropological data // *Population Dynamics in Pre- and Early History: New Approaches Using Stable Isotopes and Genetics*. Berlin, 2012. P. 95–113.
- Oven van M., Kayser M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation // *Hum. Mutat*. 2009. V. 30. P. E386–E394.
- Paabo S. Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA // *Nature*. 1985. V. 314. P. 644–645.
- Paabo S., Higuchi R.G., Wilson A.C. Ancient DNA and the polymerase chain reaction // *J. Biol. Chem*. 1989. V. 264. P. 9709–9712.

- Paabo S., Poinar H., Serre D. *et al.* Genetic analyses from ancient DNA // *Annu. Rev. Genet.* 2004. V. 38. P. 645–679.
- Poinar H.N., Hoss M., Bada J.L., Paabo S. Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA // *Science.* 1996. V. 272. P. 864–866.
- Rasmussen M., Guo X., Wang Y. *et al.* An aboriginal Australian genome reveals separate human dispersals into Asia // *Science.* 2011. V. 334. P. 94–98.
- Reich D., Green R.E., Kircher M. *et al.* Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia // *Nature.* 2010. V. 468. P. 1053–1060.
- Richards M.B., Sykes B.C., Hedges R.M. Authenticating DNA extracted from ancient skeletal remains // *J. Archaeol. Sci.* 1995. V. 22. P. 291–299.
- Stoneking M. Ancient DNA: how do you know when you have it and what can you do with it? // *Am. J. Hum. Genet.* 1995. V. 57. P. 1259–1262.
- Stringer C. Modern human origins: progress and prospects // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 2002. V. 357. P. 563–579.
- Thomas R.H., Schaffner W., Wilson A.C., Paabo S. DNA phylogeny of the extinct marsupial wolf // *Nature.* 1989. V. 340. P. 465–467.
- Thorne A.G., Wolpoff M.H. The multiregional evolution of humans // *Sci. Am.* 1992. V. 266. No. 4. P. 76–79.
- Torrioni A., Achilli A., Macaulay V. *et al.* Harvesting the fruit of the human mtDNA tree // *Trends Genet.* 2006. V. 22. P. 339–345.
- Underhill P.A., Kivisild T. Use of Y-chromosome and mitochondrial DNA population structure in tracing human migrations // *Annu. Rev. Genet.* 2007. V. 41. P. 539–564.
- Willerslev E., Cooper A. Ancient DNA // *Proc. Biol. Sci.* 2005. V. 272. P. 3–16.
- Witas H.W., Zawicki P. Allele protecting against HIV (CCR5-delta32) identified in early medieval specimens from Central Poland. Preliminary results // *Anthropol. Rev.* 2006. V. 69. P. 49–53.

УДК 577.21

## ГЕНОМ ПРОКАРИОТ

© 2013 г. Н.В. Равин<sup>1,2</sup>, С.В. Шестаков<sup>2</sup><sup>1</sup> Центр «Биоинженерия» РАН, Москва, Россия, e-mail: nravin@mail.ru;<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия, e-mail: shestakovgen@mail.ru

Поступила в редакцию 4 июня 2013 г. Принята к публикации 1 ноября 2013 г.

### ВВЕДЕНИЕ

К прокариотам относятся два домена (царства) организмов – бактерии и археи, которые в отличие от эукариот (третий домен живого мира) не содержат клеточных ядер и размножаются бинарным делением. Между собой археи и бактерии различаются по структуре клеточных стенок и мембран, структуре рибосом, ферментативным механизмам процессов реализации генетической информации (Адхья и др., 2009). В частности, археи имеют сходный с эукариотами, а не с бактериями аппарат репликации и репарации ДНК, а также компоненты транскрипционного комплекса. За 3,5 млрд лет обитания на планете бактерии и археи сформировали биогеохимические циклы, определяющие облик биосферы (Заварзин, 2010). В геномах более 10<sup>8</sup> видов прокариот содержится почти 90 % всей информации о генетическом биоразнообразии в понятиях молекулярной филогении.

Геномы прокариот включают два типа генетических структур: нуклеоид (аналог хромосомы) и внехромосомные элементы (плазмиды, способные к автономной репликации). В состав хромосомы входят: структурные гены, кодирующие белки и РНК, межгенные участки (спейсеры), регуляторные элементы, определяющие работу генов, различные мобильные элементы (табл. 1).

**Геном** – физическая и генетическая совокупность всех генов и генетических элементов клетки или вируса.

Большую часть генома прокариот (как правило, 80–90 %) составляют последовательности, кодирующие белки и РНК. Интроны у бактерий и архей встречаются как в генах, кодирующих рибосомные и транспортные РНК, так и в белок-кодирующих генах. Однако частота встречаемости интронов в генах прокариот гораздо ниже, чем у эукариот.

Геномы прокариот являются динамичными структурами даже в пределах одного вида. Полученные путем секвенирования генома одного конкретного штамма сведения не позволяют говорить о геноме всего вида из-за штаммовых различий в геномном составе и размерах геномов. Так, у разных по патогенности штаммов кишечной палочки различия по количеству генов могут достигать 30 %. Исходя из внутривидовой вариативности геномов сложились представления о базовом (core) и гибком вспомогательном наборе генов (Шестаков, 2007). Консервативный базовый набор включает гены так называемого «домашнего хозяйства», ответственные за информационные системы репликации, транскрипции, трансляции, ключевые пути метаболизма и формирования клеточных структур, определяющих видовую/родовую принадлежность. В категорию вспомогательных входят операционные гены, контролирующие разные процессы метаболизма и морфофизиологические признаки, обеспечивающие приспособленность к определенной экологической нише. Многие из таких генов локализованы в плаزمиде, мобильных элементах, геномных островках, которые не обязательно присутствуют во всех штаммах одного вида. В процессе эволюции некоторые гены базового



Таблица 1

## Состав генома прокариот

Локализация	Структуры
Хромосома Плазмиды	Кодирующие последовательности генов Нетранслируемые области генов: 5'- и 3'-концевые районы, интроны Регуляторные элементы генома: промоторы, терминаторы транскрипции, сайты связывания регуляторных белков, сайты связывания рибосом Сайты связывания с клеточными мембранами Мобильные элементы Интегроны Профаги и интегрированные в хромосому плазмиды CRISPR – структуры

набора могут переходить в категорию вспомогательных, а гены вспомогательного набора становятся базовыми (рис. 1). Под видовым геномом следует понимать совокупность всех генов (и базовых, и вспомогательных) всех штаммов данного вида.

На основе сведений о базовых наборах рассматривается вопрос о том, каков же минимальный набор генов, необходимых для обеспечения жизни клетки (и для ее искусственного создания). По мнению ряда исследователей, в таком наборе должно быть не менее 200 базовых генов, без которых клетка существовать не может.

## РАЗМЕРЫ И СТРУКТУРА ГЕНОМОВ

В 1956 г. Ф. Жакоб и Э. Вольман предложили кольцевую модель организации бактериальных хромосом. Исследования структур геномов прокариот генетическими и физическими методами (электронная микроскопия, электрофорез в пульсирующем поле и др.), а позднее и посредством полногеномного секвенирования показали, что большинство геномов прокариот

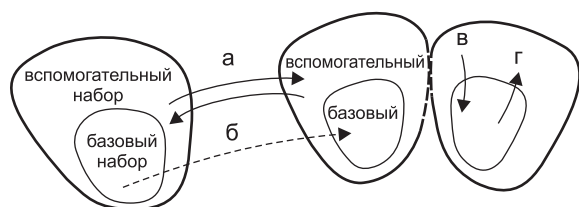


Рис. 1. Базовый и вспомогательный наборы генов.

а – межвидовой обмен вспомогательными генами; б – перенос генов базового набора; в – переход вспомогательных генов в базовый набор; г – переход базовых генов в категорию вспомогательных.

представляют собой кольцевые двухцепочечные молекулы ДНК. У некоторых бактерий обнаружены и линейные хромосомы, однако их структура отличается от эукариотических, которые имеют специальные концевые последовательности, теломеры, и используют при репликации теломеразу. В отличие от эукариот бактерии используют иные механизмы (рис. 2): у стрептомицетов, обладающих линейными хромосомами, к 5'-концам ковалентно присоединены белки, обеспечивающие свободный 3'-ОН конец для инициации репликации. Другой тип линейных хромосом, имеющих ковалентно замкнутые «шпилечные» концы, обнаружен у спирохет рода *Borrelia*. Некоторые бактерии помимо основной кольцевой хромосомы имеют и дополнительные. Так, две кольцевые хромосомы обнаружены у *Vibrio cholerae*, а у фитопатогенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens* выявлены одна кольцевая и одна линейная хромосомы. Геномы архей представляют собой одну кольцевую хромосому. Исключением является архея *Haloarcula marismortui*, содержащая две кольцевые хромосомы.

Полногеномное секвенирование нуклеотидных последовательностей показало, что размеры геномов у культивируемых бактерий нахо-

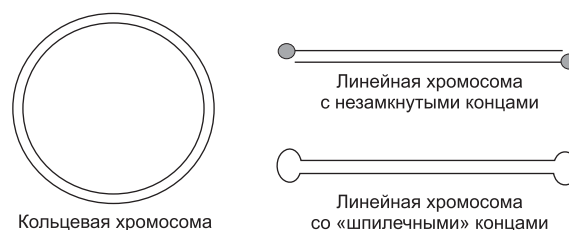


Рис. 2. Структуры хромосом прокариот.

дятся в диапазоне от 0,58 млн п.н. у *Mycoplasma genitalium* до 9,2 млн п.н. у *Bradhyrhizobium japonicum* (Боринская, Янковский, 1999) (табл. 2). Размер архейных геномов варьирует более чем в 12 раз, от 0,49 млн п.н. у облигатного симбионта *Nanoarchaeum equitans* до 5,75 млн п.н. у метаногенной археи *Methanosarcina acetivorans* (Марданов, Равин, 2012). Размер генома в большинстве случаев прямо пропорционален количеству генов при соотношении в среднем один ген на одну тысячу нуклеотидов. Археи и бактерии с наименьшими геномами являются, как правило, паразитами или симбионтами (Bentley, Parkhill, 2004). Среди свободноживущих видов небольшие геномы характерны для организмов, живущих в стабильных экологических нишах и обладающих специализированным метаболизмом. Например, у некоторых морских фотосинтезирующих цианобактерий геном составляет 0,6–1,8 млн п.н. Небольшие по размеру геномы имеют и многие гипертермофильные археи (Марданов, Равин, 2012).

Организмы с крупными геномами обитают в сложных по структуре экосистемах с широким диапазоном условий. К ним относится большинство почвенных бактерий.

Важной характеристикой геномов прокариот является G + C состав, который находится в диапазоне от 23 до 72 %, причем этот параметр не коррелирует с температурой роста: для большинства гипертермофильных архей характерен низкий G + C состав, а стабильность хромосомы обеспечивается комплексом ДНК-связывающих белков.

### ПЛАЗМИДЫ, ВИРУСЫ И МОБИЛЬНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ

Помимо хромосомных генов, кодирующих белки и РНК, в состав геномов прокариот входят и другие генетические структуры (Льюин, 2011) (табл. 1): мобильные элементы, плазмиды, интегроны, профаги, CRISPR локусы, различные регуляторные элементы.

Таблица 2

Размеры и структуры геномов некоторых прокариот

Вид бактерии или археи	Состав генома	Размер (т.п.н.)	Форма
Бактерии			
<i>Escherichia coli</i> K12 (MG1655)	Хромосома	4640	Кольцевая
<i>Bradhyrhizobium japonicum</i>	Хромосома	9207	Кольцевая
<i>Mycoplasma genitalium</i>	Хромосома	580	Кольцевая
<i>Vibrio cholerae</i>	Хромосома	2941	Кольцевая
	Хромосома	1072	Кольцевая
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Хромосома	2842	Кольцевая
	Хромосома	2057	Линейная
	Плаزمида	453	Кольцевая
	Плазмида	214	Кольцевая
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Хромосома	911	Линейная
	11 плазмид	9-54	Кольцевые и линейные
<i>Streptomyces coelicolor</i>	Хромосома	8667	Линейная
	Плазмида	356	Линейная
	Плазмида	31	Кольцевая
Археи			
<i>Methanosarcina acetivorans</i>	Хромосома	5751	Кольцевая
<i>Haloarcula marismortui</i>	Хромосома	3132	Кольцевая
	Хромосома	288	Кольцевая
<i>Nanoarchaeum equitans</i>	Хромосома	491	Кольцевая

Мобильные элементы представляют собой фрагменты ДНК, способные к внутрихромосомным перемещениям (транспозициям) или к передаче в другую клетку. К ним относятся инсерционные элементы (IS-элементы), кодирующие ферменты, необходимые для их перемещения (транспозазы), транспозоны, а также миниатюрные инвертированные повторяющиеся элементы (MITE), которые не содержат генов транспозаз. Характерной структурной особенностью IS элементов является наличие на их концах коротких инвертированных повторов (рис. 3). Транспозоны представляют собой мультигенные структуры, как правило, фланкированные двумя идентичными IS элементами. При перемещении транспозона возможно как его «вырезание» и перенос в другой участок генома, так и дупликация, при которой исходная копия сохраняется.

Интеграция мобильных элементов может не только вызывать инактивацию гена при «попадании» внутрь гена, но также «включать» и «выключать» соседние гены, поскольку в транспозонах могут находиться промоторы или терминаторы транскрипции. Одинаковые мобильные элементы в разных районах хромосомы являются гомологичными участками, рекомбинация между которыми может приводить к геномным перестройкам. Число мобильных элементов в геномах варьирует в широких пределах. В некоторых геномах активные мобильные элементы вообще отсутствуют, а в других число их может исчисляться десятками. Например, в геноме археи *Sulfolobus solfataricus* обнаружено более 200 мобильных элементов, на долю которых приходится 11% генома, а в геноме другого представителя этого рода, *Sulfolobus acidocaldarius*, активные мобильные элементы отсутствуют. IS элементы одних и тех же семейств встречаются у архей и бактерий,

что свидетельствует о возможности перемещения мобильных элементов между бактериями и археями, обитающими в одной экологической нише. Наряду с генами, необходимыми для собственной траспозиции, транспозоны могут содержать и полезные для клетки гены, например, гены устойчивости к антибиотикам и тяжелым металлам. Часто такие гены локализованы на конъюгативных транспозонах, способных к переносу в другие клетки. В этих крупных транспозонах (до 100 т.п.н.) находятся гены, обеспечивающие образование конъюгативного мостика между бактериями и перенос ДНК в клетку-реципиент.

К числу мобильных элементов относятся также интегроны – генетические элементы, имеющие в своем составе интеграционный модуль с геном интегразы, сайтом интеграции и промотором, направленным в противоположную от гена интегразы сторону. Благодаря этому модулю, интегроны способны встраиваться в геном и экспрессировать чужеродные гены в составе кассеты, которая может содержать десятки генов. Интегроны, захватывающие гены устойчивости к антибиотикам, являются одним из факторов распространения лекарственной устойчивости у бактерий.

Плазмиды – автономно реплицирующиеся внехромосомные генетические элементы (Квитко, Захаров, 2012). Как правило, они представляют собой кольцевые молекулы ДНК, но встречаются и линейные плазмиды, по структуре аналогичные линейным хромосомам. В отличие от хромосом плазмиды являются «необязательным» генетическим материалом, потеря которого не приводит к гибели клетки. Однако многие крупные плазмиды содержат десятки–сотни генов, кодирующих важные для клетки функции, которые могут оказаться необходимыми в определенных экологических

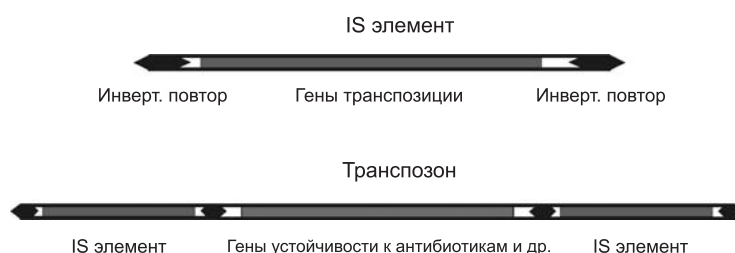


Рис. 3. Структура инсерционного элемента и транспозона.

условиях. Поэтому терминологическое отличие таких «мегаплазмид» от хромосом является условным. Приобретаемые с плазмидами новые признаки в ряде случаев определяют названия плазмид: например, F плазида (fertility factor), придающая клеткам *Escherichia coli* донорные свойства, или плазида R, определяющая резистентность клеток к антибиотикам. Способность к автономной репликации плазмид обеспечивается наличием сайта инициации репликации (*ori*) и набором генов, кодирующих необходимые белки. Плазмиды содержат лишь часть необходимых для собственной репликации ферментов, используя также компоненты репликационного аппарата клетки-хозяина. Специфичностью *ori*-сайта определяется группа несовместимости плазмид: разные плазмиды с одинаковым *ori*-сайтом не могут сосуществовать в одной клетке. Многие плазмиды кодируют и собственные инициаторные белки, специфически распознающие *ori*-сайты. Это снижает зависимость плазмиды от клетки-хозяина и расширяет спектр возможных хозяев, что способствует межвидовому переносу генетического материала. Плазмиды могут содержать несколько *ori*-сайтов, функционирующих в разных организмах-хозяевах или в одном штамме, но в разных условиях. Некоторые плазмиды могут интегрироваться в хромосому клетки-хозяина и реплицироваться в ее составе в виде эписомы. Число копий плазмид в клетке может варьировать в широких пределах, от одной до

нескольких сот копий на хромосому, но во всех случаях их количество регулируется, поскольку неограниченная репликация плазмидной ДНК привела бы к гибели клетки. По механизму контроля числа копий плазмиды делятся на две группы. В одних плазмидах контроль осуществляется либо с помощью антисмысловой РНК, взаимодействующей с РНК, синтез которой инициирует репликацию (плазида ColE1), либо на уровне регуляции экспрессии гена репликационного белка (плазида R). Другой способ обеспечивается взаимодействием контролирующего репликацию плазмиды белка с повторяющимися последовательностями (итеронами) в районе *ori*-сайта. При «избыточном» числе копий эффективность инициации репликации снижается. При клеточном делении плазмиды могут распределяться между дочерними клетками случайным образом. Если для высококопийных плазмид вероятность попадания всех плазмид в одну из двух дочерних клеток ничтожно мала, то для низкокопийных такая вероятность весьма высока. Например, для плазмиды, две копии которой будут присутствовать в клетке перед делением, вероятность случайной потери составит 50 %. Поэтому для низкокопийных плазмид в процессе эволюции выработались специальные механизмы, обеспечивающие их поддержание в популяции (рис. 4). Первый из них – точное распределение реплицированных плазмид между дочерними клетками перед делением (сегрегационная

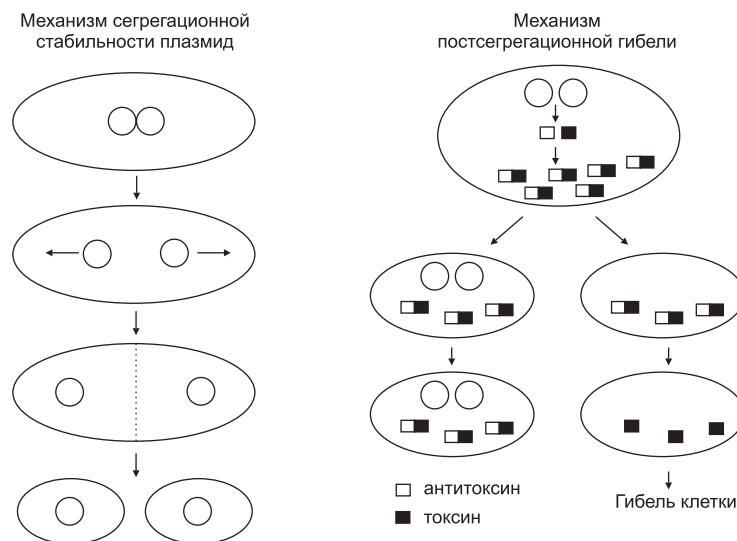


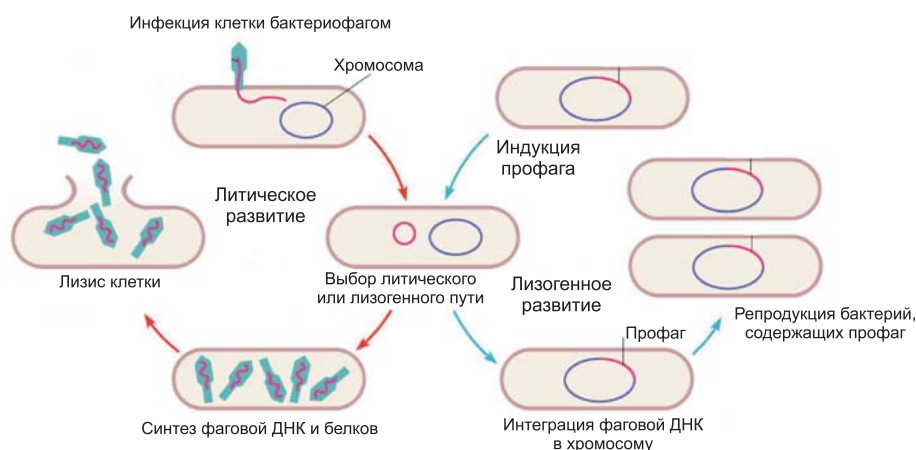
Рис. 4. Механизмы поддержания плазмид в клетках хозяина.

стабильность). Другим механизмом стабилизации плазмид является постсегрегационная гибель бесплазмидных клеток. В этой системе участвуют два гена, продуктами которых являются стабильный токсин и инактивирующий его «антитоксин», время деградации которого значительно меньше. Клетки, содержащие плазмиду, синтезируют оба компонента и сохраняют жизнеспособность. В клетках, потерявших плазмиду, после инактивации антитоксина сохранится стабильный токсин, что приведет к их гибели. Механизмы сегрегационной стабильности и постсегрегационной гибели не являются взаимоисключающими и у многих низкокopiesных плазмид, в том числе плазмиды F, встречаются одновременно.

В отличие от плазмид провирусы (профаги) представляют собой вирусные геномы, встроенные в геном клетки-хозяина и реплицирующиеся в его составе (Льюин, 2011). При инфекции ДНК вируса инъецируется в клетку, после чего инициируются репликация и экспрессия вирусного генома (рис. 5). При этом происходит «перепрограммирование» клетки на синтез вирусных белков. В результате образуются десятки–сотни копий вирусного генома, которые упаковываются в образованные вирусными белками частицы – вирионы. На заключительной стадии инфекционного процесса происходят лизис клетки и освобождение свободных частиц вируса. Более сложным жизненным циклом обладают лизогенные бактериофаги. После инфекции возможны как литическое развитие, так и латентное сохранение провируса (рис. 5).

В последнем случае происходят интеграция вирусной ДНК в хромосому клетки-хозяина и «выключение» большинства вирусных генов за счет действия белка-репрессора. В интегрированном состоянии профаг может наследоваться в составе хромосомы на протяжении многих генераций. Некоторые бактериофаги, например P1 и N15, в лизогенном состоянии не включаются в хромосому клетки-хозяина, а представляют собой плазмиду. Состояние профага, однако, не является необратимым: в случае инактивации репрессора происходит вырезание фагового генома из хромосомы и развивается литический процесс. Такая «индукция» профага, в частности, происходит при попадании клетки в неблагоприятные условия. Интегрированные в хромосому профаги могут накапливать мутации, в первую очередь делеции, вследствие которых они теряют способность к индукции и литическому развитию. Такие «дефектные» профаги присутствуют в геномах большинства прокариот. Часто профаги и другие мобильные элементы входят в состав «геномных островков», привносимых в геном в результате событий горизонтального переноса. Участки, отличающиеся по нуклеотидному составу от остального генома, могут содержать гены, ответственные за патогенез, симбиогенез, транспорт металлов и др.

**Горизонтальный перенос** – процесс, в котором организм передает генетический материал другому организму, не являющемуся его потомком.



**Рис. 5.** Жизненный цикл бактериофага.

Прокариоты выработали несколько способов борьбы с попадающими в клетку извне мобильными элементами, вирусами. Эффективным механизмом являются системы рестрикции–модификации ДНК, которые расщепляют чужеродную ДНК специфическими рестрикционными ферментами, от действия которых защищена модифицированная метилированием ДНК клетки-хозяина. В геномах многих бактерий и большинства архей были найдены участки, представляющие собой кластеры из коротких повторяющихся последовательностей (от 20 до 40 п.н.), разделенных спейсерами с уникальными последовательностями. Эти кластеры были названы CRISPR-структурами (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). Предполагается, что спейсерные последовательности «отбираются» из вирусов, плазмид и мобильных элементов, а роль CRISPR-структур состоит в блокировании распространения мобильных элементов, последовательности которых совпадают с последовательностями спейсеров.

### РЕГУЛЯТОРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ ГЕНОМА ПРОКАРИОТ

К числу регуляторных элементов генома относятся промоторы, терминаторы транскрипции, аттенюаторы, сайты связывания регуляторных белков (Адхья и др., 2009). Индивидуально экспрессируемый прокариотический ген помимо кодирующей структуру белка или РНК области содержит промотор и терминатор транскрипции (рис. 6).

**Экспрессия генов** – процесс, в ходе которого наследственная информация (последовательность нуклеотидов в ДНК) реализуется в синтезе РНК или белка.

Гены, вовлеченные в одну функцию, часто располагаются один за другим и транскрибируются в одной мРНК. Такая организация генов называется опероном. Гены, сцепленные в составе оперона, регулируются координированно, объединение в оперон облегчает горизонтальный перенос целого кластера генов.

Промотор – последовательность нуклеотидов в ДНК, узнаваемая РНК-полимеразой как стартовая площадка для начала специфической транскрипции. Промоторы имеют два консервативных участка, один из которых необходим для узнавания, а другой – для прочного связывания промотора с РНК-полимеразой. У большинства бактерий это последовательности с консенсусом TTGACA и TATAAT, расположенные на расстояниях 35 и 10 нуклеотидов от точки старта транскрипции. Промоторные области генов могут содержать сайты связывания регуляторных белков – специфические нуклеотидные последовательности, способные взаимодействовать с репрессорами или активаторами транскрипции. Между точкой начала транскрипции и стартовым кодоном обычно расположен сайт связывания рибосом, последовательность которого комплементарна 3'-концу 16S рибосомной РНК. Терминатор – участок ДНК, содержащий сигнал (последова-

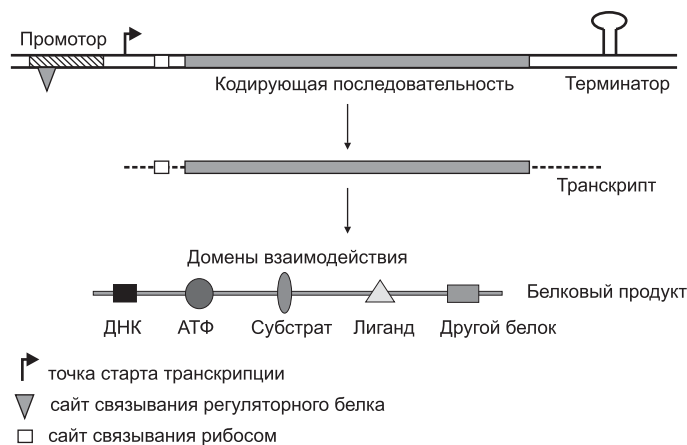


Рис. 6. Структура прокариотического гена.

тельность) окончания транскрипции в конце гена. Как правило, терминаторные последовательности содержат инвертированные повторы длиной несколько нуклеотидов, образующие шпильку в РНК. В остановке транскрипции могут принимать участие также аттенуаторы – ослабители транскрипции. Например, в составе триптофанового оперона *E. coli* содержится аттенуатор, который в условиях избытка триптофана обеспечивает снижение уровня синтеза мРНК, т. е. выполняет важную функцию регуляции экспрессии генов.

### ВКЛАД МЕТАГЕНОМИКИ В ИЗУЧЕНИЕ ГЕНОМОВ ПРОКАРИОТ

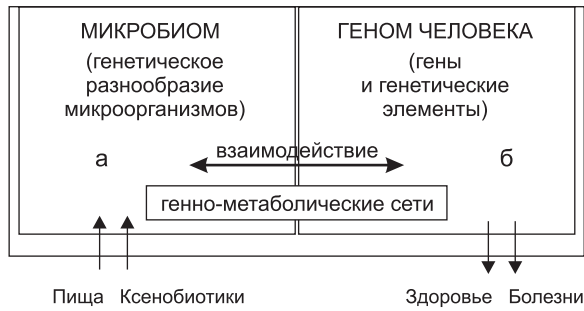
Основные сведения об организации геномов прокариот получены при изучении культивируемых видов, но почти 99 % бактерий и архей, обитающих в природных экосистемах, не растут на искусственных средах. В исследовании геномов некультивируемых видов ведущая роль принадлежит новым методам, включающим: а) секвенирование амплифицированных фрагментов геномов единичных клеток, изолированных с помощью проточной цитометрии; б) анализ коллективного метагенома – совокупности геномов всех микробов в пробе, взятой непосредственно из природной среды. Схема этапов метагеномного анализа приведена на рис. 7. С применением методов метагеномики открыты сотни новых видов, десятки тысяч

новых генов, реконструированы геномы и пути метаболизма многих некультивируемых видов, уточнены филогенетические связи таксонов, изучены генные сети в различных сообществах, расшифрована природа ряда симбиотических систем, разработаны схемы мониторинга таксономического и генного составов природных сообществ, выявлены новые продуценты биотехнологически перспективных соединений (Handelsman, 2004; Шестаков, 2011).

В одной из первых работ (2004) по метагеномному анализу биоразнообразия микробиоты Саргассова моря было выявлено 4800 видов (включая около 150 ранее неизвестных фило типов) и более миллиона генов, 67 тыс. из которых не имели гомологов в базах данных. В этом исследовании были сделаны крупные открытия: а) показано участие бактериальных генов, кодирующих родопсин-подобные белки, в светозависимой энергетике морских экосистем; б) в метагеноме обнаружено много фаговых генов, что позволило обосновать важную роль вирусов в переносе генов внутри микробного сообщества. Масштабные метагеномные исследования внесли большой вклад в понимание генетической структуры различных почвенных, водных, экстремофильных экосистем; в изучение новых таксонов бактерий и архей в геотермальных источниках (Бонч-Осмоловская, Равин, 2010). На основе метагеномики разработана концепция «суперорганизма» (рис. 8), в котором гены человека действуют совместно с коллективным



Рис. 7. Схема проведения метагеномного анализа.



**Рис. 8.** Функциональная метагеномика суперорганизма.

а – виды и гены, влияющие на жизнедеятельность человека; взаимодействие микробов; б – гены и клеточные системы, влияющие на микробиоту и реагирующие на изменения в составе и активности микробиоты.

геномом микробов, живущих на/в теле человека (Шестаков, 2010).

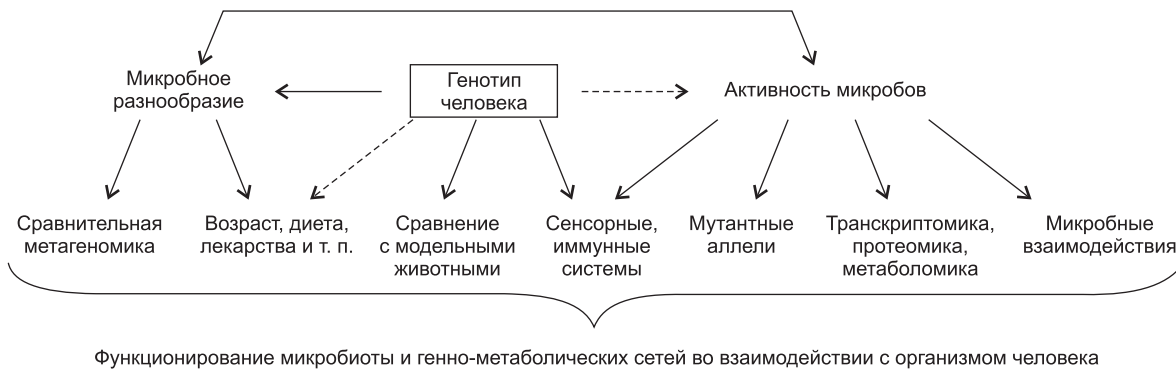
Изучение таксономического и генного состава микробиоты желудочно-кишечного тракта человека и животных позволило идентифицировать много новых прокариотических генов и выявить закономерности взаимодействия различных видов/штаммов экосистемы факультативного симбиоза (мутуализма) с организмом хозяина (рис. 9).

Геномный состав микробиоты индивидуален для каждого человека и зависит от его генотипа. Вместе с тем, геномная вариабельность близкородственных штаммов в экосистеме обеспечивает высокий адаптивный потенциал состава микробиома человека. Сбалансированный состав микробиома является одним из критериев оценки состояния здоровья человека (Dethlefsen *et al.*, 2007). Изменения в типе питания при действии стрессовых факторов, ксенобиотиков, патогенов и т. п. могут быть причиной развития

(при наличии генетической предрасположенности) различных патологий, таких как ожирение, рак, аутоиммунные, сердечно-сосудистые, инфекционные и прочие болезни. Метагеномный анализ микробиоты кишечника, ротовой полости, вагины, кожных покровов дает важную информацию для решения вопросов диагностики, профилактики и лечения многих болезней. В частности, разработаны технологии применения микробных препаратов пробиотиков для оптимизации деятельности кишечника и стимуляции систем иммунитета.

### ФОРМИРОВАНИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОМОВ

Анализ полных геномов тысяч видов/штаммов прокариот позволил переосмыслить классические постулаты молекулярной филогении, соответствующие представлениям о едином универсальном дереве жизни, отражающем концепцию вертикальной эволюции на основе мутационных изменений и дивергенции. В сравнительной геномике для выяснения родственных связей и происхождения таксонов принято использовать понятия ортологичных и паралогичных генов. По степени гомологии ортологов судят о генетическом родстве видов/штаммов прокариот и на этой основе строят таксономическую классификацию. Наиболее часто молекулярно-филогенетический анализ ведут по консервативным генетическим маркерам, таким как последовательности генов 16S рибосомных РНК или белков аппарата транскрипции/трансляции. Но филогенетические деревья, построенные только по маркерам 16S рибосомной РНК, не отражают реальную историю эволюции вида,



**Рис. 9.** Экосистема микробиоты кишечника.



поскольку часто не совпадают с деревьями по многим ортологичным белок-кодирующим генам. Вертикальное наследование по принципу бифуркации не является единственным механизмом, определяющим биологическую эволюцию на уровне организмов и сообществ.

Помимо мутационной изменчивости важную роль в формировании геномов играют и другие генетические процессы, приводящие к реорганизации геномов, утрате или приобретению генов и сегментов генома, к изменению размеров генома (рис. 10).

1. Эволюция многих таксонов шла по пути редукции геномов. Это характерно для облигатных внутриклеточных патогенов и эндосимбионтов (Смирнов, 2008). У них утеряны гены некоторых путей метаболизма и клеточных процессов, отсутствие которых компенсируется системами клетки хозяина. Экономически «выгодная» редукция геномов направлена на оптимизацию приспособленности микробов к узким специализированным экологическим нишам. При этом могут теряться как «ненужные» гены (поскольку их функции обеспечиваются организмом хозяина), так и гены, «мешающие» адаптации, например, ответственные за вирулентность или чувствительность к ксенобиотикам. Редукционная эволюция характерна и для свободноживущих микробов, в частности для морских одноклеточных цианобактерий *Prochlorococcus*, обладающих маленькими геномами (1,0–1,8 Мб) и обитающими в относительно гомогенной, обедненной органикой среде. Уменьшение размеров геномов может происходить путем утраты больших сегментов в составе плазмид, профагов, мобильных элементов, геномных островков и т. п., а также в результате инактивации отдельных генов, которые превращаются

**Ортологичные гены** – сходные по степени гомологии гены в геномах разных организмов, происходящие от общего предкового гена и передающиеся при вертикальном наследовании.

**Паралогичные гены** – сходные гены внутри одного генома. Они возникают в результате дупликаций и дают начало семействам генов с близкими функциями.

в псевдогены, элиминируемые посредством делеций (рис. 10). Ключевую роль в эрозии геномов выполняют системы рекомбинации, участвующие в геномных перестройках.

2. Функциональная реорганизация геномов осуществляется через процессы гомологичной и сайт-специфической рекомбинации, транспозиции, обеспечивающей перемещение внутри генома генов и генетических элементов, ответственных за регуляцию экспрессии генов. Такая нестабильность генома связана с наличием IS-элементов с функциями интеграз и транспозаз, участвующих в процессах транспозиции. Геномные перестройки лежат в основе «фазовых вариаций», проявляющихся в системной морфологической изменчивости бактерий, в адаптивном изменении многих признаков, определяющих направленность микроэволюционных процессов в популяциях. От различий в рекомбинационном потенциале зависят и сценарии эволюции геномов. У видов с активной системой транспозаз формирование геномов осуществляется преимущественно через геномные перестройки. Эволюция геномов с низкой рекомбинационной активностью идет по пути мутационных изменений, ответственных за генный полиморфизм.

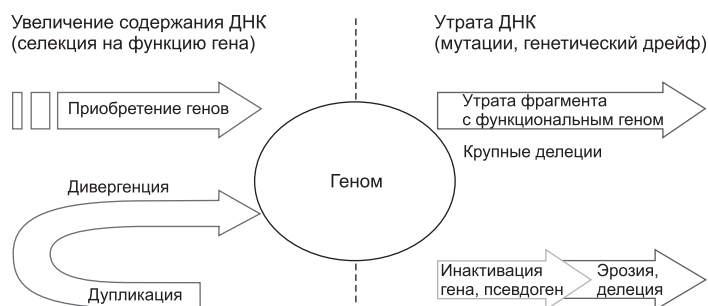
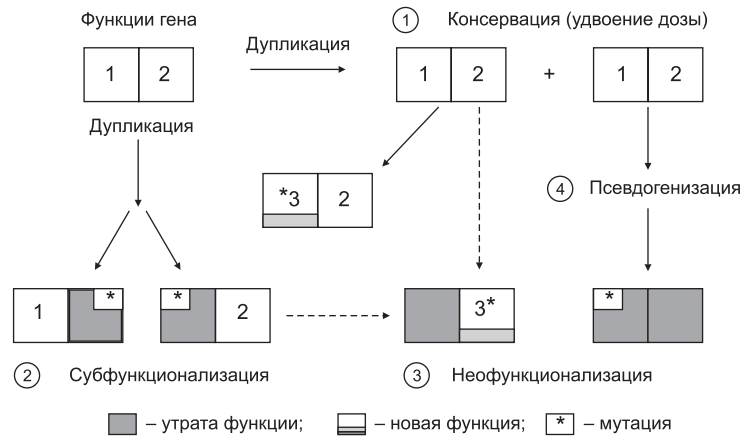


Рис. 10. Пути эволюции размера геномов прокариот.



**Рис. 11.** Образование паралогичных генов при дупликации и дивергенции бифункционального гена.

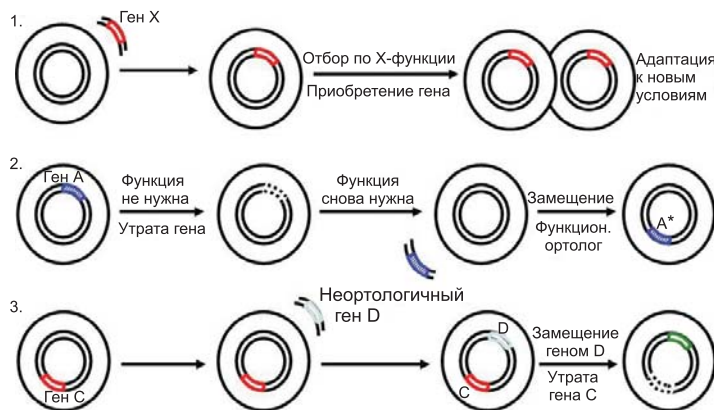
3. Рекомбинационные механизмы отвечают за увеличение размеров геномов и через образование паралогичных генов, подвергающихся функциональной дивергенции. Образование паралогичных генов увеличивает белковый репертуар, адаптивный потенциал клеток и лежит в основе процессов усложнения клеточной организации. Это происходит в результате дупликации/мультипликации генов с помощью систем неравного кроссинговера, транспозиций (Hahn, 2009).

Возможны несколько вариантов реализации судьбы паралогичных генов (рис. 11).

1. Тандемно дуплицированные гены, чья активность дает безусловные преимущества, могут долго сохраняться в неизменном виде под действием мощного стабилизирующего отбора. Такая консервация увеличивает дозу гена и поддерживает высокий уровень генного продукта, ответственного за жизненно важные признаки. Наличие идентичных копий гаран-

тирует сохранение функции, если произойдет инактивация одного из паралогов.

2. Главным же направлением в эволюционном преобразовании паралогичных генов является их трансформация с разделением функций (субфункционализация) или с образованием новой функции (неофункционализация). В первом случае у одного из паралогов сохраняются все исходные функции, тогда как у другого (а может быть, и у обоих) происходит разделение доменов (рис. 6), контролирующих разные функции: катализ, взаимодействие с лигандами и белками, связывание с ДНК и т. п. В итоге возникают два гена, кодирующих разные продукты. Структурно сходные паралоги, оказавшиеся под контролем различных промоторов, могут функционировать по-разному. Такая субфункционализация характерна для экопаралогов, которые в одной клетке экспрессируются дифференцированно в разных условиях обитания (рН, температура, соленость, наличие субстра-



**Рис. 12.** Пути горизонтального переноса генов.

тов и т. п.). Изменение структуры паралога может привести к его неофункционализации, т. е. к приобретению совсем новой функции, отсутствующей у исходного гена, послужившего источником дубликации. В результате диверсификации паралогичных генов происходила экспансия родственных семейств генов: например, в геноме у обитающей в кишечнике человека бактерии *Bacteroides thetaiotaomicron* обнаружено более 170 паралогичных генов, кодирующих гликозил-гидролазы, расщепляющие в том числе различные олиго- и полисахариды. Вероятность дубликаций при образовании паралогичных генов зависит от их локализации в геноме и принадлежности к определенной функциональной категории. Наиболее часто дубликациям подвергаются гены, контролирующие сенсорные системы адаптивного ответа, транспорта ионов, синтеза поверхностных полисахаридов, белков рестрикции–модификации, процессов репарации ДНК, аппарата подвижности клеток и др.

4. Увеличение размеров генома и генного репертуара может быть следствием горизонтального переноса генов (ГПГ) как между близкородственными таксонами, так и между филогенетически отдаленными видами и даже между бактериями и археями. Если в результате мутаций и внутригеномных перестроек происходят изменения (перераспределение) в существующем геноме, то ГПГ заключается в приобретении новых генов, генных кластеров и генетических элементов, что ведет к появлению новых признаков, дающих клетке селективные преимущества (Шестаков, 2007; Voto, 2010). ГПГ между генетически далекими партнерами осуществляется через процессы трансформации, конъюгации, трансдукции посредством механизмов сайт-направленной и «незаконной» рекомбинации, путем внедрения плазмид и мобильных элементов. Инновационную ценность представляют три типа ГПГ (рис. 12): 1) привнесение гена, не имеющего гомологов в геноме реципиента; 2) перенос сходного ортологичного гена от филогенетически далекого донора; 3) замещение геном-ксенологом резидентного гена, ответственного за сходную функцию. Полученные «чужеродные» гены можно обнаружить по (1) отличию в нуклеотидном составе и частоте встречаемости кодонов нового сегмента от ос-

тальной части генома; (2) по высокой степени сходства с геном из филогенетически далекого таксона; (3) по отличию в положении анализируемого гена на филогенетическом дереве от других генов в геноме.

В результате ГПГ организмы получают новые метаболические возможности, системы защиты от патогенов, ксенобиотиков, стрессовых воздействий, факторы оптимизации/регуляции клеточных систем. Чаще всего мишенями ГПГ являются гены, контролирующие процессы вторичного метаболизма, транспортные и сигнальные системы, подвижность клеток, вирулентность, устойчивость к ксенобиотикам, т. е. гены, имеющие большое адаптивное значение. Реже в ГПГ участвуют гены информационных систем (репликации, транскрипции и др., составляющие базовый геном). Клетка служит проточной емкостью, в геноме которой в процессе эволюции элиминируются «ненужные» гены и приобретаются и закрепляются «полезные» гены (кластеры генов), обеспечивающие приспособленность к конкретным экологическим условиям. Приобретенные гены подвергаются амелиорации – унификации G + C состава и встречаемости кодонов (за счет накопления мутаций) и становятся неотличимыми от генов исходного генома. Поэтому можно надежно отслеживать сравнительно недавние события ГПГ и судить о времени приобретения генов, соотносить процессы формирования геномов с геологическими периодами и экологическими кризисами, изучать динамику региональной биоты.

В принципе возможен горизонтальный перенос любых генов, но вероятность их интеграции в геном реципиента лимитируется многими факторами: структурами клеточной поверхности, системами рестрикции–модификации, активностью систем рекомбинации, совместимостью с путями метаболизма, возможностями отбора клеток в популяции. Поэтому лишь небольшая доля перенесенных генов фиксируется стабильно в геноме реципиента. Тем не менее общепринятыми стали представления о том, что ГПГ является мощным ускорителем эволюционного процесса возникновения новых видов/штаммов. Все большую поддержку получает концепция, согласно которой основной вклад в эволюцию прокариот, формирование

их геномов внесли именно события горизонтального переноса. В настоящее время успешно разрабатываются методические подходы, направленные на построение новой системы молекулярной филогении, которая соединяет принципы вертикальной эволюции (на основе бифуркации) и горизонтального переноса генов, отражающего пути сетевой эволюции.

### ЛИТЕРАТУРА

- Адхья С., Альперт К.-А., Буккель В. и др. Современная микробиология. Прокариоты: В 2 т. / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. Пер. с англ. М.: Мир, 2009. 1192 с.
- Бонч-Осмоловская Е.А., Равин Н.В. Анализ полных геномов – очередной этап в развитии микробиологии // Вестн. РАН. 2010. Т. 80. № 11. С. 977–984.
- Боринская С.А., Янковский Н.А. Структура прокариотических геномов // Биохимия. 1999. Т. 33. № 6. С. 941–957.
- Заварзин Г.А. Начальные этапы эволюции биосферы // Вестн. РАН. 2010. Т. 80. № 12. С. 1085–1098.
- Квитко К.В., Захаров И.А. Генетика микроорганизмов: Уч. пособие / Под ред. А.В. Пиневиича. 2-е изд. СПб.: Изд. дом СПб. ун-та, 2012. 268 с.
- Льюин Б. Гены: Пер. 9-го англ. изд. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. 896 с.
- Марданов А.В., Равин Н.В. Роль геномики в исследовании разнообразия и эволюции архей // Биохимия. 2012. Т. 77. № 8. С. 965–980.
- Смирнов Г.Б. Механизмы приобретения и потери генетической информации бактериальными геномами // Усп. соврем. биологии. 2008. Т. 28. № 1. С. 52–76.
- Шестаков С.В. Вклад метагеномики в развитие биотехнологии // Биотехнология. 2011. № 6. С. 8–22.
- Шестаков С.В. Как происходит и чем лимитируется горизонтальный перенос генов у бактерий // Экол. генетика. 2007. Т. 5. № 2. С. 12–24.
- Шестаков С.В. Метагеномика микробиома человека // Усп. соврем. биологии 2010. Т. 30. № 6. С. 531–543.
- Bentley S.D., Parkhill J. Comparative genomic structure of prokaryotes // Annu. Rev. Genet. 2004. V. 38. P. 771–791.
- Boto L. Horizontal gene transfer in evolution: facts and challenges // Proc. Roy. Soc. 2010. V. 277. P. 819–827.
- Dethlefsen L., McFall-Ngai M., Relman D.A. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease // Nature. 2007. V. 449. P. 811–818.
- Hahn M.W. Distinguishing among evolutionary models for the maintenance of gene duplication // J. Heredity. 2009. V. 100. P. 605–617.
- Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2004. V. 68. P. 669–685.

УДК 579.26:575.1:57.05

## ГЕНЕТИКА СИСТЕМНОГО КОНТРОЛЯ МИКРОБНО-РАСТИТЕЛЬНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

© 2013 г. **И.А. Тихонович**

ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии РАСХН,  
Санкт-Петербургский государственный университет, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия,  
e-mail: contact@arriam.spb.ru

Поступила в редакцию 10 мая 2013 г. Принята к публикации 19 августа 2013 г.

### ВВЕДЕНИЕ

Системный контроль является одним из фундаментальных свойств многоклеточных организмов, от которых в решающей степени зависит адаптация к меняющимся условиям среды. Л. фон Бергаланфи определил систему как «комплекс взаимодействующих компонентов» или как «совокупность элементов, находящихся в определенных отношениях друг с другом и со средой». Эти понятия до сих пор лежат в основе использования понятий «системы» (цит. по: Карпин, 2005). Простота данного определения позволяет распространять его на многие объекты окружающего мира, и в первую очередь на живые организмы, для которых системность проявляется в скоординированном изменении элементов в интересах выживания многоклеточного организма как целого.

Среди биологических исследований весьма многочисленны примеры изучения влияния системных факторов на рост и развитие организмов.

М.Е. Лобашеву (1967) принадлежит приоритет в развертывании исследований по влиянию системных факторов на протекание генетических процессов, в том числе мутагенеза. Им были предсказаны некоторые новые свойства в реализации генетической информации, например ее зависимость от систем организма. Он писал о том, что поведение контролирует последствия в организме, вызванные действием окружающей среды, в том числе и генетические. Далее он продолжает: «... таким образом организм пре-

дохраняет себя от того, что элементы системы, в данном случае клетки, начинают вести себя так, что нарушают гомеостаз всего организма». М.Е. Лобашев впервые высказал предположение о генетическом контроле системных процессов.

У животных нервная система, как и другие системы, наиболее полно осуществляет поддержание гомеостаза в организме. Однако системность сама по себе должна была эволюционно возникнуть гораздо раньше и проявить свой адаптационный потенциал, что и вызвало необходимость появления специализированных, интегрирующих организм систем. Без обеспечения функционирования элементов в интересах всей системы невозможно представить себе многоклеточный организм вообще. Трудно найти процессы, которые проходили бы вне системного контроля, поэтому расшифровка молекулярно-генетических механизмов системности является неременным условием понимания механизмов поддержания гомеостаза.

Изучение системности как генетического признака требует моделей, где могут проявляться мутации, в результате которых отдельная клетка или их сообщество выходят из-под контроля организма и начинают, например, бесконтрольно размножаться. Если это затрагивает регулярные признаки организма, то такие мутации, скорее всего, окажутся летальными. Гораздо лучше подходят в качестве модели те случаи, когда развитие организма может протекать поливариантно, в зависимости от условий среды.

Системность в данном случае проявляется в том, что организм оценивает изменение состояния окружающей среды и обеспечивает выработку адекватной адаптации. В результате мутации системная реакция организма нарушается, он выходит из гомеостаза, однако поддержать развитие мутантной особи можно в таких условиях, когда в развитии адаптации нет необходимости.

На наш взгляд, симбиоз растений с микроорганизмами обеспечивает именно такую возможность. Это связано с тем, что в процессе своего роста и развития растения должны реагировать на изменение двух важнейших характеристик окружающей среды – доступности питательных элементов и наличия фитопатогенов. Оба эти свойства носят экологически облигатный характер. Если почва содержит доступные соединения азота, то растения не нуждаются в развитии дополнительных адаптаций симбиотического происхождения. Это было показано еще в 1916 г. (Streeter, 1988). Но если азота для развития всего растения не достаточно, то необходимо обеспечить его мобилизацию из недоступных «одиноким» растениям источников. В этом уже заложена необходимость системного контроля, но она не очевидна. Теоретически возможна ситуация, когда все клетки организма испытывают дефицит питательных элементов, и те из них, которые находятся ближе к источнику, например клетки корней, начнут усваивать необходимые им элементы за счет локального развития необходимых адаптаций. Вторая возможность – это то, что организм как целое «определяет» наличие питательных элементов и в соответствии с этим перестраивает весь свой метаболизм.

Снабжение бобовых растений важнейшим питательным элементом – азотом – обеспечивается за счет их специфического взаимодействия с почвенными бактериями, в результате чего на корнях появляются образования симбиотического генезиса – клубеньки, в которых происходит фиксация молекулярного азота до доступной растениям формы, и таким образом данная микробно-растительная система (МРС) становится независимой от минерального азота почвы. Понятие МРС предполагает, что в результате функциональной интеграции генетических систем про- и эукариот возникает

новый суперорганизм, у которого появляются признаки, которыми не обладали партнеры до объединения. Клубеньковый симбиоз, особенно его недетерминированные варианты, полностью отвечает такому определению.

Развитие клубеньков подчиняется ряду требований, среди которых главными являются специфичность взаимодействия (рис. 1) и его экологическая облигатность. Первый признак подтверждает неслучайность образования надвидовой системы, но только в случае комплементарности генов узнавания партнеров. Второе требование связано с оптимизацией питания растений. Поскольку получение и применение азотных удобрений являются очень энергозатратными (не менее половины всей энергии, используемой в сельскохозяйственном производстве), то расшифровка молекулярных механизмов системных реакций по отношению к азотному статусу растений позволит разработать эффективные способы энергосбережения. Возможность проведения генетического анализа этих свойств появилась после получения мутаций по признаку, который можно определить следующим образом: способность растений определять доступность питательных элементов и контролировать степень развития симбиоза в соответствии со своими энергетическими возможностями и потребностями в элементах питания.

### СИСТЕМНЫЕ МУТАЦИИ КЛУБЕНЬКООБРАЗОВАНИЯ

Данный признак в ходе генетического анализа был обозначен как авторегуляция клубенькообразования – АРК (в английской транскрипции AON – autoregulation of nodulation). Обеспечивая поступление азота, клубеньки выступают как один из важнейших потребителей углерода. Мутации, приводящие к сверхоптимальному развитию симбиотического аппарата, вызывают замедление роста корней и побегов, хотя азотфиксация при этом не повышается. Это наблюдение было сделано еще в 50-е годы прошлого столетия одним из классиков земледелия P.S. Nutman (1946, 1984). В процессе изучения изменчивости клубенькообразования многие селекционеры приходили к выводу, что для каждого генотипа растений характерен

свой показатель массы клубеньковой ткани. При недостаточной азотфиксации (например, при использовании для инокуляции неэффективных штаммов) количество клубеньков увеличивается, но их размер уменьшается. При нерегулярной инокуляции редкие на растении клубеньки превышают по размеру обычные, сохраняя стабильность массы симбиотического аппарата.

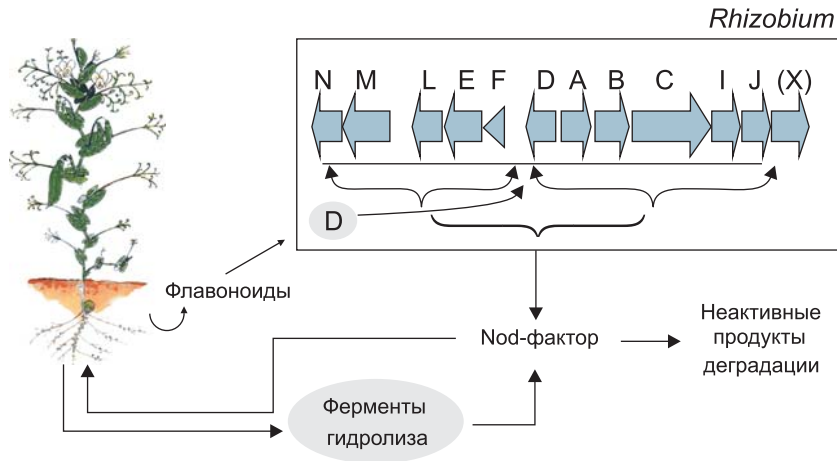
Необходимость балансировки процессов фотосинтеза и азотфиксации хорошо иллюстрируют эксперименты автора этой статьи и его коллег В.И. Романова и С.А. Четковой, выполненные в 90-х годах прошлого столетия, по изучению хлорофилльных мутантов гороха, полученных С.А. Гостимским в МГУ (Тихонович и др., 1987). Такие мутанты содержали 2 и 42 % (R-2 и R-42) от нормального количества хлорофилла и вследствие этого были остродефицитны по углероду. Изучение параметров симбиотической азотфиксации у таких мутантов показало, что активность нитрогеназы у них или не возникает вообще у 2 % мутантов, или резко снижена (42 % хлорофилла). Тем не менее процентное содержание азота в массе R-42 растений превышает таковое у нормальных горохов. У мутанта наблюдается повышенное количество транспортных форм аминокислот, которые накапливаются в клубеньках, поскольку у растений, вероятно, не достаточно углерода для связывания вновь фиксированного азота. Эти эксперименты показали, что в условиях недостаточного питания клубеньки начинают проявлять элементы паразитизма. Таким образом, должен существовать механизм, уравнивающий потребности в азоте и возможности растения по получению фотосинтатов. Знание этого механизма (или механизмов) позволит внести значительный вклад в экономию азотных удобрений при одновременном сохранении высоких урожаев.

Наследование числа клубеньков у разных генотипов было описано известным шведским генетиком гороха S. Blixt (Gelin, Blixt, 1964). Эти различия не выходят за рамки изменения числа клубеньков в 1,5–2 раза у изученных генотипов. Количество клубеньков может даже служить селекционным признаком на повышение эффективности симбиотической азотфиксации. Здесь уместно отметить работы К.К. Сидоровой (Сидорова и др., 2006).

Количественный характер спонтанных различий по числу клубеньков не позволяет прямо исследовать генетический контроль АРК, эта возможность появилась после получения суперклубеньковых мутантов.

Первые такие мутации были получены в 80-х годах прошлого столетия. Начало их подробного изучения было положено P. Gresshoff и его коллегами на сое (*Glycine max*) (Reid *et al.*, 2011). Фенотип таких мутантов характеризовался резким увеличением числа клубеньков – не менее чем на порядок по сравнению с диким типом (рис. 2), а также намного превышал границы спонтанной изменчивости по клубенькообразованию. Кроме количественной разницы, существует и качественный признак системных мутаций – образование клубеньков происходит независимо от количества азота в почве. Такие мутации были обозначены для сои как *nts* (nitrogen-tolerant symbiosis), затем по мере развития знаний по молекулярному механизму системной регуляции они были переименованы в *nark* (nodule autoregulation receptor kinase). Суперклубенькообразование описано у нескольких бобовых, и выявлены соответствующие гены, например *Lotus japonicus* (*HARI*), *Pisum sativum* (*SYM29*), *Medicago truncatula* (*SUNN: SUPER NUMERIC NODULES*) и т. д.

Изменчивость числа клубеньков свидетельствует о том, что существуют по крайней мере два уровня регуляции: один проявляется в изменчивости клубенькообразования дикого типа, в зависимости, вероятно, от механизмов, работающих на корнях; второй уровень – это общее разрешение на клубенькообразование, которое связано с азотным статусом почвы и осуществляется путем передачи сигналов на дальние расстояния. Последнее стало известным в связи с наиболее интригующим свойством мутаций суперклубенькообразования: мутантный фенотип определяется верхней частью растения. Это следовало из экспериментов по реципрокным прививкам побегов мутантных растений на корни дикого типа и наоборот (рис. 3). При этом суперклубенькообразование всегда возникало на растении, несущем мутантные побеги, независимо от генотипа корневой системы. Следующим подтверждением системности реакции АРК стали эксперименты по «расщепленному корню» (рис. 4). Суть их состоит в том, что две



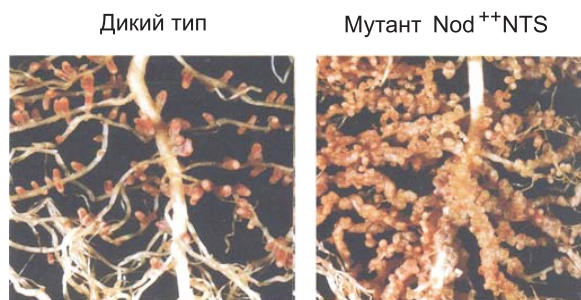
**Рис. 1.** Молекулярные механизмы сигналинга в симбиозе *Rhizobium* и бобовых, определяющие специфичность.

Сигнал в виде специфических флавоноидов, производимый в корнях бобовых, воспринимается белком podD, что вызывает экспрессию генов клубенькообразования, синтезирующих pod-фактор, структура которого отвечает особенностям рецепторной молекулы совместимого бобового растения.

части корневой системы бобового растения помещают в различные пробирки, что исключает их физический контакт. Инокуляция одной из частей вызывает образование на ней клубеньков, тогда как вторая часть остается свободной от клубенькообразования. Если теперь спустя несколько дней нанести бактерии на вторую часть, то в норме новые клубеньки не возникнут вообще или их число будет резко снижено. Но в случае мутаций суперклубенькообразования такая отстроченная инокуляция может вообще не повлиять на образование клубеньков или это влияние будет значительно ослаблено.

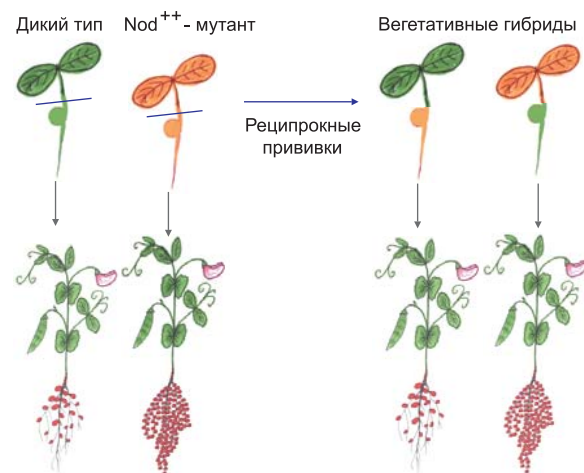
Отсроченное клубенькообразование является независимым от присутствия живых бактерий, оно наблюдается даже при добавлении очищенного pod-фактора, сигнального соединения, синтезируемого бактериями, структура которого определяет специфичность взаимодействия (рис. 5).

В системе расщепленного корня pod-фактор подавляет образование клубеньков на вторичных корнях, однако только его наличия недостаточно для полного проявления АКК.



**Рис. 2.** Нарушение системной регуляции числа клубеньков у гороха.

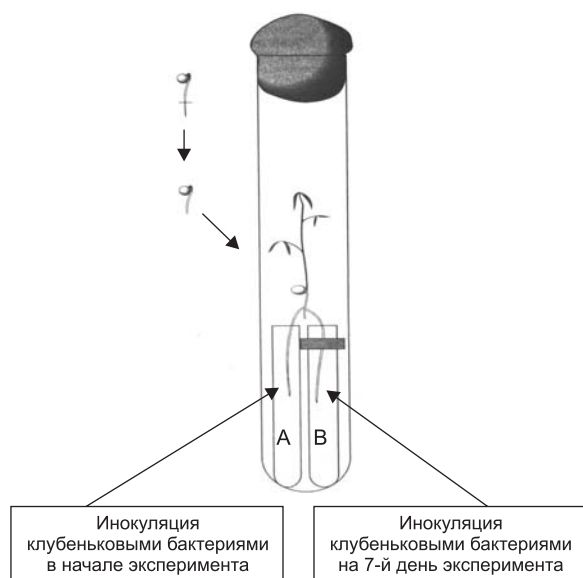
Мутации по признакам системности вызывают суперклубенькообразование у гороха. NTS (nitrate tolerant symbiosis) – устойчивость клубенькообразования к высокому содержанию азота в среде.



**Рис. 3.** Локализация сигнала, контролирующего число клубеньков.

Признак суперклубенькообразования следует за верхней частью растения в эксперименте по прививкам.





**Рис. 4.** Система «расщепленный корень» (Kosslak, Bohloul, 1984. P. 125–130).

У мутанта на корне В формируется большее количество клубеньков вследствие нарушенной авторегуляции.

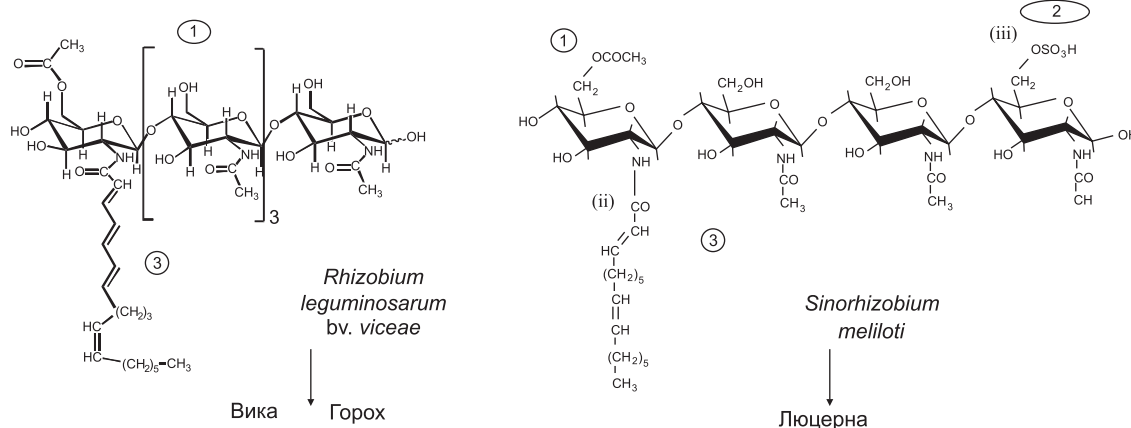
### ОБЩАЯ СХЕМА СИСТЕМНОГО СИГНАЛИНГА

Описанные выше эксперименты свидетельствовали о том, что сигнал, разрешающий клубенькообразование, генерируется в верхней части растения, а затем поступает в корневую систему, что кажется логичным, поскольку именно в верхней части происходит процесс фотосинтеза, от эффективности которого за-

висят потребность растений в азоте и их энергетический статус. Однако такое объяснение представляется очень формальным, требующим расшифровки более конкретных механизмов, тем более, что дефолиация вызывает увеличение образования клубеньков на корнях мутантов по сравнению с диким типом. Следовательно, механизм АРК нельзя трактовать как простую зависимость от количества фотосинтатов.

Наиболее логичным казалось объяснение, предложенное P. Gresshoff, предполагавшим, что в процессе развития клубеньковых примордиев генерируется сигнал, который транспортируется в верхнюю часть растения, где обрабатывается и вследствие этого рождается побеговый сигнал, который, попадая в корневую систему, подавляет дальнейшее клубенькообразование. Для расшифровки этого механизма, следовательно, надо было обнаружить оба сигнальных соединения, которых могло быть и больше, а также их рецепторы в верхушечной части и в корнях растения. Эта логика совпадает с ранее высказанным М.Е. Лобашевым положением о том, что клетка не должна выходить из-под контроля организма, что особенно актуально для такого признака, как деление. Процесс образования клубеньков как раз и представляет из себя дедифференцировку клеток кортекса с появлением вторичных меристем и новообразований.

Феномен симбиотической азотфиксации, таким образом, является интересной моделью



**Рис. 5.** Nod-факторы, определяющие специфичность к разным растениям.

Различия в структуре pod-фактора определяют специфичность взаимодействия. При наличии сходной части молекулы – хитоолигосахарида (1), в зависимости от наличия заместителя – сульфогруппы (2) и разных остатков жирных кислот (3) pod-фактор вызывает клубенькообразование у гороха или люцерны.

для изучения скоординированной реализации комплекса факторов, от которых зависит переход растений на новый источник питания путем системного регулирования.

Итак, процесс клубенькообразования запускается посредством *pod*-фактора, находится под контролем растения и зависит от условий окружающей среды. При этом происходят два процесса – проникновение бактерий в растение посредством образования инфекционных нитей и образование вторичных меристем внутри корня. Эти два процесса обеспечиваются сходными генами, работающими в различных программах. (рис. 6). Данный процесс активно контролируется в растении преимущественно за счет отрицательных связей, что подробно рассмотрено Н.А. Проворовым и Н.И. Воробьевым (2012). При этом подавляется избыточное образование инфекционных нитей и зачатков клубеньков. Последние образуются только в очень ограниченной зоне корня, сразу за корневой точкой роста (Более подробно описано в (D’Haeseleer *et al.*, 2010)).

Феномен АРК, таким образом, является примером регуляции на дальнем расстоянии. Наиболее вероятным было полагать, что такой механизм основан на контроле процесса деления клеток как части более общего процесса регуляции роста и развития растений. В дальнейшем эти предположения подтвердились при выявлении рецепторов сигнала, поступающего из корней.

Плейотропное действие мутантов по АРК сказывается на развитии корневой системы. Корнеобразование является комплексным процессом, который характеризуется большой пластичностью в ответ на изменяющиеся условия среды, обеспечивая выживание организма.

Исследователи АРК – F. de Bruijn и K. Szczygowski – обратили внимание на мутант *Lotus japonicus*, который характеризовался нарушением в развитии корней и одновременно проявлял суперклубенькообразование (Krusell *et al.*, 2002). Были описаны несколько аллелей данного гена, которые получили название *har1-1-3*. Инокуляция такого мутанта *Mesorhizobium loti* вела к почти полному подавлению роста растения и суперклубенькообразованию, при котором клубеньки практически покрывали

весь корень. Исследование процесса проникновения бактерий в корень показало, что процесс образования инфекционных нитей практически не отличается от процесса у дикого типа, однако если у нормальных растений из этих нитей образуется только 9–15 клубеньков, то у мутанта развитие большинства инфекционных нитей приводит к формированию многочисленных зон с митозами, которые затем формировали клубеньковые примордии, что вело к суперклубенькообразованию с характерной для данного мутанта устойчивостью к повышенной концентрации нитратов в среде. Неинокулированный мутант *har1* характеризовался также значительно укороченной корневой системой. При этом положение вторичных корней как у мутанта, так и у нормальных растений не различалось, однако частота вторичных корней была значительно выше у мутанта. Митотическая активность у мутанта также значительно превышала таковую у дикого типа. Было также отмечено почти двукратное укорочение корней и снижение надземной массы, что выявлялось даже без инокуляции. Подавление развития растений, связанное с инокуляцией, характерно, хотя и не в такой степени, и для других мутантов по клубенькообразованию, т. е. нарушение регуляции приводит к усилению паразитических свойств симбиотических систем. Следует предположить, что сходные гены могут быть вовлечены как в симбиотические, так и несимбиотические процессы. Графтинг (прививки) выявил, что корневые признаки также контролируются верхней частью. Значит, ген *Har-1* является элементом контроля корнеобразования на длительном расстоянии.

Это можно объяснить по-разному. Поскольку мутантный фенотип проявляется в отсутствие ризобий, то первичная роль гена *Har*, вероятно, должна быть связана с контролем корнеобразования, а дефект клубенькообразования вызван конфликтом программ, в которые вовлечен данный ген. Альтернативно продукт этого гена напрямую контролирует клубенькообразование, представляя, таким образом, один из элементов общего пути регуляции развития корней и клубеньков, связанный, кроме того, и с чувствительностью к азотному статусу почвы.

## СТРУКТУРА ГЕНОВ АРК И ПЕРЕДАЧА СИГНАЛА

Решающий прорыв в изучении молекулярно-генетического контроля системности был достигнут тогда, когда к уже упомянутым F. de Bruijn и K. Szczyglowski присоединился J. Stougaard, который к тому времени сумел наладить секвенирование симбиотических генов, в частности впервые расшифровал структуру гена *nin*. В результате позиционного клонирования удалось идентифицировать контиг, содержащий локус, последовательность нуклеотидов которого была изменена у мутанов по гену *har* (Krusell *et al.*, 2002). В состав этого гена входит один интрон, открытая рамка считывания включает 2 958 нуклеотидов. Соответствующий белок насчитывает 986 аминокислот. Данный белок относится к трансмембранным белкам с обогащенными лейцином участками (LRR), расположенными сразу за сигнальным пептидом и имеющими следующий мотив: XfXXNXLS/TGXfPXXfXXfXXLXXL (где f и X обозначают гидрофобные и варьирующие аминокислоты). Данный мотив повторяется более 20 раз. Внутриклеточная часть белка характерна для серин/треониновых киназ. Таким образом, он обладает всеми признаками рецепторного белка. Его возможная функция, как и индуктор, были вычислены на основании имеющейся базы данных. Этот ген на 53,2 % сходен со структурой гена *CLAVATA1*, включая и экзон-интронную структуру (рис. 7). Структура гена *HAR1* также на 74,8–91,5 % совпадала с генами, выявленными у сои. Подробно была изучена также структура гена гороха *SYM29*, мутации по которому имели фенотип суперклубенькообразования, сходный с мутантами у сои и лотуса. Мутанты по данному гену несли различные отклонения в его структуре как в экстрацеллюлярном, так и во внутриклеточном, киназном, доменах. Косегрегационный анализ подтвердил гипотезу о гомологичности генов *PsSYM29* и *HAR1*.

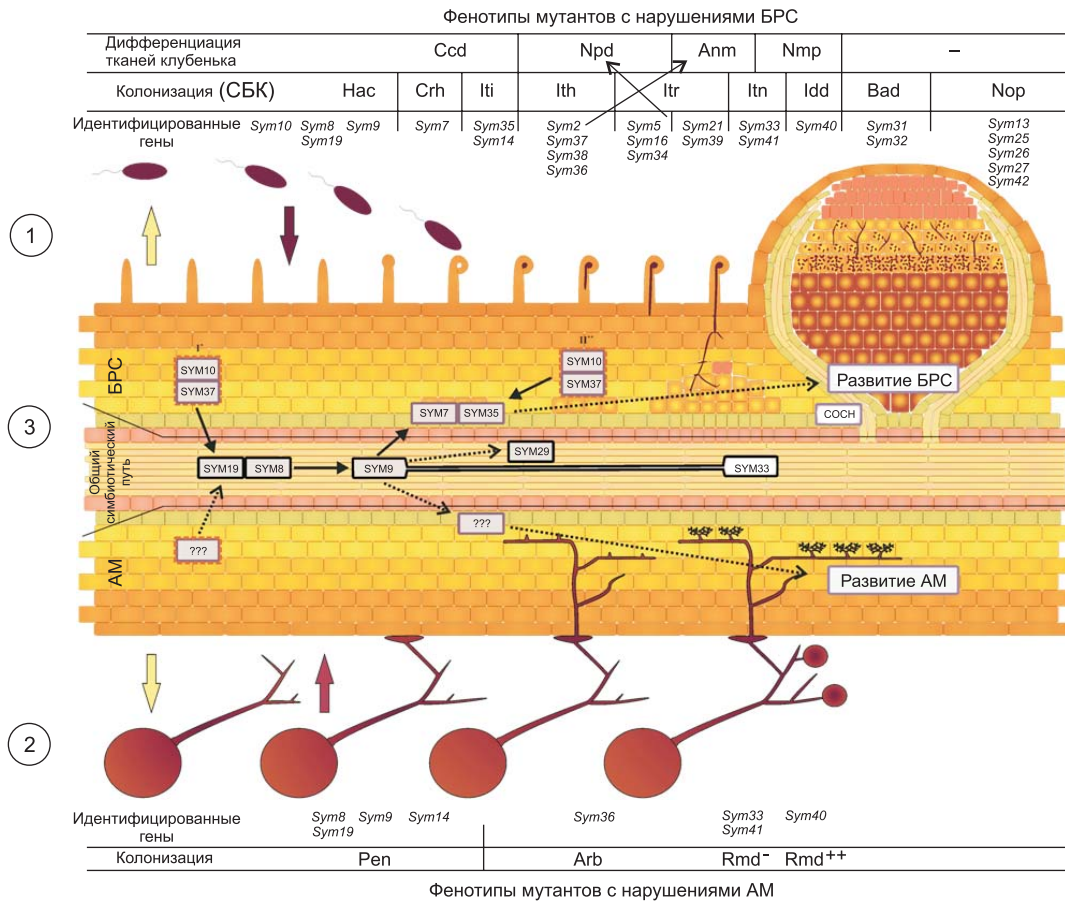
Выяснилось, что все 4 гена у разных бобовых, *har1*, *sym29*, *nark* и *sunn*, являются киназами, обогащенными лейциновыми повторами в экстрацеллюлярном домене (LRR) и могли рассматриваться как вероятные кандидаты на роль рецепторов корневого сигнала. Анализ экспрессии данных генов у гороха и лотуса

показал, что их транскрипты широко представлены в различных частях растения, а экспрессия не зависит от ризобий и наличия минерального азота. Этого и следовало ожидать, если мы предполагаем, что белки *PsSYM29* и *HAR1* являются рецепторами, однако должны были существовать сигналы, связанные как с азотным статусом почвы, так и с присутствием бактерий.

Наиболее вероятной казалась связь АРК и системы регуляции, сходной с регуляцией генов типа *CLAVATA*, где индукторы уже были известны.

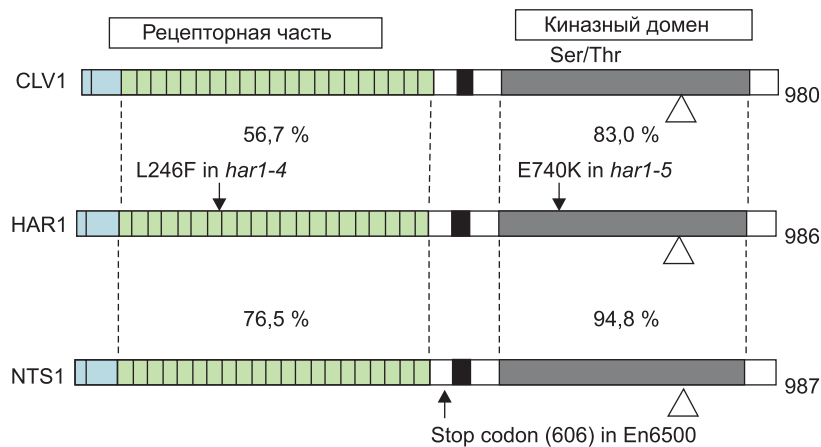
*CLAVATA1*, описанный ранее у арабидопсиса, функционирует как рецептор, узнающий сигнал в виде небольшого белка *CLAVATA3* (*CLV3*). Ранее было известно, что данный сигнал генерируется делящимися побеговыми клетками и на коротком расстоянии ингибирует деление стеблевых меристем, стимулируя переход к дифференцировке и поддерживая таким образом необходимый баланс между наличием функционирующих меристем и формированием новых органов растения. Такой же регуляторный комплекс был обнаружен и у других растений, в частности у риса, где было отмечено, что рецептор, сходный с *HAR1*, связывается белками *CLE* семейства. Это семейство вызывает большой интерес как универсальный регуляторный механизм у растений (см. обзор Додуевой и др. (2012)).

Поэтому наиболее вероятной гипотезой было то, что данный механизм функционирует и в симбиозе. Эту гипотезу одним из первых проверили исследователи из Токийского университета (Okamoto *et al.*, 2009) под руководством M. Kawaguchi. Данные были опубликованы в 2009 г. В ходе работы в геноме лотуса было выявлено до 4 десятков пептидов, обладающих сходством с *CLV3*. Из всего числа возможных кандидатов в клубеньках экспрессия трех из них усиливалась почти в 100 раз. Эти гены были помещены под сильный 35S промотор и такой конструкцией были трансформированы корни лотуса посредством *Agrobacterium*. Отобранные по наличию маркерных признаков трансформированные растения были проинокулированы. Независимый от *CLE* пептидов маркер трансформации, включенный в состав конструкции, позволял различить трансформированные и интактные корни. Сравнительный анализ таких корней



**Рис. 6.** Функционирование симбиотических генов гороха (*Pisum sativum* L.).

В процессе развития симбиогенеза реализуются три генетические программы: размещение в растении бактериальной клетки (1), образование в корнях микоризных структур (2) и закладка и образование вторичных меристем (3). Многие общие *Sym*-гены контролируют все три процесса, участвуя в разных программах, но в различной очередности, что отражено с помощью перекрещивающихся стрелок.



**Рис. 7.** Структура рецепторных киназ, контролирующих системные признаки.

Признак системности клубенькообразования контролируется геном *Har* у лотуса, *NTS1* – у сои, которые сходны между собой, а также имеют высокий процент гомологии с геном *CLAVATA1*. Треугольники и стрелки обозначают мутантные локусы. Рецепторная часть (зеленый цвет) представлена LRR повторами. Киназный домен (серый цвет) гораздо более консервативен по сравнению с рецепторной частью.

показал, что сверхэкспрессия двух из трех *LjCLE* генов достоверно ингибировала образование клубеньков на растениях дикого типа. Интересно, что угнетение клубенькообразования наблюдалось даже в нетрансформированной части корней одного и того же растения. Вероятно, ингибирующий эффект распространялся по растению системно. Для того чтобы проверить возможную связь *LjCLE* белков с *HAR1*, этими же конструкциями были трансформированы мутанты *har1*. На мутантных растениях с признаками суперклубенькообразования угнетения отмечено не было, что говорит о том, что *har1* эпистатирует над действием *LjCLE* и доказывает их связь.

Синтез *LjCLE* белков наступал в течение 3 ч после инокуляции одновременно с ранними нодулинами, что также подтвердило их связь с клубенькообразованием. Штаммы ризобий, не вырабатывающие *nod*-фактора вследствие мутации по *nodA*, были не способны запустить повышенную экспрессию *CLE* генов в клубеньках, что показало важную роль бактериальных сигналов в развитии системных реакций. Наличие большого количества мутаций по генам клубенькообразования позволило вычислить примерное время работы генов АРК. Оказалось, что у мутантов *CASTOR* и *LjCCaMK* повышенной экспрессии *LjCLE* генов не наблюдается. Однако она регистрировалась у мутанта по гену *LjNSP2*, что указывало на действие гена уже после разделения генетических программ на клубеньковую и микоризную, что также подчеркивает важность элементов пути распространения бактериального сигнала для системной регуляции.

*LjCLE* пептиды оказались участниками регуляции клубенькообразования через азотный статус почвы. Мутанты по суперклубенькообразованию, как уже подчеркивалось, устойчивы по отношению к наличию повышенных концентраций азотных соединений в почве. Экспрессия одного из трех генов, специфических для клубеньков (*LjCLE-RS2*), оказалась зависимой от нитрата калия в почве, причем она усиливалась с увеличением концентрации минерального азота при одновременном подавлении образования клубеньков. Эффект зависимости экспрессии *LjCLE-RS2* сохранялся и на растениях, мутантных по генам *CASTOR*, *LjCCaMK* и некоторым

другим, что подчеркивает независимость путей нитратного ингибирования от сигнального пути *nod*-фактора.

Рассматривая в целом роль данных генов, следует отметить, что они сходны с таковыми у других растений, которые регулируют процесс деления клеток, но имеются и серьезные отличия «клубеньковых» *CLE* пептидов. Прежде всего, следует указать на то, что они появлялись в ответ на внешние воздействия, что и должно было быть, если рассматривать их как сигналы изменений в окружающей среде. Однако до сих пор не удается прямо показать транспорт таких белков из корней к верхней части растения. Это может быть связано с тем, что они претерпевают посттрансляционные изменения и, вероятно, могут быть редуцированы до 12-членных пептидов, включающих гидроксипролиновые остатки. Такие остатки (RLSPGGPDPQHN) являются высококонсервативными, а потому, вероятно, весьма функционально значимыми. Однако такие природные или синтетические укороченные пептиды были не способны повлиять на клубенькообразование. Симбиотические пептиды имеют некоторые специфические участки, состоящие из 4 или 5 аминокислот на N'- и C'-концах соответственно. Таким образом, часть свойств *CLE* пептидов укладывается в их сигнальную специфическую роль в симбиозе, однако прямые доказательства отсутствуют. Одним из объяснений, касающихся потери чувствительности к нитратам, может быть гипотеза о том, что мутации по сигнальным молекулам нарушают их связь с рецептором, что и снимает ингибирующий эффект (Okamoto *et al.*, 2009).

Данная работа японских авторов значительно расширила наше понимание развития АРК, однако оставалось неясным, как связаны клубеньковые факторы типа *CLAVATA* с функционированием регулярных меристем организма.

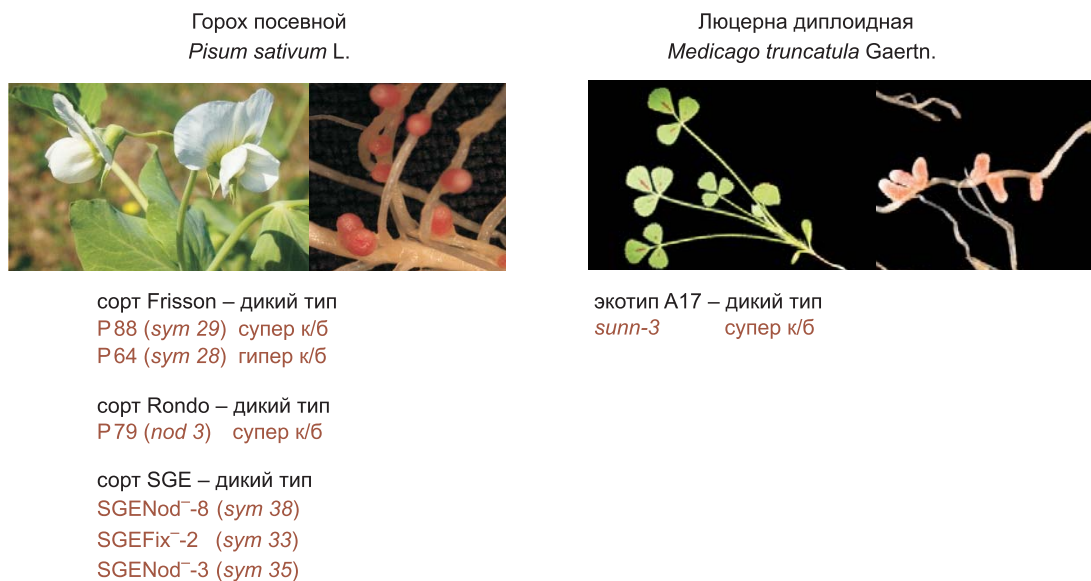
Ранее было известно, что *CLV3*, *CLV1/CLV2* сигнальный путь служит для негативного контроля активности гена *WUS*, и таким образом поддерживается размер клеточной популяции в верхушечной меристеме растения. В корневой системе в покоящемся центре функционирует связанный с геном *WUS* гомеобокс 5 (*WOX5*). Под его контролем клетки, находящиеся в покоящемся центре, по мере необходимости выходят

из данного состояния в митотический цикл, что позволяет поддерживать баланс между делящимися и дифференцирующимися популяциями. Гены *WUS* и *WOX* являются функционально идентичными, и их регуляция опосредована CLE пептидами. Отсюда следовало, что механизм АРК также может обеспечиваться по сходному пути. Нам удалось проанализировать, каким образом АРК и синтез CLE пептидов сказываются на активности генов, контролирующей развитие меристем (Osipova *et al.*, 2012). В работе были использованы неаллельные мутанты гороха по клубенькообразованию, *Pssym28*, *Pssym29*, и *Psnod3*, и проведено их сравнение с данными, полученными при изучении модельного объекта *Medicago truncatula* (рис. 8).

Ранее было обнаружено, что *WOX5* является одним из генов, активность которого индуцируется в процессе клубенькообразования, его структура а также профиль активности сходны при клубенькообразовании у различных объектов (рис. 9). Активность экспрессии *WOX5* зависела от экзогенного ауксина. Локализация активности данного гена в пределах корневой зоны показала, что она сосредоточена в пределах покоящегося центра, а также приурочена к местам развития боковых корней (рис. 10). На 3–4-й день после инокуляции в корнях люцерны активность *WOX5* была видима в районе деля-

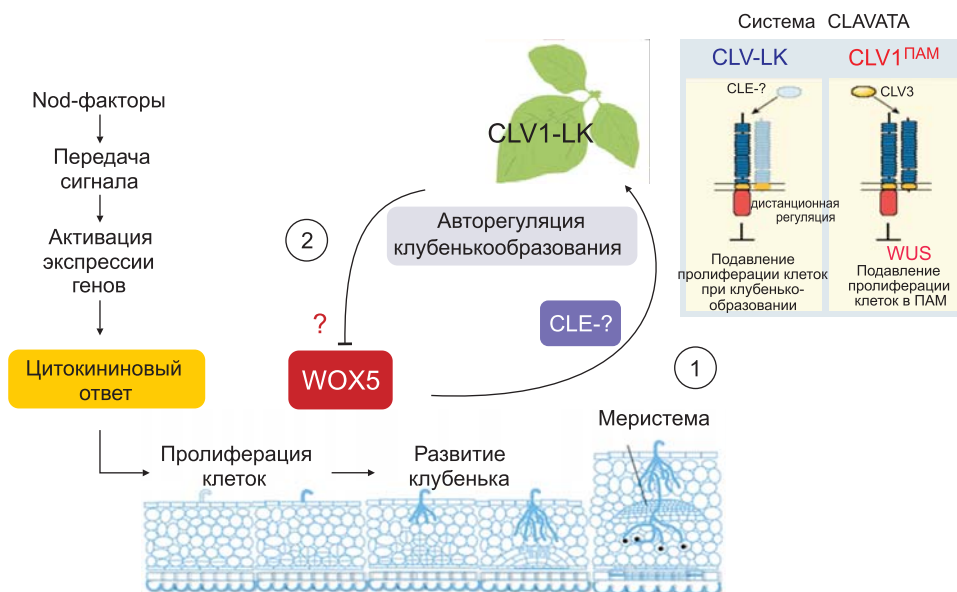
щихся клеток перидермы, эндодермы и кортекса напротив ксилемной поры, что соответствует образованию клубеньковых примордиев. Затем активность смещалась на периферию клубеньков. В общем, эти данные свидетельствовали о возможной связи *WOX5* с процессом клубенькообразования. Профиль его экспрессии также соответствовал процессу развития клубеньков (рис. 11), а у растений, неспособных образовывать клубеньки, активности *WOX5* не наблюдается. У *M. truncatula* (мутация *sun-4*) и у гороха, мутантного по генам *Sym29* и *Sym28*, профили экспрессии четко показали ее увеличение у мутантов, что свидетельствовало о связи АРК побегового комплекса и функционирования корневого гена *WOX5*. Различия в экспрессии носили также тканеспецифичный характер, экспрессия генов у АРК мутантов была выражена по всей меристематической ткани, тогда как у дикого типа она носила гораздо более ограниченный характер.

Если мутации по АРК связаны с дефектами докинга (стыковки) CLV и CLE пептидов, то изменение концентрации последних должно влиять на развитие клубеньков (подавлять) и не оказывать действия на суперклубенькообразование. Для проверки этого 4-дневные проростки были трансформированы штаммами *Agrobacterium rhizogenes*, несущими в



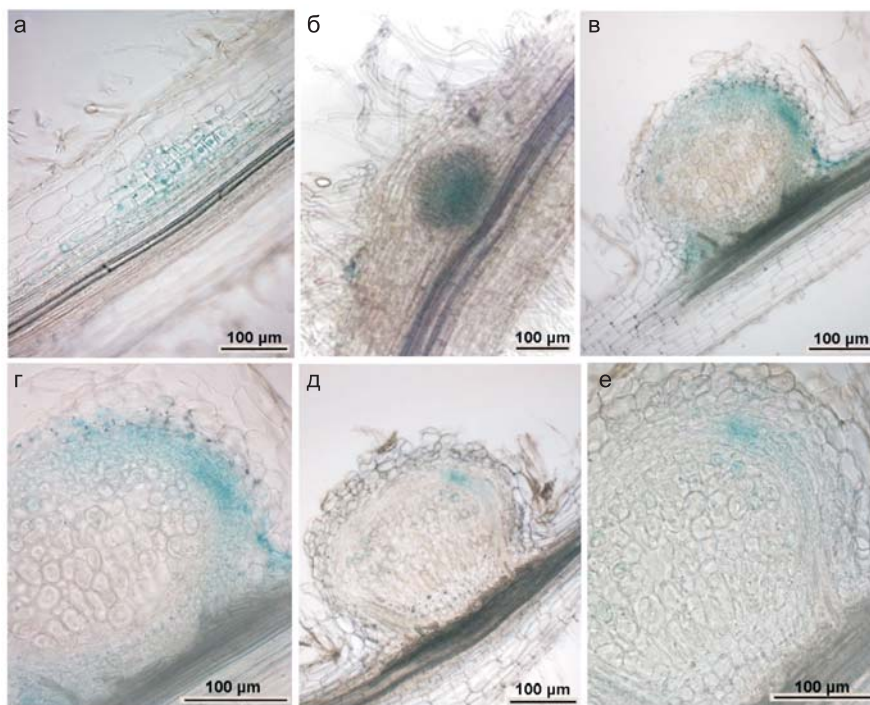
**Рис. 8.** Объекты изучения системности клубенькообразования.

Мутанты гороха *sym28*, *29*, *nod3* имеют нарушения в системном контроле, однако различаются по степени проявления признака (супер- и гиперклубенькообразование) и месту проявления мутации (корни или побеги).



**Рис. 9.** Регуляция пролиферации клеток при развитии симбиотического клубенька.

В процессе экспрессии *WOX5* индуцируется корневой сигнал (1), который, перемещаясь в побеговую часть, связывается с рецептором типа CLAVATA1. В ответ происходит выработка сигнала, подавляющего клубенькообразование (2).



**Рис. 10.** Локализация экспрессии гена *WOX5* (*pMtWOX5::GUS*) на различных этапах развития клубенька.

Экспрессия *WOX5* (синяя окраска) при клубенькообразовании совпадает с закладкой митотических тканей и следует за развитием меристем аналогично с процессами, происходящими при образовании вторичных корней.

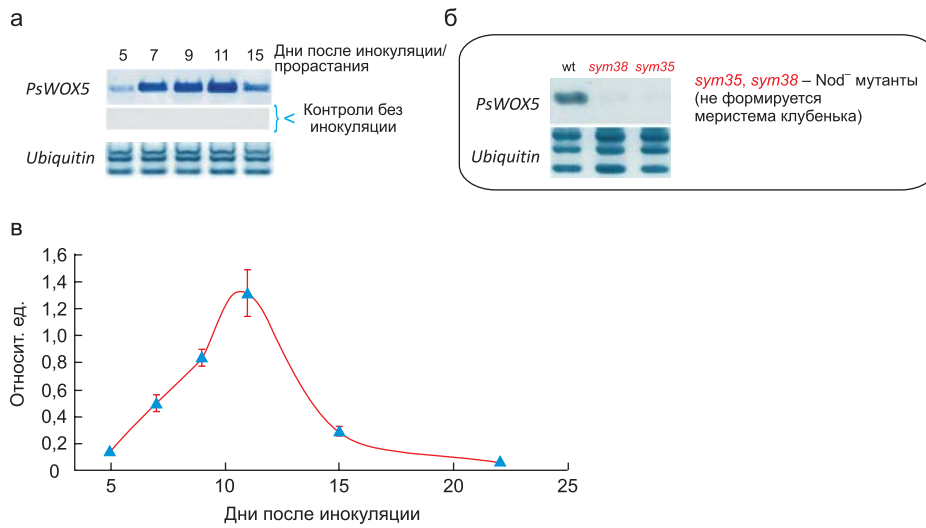
качестве контроля следующие конструкции: *35S::MtCLE13* или *35S::GUS*. Увеличение числа и экспрессии генов *MtCLE13* вызвало резкое подавление клубенькообразования у растений

дикого типа, а у мутантов такого действия не наблюдалось (рис. 12, 13).

Таким образом, нам удалось показать, что экспрессия *WOX5* в клубеньках подавляется

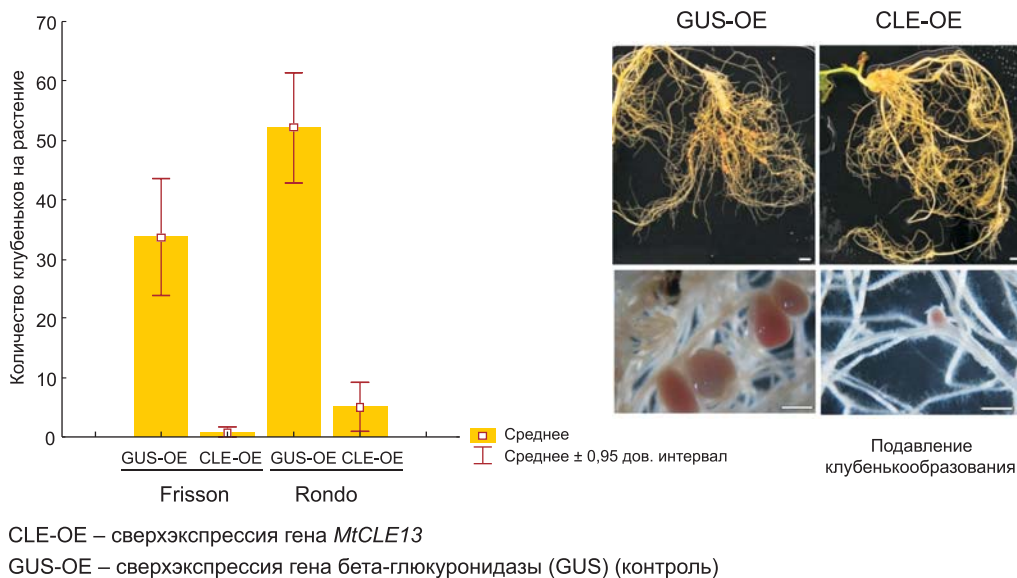
CLV комплексом, который контролирует АРК. Поэтому консервативная регуляторная система WUS/WOX-CLV задействована в контроле не только регулярных, но и клубеньковых, вторичных меристем. На примере АРК мы видим, что для образования экологически облигатных признаков, в частности при симбиотической

азотфиксации, используются уже существующие пути, регулирующие деление клеток. Путем подбора специфических для симбиоза компонентов сигнального пути вырабатывается механизм развития дополнительных функций в зависимости от требований окружающей среды. Важно отметить, что профиль экспрессии



**Рис. 11.** Анализ экспрессии гена *WOX5* при развитии клубенька.

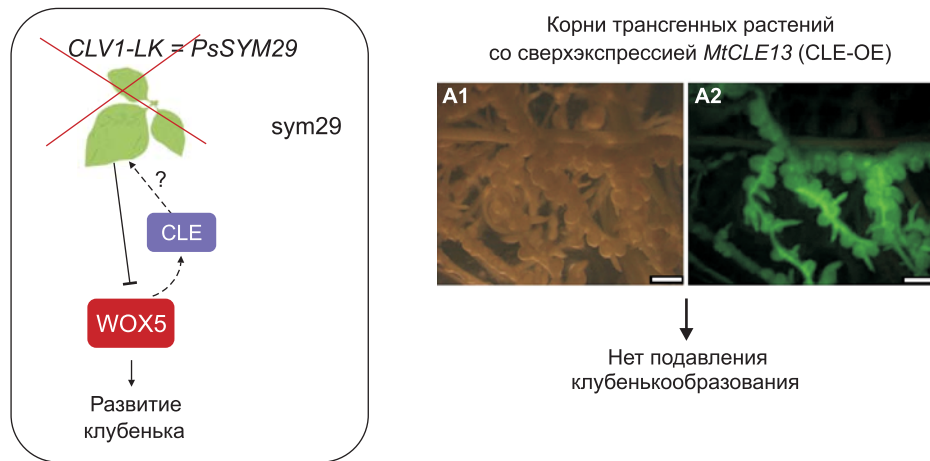
а – экспрессия *PsWOX5* у гороха дикого типа (Frisson); б – экспрессия *PsWOX5* у мутантов *sym35*, *sym38* на 7 д.п.и.; в – количественный анализ экспрессии *PsWOX5* у гороха дикого типа (Frisson) методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Экспрессия гена *WOX5* не наблюдается в отсутствие инокуляции, так же, как и у мутантов *Nod<sup>-</sup>*. Профиль его активности совпадает с интенсивностью клубенькообразования.



**Рис. 12.** Влияние сверхэкспрессии гена *MtCLE13* на количество образующихся клубеньков у гороха дикого типа.

Сверхэкспрессия сигнальных пептидов подавляет клубенькообразование в случае наличия активного рецептора (типа *CLA1*).





**Рис. 13.** Влияние сверхэкспрессии гена *MiCLE13* на количество образующихся клубеньков у гороха, мутантного по гену рецептора.

Сверхэкспрессия не влияет на суперклубенькообразование, видимо, вследствие нарушения связи CLV1-CLE.

*WOX5* в ходе симбиогенеза сходен с профилем экспрессии генов, вовлеченных в цитокининовый сигналинг. Это заставляет предположить, что данный ген может быть вовлечен в локальную регуляцию клубенькообразования путем влияния на цитокининовый сигналинг, как это имеет место при образовании регулярных меристем, например, у арабидопсиса. Если бы такое сходство существовало, то увеличение активности *WOX5* должно было бы приводить к увеличению клубенькообразования, чего не было отмечено, следовательно роль *WOX5* может и не быть связанной с цитокининовым сигналингом.

Как уже было отмечено, *WOX5* может контролировать клетки покоящегося центра, тем самым регулируя их выход в деление. Изучение системы регуляции клубенькообразования, основанной на генах типа *WOX5*, позволяет приблизиться к пониманию механизмов образования клубеньковых структур из корневых. Например, наиболее простым предположением было бы то, что в ходе развития клубеньков происходит слияние двух корневых меристем, что и дает начало клубеньку. Это предположение было высказано М. Parniske. Нами изучаются мутации, которые связывают между собой два этих процесса. Мутанты гороха по гену *Coch* (*Cochleata*) характеризуются уникальным фенотипом – формированием корня на кончике развивающегося клубенька (рис. 14). Данный ген был клонирован нами в сотрудничестве с

зарубежными коллегами из Института изучения растений (ISV-CNRS, Gif-sur-Yvette, France) с использованием мутанта *noot Medicago truncatula* по гомологичному гену. Изучение гена *Cochleata* показало, что он кодирует белковый регулятор «идентификации» вторичной клубеньковой меристемы, и его «выключение» вследствие мутации ведет к переопределению статуса меристематической ткани с «клубенькового» типа на «корневой». Таким образом, роль *Cochleata* сводится к поддержанию меристемы клубенька в качественно ином состоянии по сравнению с таковым на кончике корня, а отсутствие его экспрессии приводит к «возвращению» меристемы к «базовому», корневому состоянию. Интересно, что у мутантов *M. truncatula* по гомологичному гену *noot* в зоне меристемы клубенька наблюдаются нарушения процессов обратной связи: в отличие от нормы (дикого типа), в клубеньках *noot* повышена экспрессия гена *WOX5* и подавлена экспрессия клубеньк-специфичного гена *CLE*. Следовательно, в основе поддержания статуса клубеньковой меристемы лежит та же консервативная регуляторная система WUS/*WOX*-CLV, при этом отличие от корневой меристемы обеспечивает белковый регулятор COCHLEATA, контролирующей работу данной системы в клубеньках при участии клубеньк-специфичных CLE пептидов.

Проявление мутантного фенотипа *Cochleata* не ограничено корневой системой и затрагивает также надземную часть растения – прилистники

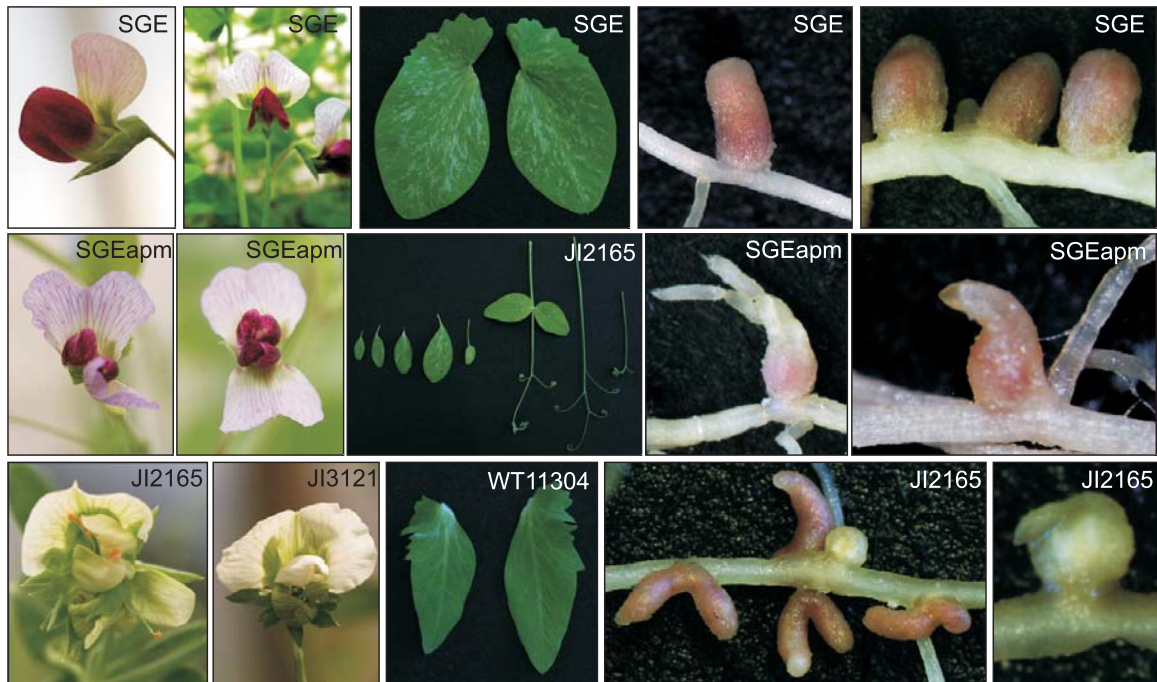


Рис. 14. Варианты проявления мутантного фенотипа *cochleata*.

Мутация определяет неспособность разграничения клубеньковой и корневой меристем. Она также плеiotропно влияет на ряд других признаков растения, связанных с функционированием меристем.

и цветки. Такое плеiotропное действие мутации в симбиотическом гене позволяет считать, что ген *Cochleata* был рекрутирован в систему контроля вторичной меристемы клубенька из более ранней системы контроля побеговых и корневых меристем типа *CLAVATA*.

Генетический анализ показал, что у арабидопсиса в рецепции сигнала, регулирующего функционирование меристемы, принимает участие третий белок – *CLAVATA2 (CLV2)*. Первоначально также предполагалось, что в ходе клубенькообразования *CLV2* и *CLV1* образуют гетеродимерный комплекс. Образование гетеродимеров, кажется, вообще характерно для сигнальных путей, например, это справедливо для рецепторного комплекса *pod*-фактора. Поэтому требовалось проверить, является ли ген *CLV2* специфическим фактором регулярных меристем или он также вовлечен и в симбиотическое взаимодействие.

Роль *CLV2* в процессе клубенькообразования была исследована группой авторов из 7 различных лабораторий мира, использовавших методологию исследований J. Stougaard (Krusell *et al.*, 2011).

Для идентификации *CLV2* гена у лотуса воспользовались геномной библиотекой трансформационно компетентных искусственных бактериальных хромосом (*transformation competent bacterial artificial chromosome -TAC*), в которой был обнаружен ген, названный (*LjClv2*). Подобный ген был обнаружен и у гороха (*PsClv2*). Оба гена были сходны между собой на 85 % и содержали открытую рамку считывания со структурой белка, состоящего соответственно из 719 и 724 аминокислот, с характерной для рецепторов LRR структурой экстрацеллюлярного домена. Они также были сходны с различными белками арабидопсиса, кукурузы и других растений, принимающих участие в контроле развития органов и тканей, а также в контроле устойчивости к фитопатогенам. Экстрацеллюлярная часть генов *LjCLV2*, *PsCLV2* и *MtCLV2* была сходна на 79–74 %, однако сходство с ортологичным геном арабидопсиса было гораздо меньшим: 37–33 %. Это показывает, что для создания новых адаптаций используются уже имеющиеся генетические структуры, которые, модифицируясь, становятся все более специфическими для новых образований, однако

сохраняют некоторые исходные функции. Это в полной мере проявляется при изучении фенотипа мутации *sym28* у гороха. Данный мутант проявляет гипернодулирующий фенотип с 2–3-кратным повышением количества клубеньков, который подчиняется стеблевому контролю. Оказалось, что ряд мутантов с увеличенным количеством клубеньков относятся именно к изменениям гена *Clv2*. При этом эффект выражен слабее и целесообразно было бы именовать данное явление гипернодуляцией в отличие от супернодуляции.

Соответствие мутации *sym28* гену *PsCLV2* убедительно доказано: были получены мутации в данном гене, которые в одном случае привели к появлению соответствующего фенотипа. Более того, в результате создания вектора *LjClv2 RNAi* удалось обеспечить сайленсинг данного гена, что привело к развитию гипернодуляции с двукратным повышением количества клубеньков, а также уменьшению транскрипционной активности до 20–30 % от дикого типа. Никаких изменений в развитии верхней части растения у таких форм выявлено не было. Это удивительно, поскольку в отличие от ранее описанного мутанта суперклубенькообразования *sym29*, у *sym28* хорошо видны изменения в габитусе растения (рис. 15): время закладки и формирования органов, а также расстояния между междоузлиями и закладкой листьев, в результате чего форми-

руется «букет» из цветков и листьев. Ботаники найдут здесь большое количество отклонений от нормального развития гороха. Вероятно, данный вариант *PsCLV2* или утрачивает обычные функции контроля регулярных меристем, или наоборот приобретает все большую специфичность по отношению к процессу клубенькообразования. Комбинация *clv2-1* и *har1-7* мутаций в одном генотипе не привела к изменению числа клубеньков, это подчеркивает, что «клубеньковый» ген *CLV2* работает раньше, чем *CLV1*, т. е. является более общим регулятором. Об этом же говорят и данные по его экспрессии – она независима от индукции симбиогенеза. Все эти данные подчеркивали независимость работы клубеньковых «клават». На это же указывала локализация этих белков в растительной клетке. Это было сделано с использованием бимолекулярной флюоресцентной комплементации. Суть метода состоит в том, что модельный объект, табак *N. benthamiana*, был трансформирован конструкциями, в которых полноразмерные кДНКовые копии *LjHar1* и *LjClv2* были слиты с *nYFP* или *cYFP*, которые по-разному светятся и позволяют отследить локализацию изучаемых белков в клетке. Инфильтрация листьев различными комбинациями взаимодействия белков не выявила. Это следовало из того, что анализируемые белки локализовались либо вместе с маркерами эндоплазматического ретикулюма (*CLV2*),



Рис. 15. Мутантный фенотип по гену *sym28* (Krussell *et al.*, 2002. P. 861–871).

а – гиперклубенькообразование у мутанта (слева) по сравнению с диким типом (сорт Frisson); б – побеги мутанта с фасцированным апикальным стеблем и укороченным расстоянием цветущих междоузлий. Можно видеть стебель мутанта в разрезе; в – то же у дикого типа; г – цветущий апекс дикого типа (увеличено); д – то же у мутанта; е – схема развития растений дикого типа (слева) и мутанта. Отмечено междоузлие, в котором появляется первый лист у дикого типа и у мутанта, а также появление двух листьев в одном междоузлии и фасциация у мутанта.

либо с маркерами плазматической мембраны (CLV1), но никак не вместе. Это доказывает то, что клубеньковое взаимодействие строится на известных механизмах или их составляющих, но отнюдь полностью к ним не сводится. Пока не существует убедительных схем, объясняющих все аспекты взаимодействия элементов молекулярного контроля АРК и клубенькообразования, тем более что такой контроль осуществляется на различных уровнях.

Важным вопросом в развитии учения о системности клубенькообразования является понимание роли гормонов в этом процессе (D'Haeseleer, 2010), в частности ауксина, который может рассматриваться как возможный кандидат на верхушечный сигнал. Стеблевая часть является основным источником данного гормона. Ауксин транспортируется в корни и может являться важным регулятором клубенькообразования. Его концентрация увеличивается у мутантов *supp* по сравнению с диким типом. В растениях дикого типа по мере развития АРК концентрация ауксина уменьшается, чего не наблюдается у мутантов. Вполне возможно, что концентрация данного гормона прямо связана с количеством клубеньков. Однако что-то определенное можно будет сказать по этому поводу только в свете изменения уровня и других гормонов, задействованных в регуляцию клеточных делений, например цитокинина и др.

Системность проявляется как общий признак развития симбиотических отношений с разными микроорганизмами. Разнообразие бактерий, живущих на листовой поверхности растений, было проанализировано у нормальных, бесклубеньковых и суперклубенькообразующих мутантов сои в условиях дефицита и достаточного количества азотных удобрений (Ikeda *et al.*, 2011). Состав популяции листовых бактерий существенно менялся у *Nod*<sup>-</sup> и *Nod*<sup>++</sup> растений под воздействием азотных удобрений, тогда как у дикого типа он был более стабилен. Удалось даже определить две ОУТ, которые были наиболее чувствительны к уровню азота.

Системному контролю подчиняется также и микоризная инфекция. Изучение в системе расщепленного корня процесса микоризации на мутанте сои *nts 1007* (Meixner Claudia *et al.*, 2005) показало, что у дикого типа наблюдается явный супрессорный эффект на образование

отстроченных микоризных структур, тогда как у мутантов такой эффект отсутствовал.

Таким образом, АРК – это универсальный механизм контроля симбиотических отношений с микрофлорой.

## КОРНЕВАЯ РЕГУЛЯЦИЯ КЛУБЕНЬКООБРАЗОВАНИЯ

Как показали данные спонтанной изменчивости, регуляция клубенькообразования осуществляется на двух уровнях: на длительном расстоянии (АРК) и на более коротком, при котором регуляция осуществляется непосредственно в корнях. Примером таких исследований может служить работа, выполненная японскими авторами на мутации у *Lotus japonicus*, названной «слишком много любви» (*too much love*). Данный мутант характеризовался гипернодуляцией, однако при исследовании прививок и системы расщепленного корня было показано, что контроль данного признака осуществляется в корневой зоне. Естественно, что наиболее интересным является ответ на вопрос, в какой степени данный уровень регуляции связан с АРК, является ли он его частью. В ходе очень простого эксперимента, в котором мутантные и нормальные растения были обработаны различными концентрациями жасмоновой кислоты, было показано, что она угнетает клубенькообразование у обеих форм пропорционально использованной концентрации. Это наблюдение указывало на то, что данный гормон не является сигнальным фактором во взаимодействии корня–побеги, кроме того, у *tml* мутантов не наблюдается повышенной экспрессии *LjCLE-RS1* системы. Таким образом, скорее всего, мы имеем дело с системой регуляции, ассоциированной с АРК.

В нашем распоряжении была мутация *nod3* у гороха, которая характеризовалась повышенным клубенькообразованием, контроль которого, как и у *tml*, осуществлялся корневой зоной.

Проверка влияния сверхэкспрессии *MtCLE1* у *Psnod3* не выявила подавления клубенькообразования. Это свидетельствует о том, что корневой контроль является частью общей системы АРК, т. е. регуляция осуществляется на двух уровнях: на длительном расстоянии и непосредственно в месте образования клубенька.

Таким образом, сигнальный путь системной реакции достаточно подробно описан на модели клубенькообразования.

### ФИЛОСОФСКОЕ ОСМЫСЛЕНИЕ СИСТЕМНОСТИ МРС

Понятия системности во всем их разнообразии описывает или стремится описать философия, в частности философия интеграции приспособительных процессов (см., напр.: Карпин, 2005). Естественно, что наиболее подробно анализируются процессы в многоклеточном животном организме, однако, как нам кажется, и растения в союзе с микроорганизмами представляют собой ценный материал для понимания роли системных процессов в адаптации. Согласно определению, система состоит из далее неделимых элементов. В качестве таких элементов в АРК можно рассматривать гены растений и бактерий, которые, интегрируясь в единую систему, создают расширенные возможности для адаптации. Также в качестве элементов могут выступать рецепторы и сигналы, способные отвечать на вызовы среды. Возмущения среды, выражающиеся в дефиците азота, например, компенсируются за счет привлечения азотфиксирующих бактерий к снабжению растений азотом. Система относительно обособлена по отношению к среде, она противостоит изменениям окружающего мира. Легко видеть, что именно МРС выполняет данную функцию.

Важным для понимания вопроса является иерархичность систем. Она прослеживается на примере дальнего и ближнего сигналинга. Методология анализа МРС вносит нечто новое в понимание высшего уровня системности. Этот уровень толкуется по-разному, в частности академик Ю.В. Наточин считает, что такой уровень представляет из себя организм, а не популяцию (цит. по: Карпин, 2005). Между этими понятиями МРС занимает некоторую промежуточную позицию. Формируясь на основе геномов про- и эукариот, микробная растительная система выступает как более высокая степень по отношению к организму, но зависит в свою очередь от популяционных процессов, протекающих среди почвенной микрофлоры. Понимание такой особенности МРС должно способствовать наиболее

эффективному использованию преимуществ данного уровня адаптации.

Еще одна особенность МРС заключается в сочетании отрицательных и положительных связей. С одной стороны, на примере формирования симбиотического аппарата мы видим, что регуляция обеспечивается в основном за счет отрицательных связей, сходных с патогенезом, но с другой стороны, после ее возникновения положительные связи начинают преобладать, особенно в сфере интеграции метаболических процессов (более подробно см. Проворов, Воробьев, 2012).

Мы рассмотрели, естественно, не все аспекты системности, но даже на этих примерах видно, что МРС не только вписывается в общую теорию системности и ее регуляции, но и вносит новые моменты, расширяющие наши представления об адаптациях живых организмов.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарит за предоставленные материалы Л.А. Лутову, М.А. Осипову, А.Ю. Борисова, Е.А. Долгих, В.А. Жукова, О.Ю. Штарк, В.А. Ворошилову, а также Н.А. Проворова за прочтение рукописи и конструктивные предложения.

### ЛИТЕРАТУРА

- Додуева И.Е., Орлова Е.В., Осипова М.А., Лутова Л.А. CLE пептиды – универсальные регуляторы развития меристем // Физиология растений. 2012. Т. 59. С. 17–31.
- Карпин В.А. Биологическая система: интеграция приспособительных процессов // Философия науки. 2005. № 3. С. 127–140.
- Лобашев М.Е. Генетика: учебник. 2-е изд. Л.: ЛГУ, 1967. 752 с.
- Проворов Н.А., Воробьев Н.И. Генетические основы эволюции растительно-микробного симбиоза / Под ред. И.А. Тихоновича. СПб.: Информ-Навигатор, 2012. 399 с.
- Сидорова К.К., Шумный В.К., Назарюк В.М. Симбиотическая азотфиксация: генетические и эколого-агрохимические аспекты. Новосибирск: Акад. изд-во «Гео», 2006. С. 134.
- Тихонович И.А., Романов В.И., Четкова С.А. и др. Азотфиксация у хлорофилльных мутантов гороха // Докл. АН СССР. 1987. № 294. 4 с.
- D'Haeseleer K., Goormachtig S., Holsters M. Legume nodule development // Developmental Biology – Biotechnological Perspectives Plant / Eds E.C. Pua, M.R. Davey. Berlin;

- Heidelberg: Springer-Verlag, 2010. V. 1. Ch. 6. DOI 10.1007/978-3-642-02301-9\_6#
- Gelin O., Blixt S. Root nodulation in peas // *Agr. Hort. Genetics*. 1964. V. 22. P. 149–159.
- Ikedo S., Anda M., Inaba Sh. *et al.* Autoregulation of nodulation interferes with impacts of nitrogen fertilization levels on leaf-associated bacterial community in soybean // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. doi:10.1128/AEM.02567-10.
- Kosslak R.M., Bohlool B.B. Suppression of nodule development of one side of a split-root system of soybeans caused by prior Inoculation of the other side // *Plant Physiol.* 1984. V. 75. P. 125–130.
- Krusell L., Madsen L.H., Sato S. *et al.* Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase // *Nature*. 2002. V. 420. P. 422–425.
- Krusell L., Sato N., Fukuhara I. *et al.* The *Clavata2* genes of pea and *Lotus japonicus* affect autoregulation of nodulation // *Plant J.* 2011. V. 65. P. 861–871.
- Meixner C., Ludwig-Muller J., Miersch O. *et al.* Lack of mycorrhizal autoregulation and phytohormonal changes in the supernodulating soybean mutant nts1007 // *Planta*. 2005. V. 222. P. 709–715.
- Nutman P.S. Genetic factors concerned in the symbiosis of clover and nodule bacteria // *Nature*. 1946. V. 157. P. 463.
- Nutman P.S. Improving nitrogen fixation in legumes by plant breeding: The relevance of host selection experiments in red clover (*Trifolium pratense* L.) and subterranean clover (*Trifolium subterraneum*) // *Plant and Soil*. 1984. V. 82. P. 285–301.
- Osipova M., Mortier V., Demchenko K.N. *et al.* *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX5* gene expression and interaction of CLE peptides with components of the systemic control add two pieces to the puzzle of autoregulation of nodulation // *Plant Physiology*. 2012. V. 158. No. 3. P. 1329–1341.
- Reid D.E., Ferguson B.J., Hayashi S. *et al.* Molecular mechanisms controlling legume autoregulation of nodulation // *Ann. Bot.* 2011. V. 108. P. 789–795.
- Okamoto S., Ohnishi E., Sato Sh. *et al.* Nod factor/nitrate-induced *CLE* genes that drive HAR1-mediated systemic regulation of nodulation // *Plant Cell Physiol.* 2009. V. 50. No. 1. P. 67–77.
- Streeter J.G. Inhibition of legume nodule formation and N<sub>2</sub> fixation by nitrate // *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 1988. V. 7. P. 1–23.

УДК 575:57.052:577

## СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ГЕНЕТИКИ РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ

© 2013 г. Л.А. Лутова

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия,  
e-mail: la.lutova@gmail.com

Поступила в редакцию 22 апреля 2013 г. Принята к публикации 1 ноября 2013 г.

### ВВЕДЕНИЕ

Генетика развития изучает процесс реализации генетической информации в ходе индивидуального развития, т. е. путь от гена к признаку. Развитие организма включает в себя такие понятия, как рост и дифференцировка. Рост – это количественные, а дифференцировка – качественные изменения в организме. Дифференцировка может осуществляться на всех уровнях организации – клеточном, тканевом, органном. Органный уровень дифференцировки часто обозначают термином «морфогенез».

Большой вклад в создание основ генетики развития внесли отечественные ученые. Несомненная роль в развитии этой науки принадлежит М.Е. Лобашеву, Н.К. Кольцову, Б.Л. Астаурову, Н.В. Тимофееву-Ресовскому. На первых этапах своего существования, в 20–50-е годы XX в., генетика развития носила описательный характер, отвечала на вопрос: как выглядит объект и носила название «феногенетика». С 60-х годов XX в. начался новый этап генетики развития, который можно обозначить как «молекулярно-генетический», позволивший отвечать на вопрос: почему так выглядит объект. Сегодня благодаря реализации геномных проектов и развитию новых методов проведения исследований, начали открываться молекулярно-генетические механизмы развития многоклеточных организмов.

**Основная задача генетики развития** – расшифровка программ развития, т. е. изучение молекулярно-генетических механизмов, лежащих в основе принципов управления онтогенезом. На сегодняшний день можно выделить 6 основных проблем генетики развития.

1. Изучение генетического контроля онтогенеза. Эта проблема занимает центральное место и является чисто генетической. Для ее решения необходимо: 1) выявить гены, контролируемые этапы и уровни онтогенеза; 2) изучить функцию выявленных генов; 3) выяснить иерархию (последовательность) действия генов с помощью анализа генов взаимодействия; построить схему (генную сеть) регуляции процессов развития.

2. Изучение генетического контроля сигнальных путей, т. е. механизмов восприятия и передачи внешних и внутренних сигналов. Проблема включает в себя изучение сигнальных путей, обеспечивающих координацию развития с условиями внешней среды, выявление генов, контролируемых компоненты сигнальных путей, и установление их функции на уровне организма с помощью физиологических и биохимических методов.

3. Изучение генетических механизмов дифференциальной регуляции действия генов в онтогенезе. Эта проблема решается генетиками вместе с молекулярными биологами. Если молекулярные биологи изучают уровни и механизмы регуляции экспрессии генов (транскрипционный, посттранскрипционный, трансляционный и пр.), то генетики выявляют гены, которые участвуют в этой регуляции, в том числе и те, которые являются компонентами сигнальных путей и опосредуют регуляцию развития факторами внешней и внутренней среды. Важной задачей является выявление регуляторных участков генов (цис-регуляторных элементов), обуславливающих специфичность экспрессии.

4. Изучение генетических механизмов, контролируемых взаимодействие клеток и тканей

(клональный анализ). Взаимодействия клеток основаны на обмене определенными индуктивными сигналами, поэтому основной задачей клонального анализа является выявление генов, контролирующих образование сигналов, а также генов, которые обеспечивают перемещение сигналов между клетками.

5. Изучение генетических основ регуляции развития растений фитогормонами. Изучение генетических механизмов действия регуляторов роста растений, в том числе фитогормонов, является одним из основных разделов генетики развития растений.

Фитогормоны являются основными эндогенными сигналами, регулирующими развитие растений. Это небольшие мобильные молекулы, легко перемещающиеся между органами растения или даже от одного растения к другому (например газообразные гормоны: этилен, эфиры жасмоновой кислоты).

Основными свойствами фитогормонов являются:

- Способность влиять на процессы жизнедеятельности и развитие растений в очень низких концентрациях.

- Наличие собственного рецептора, специфически связывающего данный фитогормон. В ряде случаев для одного фитогормона имеется несколько рецепторов.

- Наличие собственной системы передачи сигнала, работа которой активируется при связывании гормона с рецептором.

- Способность специфически влиять на экспрессию генов.

Фактически каждый этап морфогенеза растений – от ранних этапов эмбриогенеза до цветения и завязывания семян – находится под влиянием фитогормонов. В контроле большинства морфогенетических процессов фитогормоны взаимодействуют между собой, при этом они могут быть как синергистами, так и антагонистами. Тем не менее у каждого фитогормона имеется «своя область действия» – процесс, в контроле которого этот гормон играет основную роль.

6. Изучение генетических основ эволюции онтогенеза. К решению проблемы эволюционной биологии онтогенеза генетики обратились совсем недавно. Это стало возможным благодаря успехам в изучении генетики развития модельных объектов, на которых были выяв-

лены ключевые регуляторы развития растений. Открытия, сделанные на модельных объектах, создали возможность для поиска и изучения структуры и функции гомологичных генов развития у других видов растений.

В зависимости от задачи исследования к модельным объектам предъявляют разные требования, но основные являются общими для всех. Обязательными условиями являются половое размножение, диплоидность, высокая плодовитость, наличие генетических коллекций, наличие генетических и молекулярных карт, высокая способность к регенерации и трансформации, наличие транспозонов, небольшой по размеру геном. В последние десятилетия излюбленным объектом во многих лабораториях мира стала резушка Таля, или арабидопсис (*Arabidopsis thaliana*), – растение, которое обладает всеми вышеперечисленными качествами (Ежова и др., 2003).

## ОСОБЕННОСТИ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ КАК ОБЪЕКТА ГЕНЕТИКИ РАЗВИТИЯ

Особенности генетики развития растений связаны, прежде всего, с уникальными особенностями их строения и жизненной стратегии (Лутова и др., 2010).

Для развития растения крайне важную роль играют факторы внешней среды. Их множество: свет, направление вектора силы тяжести, контакт с микроорганизмами и т. д. Возможность координировать развитие с внешними воздействиями – основной фактор выживания, и это особенно актуально для растений, так как они ведут прикрепленный образ жизни. В результате этой особенности в эволюции растений выработалась собственная жизненная стратегия – сохранение высокого уровня адаптации за счет множества механизмов (программ) защиты, которые реализуются в онтогенезе. Результаты расшифрованного генома арабидопсиса свидетельствуют о том, что около 5 % всех генов вовлечены в обеспечение защитных реакций. Так, в реализации программ защиты от биотических и абиотических факторов у арабидопсиса участвуют 32 % генов, контролирующих вторичный метаболизм, среди которых, например, гены биосинтеза фитоалексинов, которые обеспечивают неспецифический иммунитет растений (рис. 1).



По сравнению с животными растение организовано просто. Так, у животных описано более 100 типов клеток, а у растений – не более 40; у животных 4 основных типа тканей, а у растений – 3 (отсутствует нервная ткань). Для растений характерно модульное строение организма: например, модуль надземной части растения включает в себя лист, междоузлие и боковую почку. Каждый такой модуль возникает как вздутие на апикальной меристеме побега на определенном расстоянии от другого модуля, его возникновение и развитие зависят от градиента концентрации фитогормонов. Совокупность модулей определяет структуру растения, поэтому растение часто сравнивают с колонией.

Еще одна особенность, отличающая развитие растений от развития животных, – отсутствие миграции клеток вследствие наличия жесткой клеточной стенки. В связи с этим для растений характерна жесткая пространственная детерминация: клетка растения в течение всего онтогенеза «остается на одном месте», и ошибку дифференцировки может компенсировать, например, за счет скорости и направления деления. У растений описано два типа деления клеток – антиклинальное (перпендикулярно поверхности) и периклинальное (параллельно поверхности); первый тип увеличивает число клеток в слое, второй – число слоев клеток в

ткани. Сочетание разных типов деления клеток, а также направленный рост клетки определяют развитие отдельных тканей и органов растения.

К особенностям развития высших растений также следует отнести морфогенез в течение всей жизни (а не только в процессе эмбриогенеза, как у животных). У животных репродуктивные и соматические органы закладываются в раннем эмбриогенезе, т. е. для них характерно наличие зародышевой линии. У растений зародышевая линия отсутствует, у них нет специализированных клеток для формирования генеративных органов. «Растянность» морфогенеза растений во времени определяется наличием меристем – образовательных тканей, которые являются резервуаром стволовых клеток.

Наибольший вклад в формирование растительного организма вносят апикальные меристемы побега и корня (ПАМ и КАМ), обеспечивающие рост надземной и подземной частей растения и формирование тканей стебля и корня, а также латеральные меристемы – прокамбий, камбий и перицикл. Поскольку способность к делению сохраняется у многих дифференцированных клеток растений, не потерявших ядро, в постэмбриональном развитии могут формироваться вторичные меристемы: пробковый камбий, меристемы клубеньков у



**Рис. 1.** Распределение генов *Arabidopsis thaliana* в соответствии с выполняемыми ими функциями (модифицировано по: (The Arabidopsis Genome Initiative ..., 2000. P. 796–815)).

бобовых и т. д. Апикальные меристемы (ПАМ и КАМ) устроены по сходному плану: они содержат пул стволовых клеток в центральной части и дифференцирующиеся клетки на периферии, которые дают начало разным типам тканей (Stahl, Simon, 2010). Необходимым структурным элементом апикальных меристем является организующий, или покоящийся, центр (ОЦ ПАМ или ПЦ КАМ) – небольшая группа клеток, которая является источником сигнала, ингибирующего дифференцировку стволовых клеток (рис. 2).

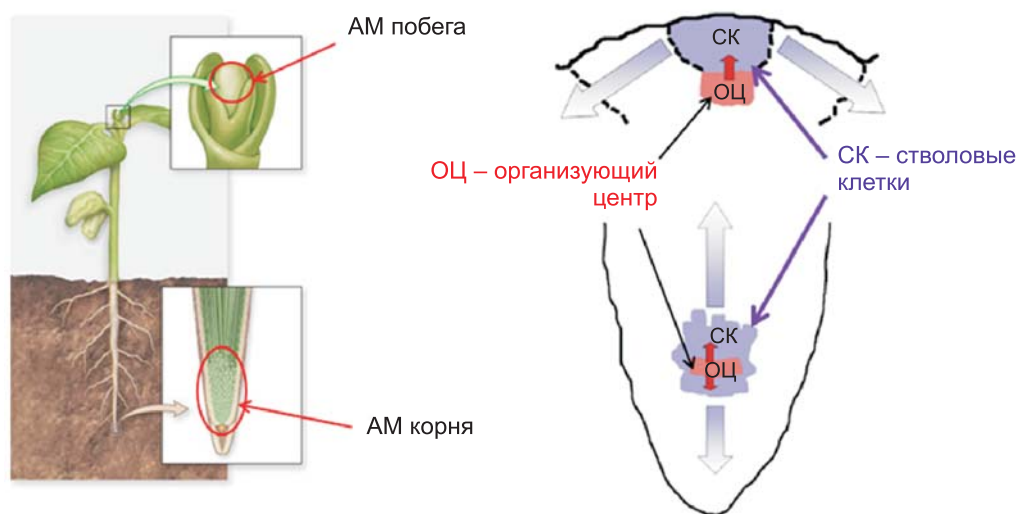
Безусловно, важной особенностью растений является тотипотентность клеток – т. е. способность воссоздать новый организм практически из любой клетки. Тотипотентность растительных клеток – фактор, который определяет способность к регенерации, а потому лежит в основе методов генной и клеточной инженерии. Способность к регенерации является основой вегетативного размножения растений, а также важным фактором адаптационного потенциала, обеспечивающего выживание растений в стрессовых условиях.

Таким образом, уникальность строения растений, их жизненная стратегия предполагают и особенности регуляции развития растений.

## ОСНОВНЫЕ ГРУППЫ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ РАСТЕНИЙ

Наиболее важные для развития организмов гены называют генами развития. К ним прежде всего относят гены, кодирующие транскрипционные факторы. Эти гены являются эволюционно консервативными. В настоящее время в геноме арабидопсиса идентифицировано около 2000 генов, кодирующих транскрипционные факторы (ТФ), что составляет около 7 % от общего числа генов. Транскрипционные факторы объединяют в группы (семейства) на основании сходства ДНК-связывающих доменов, а также наличия других консервативных доменов. Менее половины семейств ТФ растений являются уникальными для растений, большинство из них встречается и у представителей других царств эукариот, например у арабидопсиса выявлено около 150 уникальных транскрипционных факторов (Shiu *et al.*, 2005). Среди изученных ТФ растений ключевую роль в развитии играют семейства ТФ, содержащие MADS-домен, гомеодомен, GRAS-домен и т. д. Остановимся на характеристике наиболее значимых ТФ растений.

**Транскрипционные факторы с MADS-доменом.** ТФ с MADS-доменом являются важными регуляторными молекулами у растений, животных, грибов. Название MADS произошло



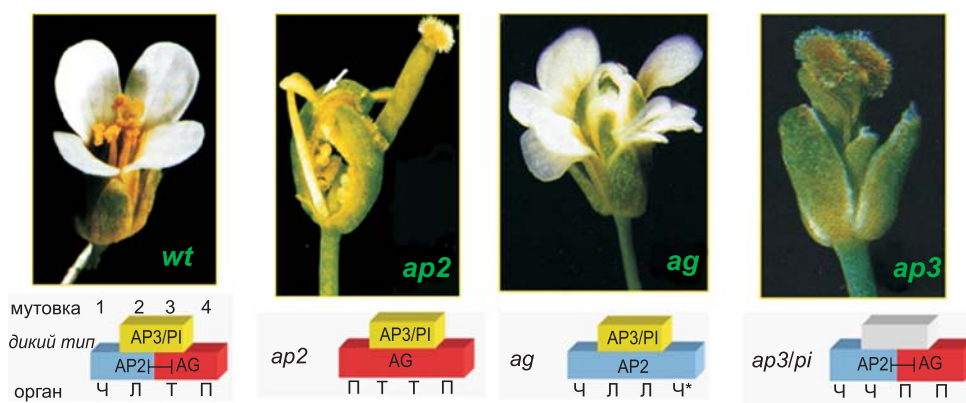
**Рис. 2.** Стволовые клетки и организующие центры в апикальных меристемах (АМ) побега и корня (модифицировано по: (Stahl, Simon, 2010. P. 53–58)).

от MCM1, AGAMOUS, DEFICIENS и SRF, типичных представителей ТФ этой группы у эукариот (Schwarz-Sommer *et al.*, 1990). В геноме арабидопсиса существует около 100 генов с MADS-боксом, многие из которых контролируют различные аспекты развития. Экспрессия генов с MADS-боксом регулируется специфичным образом во времени и пространстве с участием других генов или сигнальных событий. Наиболее изучена роль ТФ с MADS-доменом в развитии цветка. На модели «ABC» было показано, что взаимодействия между различными ТФ с MADS-доменом определяют идентичность органов цветка (Smaczniak *et al.*, 2012). Мутации в генах растений, кодирующих ТФ с MADS-доменом, приводят к гомеозисным заменам органов цветка (рис. 3).

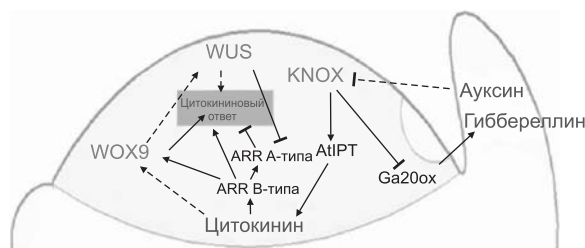
**Транскрипционные факторы с гомеодоменом.** ТФ с гомеодоменом играют важную роль в регуляции развития эукариот. У животных гены, кодирующие ТФ с гомеодоменом, называют гомеозисными (гомеотическими), поскольку мутации в их генах приводят к гомеозису: первым изученным примером гомеозисной мутации является мутация дрозофилы *antennapedia*, при которой происходит развитие ног на месте антенн (Postlethwait, Schneiderman, 1971). У растений ТФ с гомеодоменом также играют важную роль в развитии, но, в отличие от животных, мутации в генах растений, кодирующих ТФ с гомеодоменом, не приводят к гомеозису. У растений типичными представителями семейства гомеодомен-содержащих ТФ являются ТФ семейства KNOX и WOX, функции которых заключаются

в регуляции развития и поддержании активности меристем (Hamant, Pautot, 2010) (рис. 4).

ТФ KNOX относятся к гомеодомен-содержащим ТФ надсемейства TALE (Three Amino Acid Loop Extension). В отличие от типичного гомеодомена, состоящего из 60 аминокислот, гомеодомены ТФ TALE содержат 3 дополнительные аминокислоты между первой и второй спиралью. ТФ TALE широко распространены и у животных и представлены у них 4 группами: PBC/PBX, MEIS, TGIF, IRO. У грибов также обнаружены белки TALE (в частности белки M-ATYP, определяющие тип спаривания) (Burglin, 1998). У растений надсемейство TALE представлено главным образом двумя классами KNOX (KNOTTED1-like homeobox) генов: KNOX I и KNOX II. Помимо консервативного ДНК-связывающего гомеодомена (HD) продукты *KNOX* генов содержат KNOX домен, необходимый для белок-белковых взаимодействий. Также в ТФ KNOX выделяют домен GSE (обогащенный аминокислотами Gly (G), Ser (S), Glu(E)), необходимый для регуляции стабильности белка, и домен ELK (обогащенный аминокислотами Glu (E), Leu (L), Lys(K)) с неизвестной функцией (Hay, Tsiantis, 2009). Одним из первых идентифицированных генов из данного семейства у растений был ген *KNOTTED1* кукурузы, относящийся к классу I KNOX генов (Kerstetter *et al.*, 1994). По гомологии с ним в геноме арабидопсиса выявлено несколько KNOX генов, получивших название KNAT (Knotted1-like of *Arabidopsis thaliana*) (Reiser *et al.*, 2000).



**Рис. 3.** Фенотипы мутантов арабидопсиса по генам, кодирующим транскрипционные факторы с MADS-доменом (по: (Krizek, Fletcher, 2005. P. 688–698)).



**Рис. 4.** Взаимодействие ТФ KNOX и WOX с фитогормонами в развитии АМ побега (по: (Лутова и др., 2010)).

ТФ семейства *WOX* представляют собой гомеодомен-содержащие ТФ с атипичным гомеодоменом, состоящим из 66 аминокислотных остатков. Наиболее хорошо охарактеризованными представителями ТФ *WOX* являются *WUSCHEL* (*WUS*) и *WOX5* (*WUSCHEL* related homeobox 5), регулирующие активность ПАМ и КАМ соответственно. У арабидопсиса семейство ТФ *WOX* включает 14 представителей (Van der Graaff *et al.*, 2009).

ТФ семейства *GRAS* содержат консервативный *GRAS*-домен, название которого произошло от первых букв типичных представителей ТФ этой группы: *GAI*, *RGA*, *SCR*. К семейству ТФ *GRAS* относятся белки *DELLA*, которые регулируют передачу сигнала гиббереллинов, ТФ *SCARECROW* (*SCR*) и *SHORTROOT* (*SHR*), контролирующие дифференцировку клеток эндодермы, и ТФ *HAIRY MERISTEM* (*HAM*), блокирующий дифференцировку клеток апикальной меристемы побега (Hirsch, Oldroyd, 2009). ТФ *GRAS* бобовых растений *MtNSP1* и *MtNSP2*, *PsSYM7* играют важную роль в развитии бобово-ризобияльного симбиоза и являются ключевыми регуляторами, индуцирующими экспрессию генов растений в ответ на сигналы, выделяемые симбиотическими почвенными бактериями ризобиями (липохитоолигосахариды *Nod*-факторы) (Heckmann *et al.*, 2006).

Итак, центральная роль в реализации программы развития, под которой понимается строго упорядоченная во времени и пространстве скоординированная экспрессия множества генов, отводится транскрипционным факторам. Каждый ТФ контролирует экспрессию существенного количества генов-мишеней.

## МЕРИСТЕМЫ РАСТЕНИЙ, СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, ТФ, РЕГУЛИРУЮЩИЕ АКТИВНОСТЬ МЕРИСТЕМ, И ИХ РОЛЬ В ЭВОЛЮЦИИ РАСТЕНИЙ

В ходе развития способность к клеточным делениям сохраняется почти у всех живых зрелых тканей растений, которые, будучи тотипотентными, способны дать начало отдельному растению. При этом активная пролиферация характерна для особой популяции клеток – меристем (от греч. *meristos* – делимый). Первичными меристемами, закладывающимися в эмбриогенезе, являются апикальные меристемы (АМ) корня и побега. Из АМ побега (ПАМ) формируются надземные органы растений – стебель и листья; затем по мере развития растений ПАМ дает начало меристемам соцветия и цветка. В результате делений и дифференцировки клеток-инициалей АМ корня (КАМ) образуются основные ткани корня: эпидерма, первичная кора, проводящие ткани, а также корневой чехлик; закладка боковых корней у большинства растений происходит вне КАМ.

Для того чтобы АМ побега или корня могла постоянно продуцировать новые ткани, она должна обладать двумя основными свойствами: 1) постоянно поддерживать недифференцированное состояние и обеспечивать постоянство развития; 2) продуцировать клетки, способные к дифференцировке и формированию новых органов. Источником специализированных клеток является пул стволовых клеток меристемы, сохраняющих недифференцированный статус в центральной зоне АМ и претерпевающих дифференцировку на ее периферии, где происходит закладка органов и тканей. Способность стволовых клеток постоянно поддерживать недифференцированное состояние зависит от особой популяции клеток – организующего центра (ОЦ). Свойством клеток ОЦ является способность поддерживать собственную популяцию и подавлять дифференцировку прилежащих стволовых клеток за счет определенных сигнальных молекул, продуцируемых клетками ОЦ.

Наличие стволовых клеток, способных к возобновлению, позволяет растениям формировать новые органы в течение всего жизненного

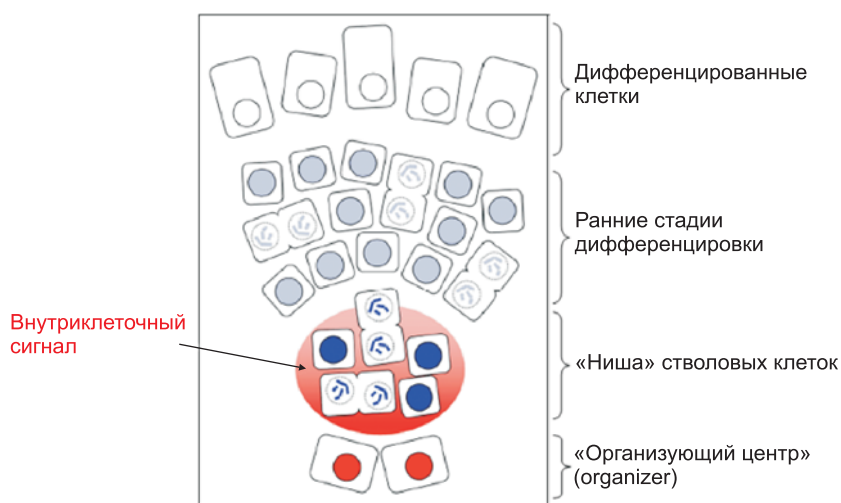
цикла. Это отличает их от животных. У животных тотипотентными являются лишь клетки, возникающие после первых делений дробления, далее формируется бластоциста, клетки которой уже не равноценны: из отдельной клетки бластоцисты не может сформироваться нормальный зародыш. Клетки бластоцисты дают начало всем типам клеток организма, их называют плюрипотентными. По мере развития стволовые клетки специализируются и становятся способными участвовать в образовании только определенного типа клеток (такие клетки называют мультипотентными).

Несмотря на существующие различия свойств стволовых клеток, у растений и животных можно выделить общие принципы их регуляции (Sablowski, 2004). Стволовые клетки растений и животных локализируются в так называемой «нише стволовых клеток» – локальном микроокружении, поставляющем факторы, необходимые для их поддержания. Дифференцировка стволовых клеток в нише подавляется в результате действия факторов, продуцируемых клетками организующего центра. Как правило, клетки ОЦ характеризуются большей длительностью клеточного цикла, т. е. делятся с меньшей скоростью. По мере деления дочерние клетки удаляются от ОЦ, оказываясь вне зоны действия сигналов, продуцируемых этим центром, и претерпевают дифференцировку (рис. 5). Таким образом, принцип организации стволовых клеток является общим

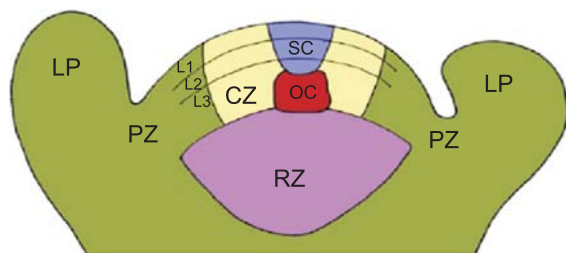
для растений и животных, но молекулярные механизмы поддержания стволовых клеток у них принципиально различны.

АМ побега расположена на верхушке побега и прикрыта зачатками молодых листьев, АМ корня находится на кончике главного и боковых корней и отделяется от внешней среды корневым чехликом (колумеллой). В ПАМ выделяют различные морфофункциональные зоны (рис. 6). Клетки центральной зоны ПАМ (ЦЗ) делятся медленно и с постоянной скоростью, обеспечивая постоянство развития. Именно в этой зоне сосредоточены стволовые клетки ПАМ и ОЦ. ЦЗ окружена клетками периферической зоны (ПЗ), способными к дифференцировке: в результате делений клеток ПЗ формируются листовые примордии и пазушные почки. Клетки подстилающей зоны дают начало внутренним тканям побега. В КАМ ОЦ (который получил название покоящегося центра) окружен стволовыми клетками, так называемыми клетками-инициалами. Они дают начало дистальным (колумелла), латеральным (латеральная часть корневого чехлика и эпидерма) и проксимальным (кора, эндодерма и стела) тканям корня.

ТФ, контролирующие активность меристем, относятся к разным семействам. Среди них есть ТФ, встречающиеся у других групп эукариот, как, например, ТФ с гомеодоменом (семейства KNOX и WOX). Гомеодомен-содержащие ТФ группы KNOX I необходимы для закладки ПАМ в эмбриогенезе, ее дальнейшего развития и функ-



**Рис. 5.** Общий принцип организации «ниши» стволовых клеток (модифицировано по: (Sablowski, 2004. P. 605–611)).



**Рис. 6.** Строение АМ побега (по: (Dodsworth, 2009. Р. 1–9)).

CZ (central zone) – центральная, PZ (peripheral zone) – периферическая, RZ – подстилающая зона.

ционирования. В клетках формирующегося листового примordia экспрессия генов *KNOX* подавляется. Интересно отметить, что подавление экспрессии *KNOX* генов I класса в листовом примордии характерно для арабидопсиса – растения, имеющего простые листья, но не для растений со сложными листьями, например томата (Janssen *et al.*, 1998). Изменение морфологии листа в эволюции растений связано с изменением характера экспрессии *KNOX* генов в апексе побега.

Аналогичная ситуация обнаружена и для других генов, кодирующих ТФ. Характер экспрессии генов-ортологов *LFY/FLO* (ген *LFY* контролирует переход к цветению у арабидопсиса, а *FLO* – у львиного зева) определяет тип соцветия – открытое или закрытое. Так, изменение места экспрессии гена *LFY* у трансгенных растений *35S::LFY*, где *LFY* экспрессируется в вегетативной ПАМ, приводит к ее превращению во флоральную меристему и формированию терминальных цветков (закрытие соцветия) (Krizek, Fletcher, 2005). Мутации в генах ТФ, контролирующих развитие органов цветка (*MADS*-гены), изменяющие место их экспрессии, приводят к формированию цветков разной структуры и многообразию форм цветка у растений (Theissen, Melzer, 2007).

Таким образом, анализ экспрессии генов ТФ у разных видов растений позволяет заключить, что изменение характера экспрессии основных регуляторных генов приводит к кардинальным изменениям морфологии и могло лежать в основе морфологической эволюции растений.

Несмотря на длительное изучение функций генов *KNOX* в развитии ПАМ, было идентифицировано очень небольшое количество генов-мишеней, экспрессия которых регулируется с помощью ТФ *KNOX*. Идентифицированные на сегодняшний день гены-мишени ТФ *KNOX* контролируют биосинтез двух групп гормонов, выполняющих противоположные функции в развитии ПАМ – цитокининов и гиббереллинов. ТФ *KNOX* напрямую репрессируют транскрипцию генов, кодирующих GA-2-оксидазы и GA-20-оксидазы, – ферменты, катализирующие синтез активных гиббереллинов (Sakamoto *et al.*, 2001). Напротив, экспрессия генов *IPT*, контролирующих первый этап биосинтеза цитокининов, активируется ТФ *KNOX* (Jasinsky *et al.*, 2005). Поскольку в контроле развития ПАМ цитокинины действуют в одном направлении с ТФ *KNOX*, стимулируя пролиферацию недифференцированных клеток ПАМ, а гиббереллины ингибируют пролиферацию клеток и запускают их дифференцировку, считается, что *KNOX*-зависимая регуляция биосинтеза этих гормонов, по-видимому, является основной функцией ТФ *KNOX* в развитии ПАМ (рис. 4).

Гены семейства *WOX*, кодирующие ТФ с гомеодоменом, являются ключевыми регуляторами пролиферации и дифференцировки клеток в различных типах меристем растений. Так, ген *WUS* функционирует в ПАМ, а паралог этого гена – *WOX5* – активен в КАМ (Sarkar *et al.*, 2007). Эти гены экспрессируются в ОЦ апикальных меристем, и их функция – поддержание ОЦ и подавление дифференцировки стволовых клеток. В ПАМ ТФ *WUS* напрямую подавляет экспрессию генов RR A-типа – репрессоров передачи сигнала цитокининов, таким образом локально усиливая цитокининовый ответ (Leibfried *et al.*, 2005).

В то же время ТФ *WUS* взаимодействует с системой *CLAVATA*, включающей в себя рецепторы *CLV1* и *CLV2/CRN*, с которыми связывается пептидный лиганд *CLV3* – член семейства *CLE*-пептидов, которые в настоящее время рассматриваются как новый класс пептидных гормонов растений. Связывание *CLV3* запускает сигнальный каскад, приводящий к подавлению экспрессии гена *WUS* в ОЦ и, как следствие, – к ограничению размера пула стволовых клеток в ПАМ. Взаимодействие *WUS*-

CLAVATA обеспечивает регуляцию тонкого баланса пролиферации и дифференцировки клеток в меристеме (Schoof *et al.*, 2000).

Ген *CLV1* кодирует трансмембранную рецепторную киназу и экспрессируется в клетках внутреннего слоя ЦЗ ПАМ (Clark *et al.*, 1996). Ген *CLV2* кодирует белок, имеющий значительное сходство с *CLV1*, но без цитоплазматического киназного домена; для связывания лиганда *CLV2* образует гетеродимер с *CLV1*-подобной киназой *CORYNE* (*CRN*), лишенной экстраклеточного рецепторного домена (Muller *et al.*, 2008). Ген *CLV3* экспрессируется во внешних слоях клеток ЦЗ ПАМ (рис. 7, а).

Продуктом гена *CLV3* является небольшой секреторный пептид из 96 аминокислот. Связывание белка *CLV3* с рецепторами *CLV1* и *CLV2/CRN* приводит к запуску малоизученного сигнального каскада, негативно регулирующего экспрессию гена *WUS*. ТФ *WUS* позитивно регулирует экспрессию гена *CLV3*, напрямую связываясь с его промотором (Muller *et al.*, 2008).

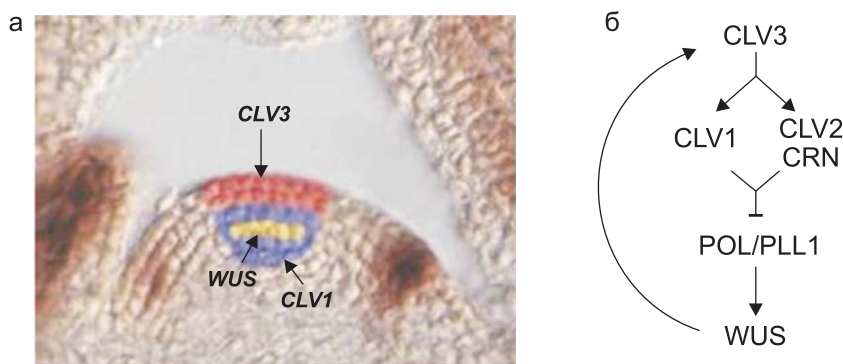
Семейство пептидов *CLE* (*CLV3/ESR*) получило свое название по первым выявленным представителям: вышеупомянутому секреторному пептиду *CLV3* арабидопсиса и белкам с неизвестной функцией *ENDOSPERM SURROUNDING REGION* (*ESR*) кукурузы. *CLE*-пептиды широко распространены у всех наземных растений: так, в геноме арабидопсиса выявлено 32 гена, кодирующих пептиды этого класса (Ito *et al.*, 2006). Семейство *CLE*-пептидов арабидопсиса делится на две группы в соответствии с их влиянием на дифференцировку стволовых клеток в меристемах (Whitford *et al.*, 2008). К группе А у арабидопсиса относятся *CLV3*, *CLE40* и другие *CLE*-пептиды, подавляющие пролиферацию и стимулирующие дифференцировку стволовых клеток в ПАМ и КАМ. В противоположность им *CLE*-пептиды группы В, такие как *CLE41*, *42* и *44*, действующие в камбии, способствуют пролиферации и поддержанию недифференцированного статуса стволовых клеток.

Таким образом, в системе *WUS-CLAVATA* работает отрицательная обратная связь: экспрессия *WUS* в ОЦ стимулирует поддержание стволовых клеток в верхних слоях меристемы и активирует в них экспрессию *CLV3*; в свою очередь секреторный пептид *CLV3* перемещается в нижележащие слои меристемы, где связывается с *CLV1*-подобными рецепторами и запускает каскад, подавляющий экспрессию *WUS* (рис. 8, б).

Таким образом, в системе *WUS-CLAVATA* работает отрицательная обратная связь: экспрессия *WUS* в ОЦ стимулирует поддержание стволовых клеток в верхних слоях меристемы и активирует в них экспрессию *CLV3*; в свою очередь секреторный пептид *CLV3* перемещается в нижележащие слои меристемы, где связывается с *CLV1*-подобными рецепторами и запускает каскад, подавляющий экспрессию *WUS* (рис. 8, б).

#### ИЗУЧЕНИЕ НЕРЕГУЛЯРНЫХ МЕРИСТЕМ: ПОИСК УНИВЕРСАЛЬНЫХ МЕХАНИЗМОВ

Одним из интересных открытий последнего десятилетия является обнаружение систем, сходных с системой *CLAVATA*, в других типах меристем: КАМ, камбии, меристемах клубеньков у бобовых, а также в аномальных меристемоподобных структурах, развивающихся при взаимодействии с патогенами (Додуева и др., 2012).



**Рис. 7.** Работа системы *WUS-CLAVATA* в апикальной меристеме побега (по: (Bowman, Eshed, 2000. P. 110–115)).

а – экспрессия генов *CLV1*, *CLV3* и *WUS* в апикальной меристеме побега; б – схема сигнального каскада, индуцируемого *CLV3*.

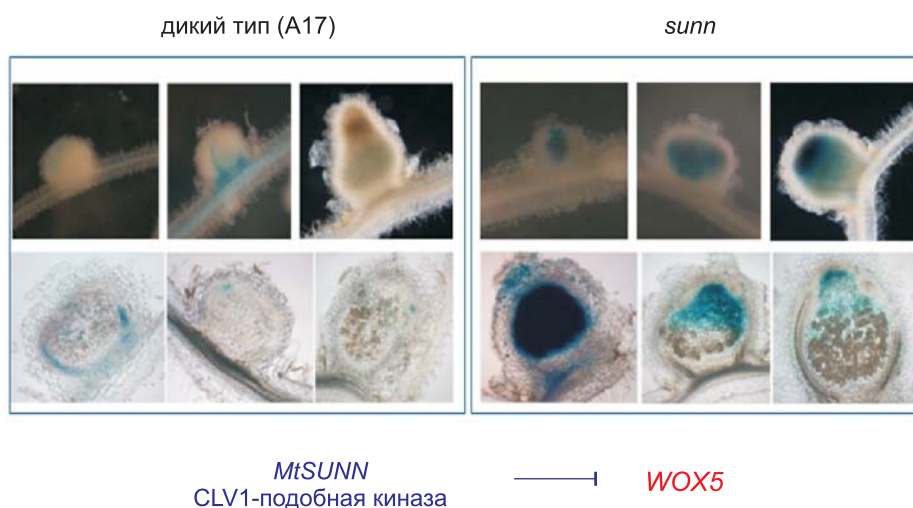
Как было отмечено выше, меристемы высших растений разнообразны, кроме того, в связи с типотентностью растительных клеток в течение онтогенеза у растений возможно формирование меристем *de novo*. При определенных условиях у растений формируются так называемые нерегулярные или дополнительные меристемы, к которым можно отнести меристемы клубеньков у бобовых, развивающиеся при взаимодействии с бактериями *Rhizobium*, а также спонтанные и патоген-индуцированные опухоли.

На примере развития меристем клубеньков у люцерны и гороха была впервые обнаружена роль генов *WOX* и системы *CLAVATA* в развитии нерегулярных меристем (рис. 8). В работе использована генетическая коллекция гороха ВНИИСХМ (<http://www.arriam.spb.ru/rus/lab9/collections.html>) (Osipova *et al.*, 2012). Пептид MtCLE13 люцерны участвует в регуляции количества клубеньков (Mortier *et al.*, 2010); его вероятным рецептором является CLV1-подобная киназа MtSUNN/PsSYM29 – компонент системы авторегуляции клубенькообразования (Searle *et al.*, 2003). В наших работах показано, что в развитие клубенька также вовлечен ген *WOX5*, экспрессия которого регулируется киназой MtSUNN/PsSYM29 (Осипова и др., 2011; Osipova *et al.*, 2012).

Опухоли высших растений – удачная модель для изучения контроля клеточной пролифера-

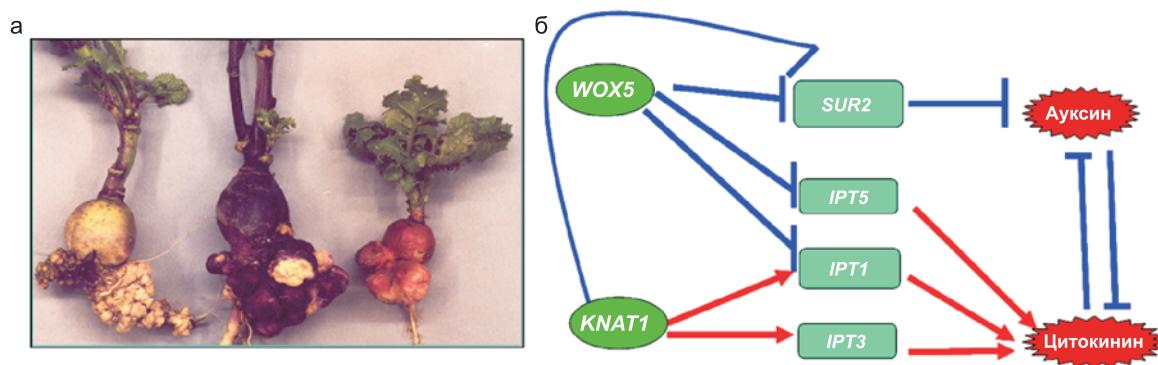
ции и дифференцировки, так как они могут быть вызваны мутациями в генах, действующих на различных уровнях регуляции клеточных делений. Поскольку процессы пролиферации и дифференцировки клеток высших растений сосредоточены главным образом в меристемах, образование опухолей у растений может быть рассмотрено как возникновение эктопических зон меристематической активности. Действительно, на ряде примеров спонтанных опухолей было продемонстрировано усиление экспрессии меристем-специфичных генов как необходимый пусковой механизм опухолеобразования (Лутова, Додуева, 2007). Более того, в геномах некоторых опухоль-индуцирующих фитопатогенов содержатся гены, сходные с меристем-специфичными и гормональными генами растений. Примером могут служить CLE-пептиды паразитических нематод: их секреция в корень растения и связывание с рецепторным комплексом CLV2/CRN необходимы для развития галлов (Replogle *et al.*, 2011).

В работах кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ для изучения опухолеобразования у растений использовали опухоли у инбредных линий генетической коллекции редиса (Нарбут, 1967; Лутова и др., 2008) (рис. 9). Опухоли развиваются на корнях некоторых линий в период цветения; пусковым механизмом является повышение концентрации свободных цитокининов в



**Рис. 8.** Экспрессия конструкции *pMtWOX5:GUS* при развитии клубенька у люцерны дикого типа и мутанта *sunp* с нарушением в гене CLV1-подобной киназы (модифицировано по: (Osipova *et al.*, 2012. P. 1329–1341)).





**Рис. 9.** Опухоли у инбредных линий редиса (а) и предполагаемая схема регуляции опухолеобразования с участием меристем-специфичных генов (б).

корне (Matveeva *et al.*, 2004). На примере опухолей у линий редиса была показана роль генов семейств *KNOX* и *WOX* в развитии опухолей, а также их связь с экспрессией генов биосинтеза цитокининов (Tvorogova *et al.*, 2012). На редисе впервые получены данные о взаимодействии CLE-пептидов и цитокининов, которое может иметь значение для индукции опухоли (Додуева и др., 2013).

Наличие общих механизмов развития для разных меристем, в том числе таких аномальных меристемоподобных структур, как опухоли, предполагает универсальность механизмов регуляции меристематической активности клеток растений.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У высших растений дифференциальная экспрессия генов, основанная на работе разнообразных ТФ, лежит в основе разнообразия типов клеток и тканей. Экспрессия генов, кодирующих ТФ, определяет идентичность клеток, тканей, органов растений. Большой процент мутантных форм растений, характеризующихся теми или иными аномалиями развития, имеют нарушения в генах ТФ. Яркой иллюстрацией этого универсального принципа может служить роль ТФ в определении идентичности органов цветка.

Важное значение в развитии растений имеет принцип клеточных взаимодействий (принцип эмбриональной индукции), который заключается в том, что одна ткань или группа клеток

(индуктор) влияет на другую (компетентную ткань), определяя путь ее развития. Этот универсальный принцип развития постулирует важность позиционной информации (клеточного окружения) и межклеточных взаимодействий в определении пути дифференцировки клеток. По сути, развитие – это цепь эмбриональных индукций, т. е. взаимодействий индуктор – компетентная ткань. Рассогласование (например, из-за мутаций) во времени созревания индуктора и компетентной ткани нарушает ход морфогенетического процесса. У растений примером такого типа индукции является ограничение областей экспрессии генов *WUS* в ПАМ и *WOX5* в КАМ за счет работы системы *CLAVATA*.

Согласованное «включение» и «выключение» генов одной группы при дифференцировке клеток являются общепринятым способом регуляции развития и зависят от активации/инактивации экспрессии генов группами ТФ, активными на разных стадиях. Вместе с тем, принцип единства активации/инактивации генов у растений имеет ряд особенностей. У животных в его основе лежит кластеризация генов: зачастую гены одной группы расположены на одной хромосоме и образуют кластер, что облегчает регуляцию их экспрессии (яркий пример – кластеры *HOX* генов). У растений не обнаружено примеров кластеризации генов; в частности, гены семейства *KNOX* не организованы в кластеры, их согласованная активация/инактивация достигается за счет регуляции экспрессии генов одной группы одними и теми же ТФ.

Развитие растений согласовано с действием факторов внешней среды гораздо в большей

степени, чем развитие животных, что связано с особенностями прикрепленного образа жизни. Важнейшими внутренними факторами, контролирующими развитие растений, являются разнообразные группы фитогормонов. В основе гормональной регуляции развития всех высших эукариот лежит гормон-зависимый контроль экспрессии генов, кодирующих ТФ.

Различаясь особенностями регуляторных механизмов, животные и растения вместе с тем имеют консервативные семейства генов, которые, возникнув на заре эволюции многоклеточных, сохраняют консерватизм в силу эффективности механизмов развития, которые ими определяются. Растения и животные имеют целый ряд схожих по структуре ТФ, играющих ключевую роль в развитии (MADS, ТФ с гомеодоменом и др.). Например ТФ растений KNOX имеют структурное сходство с ТФ животных MEIS, те и другие относятся к надсемейству гомеодомен-содержащих ТФ TALE, а также характеризуются сходством функций: и те, и другие вовлечены в регуляцию пролиферации клеток. В то же время растения и животные имеют различия во многих существенных деталях: например, у растений к гомеозисным замещениям органов приводят мутации не по гомеобокс-содержащим генам, а по генам *MADS* и т. д. Эти отличия, появившиеся на более поздних этапах эволюции, лежат в основе принципиальных различий растений и животных.

Говоря об эволюции растений, необходимо отметить роль горизонтального переноса генов (ГПГ) в этом процессе. Постгеномная эра исследований показала, что разнообразие генов эукариот достаточно ограничено, по крайней мере, по сравнению с прокариотами: многие процессы даже у отдаленных видов растений контролируются очень сходными генетическими факторами. ГПГ может оказаться дополнительным и очень важным аспектом эволюции, позволяющим конструировать геном эукариот с участием прокариотических факторов. Это дало бы возможность достичь исключительной оперативности в приобретении растениями необходимых адаптаций. ГПГ происходит экстенсивно в пределах прокариот, и его экологические и эволюционные эффекты хорошо документированы. В последнее время стали появляться факты, указывающие на то,

что в эволюции эукариот ГПГ также имеет место. Хотя принципиально такая возможность была ранее продемонстрирована американским микробиологом Ю. Нестером при обнаружении последовательностей *Agrobacterium rhizogenes* в геномах видов рода *Nicotiana* (White *et al.*, 1982), изучения распространенности ГПГ от агробактерий к растениям в природе до исследований на кафедре генетики и биотехнологии СПбГУ не проводилось. В работе Т.В. Матвеевой в ходе анализа 208 видов двудольных растений был выявлен новый пример ГПГ от агробактерий к растениям: у видов рода *Linaria* обнаружены Т-ДНК-подобные последовательности, гомологичные генам *A. rhizogenes* *ORF2*, *ORF3*, *ORF8*, *rolA*, *rolB*, *rolC*, *ORF13*, *ORF14* и *mis* (Matveeva *et al.*, 2012). Следовательно, ГПГ от агробактерий к растениям, являясь редким событием, все же не уникален для представителей рода *Nicotiana*, как считалось ранее.

**Итак, изучение развития растений позволило проследить универсальные для эукариот принципы регуляции развития, а также выявить уникальные особенности онтогенеза этих весьма своеобразных живых существ. В эволюции растений важное место занимали мутации по регуляторным генам, изменение экспрессии которых привело к многообразию форм.**

**С точки зрения биологии развития, растения относятся к числу организмов с ярко выраженным «регуляторным» типом онтогенеза. По сравнению с другими многоклеточными они характеризуются наиболее высоким адаптивным потенциалом, возможно, именно поэтому растения доминируют в биосфере.**

## ЛИТЕРАТУРА

- Додуева И.Е., Юрлова Е.В., Осипова М.А., Лутова Л.А. CLE-пептиды – универсальные регуляторы развития меристем // Физиол. растений. 2012. Т. 59. С. 1–15.
- Додуева И.Е., Кирюшкин А.С., Юрлова Е.В. и др. Влияние цитокининов на экспрессию генов CLE редиса // Физиол. растений. 2013. Т. 60. С. 399–407.
- Ежова Т.А., Лебедева О.В., Огаркова О.А. *Arabidopsis thaliana* – модельный объект генетики растений. М.: МАКС Пресс, 2003.
- Лутова Л.А., Ежова Т.А., Додуева И.Е., Осипова М.А. Генетика развития растений. СПб.: Изд-во Н-Л, 2010.
- Лутова Л.А., Додуева И.Е. Роль меристемоспецифических генов растений в формировании генетических опухо-

- лей // Онтогенез. 2007. Т. 38. № 6. С. 350–362.
- Лутова Л.А., Долгих Е.А., Додуева И.Е. и др. Изучение системного контроля деления и дифференцировки клеток растений на примере опухолевого роста у редиса // Генетика. 2008. Т. 44. С. 1075–1083.
- Нарбут С.И. Генетическая опухоль, полученная при инбридинге у редиса // Вестн. Ленингр. ун-та. 1967. Т. 15. С. 144–149.
- Осипова М.А., Долгих Е.А., Лутова Л.А. Особенности экспрессии меристем-специфичного гена *WOX5* при органогенезе клубеньков бобовых растений // Онтогенез. 2011. Т. 42. С. 1–13.
- The Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana* // Nature. 2000. V. 408. P. 796–815.
- Bowman J.L., Eshed Y. Formation and maintenance of the shoot apical meristem // Trends Plant Sci. 2000. V. 5. P. 110–115.
- Burglin T.R. The PBC domain contains a MEINOX domain: coevolution of *Hox* and *TALE* homeobox genes // Develop. Genes Evol. 1998. V. 208. P. 113–116.
- Clark S.E., Jacobsen S.E., Levin J.Z., Meyerowitz E.M. The *CLAVATA* and *SHOOT MERISTEMLESS* loci competitively regulate meristem activity in *Arabidopsis* // Development. 1996. V. 122. P. 1567–1575.
- Dodsworth S. A diverse and intricate signalling network regulates stem cell fate in the shoot apical meristem // Develop. Biol. 2009. V. 336. P. 1–9.
- Hamant O., Pautot V. Plant development: a *TALE* story // Comptes Rendus Biol. 2010. V. 333. P. 371–381.
- Hay A., Tsiantis M. A *KNOX* family *TALE* // Curr. Opin. Plant Biol. 2009. V. 12. No. 5. P. 593–598.
- Heckmann A.B., Lombardo F., Miwa H. *et al.* Lotus japonicus nodulation requires two GRAS domain regulators, one of which is functionally conserved in a non-legume // Plant Physiol. 2006. V. 142. P. 1739–1750.
- Hirsch S., Oldroyd G.E. GRAS-domain transcription factors that regulate plant development // Plant Signaling Behav. 2009. V. 4. P. 698–700.
- Ito Y., Nakanomyo I., Motose H. *et al.* Dodeca-CLE peptides as suppressors of plant stem cell differentiation // Science. 2006. V. 313. P. 842–845.
- Janssen B.J., Williams A., Chen J.J. *et al.* Isolation and characterization of two knotted-like homeobox genes from tomato // Plant Mol. Biol. 1998. V. 36. P. 417–425.
- Jasinski S., Piazza P., Craft J. *et al.* *KNOX* action in *Arabidopsis* is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities // Curr. Biol. 2005. V. 6. P. 1560–1565.
- Kerstetter R., Vollbrecht E., Lowe B. *et al.* Sequence analysis and expression patterns divide the maize knotted1-like homeobox genes into two classes // Plant Cell. 1994. V. 6. P. 1877–1887.
- Krizek B.A., Fletcher J.C. Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide // Nature Rev. Genetics. 2005. V. 6. P. 688–698.
- Leibfried A., To J.P., Busch W. *et al.* *WUSCHEL* controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators // Nature. 2005. V. 438. P. 1172–1175.
- Matveeva T.V., Frolova N.V., Smets R. *et al.* Hormonal control of tumor formation in radish // J. Plant Growth Regulation. 2004. V. 23. P. 37–43.
- Matveeva T.V., Bogomaz D.I., Pavlova O.A. *et al.* Horizontal gene transfer from genus agrobacterium to the plant linaria in nature // Mol. Plant-Microbe Interaction. 2012. V. 25. P. 1542–1551.
- Mortier V., Den Herder G., Whitford R. *et al.* CLE peptides control *Medicago truncatula* nodulation locally and systemically // Plant Physiol. 2010. V. 153. P. 222–237.
- Muller R., Bleckmann A., Simon R. The receptor kinase *CORYNE* of *Arabidopsis* transmits the stem cell-limiting signal *CLAVATA3* independently of *CLAVATA1* // Plant Cell. 2008. V. 20. P. 1–13.
- Osipova M.A., Mortier V., Demchenko K.N. *et al.* *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX5* gene expression and interaction of CLE peptides with components of the systemic control add two pieces to the puzzle of auto-regulation of nodulation // Plant Physiol. 2012. V. 158. P. 1329–1341.
- Postlethwait J.H., Schneiderman H.A. Pattern formation and determination in the antenna of the homoeotic mutant *Antennapedia* of *Drosophila melanogaster* // Develop. Biol. 1971. V. 25. P. 606–640.
- Reiser L., Sanchez-Baracaldo P., Hake S. Knots in the family tree: evolutionary relationships and functions of *knox* homeobox genes // Plant Mol. Biol. 2000. V. 42. P. 151–166.
- Replogle A., Wang J., Bleckmann A. *et al.* Nematode CLE signaling in *Arabidopsis* requires *CLAVATA2* and *CORYNE* // Plant J. 2011. V. 65. P. 430–440.
- Sablowski R. Plant and animal stem cells: conceptually similar, molecularly distinct? // Trends Cell Biol. 2004. V. 14. P. 605–611.
- Sakamoto T., Kamiya N., Ueguchi-Tanaka M. *et al.* *KNOX* homeodomain protein directly suppresses the expression of a gibberellin biosynthetic gene in the tobacco shoot apical meristem // Genes Develop. 2001. V. 1. P. 581–590.
- Sarkar A.K., Luijten M., Miyashima S. *et al.* Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers // Nature. 2007. V. 446. P. 811–814.
- Schwarz-Sommer Z., Huijser P., Nacken W. *et al.* Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus* // Science. 1990. V. 250. P. 931–936.
- Schoof H., Lenhard M., Haecker A. *et al.* The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes // Cell. 2000. V. 100. P. 635–644.
- Searle I.R., Men A.E., Laniya T.S. *et al.* Long-distance signaling in nodulation directed by a *CLAVATA1*-like receptor kinase // Science. 2003. V. 299. P. 109–112.
- Shiu S.-H., Shih M.-C., Li W.-H. Transcription factor families have much higher expansion rates in plants than in animals // Plant Physiol. 2005. V. 139. P. 18–26.
- Smaczniak C., Immink R.G., Angenent G.C., Kaufmann K. Developmental and evolutionary diversity of plant *MADS*-domain factors: insights from recent studies // Development. 2012. V. 139. P. 3081–3098.
- Stahl Y., Simon R. Plant primary meristems: shared functions and regulatory mechanisms // Curr. Opin. Plant Biol. 2010. V. 13. P. 53–58.
- Theissen G., Melzer R. Molecular mechanisms underlying origin and diversification of the angiosperm flower // Ann. Bot. 2007. V. 100. P. 603–619.
- Tvorogova V.E., Osipova M.A., Lutova L.A. Interactions

- between KNOX and WOX genes and phytohormones in radish inbred lines with spontaneous tumorigenesis // 18th FESPB Congress, Freiburg, Germany, July 29–August 3, 2012. P. 622.
- van der Graaff E., Laux T., Rensing S.A. The WUS homeobox-containing (WOX) protein family // *Genome Biol.* 2009. V. 10. P. 248–255.
- White F.F., Ghidossi G., Gordon M.P., Nester E.W. Tumor induction by *Agrobacterium rhizogenes* involves the transfer of plasmid DNA to the plant genome // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1982. V. 79. P. 3193–3197.
- Whitford R., Fernandez A., De Groot R. *et al.* Plant CLE peptides from two distinct functional classes synergistically induce division of vascular cells // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. P. 18625–18630.
- РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА**
- Лутова Л.А., Ежова Т.А., Додуева И.Е., Осипова М.А. Генетика развития растений. СПб.: Изд-во Н-Л, 2010.
- Додуева И.Е., Юрлова Е.В., Осипова М.А., Лутова Л.А. CLE-пептиды – универсальные регуляторы развития меристем // *Физиология растений.* 2012. Т. 59. С. 1–15.
- Doonan J.H., Sablowski R. Walls around tumours – why plants do not develop cancer // *Nat. Rev. Cancer.* 2010. V. 10. P. 794–802.
- Sablowski R. Plant and animal stem cells: conceptually similar, molecularly distinct? // *Trends Cell Biol.* 2004. V. 14. P. 605–611.

УДК 575.11:576.08

## СТРУКТУРА ГЕНОМА И ХРОМОСОМНЫЙ АНАЛИЗ РАСТЕНИЙ

© 2013 г. Е.Д. Бадаева<sup>1</sup>, Е.А. Салина<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия, e-mail: kateinabadaeva@gmail.com;

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия  
e-mail: salina@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 14 апреля 2013 г. Принята к публикации 1 ноября 2013 г.

### ВВЕДЕНИЕ

Термин «**геном**» впервые был введен немецким ботаником Гансом Винклером в 1920 г. для обозначения генетического материала, составляющего гаплоидный набор хромосом у растений. Гаплоидный набор хромосом обозначают как  $1n$ , а диплоидный –  $2n$ .

**Хромосомный анализ растений** – это комплекс методов, направленных на выявление особенностей хромосомной организации генома вида, идентификацию его хромосом, анализ их функциональной активности. История хромосомного анализа насчитывает свыше 130 лет и в настоящее время он широко используется в генетических исследованиях растений.

Митотические хромосомы первым наблюдал В. Флемминг в 1879 г., изучая деление клеток аксолотля. Немного позже (в 1882 г.) Э. Страсбургер обнаружил сходные структуры в клетках растений, а в 1881 г. Э. Бальбиани описал гигантские хромосомы из клеток слюнных желез личинок *Chironomus plumosus*. В 1883 г. Дж.Л.М. Ван Бенеден показал, что число хромосом в гаметах вдвое меньше, чем в соматических клетках, а Т. Бовери предположил (1890), что редукция числа хромосом происходит во время оогенеза. Однако для обозначения структур, появляющихся в ядре во время деления клетки, эти авторы использовали различные названия («нити», «петли», «сегменты», «элементы» и др.). Термин **хромосома** (chromo – окрашенное, soma – тело) первым применил немецкий ученый

В. Вальдейер (W. Waldeyer) в 1888 г., поскольку описанные структуры интенсивно окрашивались основными красителями.

### ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНОМОВ РАСТЕНИЙ

Содержание ДНК на гаплоидный геном (**величина С**) является важной биологической характеристикой организма. Общее содержание ДНК в геноме принято измерять в парах нуклеотидов (п.н.), пикограммах и в дальтонах. Соотношение между этими величинами таково:  $1 \text{ пкг} = 0,965 \times 10^9 \text{ п.н.} = 6,1 \times 10^{11} \text{ дальтон}$ .

Изучение этого параметра выявило существенные колебания количества ДНК у значительного числа видов эукариот. Несоответствие между размерами генома и сложностью организмов, а также избыток ДНК по сравнению с ее количеством, необходимым для кодирования белков, было названо **парадоксом величины С**.

В отличие от большинства высших эукариот, растения характеризуются значительной изменчивостью размера геномов (рис. 1). Минимальный размер генома –  $5,4 \times 10^7$  – был зарегистрирован у растения *Cardamine amara* семейства капустные (Brassicaceae), тогда как наиболее крупный геном  $1,25 \times 10^{11}$  обнаружен у лилейного *Fritillaria assyriaca*.

Значительная изменчивость размеров генома может быть обусловлена несколькими причинами:

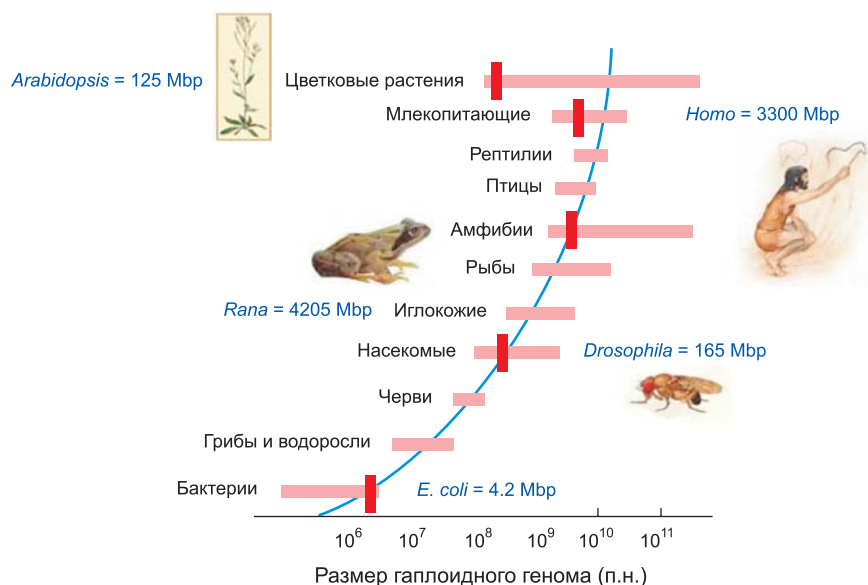


Рис. 1. Размер генома у разных групп организмов (Mbp = млн п.н.).

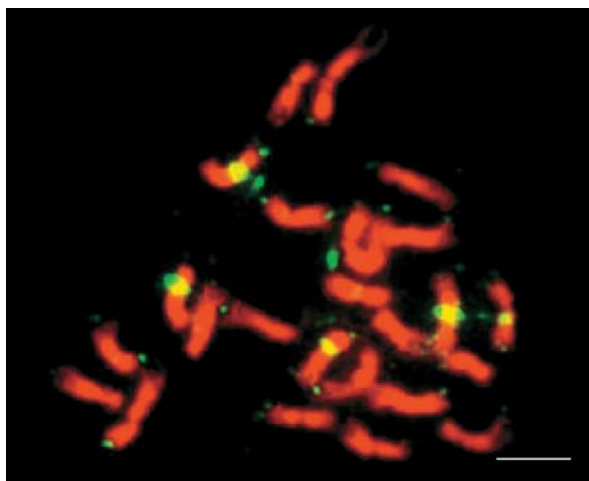
- 1) полиплоидией;
- 2) дубликацией/редукцией хромосом или их участков;
- 3) накоплением/удалением некодирующей, «избыточной», «ненужной», «эгоистичной» ДНК (junk) ДНК (термины, использованные в разные годы при описании парадокса С).

Определенный вклад в изменчивость генома вносят также процессы дубликации генов с их последующей инактивацией и перенос ДНК из других видов.

**Полиплоидия** – это кратное увеличение числа наборов хромосом. **Автополиплоиды** образуются путем кратного увеличения одного и того же генома в результате спонтанного удвоения числа хромосом или формирования нередуцированных гамет. **Аллополиплоиды** (амфиплоиды) образуются на основе объединения двух или нескольких целых геномов, принадлежащих разным видам и родам (гибридная полиплоидия). По разным оценкам от 30 до 70 % современных цветковых растений и большая часть мхов и папоротников являются полиплоидами (Meurers, Levin, 2006). К ним относятся и такие важные сельскохозяйственные культуры, как мягкая и твердая пшеница, овес, сахарный тростник и многие другие. (Источники данных по размеру геномов: М. Сингер, П. Берг. Гены и геномы, М.: Мир, 1998; Kew DNA C-values database (<http://data.kew.org/cvalues>)).

В последние годы с помощью сравнения *in silico* геномов растений, первичная структура которых в той или иной степени определена, (<http://genomeevolution.org/CoGe/>) удалось выявить многочисленные случаи «скрытой полиплоидии», или **палеополиплоидии**, у растений. Так, например, было установлено полиплоидное происхождение кукурузы, хотя геном современного вида не является истинно полиплоидным. Детальное построение генетических карт хромосом с использованием расширенного пула молекулярных маркеров показало, например, что значительная часть генома у видов *Brassica nigra*, *B. oleraceae* и *B. rapa* была дублирована в процессе эволюции. Крупные дубликации генома были выявлены у *Arabidopsis thaliana*. Доказаны случаи дубликации небольших участков генома у риса. Все эти события привели к возрастанию содержания ДНК за счет увеличения числа хромосом.

Следует отметить, что наряду с увеличением числа хромосом в процессе эволюции растений также отмечены случаи их редукции за счет теломерных слияний и инактивации одной из центромер. На цитологическом уровне это можно наблюдать с помощью гибридизации *in situ*: сигналы теломерной последовательности появляются в интерстициальных участках хромосом – внутренние теломерные районы или ITR (interstitial telomeric repeats) (рис. 2).



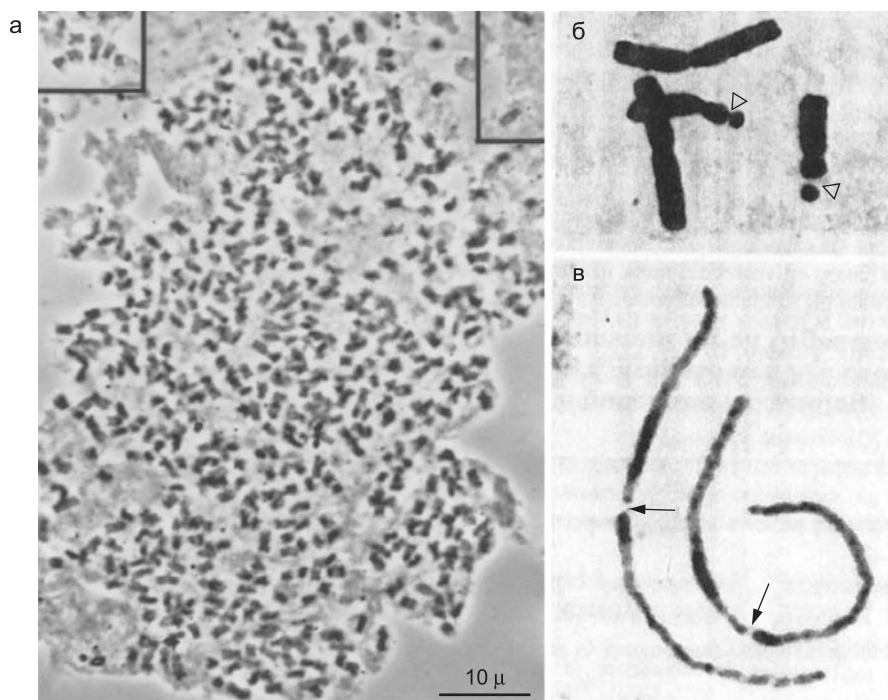
**Рис. 2.** Локализация теломероподобной последовательности рSbTC1 на хромосомах картофеля *Solanum tuberosum* методом флюоресцентной гибридизации *in situ* (Tek, Jiang, 2004. P. 77–83).

По результатам секвенирования генома у *A. thaliana* было обнаружено восемь ITR длиной от 300 п.н. до 1,2 т.п.н. Три ITR располагались в центромерных, а пять – в интерстициальных

и субтеломерных участках хромосом. Их размер, однако, настолько мал, что методом *in situ* гибридизации они не выявляются.

Предполагают, что интерстициальные сайты теломерных последовательностей являются «следами» концевых слияний хромосом. Возможно, в некоторых случаях они сопровождались амплификацией теломерного повтора, приводящей к появлению ITR протяженностью до нескольких миллионов п.н. Внутривнутрихромосомные локусы теломерной ДНК подвержены хромосомным разрывам и рекомбинациям, т. е. являются «горячими точками» хромосомных aberrаций.

Многочисленные случаи полиплоидии, включая палеоплоидию, с одной стороны, и редукция числа хромосом за счет теломерных слияний, с другой, привели к широчайшей изменчивости числа хромосом у растений. Минимальное количество хромосом  $2n = 4$  найдено лишь у четырех видов, относящихся как к классу двудольных, *Brachycome dichromosomatica* (рис. 3, б) и *Haplopappus gracilis*, так и однодольных – *Zingiber beibersteiniana* и *Colpodium versicola*.



**Рис. 3.** Митотические хромосомы (а) субтропической пальмы *Voanioala gerardii* ( $2n = 596$ ), б – *Brachycome dichromosomatica* ( $2n = 4$ ) и в – муравья *Myrmecia pilosa* ( $2n = 2$ ).

Первичная перетяжка (центромера) отмечена черной стрелкой. Вторичные перетяжки, соответствующие ядрышкообразующим районам, обозначены треугольниками (Bennett, 1998. P. 2011–2016).

Высокие числа хромосом (> 500) характеризуют мхи и папоротники. Максимальное число хромосом ( $2n = 1440$ ) зарегистрировано у папоротника *Ophioglossum reticulatum*, у цветковых растений – у пальмы *Voanioala gerardii* ( $2n = 596$ ) из субтропических лесов Мадагаскара (рис. 3, а). У большинства высших растений числа хромосом варьируют в пределах от 10 до 50 ( $n = 5-25$ ). Предполагают, что виды с числом хромосом  $n > 10$  являются полиплоидами.

Варьирование размера генома у растений с одинаковым числом хромосом в основном связано с количественными изменениями повторяющихся последовательностей ДНК. **Повторяющиеся последовательности (ПП)** – это последовательности ДНК, многократно повторенные в геноме. Ранее на основании анализа кинетики ренатурации ДНК их подразделяли на следующие группы:

– *Низкочастотные* повторы – последовательности, повторяющиеся десятки раз.

– *Промежуточные*, или *среднечастотные*, повторы – последовательности, повторяющиеся сотни и тысячи раз. К ним также относятся гены рРНК (у человека 200 на гаплоидный набор, у мыши – 100, у кошки – 1000, у рыб и цветковых растений – тысячи), тРНК, гены рибосомных белков и белков-гистонов.

– *Высокочастотные* повторы, число которых достигает несколько миллионов на геном. Это короткие некодирующие последовательности, которые входят в состав гетерохроматина (10–15 п.н.; 120–180 п.н.).

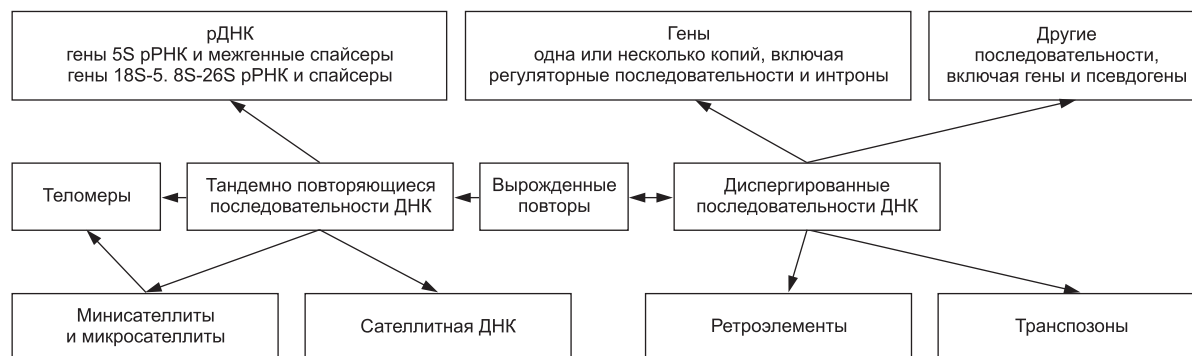
Позже ПП стали классифицировать не по уровню копийности, а по способу организации

в геноме. В соответствии с этим показателем выделяют два основных типа ПП: 1) тандемно организованные последовательности, представленные многократным повторением одной и той же последовательности ДНК (мономера) и 2) более сложно организованные группы последовательностей – диспергированные повторы (рис. 4).

Тандемные повторяющиеся последовательности (ПП) впервые были обнаружены во фракции сателлитной ДНК, которая отличается от остальной ДНК по плавучей плотности и может быть изолирована в виде отдельного пика при центрифугировании в градиенте плотности хлористого цезия. В зависимости от длины повторяющейся единицы (мономера), тандемные ПП относятся к микросателлитной, минисателлитной и сателлитной ДНК (Salina, 2007). Из кодирующих тандемно организованных последовательностей наиболее детально охарактеризованы гены рибосомальной РНК.

*Микросателлиты* – семейства коротких (1–6 п.н.) тандемно организованных повторов. Отдельные классы микросателлитов значительно отличаются по частоте встречаемости и распределению в геноме. У растений в целом преобладает микросателлит (AT)<sub>n</sub>, а геномы двудольных растений содержат меньше GC-содержащих повторов, чем геномы однодольных. Кодирующие и некодирующие участки ДНК также отличаются по составу фракций микросателлитов.

*Минисателлиты* имеют длину мотива от 9 до 100 п.н., часто 15 п.н. Они образуют кластеры размером 5–30 т.п.н., расположенные преимущественно в эухроматических участках



**Рис. 4.** Основные типы последовательностей ядерного генома растений (Schmidt, Heslop-Harrison, 1998. P. 195–199).



геномов. К классу минисателлитов относятся теломерные повторы.

*Сателлитная ДНК* состоит из тандемно организованных последовательностей ДНК с длиной повторяющейся единицы от ста до нескольких т.п.н. Сателлитные повторы характеризуются высоким уровнем копийности ( $10^5$ – $10^6$ ), образуя кластеры, содержащие до нескольких миллионов п.н. Использование сатДНК в качестве зондов при гибридизации *in situ* показало, что они располагаются в гетерохроматических районах хромосом вблизи теломерных и центромерных участков. Распространение сателлитных ДНК, как правило, ограничено одним или группой близкородственных видов. Они могут составлять до 10–20 % от общего размера генома, и нередко именно с ними связаны значительные различия в содержании ДНК у близкородственных видов. Показано также, что тандемно организованные последовательности ДНК участвуют в формировании таких функционально важных участков хромосом, как теломеры, центромеры и ядрышкообразующие районы.

Мобильные элементы (МЭ) являются неотъемлемой частью генома растений. В последние годы в связи с масштабными работами по анализу первичной структуры ДНК наиболее часто описывают мобильные элементы двух типов: элементы класса 1 (ретротранспозоны) и элементы класса 2 (ДНК-транспозоны). МЭ класса I перемещаются по геному с помощью механизма обратной транскрипции РНК-интер-

медиатов. Это обеспечивает размножение МЭ класса I путем «копирования–встраивания» и объясняет их широкую представленность в геномах растений. МЭ класса I образуют несколько порядков элементов, различающихся по структурной организации: LTR-ретротранспозоны, DIRS-элементы, Penelope, LINE (long interspersed element) и SINE (short interspersed element). LTR-ретротранспозоны, в отличие от остальных МЭ класса 1, имеют длинные терминальные повторы на концах (LTRs – long terminal repeats) и подразделяются на gypsy- и copia-подобные по аналогии с ретроэлементами, описанными у дрозофилы. Gypsy- и copia-подобные элементы различаются между собой порядком генов, расположенных между LTR. Gypsy-элементы, так же как и ретровирусы, характеризуются следующим чередованием генов, необходимых для их размножения и перемещения по геному: LTR – протеиназа (pro) – обратная транскриптаза (rt) – рибонуклеаза H (rh) – интеграна (int) – LTR. Copia-элементы содержат LTR – pro – int – rt – rh – LTR. Согласно последним данным, LTR-ретротранспозоны являются наиболее представленным субклассом МЭ в геноме растений (рис. 5).

В отличие от ретроэлементов, распространение которых включает стадию транскрипции и происходит с помощью РНК-интермедиатов, ДНК-транспозоны перемещаются с помощью механизма «вырезания–встраивания» фрагментов ДНК (подкласс 1) или посредством репликации ДНК (подкласс 2). Характерной

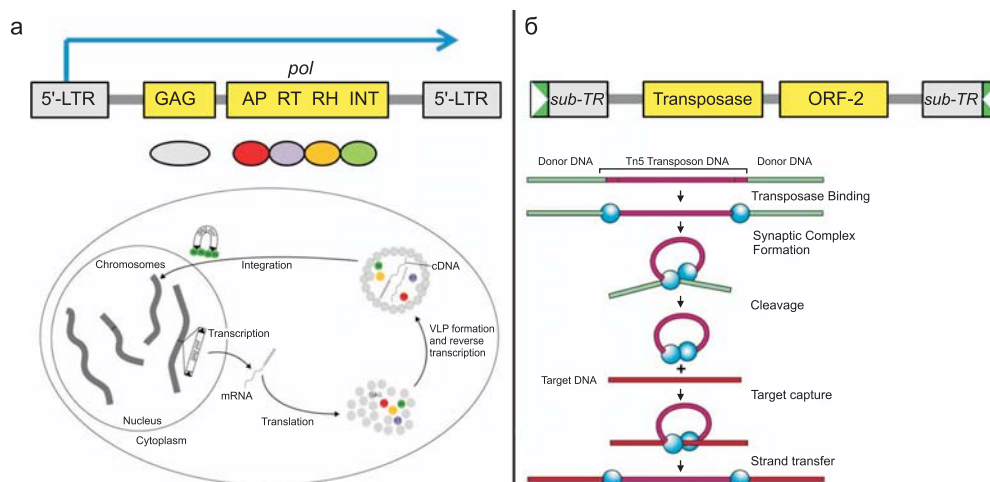


Рис. 5. Организация ретротранспозонов (а) и ДНК-транспозонов (б) (Choulet *et al.*, 2010. P. 1686–1701).

особенностью ДНК-транспозонов подкласса 1 является наличие концевых инвертированных повторов (Terminal Inverted Repeats – TIR). Транспозиция элементов первого подкласса происходит с помощью фермента транспозазы. Так, например, *Ac*-элементы кукурузы ограничены инвертированными повторами и кодируют транспозазу, которая обеспечивает их вырезание и реинтеграцию. В качестве примера подкласса 2 можно привести ДНК-транспозоны Helitron, которые описаны для генома кукурузы.

Следует отметить, что значительная часть МЭ представлена в геноме неавтономными элементами, у которых либо полностью, либо частично отсутствуют кодирующие последовательности. Неавтономные элементы способны к транспозиции только за счет активации автономными элементами соответствующего семейства генома.

Наличие среди ретротранспозонов видо-, родо-, трибо- и других специфичных для различных таксонов элементов свидетельствует о том, что инвазии ретротранспозонов происходили неоднократно в различные временные периоды (рис. 6). Обычно они перемещаются в близлежащие районы хромосом, нередко – в LTR-участки других элементов, поэтому располагаются преимущественно в бедных генами участках геномов (особенно в перицентромерных районах хромосом) (Сергеева, Салина,

2011). Помимо этого, существуют механизмы, предотвращающие встраивание или способствующие элиминации ретротранспозонов из участков генома, прилежащих к важным для организма генам.

Особенность растений в сравнении с животным состоит в значительно более высоком уровне межхромосомной гомогенизации как тандемных, так и диспергированных повторов, включая ретроэлементы. Именно этим фактом объясняют невозможность применения метода хромосомного пэйнтинга (гибридизации *in situ* с использованием хромосомоспецифичной ДНК как зонда) в исследованиях растений.

Дифференциальная амплификация мобильных элементов в геномах разных видов растений лежит в основе увеличения размеров их хромосом. Так, например, размер хромосомы арабидопсиса примерно в 100 раз меньше, чем у сосны, и в 10 раз меньше, чем у свеклы. Эти различия хорошо видны и на цитологических препаратах митотических, т. е. конденсированных, хромосом (рис. 7). В целом у представителей различных таксономических групп растений длина митотической хромосомы варьирует от долей микрона (грибы и водоросли) до 20 и более  $\mu\text{m}$  (лилейные и голосемянные).

Информация об организации и распределении кодирующих и некодирующих последовательностей в хромосомах растений начала появ-

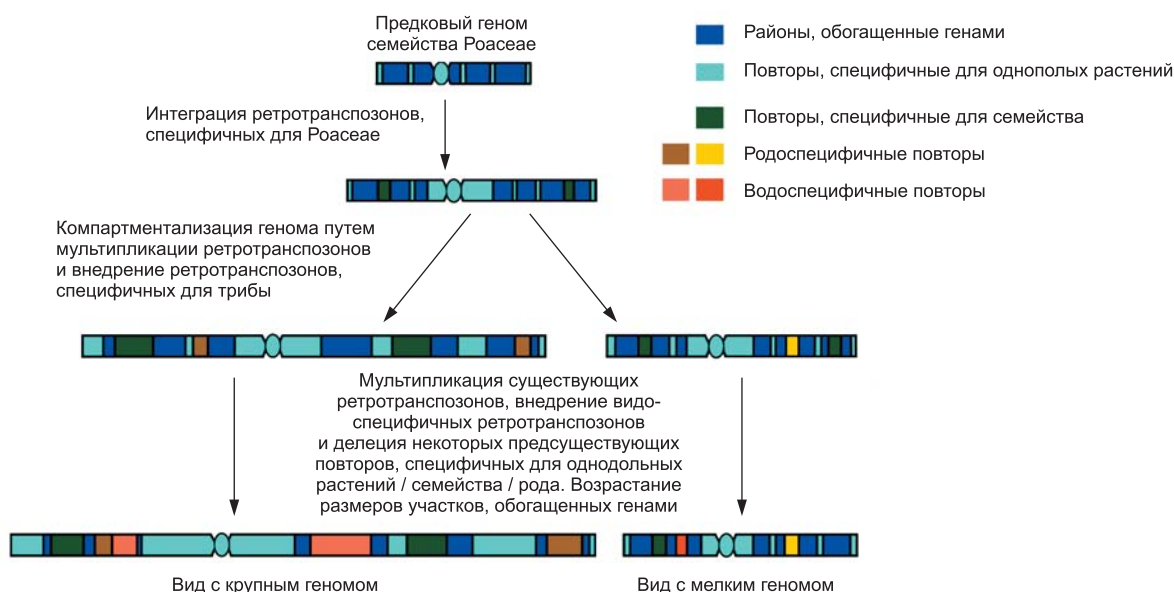
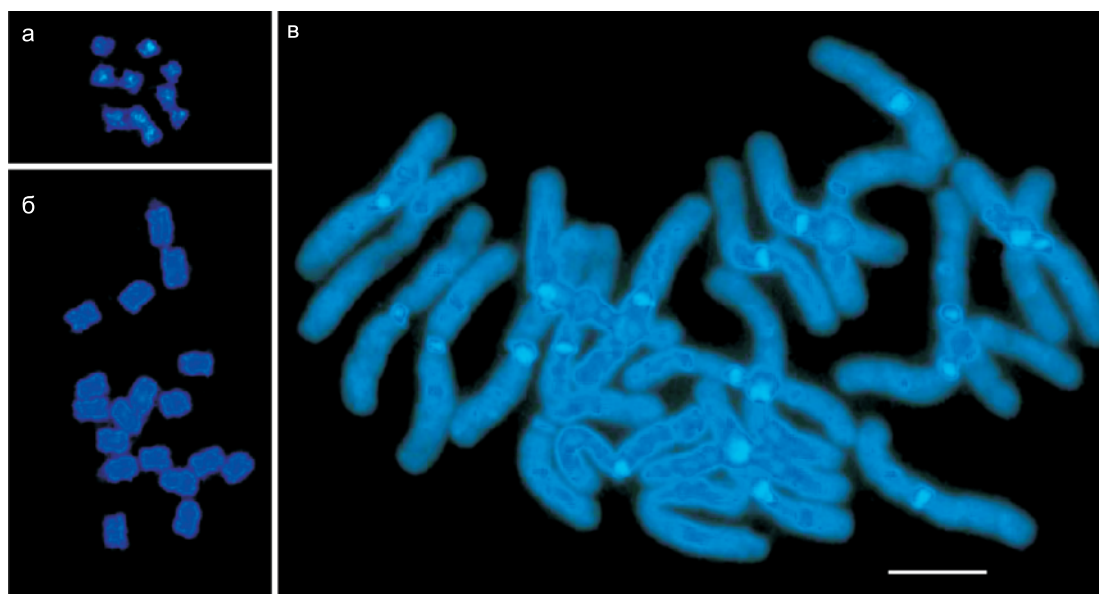


Рис. 6. Гипотетическая модель эволюции хромосом злаков (Sandhu, Gill, 2002. P. 803–811).



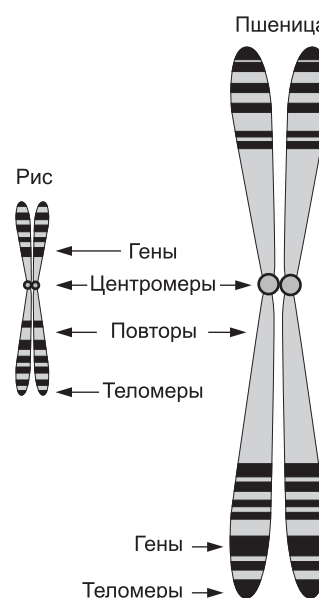
**Рис. 7.** Изменчивость размеров хромосом у трех диплоидных видов высших растений.

а – арабидопсис (гаплоидный геном 140 млн п.н.;  $2n = 10$ ); б – сахарная свекла (750 млн п.н.,  $2n = 18$ ); в – сосна (23,000 млн п.н.,  $2n = 24$ ) (Schmidt, Heslop-Harrison, 1998. P. 195–199).

ляться только с начала 90-х гг. XX в. в результате прямой локализации последовательностей ДНК на хромосомы с использованием методов **физического картирования** (гибридизация *in situ* и/или молекулярно-генетический анализ делеционных линий). Впоследствии существенный вклад в понимание структурной организации хромосом был получен при секвенировании и локализации на хромосоме отдельных протяженных участков ДНК, клонированных в составе бактериальных искусственных хромосом (bacterial artificial chromosome – ВАС клоны). В соответствии с полученными результатами последовательности ДНК, соответствующие генам, образуют дискретные кластеры, чередующиеся с участками, состоящими из одного или нескольких блоков повторяющихся последовательностей с характерной организацией и положением в геноме (рис. 8). При этом плотность генов увеличивается от центromеры к дистальному участку хромосом.

У растений с мелкими геномами в связи с отсутствием кластеров тандемных повторов в интеркалярных участках хромосом плотность генов более высокая и они распределены более равномерно. У видов со средними или крупными геномами повторяющиеся последовательности образуют протяженные, непрерывные

блоки, характеризующиеся высоким уровнем метилирования и не содержащие генов. Они разделяют богатые генами (GR = gene-rich) сегменты хромосом. Протяженные блоки повторов присутствуют не только в центромерных, но и в интеркалярных участках хромосом (рис. 8).



**Рис. 8.** Схематическое изображение метафазных хромосом риса и пшеницы со сходным содержанием и порядком генов (Moore, 2000. P. 195–222).

Локализация GR-районов на хромосомах злаков совпадает с положением участков рекомбинации, причем частоты рекомбинации в разных GR-участках могут существенно отличаться. В проксимальной трети плеча хромосомы рекомбинация полностью отсутствует, что может быть связано с приближенностью этого участка к центромере. Районы хромосом с низким содержанием генов представлены в основном ретротранспозоноподобными элементами.

### КЛАССИФИКАЦИЯ ХРОМОСОМ

Виды растений отличаются не только по числу и размерам хромосом, но их форме, которая определяется положением **центромеры**. На наружной поверхности центромеры расположены кинетохоры, служащие местом связывания микротрубочек веретена. На митотических хромосомах выделяют также **теломеры**, защищающие концы хромосом от повреждений и выполняющие ряд других жизненно важных функций в клетке. Хромосомы большинства эукариот в норме имеют одну центромеру – **моноцентрические хромосомы**. В то же время известны виды, на хромосомах которых отсутствует четко выраженная, морфологически и физиологически дифференцированная первичная перетяжка. Такие хромосомы называются **голоцентрическими**, и они имеют **диффузную центромеру**. Среди растений голоцентрические хромосомы встречаются в основном у представителей двух родственных семейств – Juncaceae (*Luzula*) и Sурегасеae (*Rhynchospora*). Существуют также виды, хромосомные наборы которых включают как моноцентрические, так и голоцентрические хромосомы.

Помимо первичной, или центромерной, перетяжки, на некоторых хромосомах могут встречаться одна или несколько **вторичных перетяжек**. Некоторые из них функционально связаны с ядрышками – структурами ядра, ответственными за синтез рибосомной РНК. Методом гибридизации *in situ* было показано, что в них расположены кластеры генов 18S-5,8S-26S рРНК. Фрагмент плеча, отделяемый спутничной нитью от тела хромосомы, называется **спутником**, а сама хромосома – **спутничной**, или **SAT-хромосомой**.

У большинства растений все хромосомы набора представлены парами **гомологичных** хромосом. В то же время некоторые виды растений содержат пару генетически отличающихся хромосом, которые определяют развитие мужского или женского пола – **половые хромосомы**. Как правило, у женских особей присутствуют две одинаковые X-хромосомы, а у мужских особей половые хромосомы разные – X и Y, хотя существуют и другие системы детерминации пола (например, у птиц, дрозофилы и др.).

У многих видов растений, наряду с хромосомами диплоидного хромосомного набора (**A-хромосомы**), встречаются добавочные, или сверхчисленные, **B-хромосомы** (рис. 9). В отличие от хромосом основного набора, их число не постоянно – оно может отличаться у разных особей одной популяции и даже в различных клетках и тканях одного индивида. Характерной особенностью B-хромосом является то, что их присутствие не обязательно для нормальной жизнедеятельности организма. В небольшом количестве они не влияют на фенотип растений, но большое число B-хромосом отрицательно сказывается на жизнеспособности и плодовитости организма.

Совокупность морфологических признаков (включая число хромосом), по которым можно идентифицировать данный хромосомный набор, называют **кариотипом**. Этот термин предложил русский ученый Г.А. Левицкий в 1924 г. Впоследствии определение кариотипа было уточнено, и в настоящее время под ним понимают систематизированный набор хромосом



Рис. 9. Дифференциально окрашенная метафазная пластинка *Aegilops speltoides* с 4 B-хромосомами.

индивида. Графическое изображение кариотипа со всеми структурными характеристиками хромосом называется **иднограммой**.

Кариотипы составляют в соответствии с определенными правилами. В цитогенетике для этого предложены два основных подхода: цитологический и генетический. Цитологическая классификация строится на основе морфологических параметров хромосом, тогда как генетическая классификация учитывает генетическое родство хромосом разных видов.

В соответствии с принципами цитологической классификации в кариотипах сначала приводят хромосомы основного набора в порядке убывания их линейной длины, при этом SAT-хромосомы ставят последними. Половые хромосомы располагают после аутосом. В случае наличия В-хромосом их приводят после основного набора.

Генетическая номенклатура базируется на генетическом родстве (гомеологии) хромосом. Ее основы были заложены в работах американского генетика Эрни Сирса, который создал первую генетическую классификацию хромосом мягкой пшеницы. Он разделил хромосомы на семь групп генетически родственных (гомеологичных) хромосом, каждая из которых включала по три пары хромосом из А-, В- и D-геномов (рис. 10).

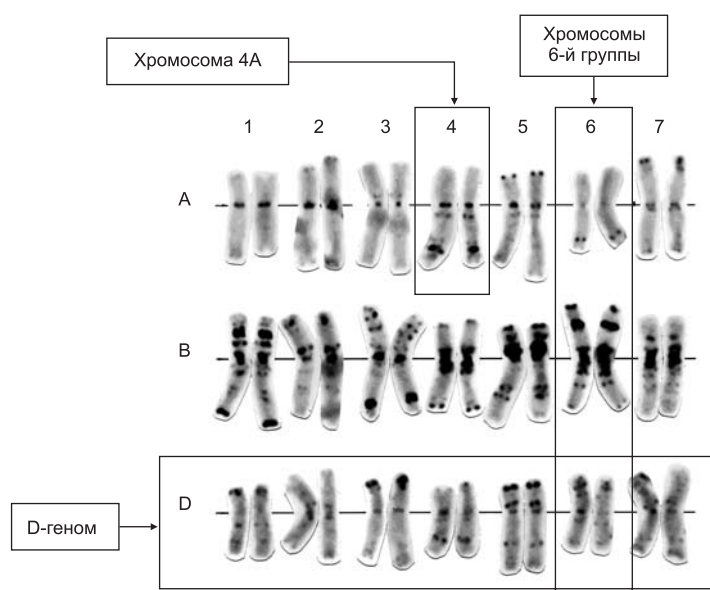
Впоследствии было установлено, что хромосомы других видов злаков также родственны хромосомам мягкой пшеницы и, соответственно,

могут быть отнесены к одной из семи гомеологических групп. Для определения генетического родства хромосом существует несколько тестов. Первый – компенсационный – тест основан на способности гомеологичных хромосом замещать друг друга в кариотипе гибридов. Другой подход учитывает их способность к индуцированной конъюгации в мейозе гибрида. Оба этих метода, однако, можно использовать лишь для хорошо скрещивающихся видов.

Для определения гомеологии можно использовать молекулярно-цитогенетические маркеры с консервативным положением на хромосомах. К ним, в частности, относятся локусы 5S и 45S рРНК генов, локализованные у злаков на хромосомах 1-й, 5-й и 6-й гомеологических групп в определенных позициях относительно друг друга. Консерватизм распределения локусов РНК генов показан и для других групп растений.

Наиболее надежным и точным способом определения генетического родства хромосом разных видов и родов растений является сравнительное генетическое картирование. С его помощью определяют взаимосвязи между хромосомами или их отдельными участками даже столь отдаленных видов и родов растений, как рис и пшеница, кукуруза и овес и т. д. (рис. 11).

Генетическая номенклатура хромосом более объективна и обладает рядом преимуществ по сравнению с цитологической классификацией, однако она доступна лишь для ограниченного



**Рис. 10.** Генетическая классификация хромосом мягкой пшеницы.

числа видов, поскольку требует детального знания генетики объекта и наличия достаточно насыщенных генетических карт хромосом.

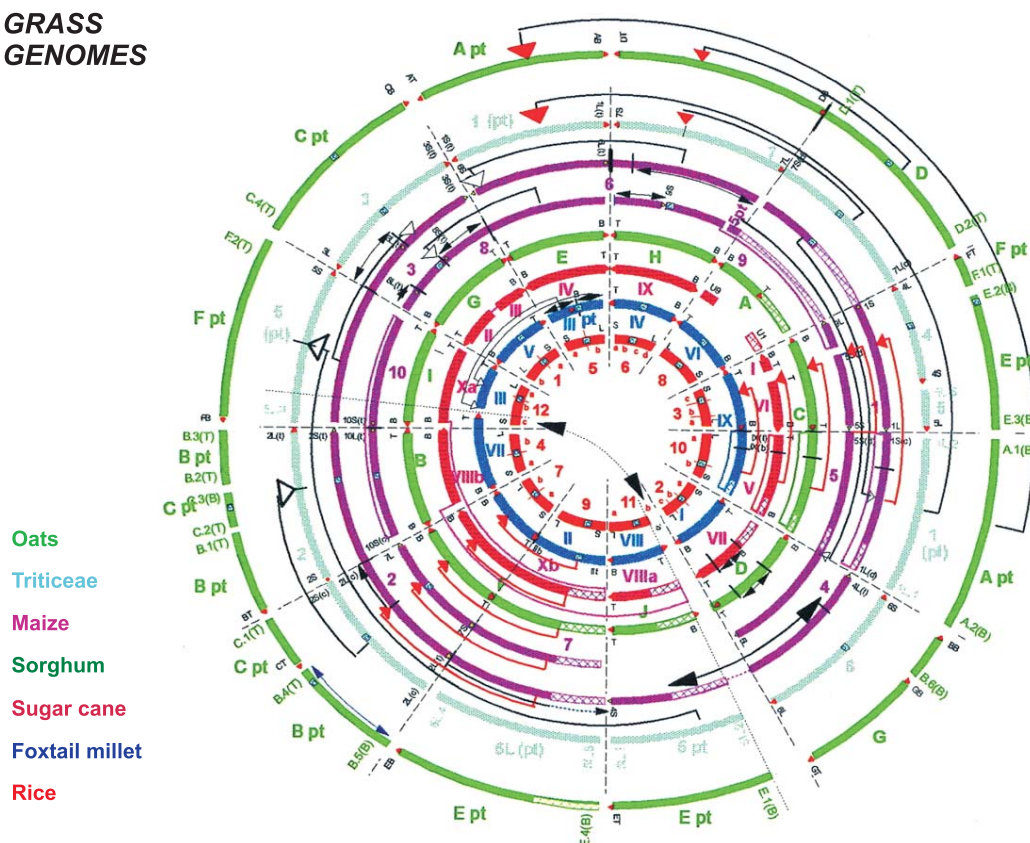
Классификации хромосом видов сельскохозяйственных растений, составленные в соответствии с принципами цитологической и генетической номенклатуры, могут не совпадать. Так, например, самая мелкая хромосома ячменя по цитологической номенклатуре обозначается 5Н (две хромосомы ячменя несут спутники и им присваиваются два последних номера – 6Н и 7Н). В то же время по данным генетического картирования, она соответствует 1-й гомеологической группе пшеницы и по генетической номенклатуре обозначается 1Н.

Таким образом, растения характеризуются значительной изменчивостью размера генома, числа и морфологии хромосом. Числа хромосом варьируют в широчайших пределах – от 4 до 1000 и более, однако большинство видов

содержат от 12 до 60 хромосом на диплоидный геном. Показана прямая взаимосвязь между размером генома растения и длиной его хромосом, при этом размер хромосом не зависит от систематического положения вида. Для растений характерна также значительная изменчивость морфологии хромосом – положения центromеры, наличия, числа и локализации вторичной перетяжки. Отдельную группу составляют растения с голоцентрическими хромосомами, характеризующимися диффузной центromерой.

Накопленная информация свидетельствует о широком разнообразии кариотипов растений, которые отличаются по числу, размеру, морфологии составляющих его хромосом. Кариотип служит важным таксономическим признаком вида. В связи с широкой кариотипической изменчивостью растений классификацию хромосом при составлении кариотипов необходимо проводить в соответствии с едиными принци-

## GRASS GENOMES



**Рис. 11.** Сравнительная консенсусная карта злаков. Данные для сравнения взяты из работ разных авторов по картированию геномов риса, кукурузы, овса, сорго, сахарного тростника, проса и пшеницы.

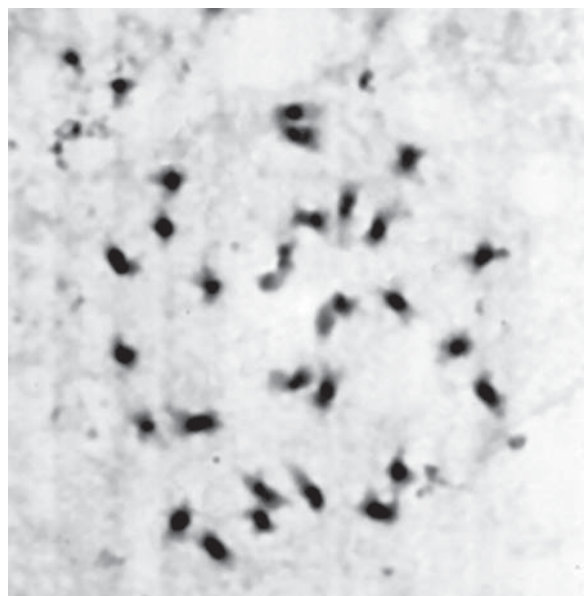
Стрелками указаны инсерции и транспозиции в хромосомах современных видов. Пунктирными стрелками отмечены районы с недостаточным числом данных для сравнения (Gale, Devos, 1998. P. 1971–1974).

пами. Для этого существуют два подхода: цитологической и генетической. Наиболее широко применяются принципы цитологической классификации, при которой хромосомы в кариотипе ранжируются по размеру. В случае если исследования проводят на видах с известной гомеологией хромосом, следуют принципам генетической номенклатуры, в соответствии с которой хромосомы классифицируют по их генетическому родству.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ХРОМОСОМ РАСТЕНИЙ

Современный хромосомный анализ – это совокупность методов и подходов, позволяющих наиболее полно охарактеризовать геном растений, выявить индивидуальные особенности каждой хромосомы для ее безошибочной идентификации, а также изучать функциональную активность хромосом и их отдельных участков на разных стадиях клеточного цикла. Высокая изменчивость растений по числу, размеру и организации хромосом, составу и распределению семейств повторяющихся ДНК обуславливает то, что методы, разработанные для анализа одних видов, могут оказаться малоинформативными или даже непригодными для изучения других видов. Например, С-бэндинг, выявляющий на хромосомах пшеницы более 100 блоков в разных позициях, мало подходит для исследования растений с мелким размером генома, поскольку они содержат С-бэнды только в прицентромерных районах хромосом и их сложно отличить друг от друга на основании этого маркера (рис. 12). С другой стороны, крупные хромосомы разных видов растений также отличаются по способности окрашиваться разными красителями из-за различий по составу фракций высокоповторяющейся ДНК. В связи с этим для каждой таксономической группы растений необходимо подбирать комплекс методов хромосомного анализа, наиболее полно выявляющих индивидуальность их геномов. В соответствии с выполняемой задачей, а также особенностями используемых методик хромосомный анализ подразделяется на:

- дифференциальное окрашивание хромосом;
- гибридизацию *in situ*;



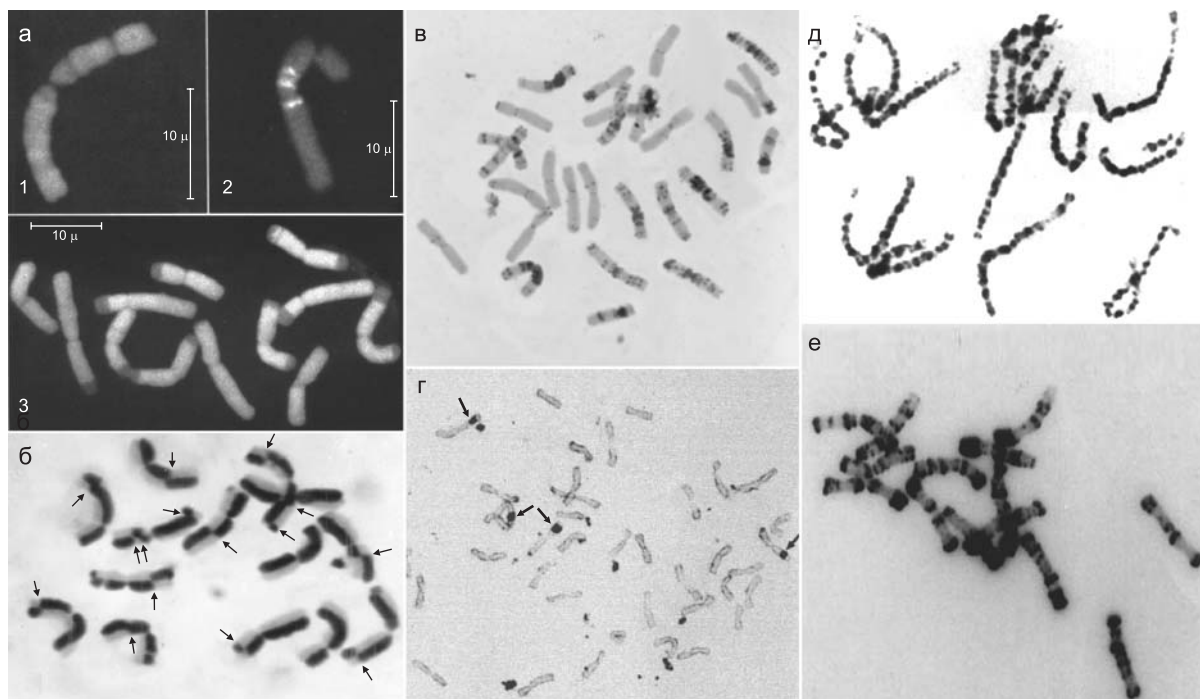
**Рис. 12.** С-окрашенная метафазная пластинка льна *Linum usitatissimum* (микрофотография любезно предоставлена О.В. Муравенко, ИМБ РАН).

- иммунофлюоресценцию;
- проточную флюориметрию;
- микродиссекцию.

Методы **дифференциального окрашивания** можно разделить на две подгруппы. Первая из них направлена на выявление линейной неоднородности хромосом, вторая – на изучение их функциональной активности. Первая из них включает разные варианты флюоресцентного окрашивания, С-, G- и N-бэндинг (рис. 13, а, с), вторая – серебрение, «арлекинное окрашивание» и репликативный бэндинг.

Впервые неравномерное окрашивание хромосом по длине при использовании флюоресцентного красителя акрихина и его производных было получено шведским ученым Т. Касперссоном в 1968 г., а затем и другими исследователями из разных стран мира. Дифференциальная флюоресценция выражалась как в появлении ярко флюоресцирующих бэндов в определенных участках хромосом, так и наоборот – более тусклой флюоресценции некоторых хромосомных сегментов (рис. 13, а).

Уже в первых работах было отмечено, что положение ярко флюоресцирующих участков совпадает с локализацией так называемого «холодового гетерохроматина» – недоконденсированных участков хромосом, появляющихся



**Рис. 13.** Разные способы дифференциального окрашивания хромосом растений.

а – флюоресцентный бэндинг: окрашивание хромосомы М *Vicia faba* с помощью этидия бромид (1) и акрифлавина (2) и метафазная пластинка *Tulbaghia pulchella*, окрашенная акрихин-ипритом (3) (Vosa, 1970. P. 366–372); б – «арлекинное окрашивание» хромосом ржи *Secale cereale* (фотография любезно предоставлена Dr. B. Friebe, WGGR, KSU, USA); в – С-окрашивание хромосом пшеницы *Triticum araraticum*; г – Ag-NOR окрашивание хромосом пшенично-ячменного амфидиплоида (Santos *et al.*, 1984. P. 425–429); д – G-окрашивание на хромосомах лилии (Chen *et al.*, 1994. P. 79–87); е – рисунок поздней репликации на хромосомах ржи, выявленный с помощью иммуноцитохимического окрашивания антителами к бромдезоксисуридину (Kakeda, Yamagata, 1992. P. 67–70).

после холодной предобработки материала. Впоследствии было установлено, что именно в этих участках располагаются сателлитные ДНК. Дифференциальная флюоресценция сателлитных ДНК обусловлена тем, что их семейства имеют относительно однородный состав со сдвигом соотношения АТ или ГЦ пар оснований относительно основного пула ядерной ДНК данного вида. Если в семействе сатДНК, формирующем данный гетерохроматиновый район, имеется избыток АТ-оснований, то соответствующий бэнд ярко окрашивается АТ-специфичными флюоресцентными красителями (акридиновый оранжевый, DAPI, Hoechst 33258) – рис. 13, а2. ГХ блоки, образованные ГЦ-богатыми сатДНК (например, блоки приядрышкового гетерохроматина), выявляют с помощью хромомицина А<sub>3</sub> (СМА<sub>3</sub>) или 7-аминоактиномицина D (AAD); при этом эти блоки тускло флюоресцируют при окрашивании DAPI (рис. 13, а3). Наиболее четкие рисунки

флюоресценции получают при использовании комбинации красителей, специфичных для АТ- и ГЦ-оснований, обычно DAPI + СМА<sub>3</sub>.

В хромосомном анализе растений широко применяется метод С-дифференциального окрашивания, или С-бэндинг (рис. 13, в, 14). Впервые С-окрашивание было получено Pardue и Gall (1970) на хромосомах мыши, вскоре после этого – на хромосомах человека и растений. Большой вклад в разработку и совершенствование этого метода внесли работы российских ученых: А.И. Щаповой, И.А. Тихоновича, А.Б. Иорданского и его группы. Наибольшее число исследований по С-бэндингу было выполнено в 70–90 гг. XX в., а в настоящее время он используется в ряде лабораторий России, США, Японии и некоторых других стран.

Показано, что блоки, выявляемые методом С-бэндинга, располагаются в определенных позициях, индивидуальных для каждой хромосомы (рис. 14). Рисунки окрашивания гено-





**Рис. 14.** Дифференциально окрашенный кариотип мягкой пшеницы сорта Чайниз Спринг (Gill *et al.*, 1991. P. 830–839).

моспецифичны и видоспецифичны. Несмотря на то что существует несколько модификаций С-бэндинга, отличающихся друг от друга порядком и продолжительностью отдельных этапов, а также составом красителя Гимза, на хромосомах конкретного вида или сорта растений они выявляют идентичные рисунки расположения С-бэндов (рис. 14). С-бэндинг используют для изучения многих растений, но наиболее широкое применение он нашел у злаков и лилейных, имеющих крупные хромосомы с большим числом ГХ блоков.

Метод N-бэндинга исходно был создан для выявления ядрышкообразующих районов (NOR) хромосом растений и животных, однако позже было обнаружено, что он специфически окрашивает также районы конститутивного гетерохроматина. Методом гибридизации *in situ* было установлено, что положение N-бэндов на хромосомах совпадает с локализацией микросателлитной последовательности (GAA)<sub>n</sub>. Бла-

годаря простоте и надежности метода, который позволил проводить масштабные эксперименты в сравнительно короткие промежутки времени, невысокой стоимости реактивов, совместимости обработок с процедурой гибридизации *in situ* и высокому разрешению N-бэндинг широко использовался в 70–80 гг. XX в. в различных областях цитогенетики растений. В частности, с его помощью японским генетиком Т.Р. Endo были созданы делеционные линии пшеницы, на которых базируются все современные исследования по физическому картированию хромосом этого вида.

Метод N-окрашивания пригоден для изучения лишь некоторых видов растений, так как выявляет не все типы гетерохроматина. Помимо этого, хорошие результаты получали только с помощью красителя Гимза-Banco, который в настоящее время снят с производства. В связи с этим число исследований с применением этого метода в последние годы резко сократилось.

Несмотря на то что G-окрашивание является основным методом анализа хромосом человека и животных, в исследованиях хромосом растений он практически не используется. Некоторые ученые считают, что получить G-бэндинг на растениях в принципе невозможно из-за существенных различий в организации хромосом растений и животных. Другие исследователи приводили результаты G-подобного окрашивания хромосом растений (рис. 13, д), полученного с помощью разного типа преобработок. Вторая группа методов дифференциального окрашивания направлена на изучение функциональной активности хромосом. В нее входят методы серебрения, или Ag-NOR окрашивания, «арлекинное окрашивание» и репликативный бэндинг. **Ag-NOR-окрашивание**, или серебрение, – это метод селективного окрашивания районов ядрышковых организаторов хромосом, активных в предшествующей митозу интерфазе (рис. 13, г). Метод был разработан в середине 70-х гг. XX в. для изучения хромосом млекопитающих, несколько позже он был модифицирован применительно к хромосомам растений. Показано, что серебро окрашивает не кластеры 45S рРНК генов, расположенные в ядрышкообразующих районах хромосом, но ассоциированные с ними аргентофильные белки транскрипционного аппарата: в основном UBF-

фактор связывания и РНК-полимеразу I (RPI), а также селективный фактор промотора (SL1) и ДНК-топоизомеразу I (Торол).

«**Арлекинное окрашивание**» – это метод, предназначенный для выявления сестринских хроматидных обменов (СХО) на хромосомах. Он основан на встраивании аналога тимидина – бром-дезоксисуридина (BrDU) в хромосомную ДНК на протяжении одного из двух или двух последовательных клеточных циклов. ДНК сестринских хроматид дочерних хромосом, образовавшихся после второго деления клеток, будет содержать разное число цепей, включивших BrDU, и в зависимости от этого они будут по-разному окрашиваться флюоресцентными красителями (Hoechst 33258) или красителем Гимза (рис. 13, б). Метод, разработанный в начале 70-х годов XX в. – для анализа хромосом млекопитающих и получивший название «арлекинное окрашивание», является высокочувствительным тестом на мутагенез, однако его применение сдерживает достаточно высокая трудоемкость и продолжительность, а также необходимость работы с токсичными агентами.

Возможность получения **репликативного бэндинга** на хромосомах растений долго оспаривалась многими исследователями. В то же время с помощью иммуноцитохимических методов была показана неравномерность репликации разных участков хромосом на протяжении S-фазы клеточного цикла. В частности, блоки теломерного гетерохроматина и перицентромерные районы хромосом ржи реплицировались в конце S-фазы (рис. 13, е).

**Гибридизация *in situ*** в настоящее время является наиболее распространенным и быстро развивающимся методом хромосомного анализа растений. Впервые как метод прямого картирования последовательностей ДНК на хромосомах ее провели в конце 1960-х–начале 1970-х гг. на животных (Pardue, Gall, 1970) и несколько позже – на растительных препаратах. В первых работах для гибридизации с цитологическими препаратами использовали РНК- или ДНК-зонды, меченные радиоактивным тритием или  $^{125}\text{I}$ , а гибридизационные сигналы выявляли с помощью радиоавтографии (рис. 15, а).

В начале 1980-х гг. был разработан метод *in situ* гибридизации с ДНК-зондами, мечеными биотином, а несколько позднее А. Райбурн и

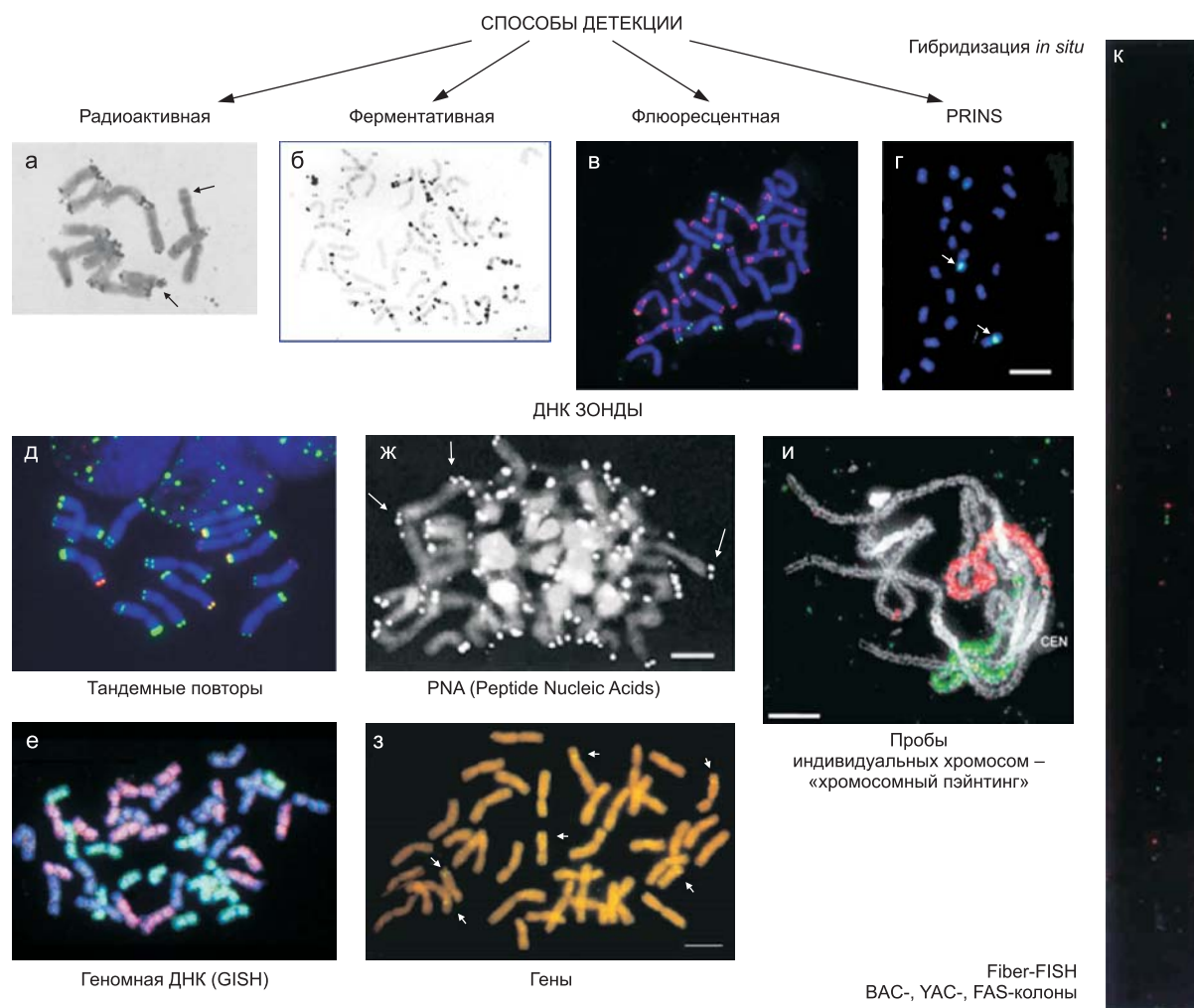
Б. Гилл модифицировали эту методику для хромосом растений (рис. 15, б). Позднее была разработана система, основанная на использовании меченных дигоксигенином (диг-ДУТФ) нуклеотидов, выявляемых с помощью системы антител. Дигоксигенин – стероидный гаптен, выделенный из наперстянки (*Digitalis*), в природе распространен намного реже, чем биотин. В связи с этим использование *dig*-меченных зондов для гибридизации позволяет снизить уровень неспецифического связывания при детекции сигнала по сравнению с биотинилированными пробами.

Важным усовершенствованием метода *in situ* гибридизации стала разработка способов флюоресцентной детекции сигнала – Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH). Преимуществом FISH перед другими методами явилась возможность локализации на одном препарате одновременно нескольких ДНК зондов (рис. 15, в–к). Использование зондов, меченных непосредственно флюорохромами, упрощает исследования, поскольку не требует детекции сигнала.

Дальнейшее развитие гибридизации *in situ* шло в разных направлениях, что привело к появлению множества модификаций метода. Бурный прогресс в этой области связан с совершенствованием микроскопической техники и молекулярно-биологических технологий, появлением систем регистрации и обработки изображений, разработкой новых методов клонирования и приготовления хромосомных препаратов растений, а также с реализацией проектов по секвенированию геномов.

В конце 1980-х–начале 1990-х гг. были опубликованы первые работы по использованию метода геномной *in situ* гибридизации – Genomic *in situ* Hybridization (GISH) – на хромосомах растений. При проведении GISH меченую геномную ДНК одного из родителей полиплоидного вида или гибрида используют как пробу, а фрагментированную геномную ДНК другого родителя или самого полиплоида добавляют в гибридизационную смесь для блокирования кросс-гибридизации. В результате в кариотипе полиплоида проявляется четкая дифференцировка между хромосомами и участками хромосом, унаследованными от разных предков (рис. 15, е).

Следует отметить, что для растений в литературе опубликована лишь одна работа, в которой



**Рис. 15.** Классификация методов *in situ* гибридизации.

а – гибридизация *in situ* меченой тритием кРНК, синтезированной с семейства повторов 480 bp на хромосомах ржи, выявленная с помощью радиоавтографии (время экспозиции 14 дней). Стрелками отмечены две NOR-хромосомы, гетерозиготные по размеру спутника (Jones, Flavell, 1982. P. 595–612); б – гибридизация меченой биотином последовательности pSc119 на хромосомах мягкой пшеницы сорта Sanstar (детекция с помощью пероксидазы хрена и окрашивания красителем Гимза); в – флюоресцентная гибридизация *in situ* pSc119.2 (красный) и Spelt-1 (зеленый) последовательностей на хромосомах *Triticum timopheevii* (фото С.А. Зошука, ИМБ РАН, Москва); г – цитогенетическое картирование тандемно организованного повтора MaTR1 на хромосомах банана методом C-PRINS (Hřibová *et al.*, 2007. P. 268–274); д – FISH с семействами тандемно повторяющихся ДНК pSc119.2 (зеленый) и Spelt52 (красный) на хромосомах *Aegilops longissima* (фото С.А. Зошука, ИМБ РАН, Москва); е – геномная гибридизация *in situ* (GISH) на хромосомах мягкой пшеницы с использованием геномной ДНК *T. monococtum* (красный) и *Ae. tauschii* (зеленый) в качестве зондов (фото А.В. Амосовой, ИМБ РАН, Москва); ж – метафазная пластинка *Nicotiana tabacum*, меченная TTAGGG-PNA зондом (Weiss, Scherthan, 2002. P. 155–164); з – картирование генов высокомолекулярных глютеинов на хромосомах мягкой пшеницы методом гибридизации *in situ* (Cabrera *et al.*, 2002. P. 49–54); и – «хромосомный пэйнтинг» хромосомы 1 *Arabidopsis thaliana* на стадии профазы митоза с помощью 183 хромосомспецифичных BAC клонов (BAC клоны короткого плеча метили биотином и выявляли красным цветом, BAC клоны длинного плеча метили дигоксигенином и выявляли зеленым цветом (Lysak *et al.*, 2003. P. 195–204)); к – многоцветный FISH с зондами интегразы (красный) и HB17 (зеленый) на вытянутых ДНК фибриллах *Aegilops squarrosa* (Fukui *et al.*, 2001. P. 189–196).

удалось получить специфическую гибридизацию каждой из индивидуальных хромосом на препаратах хромосом арабидопсиса. Этот метод, получивший название «хромосомного пэйнтинга» и основанный на использовании

хромосомспецифичных ДНК-зондов, широко используется в молекулярной цитогенетике человека и животных для исследования изменений хромосом в процессе эволюции, идентификации хромосомных перестроек и решения

многих других задач. Считается, что применение этого метода на растениях невозможно из-за избыточного содержания повторяющихся последовательностей и высокого уровня гомогенизации повторов между хромосомами.

Важным усовершенствованием метода гибридизации *in situ* стала разработка в середине 1990-х гг. системы тирамидной амплификации сигнала – Tyramide Signal Amplification (TSA). Она позволила решить одну из сложнейших проблем FISH на хромосомах растений – картирование индивидуальных генов. Суть TSA состоит в использовании тирамид, меченных флюорохромами (или биотином), как субстрата пероксидазы для переноса множества копий молекул флюорохрома (биотина) непосредственно к сайту связывания пероксидазы. Это позволяет усилить сигнал в 10–100 раз без существенного повышения фона. Сигналы можно выявлять с помощью флюоресцентного микроскопа или сразу, или после дополнительной инкубации с флюоресцентно меченым стрептавидином. С помощью этого метода стало возможным картировать на хромосомах растений ДНК-зонды размером не более 1–3 т.п.н., что примерно соответствует размеру гена. Решать подобные задачи можно также с помощью PRINS-полимеразной цепной реакции на препаратах с использованием праймеров, фланкирующих «целевой» ген (рис. 15, г).

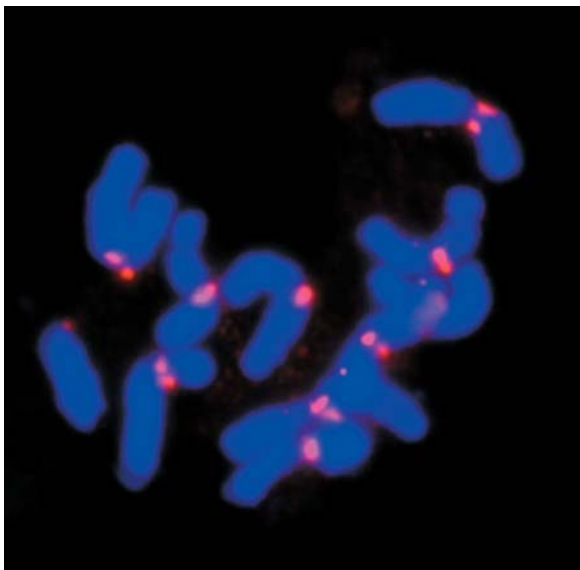
Принципиально новым подходом к созданию зондов для FISH стала разработка пептидо-нуклеиновых кислот (Peptide Nucleic Acid = PNA) – синтетических аналогов ДНК, в которых сахаро-фосфатный остов молекулы ДНК заменен полиамидным. Они не несут электрического заряда и в связи с этим обладают более высокой чувствительностью и специфичностью в сравнении с обычными ДНК зондами. Особенности химической структуры PNA позволяют использовать более короткие зонды при гибридизации, в связи с чем их применяют в основном для изучения и количественной оценки теломерных (рис. 15, ж) и центромерных последовательностей.

Одним из важных технических достижений в области флюоресцентной гибридизации *in situ* стала разработка в 1996 г. технологии получения препаратов фибрилл хроматина путем лизиса интерфазного ядра с сохранением интактных молекул ДНК, которые с помощью достаточно

сложных манипуляций растягиваются по длине предметного стекла. Fiber-FISH используется для точной физической локализации генов и разных семейств повторяющихся последовательностей (рис. 15, к), колокализации зондов относительно друг друга, картирования трансгенов и решения многих других задач.

Современная гибридизация *in situ* представляет собой комплекс методов, отличающихся как по способу детекции сигналов, так и характеру используемых зондов и способу приготовления хромосомных препаратов (рис. 15), и направлена на решение самых разнообразных задач: идентификацию хромосом, картирование генов и других типов последовательностей, в филогенетических и многих других исследованиях.

**Иммунофлюоресценция** – метод хромосомного анализа, сходный с флюоресцентной гибридизацией *in situ*, но отличающийся от нее отсутствием этапа ДНК-ДНК или ДНК-РНК гибридизации на хромосомах. Иммунофлюоресценция предназначена для выявления на цитологических препаратах специфических белков, производных азотистых оснований или других биологических молекул с использованием флюоресцентно меченых антител (рис. 16). Различают прямую и непрямую иммунофлюо-



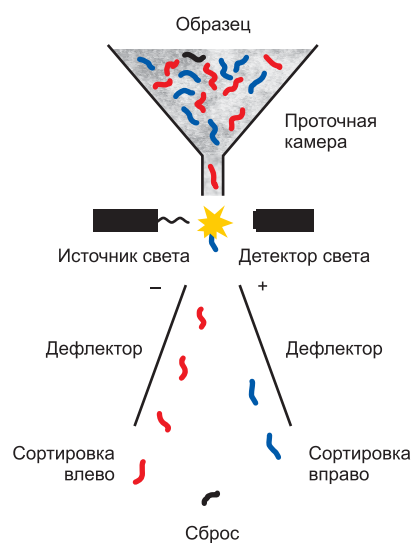
**Рис. 16.** Иммунофлюоресцентное окрашивание хромосом ячменя *Hordeum bulbosum* антителами к центромерно-специфичному гистону злаков CENH3 (фото любезно предоставлено Dr. Andreas Houben, IPK, Германия).

ресценцию; в соответствии с первым методом детекцию молекул-мишеней производят с помощью первичных антител, конъюгированных с флюорохромами, во втором используют систему двойной детекции с первичными и вторичными антителами.

**Проточная флюориметрия** – это метод получения фракций индивидуальных хромосом посредством их сортировки по размеру (интенсивности, спектру флюоресценции или другим характеристикам) при пропускании суспензии через узкий пучок света (обычно излучаемый лазером) с определенной длиной волны. Хромосома, проходящая через луч света, рассеивает световые частицы, при этом спектр испускания окрашивающих ее молекул флюоресцентных красителей имеет большую длину волны, чем у источника света. Комбинация световых волн улавливается детекторами, которые анализируют флюктуации яркости на нескольких детекторах (каждый из которых настроен на определенный пик излучения) и выдает информацию о физической и химической структуре частиц, достаточную для их разделения (рис. 17). Для проведения проточной флюориметрии необходимо, чтобы хромосомы (или другие частицы) можно было разделить по их физическим или химическим параметрам. Для работы с растениями необходимо проводить синхронизацию клеточных делений для получения достаточно высокого митотического индекса, а также использовать эффективные процедуры лизиса растительных тканей для получения суспензии изолированных хромосом.

Проточные флюориметры были разработаны в середине 1960-х гг. и с конца 1970-х годов они начали активно использоваться в молекулярной цитогенетике человека и млекопитающих для получения фракций индивидуальных хромосом с целью создания хромосомоспецифичных ДНК-библиотек, получения проб для SKY-FISH и многих других задач. Первые работы по проточной флюориметрии хромосом растений появились лишь в середине 1980-х–начале 1990-х гг.

Важной проблемой при работе с большинством видов растений является сходство морфологических параметров хромосом. В этом случае не удается изолировать «чистые» фракции отдельных хромосом, но получают группы из нескольких сходных по размеру

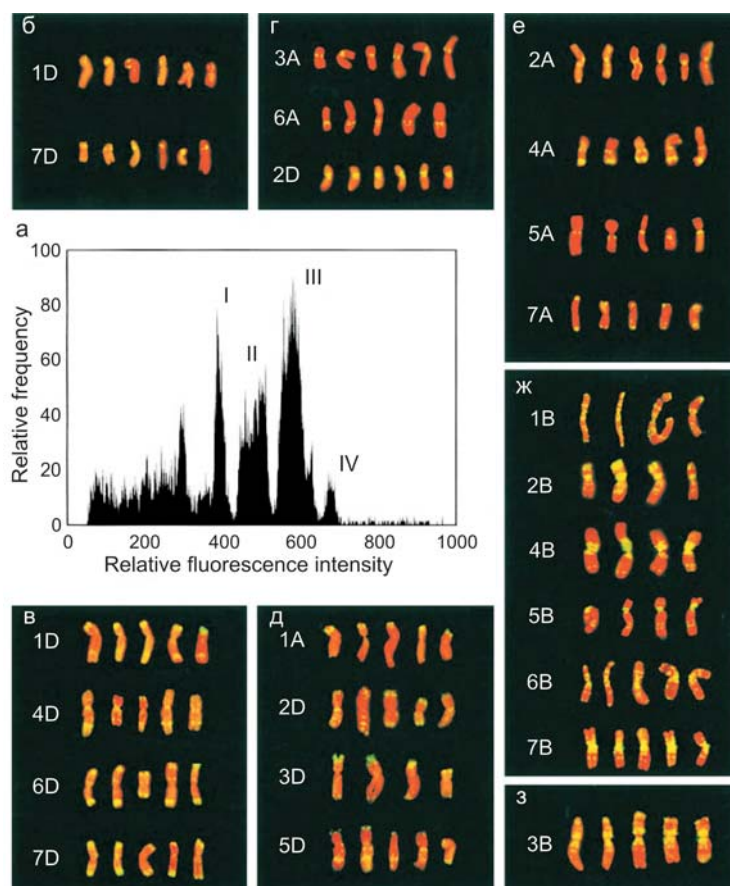


**Рис. 17.** Схема проточного флюориметра, разделяющего суспензию хромосом на две фракции.

хромосом (рис. 18). Для хромосомного сортирования таких культур используют делеционные или транслокационные линии, в которых «целевая» хромосома отличается от остального набора по размеру (Doležel *et al.*, 2009). В настоящее время проточная флюориметрия является одним из наиболее востребованных методов в геномике растений, поскольку на ее основе создаются хромосомоспецифичные ВАС-библиотеки, необходимые для успешного выполнения проектов по секвенированию геномов.

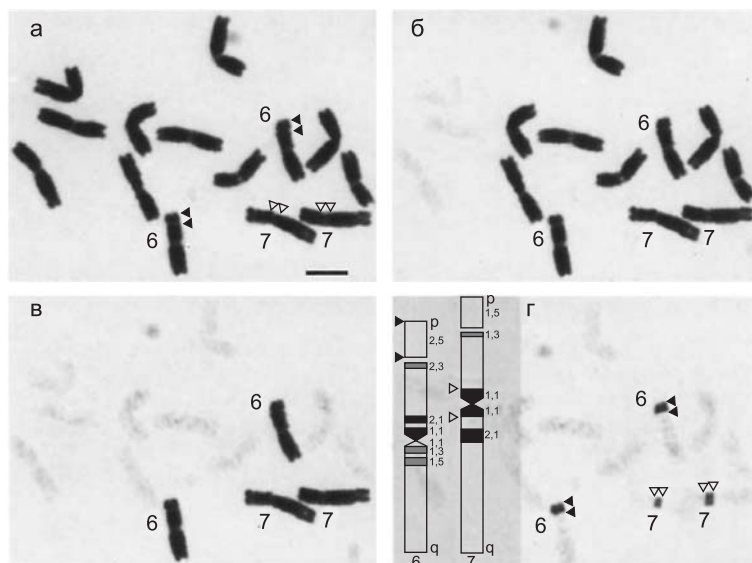
**Микродиссекция** как способ получения изолированных хромосом или их участков методом прямого «вырезания» из препаратов под микроскопом была разработана в начале 1980-х гг. для выделения и клонирования участка политенной хромосомы дрозофилы. Первые публикации по применению микродиссекции у растений вышли в начале 1990-х гг., и с тех пор этот метод применяют во многих лабораториях мира. Существуют два основных способа микродиссекции: лазерная, при которой на препаратах с помощью лазерного луча выжигают все хромосомы, кроме целевой (рис. 19), и прямое вырезание хромосом (участков хромосом) с помощью стеклянной микроиглы, присоединенной к микроманипулятору, с использованием инвертированного микроскопа (рис. 20).

Хромосомы или их фрагменты, полученные с помощью микродиссекции, собирают в

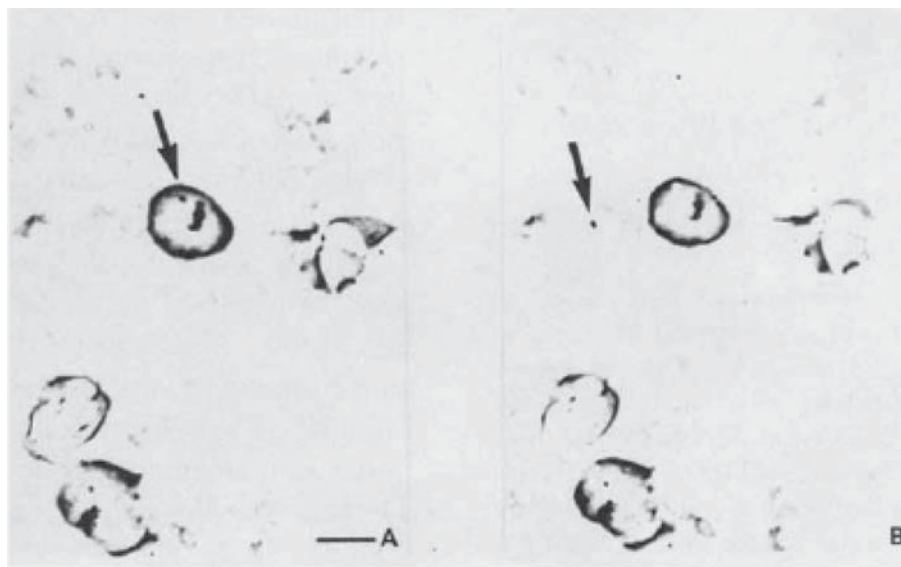


**Рис. 18.** «Цитофотометрический» кариотип *T. aestivum* cv. Chinese Spring (а) и изображения хромосом, выделенных из отдельных пиков.

Сортированные хромосомы идентифицировали по рисункам мечения методом C-PRINS с использованием праймеров к микросателлиту GAA (б, г, е-з) или *Afa* повтору (в, д). Хромосомы окрашены йодистым пропидием. (а) «Цитофотометрический» кариотип, полученный на окрашенных DAPI хромосомах, содержит три основных сложных пика (I, II и III), представляющих разное число типов хромосом, и хорошо выраженный пик IV, соответствующий хромосоме 3B. (б, в – хромосомы из пика I; г, д) – хромосомы из пика II; (е, ж) – хромосомы из пика III; (з) – хромосома 3B из пика IV (Vrana *et al.*, 2000. P. 2033–2041).



**Рис. 19.** Лазерная микродиссекция – выжигание ненужных участков препаратов с помощью лазерного луча. На препарате остаются только предназначенные для работы фрагменты хромосом (Fukui *et al.*, 1992. P. 787–791).



**Рис. 20.** Вырезание с помощью стеклянной микроиглы, присоединенной к микроманипулятору, отдельных хромосом или их фрагментов, предназначенных для анализа (Jung *et al.*, 1992. P. 503–511).

микропробирки и используют для получения зондов для гибридизации *in situ* или молекулярно-генетического анализа, создания клонотек и решения других задач. Несмотря на то что с помощью микродиссекции можно собрать существенно меньшее число копий хромосомы по сравнению с проточной флюориметрией, этот метод обладает рядом преимуществ. Во-первых, он позволяет исследователю манипулировать не только целыми хромосомами, но и их отдельными участками. Помимо этого, для проведения микродиссекции достаточно небольшого количества материала: на настоящий момент разработаны технологии, позволяющие изучать единичные хромосомы, вырезанные из препаратов.

Как и в случае проточной флюориметрии, при проведении микродиссекции необходимо, чтобы «целевую» хромосому можно было узнать на хромосомном препарате. При работе с препаратами человека и животных хромосомы окрашивают с помощью G-бэндинга, не повреждающего хромосомную ДНК. Все методы дифференциального окрашивания хромосом растений включают обработки растворами кислот и щелочей, разрушающих ДНК и делающих ее непригодной для амплификации. В связи с этим у растений микродиссекцию проводят или на хромосомах, значительно отличающихся от основного набора по морфологии (например,

половых хромосомах *Silene latifolia*), в мейозе моносомных или чужеродно-замещенных/дополненных линий, в которых целевая хромосома находится в унивалентном состоянии или на телоцентрических, транслокационных или делеционных линиях.

## ОСНОВНЫЕ ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ХРОМОСОМНОГО АНАЛИЗА РАСТЕНИЙ

### Идентификация хромосом

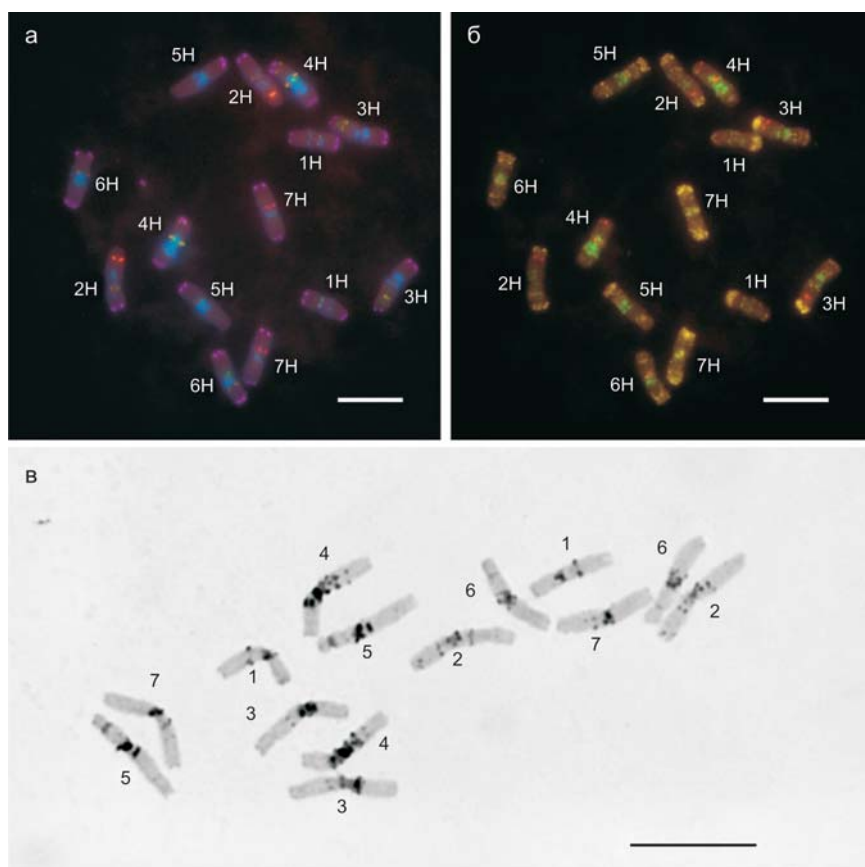
Основной целью разработки методов дифференциального окрашивания является точная идентификация всех хромосом в кариотипе организма, и эта задача остается актуальной вплоть до настоящего времени. У растений основными методами хромосомного анализа, позволяющими выявлять индивидуальность хромосом, являются различные варианты дифференциального окрашивания и гибридизация *in situ*.

Метод флюоресцентного бэндинга применяют для идентификации хромосом разных растений. Рисунки дифференциального окрашивания, получаемые с помощью флюоресцентного и С-бэндинга, могут значительно отличаться, что, в частности, наблюдается у злаков. У других видов, например лилейных и большинства мелкохромосомных растений, позиции DAPI

блоков совпадают с локализацией конститутивного ГХ, выявляемого С-методом, в связи с чем эти два метода могут заменять друг друга. Дифференциальная флюоресценция часто появляется после проведения гибридизации *in situ*, при этом положение ярко или тускло флюоресцирующих блоков служит вспомогательным маркером для идентификации хромосом.

У злаков для идентификации хромосом обычно используют метод С-бэндинга (рис. 21, в), который позволяет безошибочно узнавать все хромосомы пшеницы, ржи, ячменя, овса, а также диких сородичей этих культур. Наиболее подробно с помощью этого метода изучены хромосомы мягкой пшеницы; для нее разработана стандартная классификация хромосом (рис. 14) и принципы номенклатуры бэндов. С-бэндинг позволяет не только проводить полную идентификацию хромосом этого вида, но

и выявлять различия между сортами. Помимо дифференциального окрашивания, для идентификации хромосом злаков применяют метод гибридизации *in situ* с видоспецифичными или геном-специфичными ДНК-последовательностями или пробами рРНК генов (рис. 21, а, б). В молекулярной цитогенетике пшеницы чаще всего используют В-геном-специфичный повтор рSc119.2 и D-геномный повтор рAs1; комбинация этих зондов позволяет распознавать 19 из 21 пары хромосом. У овса имеющийся набор FISH маркеров позволяет только разделять геномы и узнавать хромосомы, несущие локусы рРНК генов, тогда как с помощью С-бэндинга можно полностью идентифицировать хромосомы всех существующих видов. Для хромосом ячменя Kato (2011) создал набор из 5 ДНК-зондов, позволяющих с высокой точностью проводить идентификацию хромосом этого вида;



**Рис. 21.** Метафазная пластинка ячменя сорта Emir.

а – комбинация проб: рHv-38 – красный, TAG – зеленый, рHv-961 – фиолетовый, рHv-365 – желтый и GAA – голубой; б – комбинация проб: рHv-38, рHv-365 и GAA (Kato 2011); в – С-окрашенная метафазная пластинка культурного ячменя (HOR 4719-1974). Хромосомы идентифицированы с соответствии с рисунками бэндинга и классифицированы по единой генетической номенклатуре хромосом злаков. Масштабная линейка – 10  $\mu\text{m}$ .



полученные им зонды маркируют не только проксимальные районы хромосом, окрашивающиеся С-методом, но и дистальные участки, не содержащие С-бэндов.

Для идентификации хромосом мелкохромосомных видов растений, характеризующихся четкими С-блоками только в прицентромерных районах хромосом, используют гибридизацию *in situ* с ДНК зондами на основе сателлитных ДНК, маркирующими каждую хромосому или хромосомное плечо (рис. 22). В настоящее время несколько лабораторий, в основном из США и Китая, работают над созданием наборов хромосомоспецифичных ДНК-зондов для видов хозяйственно полезных растений с мелким размером хромосом, таких как хлопчатник, огурец, тыква и другие.

FISH с использованием зондов рРНК генов и клонированных семейств сателлитных повторов является также наиболее эффективным методом идентификации хромосом хвойных растений.

#### Создание и поддержание коллекций генетических линий

Хромосомный анализ является необходимым инструментом для создания и поддержания коллекций генетических линий. Он необходим как для идентификации хромосом при получении таких линий, так и для контроля за наследованием структурно измененных хромосом. Это связано

с тем, что в мейозе у анеуплоидов нередко происходит смена унивалентов, что приводит к замене одной моносомной или телоцентрической хромосомы на другую. Помимо этого, анеуплоидия может индуцировать вторичные хромосомные перестройки, которые необходимо учитывать при работе с генетическими линиями.

Методы N- и C-окрашивания использовали при создании серии делеционных линий мягкой пшеницы, а затем и делеционных линий хромосом других злаков (рожь, ячмень). Поскольку рожь и ячмень являются диплоидами, анеуплоидия или делеция хромосом в гомозиготном состоянии для них летальны. В связи с этим для получения делеционных линий по хромосомам H- и R-геномов использовали наборы созданных ранее дополненных пшенично-ячменных или пшенично-ржаных линий.

#### Анализ отдаленных гибридов

Одной из наиболее востребованных областей применения хромосомного анализа растений является анализ отдаленных гибридов. Отдаленная гибридизация используется в селекции многих сельскохозяйственных культур для введения ценных признаков от диких сородичей в геном культурного растения. Показано, что многие зарубежные и российские сорта мягкой пшеницы содержат замещения или транслокации с хромосомами ржи, пырея и других видов. Быст-

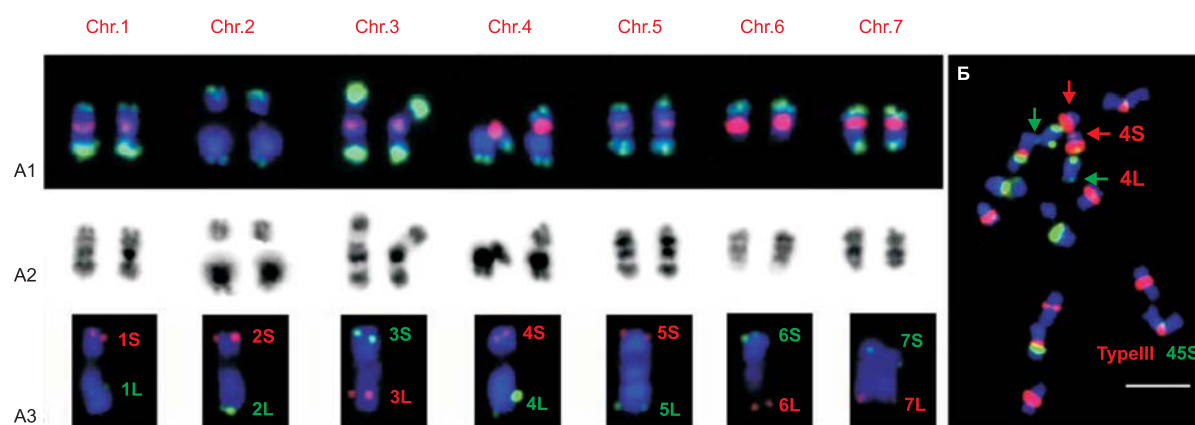
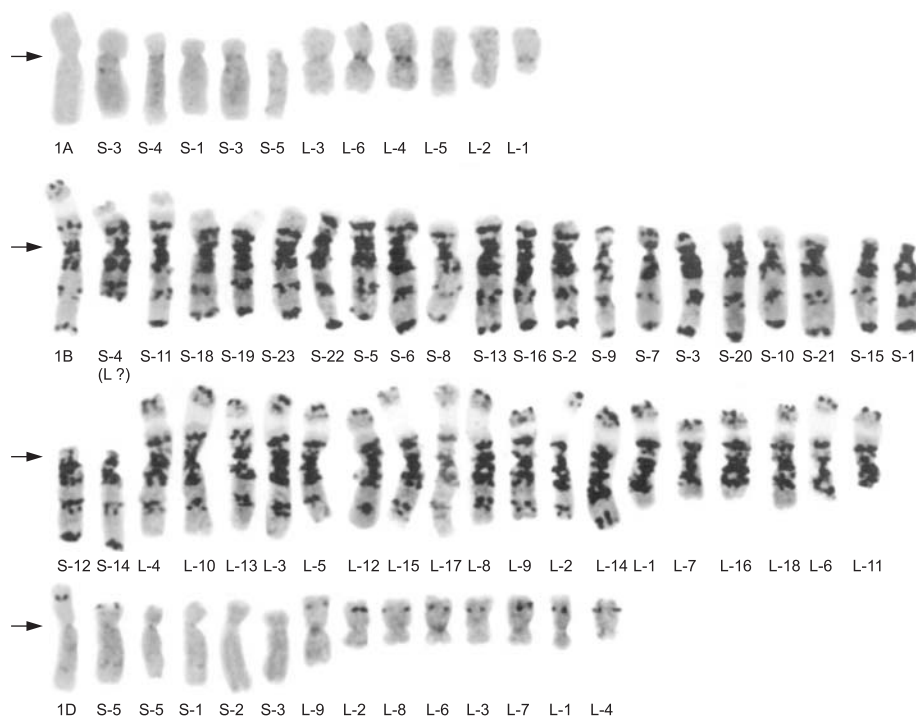


Рис. 22. Интеграция генетической и цитологической классификации хромосом огурца.

A1 – распределение повторов типа I/II (зеленый) и типа III (красный) на хромосомах огурца; A2 – инвертированное DAPI окрашивание; A3 – локализация хромосомоспецифичных фосмидных клонов на плечах индивидуальных хромосом; Б – локализация фосмиды 4S (красная) и 4L (зеленая) вместе с повторами типа Type III (красная) и 45S рДНК (зеленая) на митотических хромосомах. Масштабная линейка = 2,5 μm (Ren *et al.*, 2009. e5795).

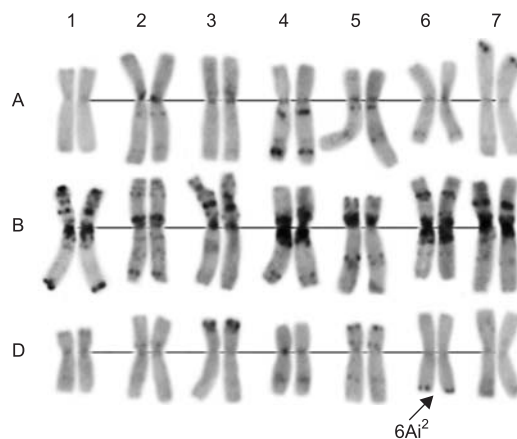


**Рис. 23.** Рисунки С-окрашивания нормальных и делетированных хромосом 1-й гомеологической группы пшеницы Chinese Spring.

Стрелками обозначено положение центромерных районов. За нормальной хромосомой (слева) следуют делетированные хромосомы по короткому и затем длинному плечам (Endo, Gill, 1996. P. 295–307).

рым и точным методом детекции чужеродного генетического материала у таких форм является С-дифференциальное окрашивание (рис. 24). В то же время этот подход недостаточно эффективен для выявления интрогрессии в участки хромосом, лишенные гетерохроматических блоков. В таком случае точное представление о числе и размерах интрогрессированных фрагментов генома донора в геном вида-реципиента можно получить с помощью геномной гибридизации *in situ* (рис. 25, а), избирательно окрашивающей участки чужеродной ДНК.

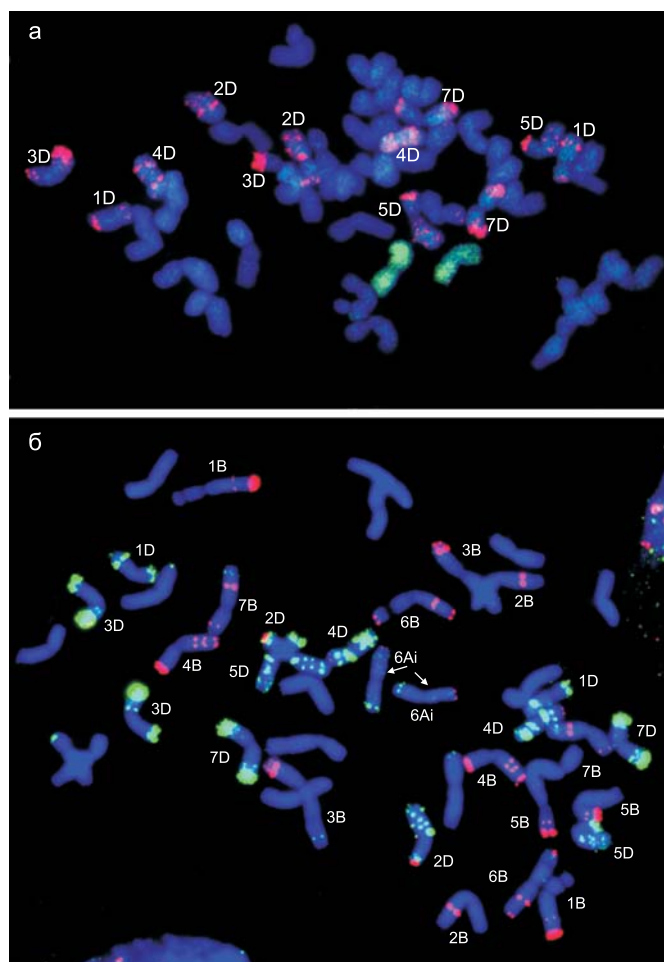
Идентификацию интрогрессированных хромосом или хромосомных фрагментов можно также проводить методом гибридизации *in situ* с геном-специфичными ДНК-зондами (рис. 25, б). В случае, когда в замещение или транслокацию вовлечена хромосома D-генома пшеницы, предпочтительнее использовать гибридизацию *in situ* с несколькими D-геном-специфичными ДНК-зондами, поскольку число получаемых с их помощью маркеров намного превышает число ГХ блоков, выявляемых С-бэндингом.



**Рис. 24.** Кариотип мягкой пшеницы сорта Тулайковская-10.

1–7 – гомеологические группы; А, В, D – геномы. 6A1<sup>2</sup> – хромосома пырея.

В отличие от других методов исследования, в том числе основанных на использовании молекулярных маркеров, только хромосомный анализ способен достаточно быстро предоставить полную информацию о генетической



**Рис. 25.** Гибридизация *in situ* на хромосомах мягкой пшеницы сорта Тулайковская-10.

а – GISH с геномной ДНК *Agropyrum glaucum* (зеленый) и D-геном-специфичным повтором pAs1 (красный) (фото к.б.н. И.Г. Адониной, ИЦиГ СО РАН, Новосибирск); б – FISH с pSc119.2 (красный) и pAs1 (зеленый) зондами (фото к.б.н. А.А. Шишкиной, ИОГен РАН, Москва).

структуре гибридной формы. На основе этих данных можно целенаправленно подбирать другие типы маркеров для точной оценки размеров и локализации интрогрессированных фрагментов.

#### Выявление и анализ хромосомных перестроек

Хромосомные перестройки являются одним из механизмов эволюции и внутривидовой дивергенции растений. Они встречаются примерно у 20 % образцов полиплоидных пшениц (Badaeva *et al.*, 2007), в некоторых странах до 40 % сортов могут содержать определенные типы транслокаций (например, T5B:7B у французских сортов мягкой пшеницы). Возможно, что некоторые хромосомные перестройки имеют адаптивное значение и благодаря этому широко распространяются среди растений в отдельных географических популяциях. В то

же время гетерозиготность по транслокациям может приводить к нарушениям мейоза и стерильности. В настоящее время хромосомный анализ является единственным надежным способом выявления и идентификации хромосомных aberrаций у растений. Для их детекции используют анализ мейотической конъюгации хромосом в гибридах, а также анализ митотических хромосом методами дифференциального окрашивания и гибридизации *in situ* с геном-специфичными ДНК зондами или зондами, специфическими для отдельных хромосомных плеч.

Наиболее сложными для идентификации являются транслокации, затрагивающие эухроматические районы двух хромосом. Для их выявления необходимо привлекать дополнительные методы, в частности GISH (если транслокация затронула хромосомы разных геномов) или FISH с ДНК-зондами, маркирующими оба плеча каждой хромосомы.

### Филогенетические исследования

Хромосомный анализ применяют при оценке филогенетического родства видов и родов растений, исследования процессов внутривидовой дивергенции, определения происхождения полиплоидных форм и установления гомеологии хромосом. Для решения каждой конкретной задачи необходимо выбирать наиболее подходящие методы исследования. Так, анализ внутривидового разнообразия целесообразно проводить с помощью наиболее полиморфных маркеров, например, рисунков С-окрашивания (рис. 26). Исследования, проведенные на пшенице, овсах, ржи, ячмене, лилейных, показали перспективность этого подхода для изучения процессов внутривидовой дивергенции и оценки генетического сходства популяций, определения возможных центров происхождения и одомашнивания культурных растений, выявления возможных путей их распространения. Рисунки С-бэндинга каждого вида растений индиви-

дуальны, при этом особенности распределения ГХ блоков на хромосомах родительских форм сохраняются и у их полиплоидных потомков. В связи с этим С-окрашивание, наряду с другими методами, используют для поиска родительских форм полиплоидных видов растений.

В то же время, метод С-окрашивания оказался малоинформативным для определения генетического родства (гомеологии) хромосом родственных видов. У видов *Triticeae* ценными маркерами, позволяющими установить принадлежность некоторых хромосом к одной из трех гомеологических групп (1-я, 5-я и 6-я), являются локусы 5S и 18S-5.8S-45S рРНК генов. Это обусловлено тем, что относительное расположение рДНК локусов на хромосомах злаков является высококонсервативным признаком геномов или групп геномов, позволяющим проводить их идентификацию. Эти маркеры активно используются и для оценки филогенетических взаимосвязей других групп растений, как однодольных, так и двудольных.

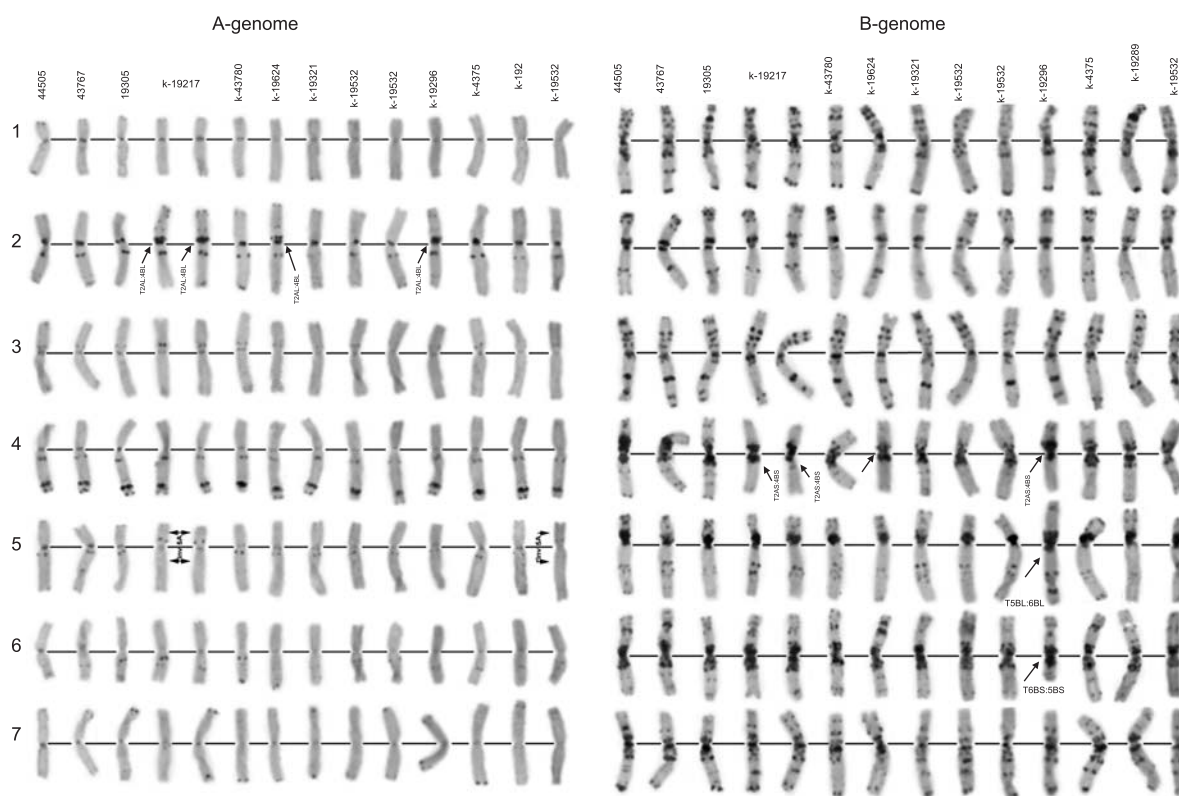


Рис. 26. Оценка внутривидового разнообразия пшеницы *T. aestivum* с помощью С-бэндинга.

1–7 – гомеологические группы. Стрелками отмечены транслоцированные хромосомы.

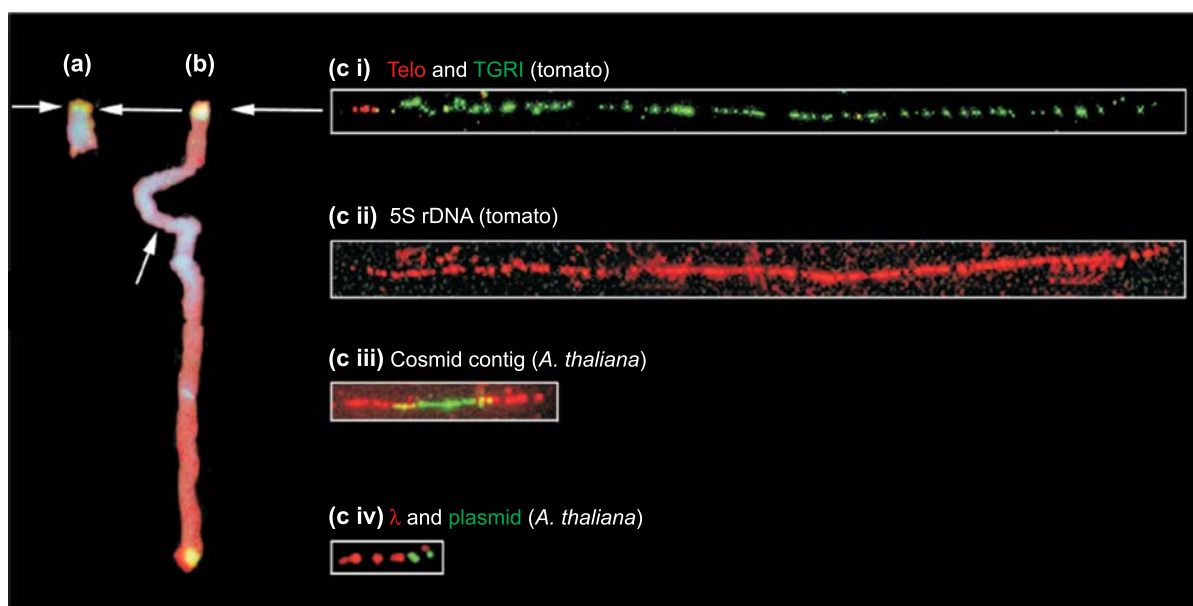
### Физическое картирование хромосом

Определение хромосомной локализации генных или других ДНК-последовательностей проводят с помощью метода гибридизации *in situ*. Картирование высокоповторяющихся ДНК не представляет сложности; такие зонды широко применяют для идентификации хромосом самых разных растений. В то же время, картирование индивидуальных генов представляет значительные трудности из-за избыточного содержания повторов и особенностей организации хромосом. Несмотря на то что первые успешные результаты по локализации генов на хромосомах были опубликованы еще в 90-х гг. XX в., значительного прогресса в этой области удалось достичь после разработки метода получения препаратов хромосомных фибрилл, создания системы тирамидной амплификации сигнала, а также совершенствования систем регистрации изображений (рис. 27). Благодаря

этому на хромосомах растений стало возможным картировать последовательности ДНК длиной менее 3 т.п.н.

### Изучение структурной организации хромосом

Для анализа структурной организации хромосом растений используют весь комплекс методов хромосомного анализа. Проточная флуориметрия и микродиссекция помогают в поиске новых ДНК-последовательностей и создании зондов для гибридизации, тогда как с помощью FISH эти зонды картируют на хромосомах. Дифференциальное окрашивание выявляет блоки гетерохроматина, АТ- и ГЦ-богатые участки на хромосомах. С помощью иммуноцитохимии определяют локализацию специфических белков (кинетохорных, белков, связанных с рекомбинацией). Fiber FISH анализирует тонкую структуру отдельных районов хромосом – центромерных,



**Рис. 27.** Флуоресцентная гибридизация *in situ* на хромосоме томата и на вытянутых ДНК фибриллах.

Рисунки (а) и (б) даны при одном увеличении. а – хромосома на стадии метафазы митоза, окрашенная DAPI, длиной 2,6  $\mu\text{m}$ , с дистальным зеленым сигналом субтеломерного повтора TGR1. Стрелкой обозначена позиция центромеры; б – пахитенный бивалент хромосомы 6 томата длиной 39,3  $\mu\text{m}$ , с теломерным и TGR-1 повторами. Гетерохроматин и эухроматин хорошо дифференцируются. Стрелкой обозначена позиция центромеры; в – примеры FISH с разными пробами, гибридизованными на вытянутых фибриллах хроматина; (с i) – теломерный повтор длиной 16 т.п.н. (красный) и субтеломерный повтор TGR1 длиной 408 т.п.н. (зеленый) на дистальном конце короткого плеча хромосомы 6 томата; (с ii) – повтор 5S рДНК (657 т.п.н.) в перичентромерном гетерохроматине короткого плеча хромосомы томата; (с iii) – три частично перекрывающиеся космиды в контиге *Arabidopsis* (de Jong *et al.*, 1999. P. 258–263).

субтеломерных (рис. 27); с ее помощью определяют положение разных типов последовательностей относительно друг друга.

### Исследования функциональной активности хромосом

В изучении функциональной активности хромосом основными методами исследования являются иммуноцитохимия, а также разные варианты дифференциального окрашивания – серебрение, «арлекинное окрашивание» и репликативный бэндинг. Нередко эти методы используются одновременно или дополняют друг друга. С их помощью изучают такие сложные процессы, как ядрышковое доминирование (методы серебрения и иммуноцитохимии), рекомбинация и репарация («арлекинное окрашивание» и иммуноцитохимия), репликация (репликативный бэндинг и иммуноцитохимия), эпигенетический сайленсинг (иммуноцитохимия), митоз и мейоз. Очевидно, что в этой области исследований все возрастающую роль играют и будут играть иммуноцитохимические методы с использованием антител к белкам, участвующим в разных клеточных процессах, или формам модифицированных гистонов, белкам клеточного аппарата и т. д.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в соответствии с Программой ФНИ (проект № VI.53.1.5.) и при поддержке РФФИ и программы РАН «Динамика и сохранение генофондов».

### ЛИТЕРАТУРА

- Сергеева Е.М., Салина Е.А. Мобильные элементы и эволюция генома растений // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2011. Т. 15. № 2. С. 585–600.
- Badaeva E.D., Dedkova O.S., Gay G. *et al.* Chromosomal rearrangements in wheat: their types and distribution // *Genome*. 2007. V. 50. No. 10. P. 907–926.
- Bennett M.D. Plant genome values: How much do we know? // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. No. 5. P. 2011–2016.
- Cabrera A., Martin A. *et al.* *In situ* comparative mapping (ISCM) of *Glu-1* loci in *Triticum* and *Hordeum* // *Chrom. Res.* 2002. V. 10. No. 1. P. 49–54.
- Chen R., Song W., Li X., An Z. Chromosome G-banding in plants by inducing with trypsin and urea[ast] // *Cell Res.* 1994. V. 4. No. 1. P. 79–87.
- Choulet F., Wicker T., Rustenholz C. *et al.* Megabase level sequencing reveals contrasted organization and evolution patterns of the wheat gene and transposable element spaces // *Plant Cell*. 2010. V. 22. No. 6. P. 1686–1701.
- de Jong J.H., Franz P., Zabel P. High resolution FISH in plants – techniques and applications // *Trends Plant Sci.* 1999. V. 4. No. 7. P. 258–263.
- Doležel J., Šimková H., Kubaláková M. Chromosome genomics in the Triticeae // *Genetics and Genomics of the Triticeae* / Eds G.J. Muehlbauer, C. Feuillet. N.Y., Springer, 2009. 7. Part 2 (Tools, Resources and Approaches). P. 285–316.
- Endo T.R., Gill B.S. The deletion stocks of common wheat // *J. Hered.* 1996. V. 87. No. 4. P. 295–307.
- Fukui K.N., Suzuki G., Lagudah E.S. *et al.* Physical arrangement of retrotransposon-related repeats in centromeric regions of wheat // *Plant Cell Physiol.* 2001. V. 42. No. 2. P. 189–196.
- Fukui K., Minezawa M., Kamisugi Y. *et al.* Microdissection of plant chromosomes by argon-ion laser beam // *Theor. Appl. Genet.* 1992. V. 84. No. 7. P. 787–791.
- Gale M.D., Devos K.M. Comparative genetics in the grasses // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. No. 5. P. 1971–1974.
- Gill B.S., Friebe B., Endo T.R. Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosome bands and structural aberrations in wheat (*Triticum aestivum*) // *Genome*. 1991. V. 34. No. 5. P. 830–839.
- Hřibová E., Doleželová M., Town C.D. Isolation and characterization of the highly repeated fraction of the banana genome // *Cytogenet. Genome Res.* 2007. V. 119. No. 3/4. P. 268–274.
- Jones J.D.G., Flavell R.B. The mapping of highly-repeated DNA families and their relationship to C-bands in chromosomes of *Secale cereale* // *Chromosoma*. 1982. V. 86. No. 5. P. 595–612.
- Jung C., Claussen U., Horstemke B. *et al.* A DNA library from an individual *Beta patellaris* chromosome conferring nematode resistance obtained by microdissection of meiotic metaphase chromosomes // *Plant Mol. Biol.* 1992. V. 20. No. 3. P. 503–511.
- Kakeda K., Yamagata H. Immunological analysis of chromosome replication in barley, rye, and durum wheat by using an anti-BrdU antibody // *Hereditas*. 1992. V. 116. P. 67–70.
- Kato A. High-density fluorescence *in situ* hybridization signal detection on barley (*Hordeum vulgare* L.) chromosomes with improved probe screening and reprobing procedures // *Genome*. 2011. V. 54. No. 2. P. 151–159.
- Lysak M.A., Pecinka A., Schubert I. Recent progress in chromosome painting of *Arabidopsis* and related species // *Chrom. Res.* 2003. V. 11. No. 3. P. 195–204.
- Meyers L.A., Levin D.A. On the abundance of polyploids in flowering plants // *Evolution*. 2006. V. 60. No. 6. P. 1198–1206.
- Moore G. Cereal chromosome structure, evolution, and pairing // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 2000. V. 51. No. 1. P. 195–222.
- Pardue M.L., Gall J.G. Chromosomal localization of mouse satellite DNA // *Science*. 1970. V. 168. No. 3937. P. 1356–1358.
- Ren Y., Zhang Z., Liu J. *et al.* An integrated genetic and cytogenetic map of the cucumber genome // *PLoS ONE*.

2009. V. 4. No. 6. e5795.
- Salina E.A. Tandem repeats in evolution of polyploid wheat and *Aegilops* section *Sitopsis* // Israel J. Plant Sci. 2007. V. 55. No. 3/4. P. 231–240.
- Sandhu D., Gill K.S. Gene-containing regions of wheat and the other grass genomes // Plant Physiol. 2002. V. 128. No. 3. P. 803–811.
- Santos J.L., Lacadena J.R., Cermeño M.C., Orellana J. Nucleolar organiser activity in wheat-barley chromosome addition lines // Heredity. 1984. V. 52. No. 3. P. 425–429.
- Schmidt T., Heslop-Harrison J.S. Genomes, genes and junk: the large-scale organization of plant chromosomes // Trends Plant Sci. 1998. V. 3. No. 5. P. 195–199.
- Tek A., Jiang J. The centromere regions of potato chromosomes contain megabase-sized tandem arrays of telomere-similar sequence // Chromosoma. 2004. V. 113. No. 2. P. 77–83.
- Vosa C.G. Heterochromatin recognition with fluorochromes // Chromosoma. 1970. V. 30. No. 3. P. 366–372.
- Vrana J., Kubalaková M., Simková H. *et al.* Flow sorting of mitotic chromosomes in common wheat (*Triticum aestivum* L.) // Genetics. 2000. V. 156. No. 4. P. 2033–2041.
- Weiss H., Scherthan H. *Aloe* spp. – plants with vertebrate-like telomeric sequences // Chromosome Res. 2002. V. 10. No. 2. P. 155–164.

#### ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Инге-Вечтомов С.Г. Генетика с основами селекции. Н-Л.: Издательство, 2010.
- Картель Н.А., Макеева Е.Н., Мезенко А.М. Генетика: энциклопедический словарь. Минск: Тэхналогія, 1999.
- Льюин Б. Гены. Изд-во «Мир», 1987.
- Appels R., Morris R., Gill B.S., May C. Chromosome Biology. Boston a.o.: Kluwer Acad. Publ., 1998. P. 256–265.

УДК 575.22:631.52:636.03

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ В ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ И В СЕЛЕКЦИИ

© 2013 г. Е.К. Хлесткина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,  
e-mail: khlest@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 14 мая 2013 г. Принята к публикации 1 ноября 2013 г.

Еще в первые десятилетия развития генетики стало ясно, что генетические маркеры могут быть полезными при анализе сложных признаков. Однако низкая встречаемость и ряд других недостатков не позволили классическим генетическим маркерам, а впоследствии и белковым маркерам широко войти в селекционную практику. Последнее поколение генетических маркеров (молекулярные, или ДНК-маркеры) характеризуется более высокой частотой встречаемости в геноме и основано на универсальных, а значит широко востребованных и постоянно развивающихся методах анализа. Это стало залогом бурного развития направлений генетики и селекции, связанных с использованием ДНК-маркеров.

В настоящей статье рассматриваются основные типы молекулярных маркеров и направления их использования.

**Ключевые слова:** генетические маркеры, ДНК-маркеры, молекулярные маркеры, классификация ДНК-маркеров, картирование генома, отбор с помощью маркеров, геномная селекция.

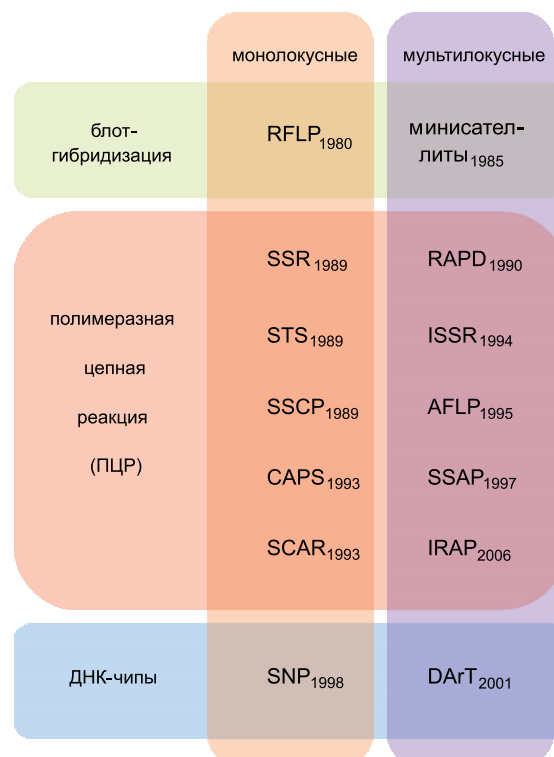
Роль молекулярных маркеров в современной генетике трудно переоценить. С их помощью составлены подробные молекулярные карты генома человека и десятков видов растений и животных, на которые нанесены важнейшие гены, определяющие рост и развитие организмов, морфологические признаки, устойчивость к заболеваниям и другие свойства. Молекулярные маркеры широко используются в популяционной генетике, сравнительной генетике и геномике, в филогенетических исследованиях. Благодаря молекулярным маркерам расширяются возможности медицинской диагностики, появляются новые более точные методы паспортизации пород животных и сортов растений. Использование молекулярных маркеров позволяет значительно ускорять процесс селекции (Алтухов и др., 2002; Банникова, 2004; Сулимова, 2004; Смарагдов, 2009; Матвеева и др., 2011; Хлесткина, 2011).

### МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ: КЛАССИФИКАЦИЯ И ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ

**Молекулярные маркеры** (синоним – **ДНК-маркеры**) – это генетические маркеры, анализируемые на уровне ДНК. ДНК-маркеры являются третьим поколением генетических маркеров. Им предшествовали **белковые маркеры**, а еще ранее – **классические генетические маркеры**. Впервые теоретическое обоснование использованию генетических маркеров («сигналей») дал около века назад А.С. Серебровский: «... сигналами мы называем удобные для менделистических наблюдений альтернативные гены с более или менее известной локализацией, которые, не оказывая воздействия на изучаемый трансгрессирующий признак и влияя достаточно определенным образом, облегчают генетический анализ этого признака,



- **Классический генетический маркер** соответствует гену, аллели которого имеют четко выраженные отличия на уровне фенотипа.
- **Белковый маркер** соответствует гену, аллели которого имеют отличия (разную молекулярную массу) на уровне белкового продукта.
- **Молекулярный маркер** соответствует гену или некодирующему участку генома, разные варианты (аллели) которого отличаются на уровне ДНК. Отличия на уровне ДНК (**полиморфизм ДНК**) могут быть выявлены:
  - с помощью гибридизации с известными нуклеотидными последовательностями;
  - при секвенировании нуклеотидной последовательности;
  - при сравнении длины фрагментов, полученных с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР);
  - в результате обработки ДНК эндонуклеазами рестрикции.



позволяя следить за наследованием того участка хромосомы, в котором эти сигналы расположены» (Серебровский, 1970).

В настоящее время насчитывается несколько десятков типов молекулярных маркеров. Наиболее широко используемые ДНК-маркеры перечислены на рис. 1. Их разделяют на три группы, согласно основному методу анализа:

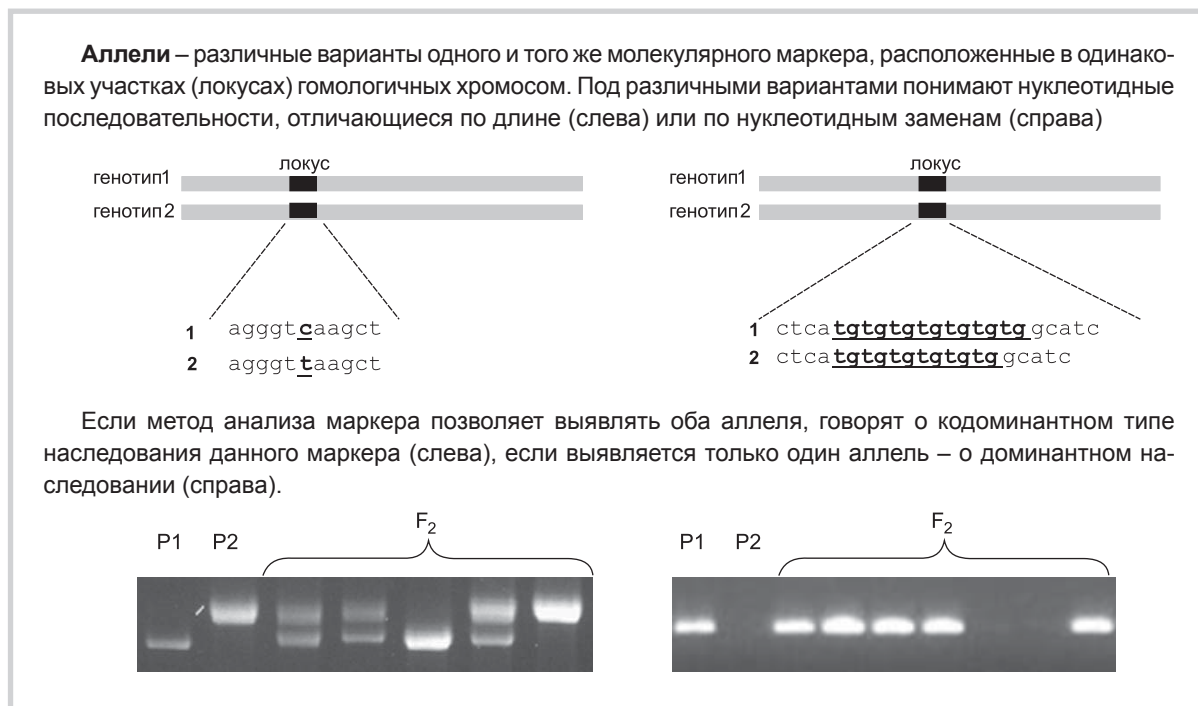
**Рис. 1.** Схематическая классификация молекулярных маркеров и год их первого упоминания в публикациях.

Слева указан основной метод, используемый для анализа данного класса маркеров.

маркеры, исследуемые с помощью (1) блот-гибридизации, (2) ПЦР и (3) ДНК-чипов.

#### Основные классы молекулярных маркеров

- **AFLP** (amplified fragment length polymorphism) – полиморфизм длины амплифицированных фрагментов.
- **CAPS** (cleaved amplified polymorphic sequences) – расщепленные амплифицированные полиморфные последовательности.
- **DArT** (diversity array technology) – ДНК-чип технология для изучения разнообразия.
- **IRAP** (inter-retrotransposon amplified polymorphism) – полиморфизм амплифицированных последовательностей между ретротранспозонами.
- **ISSR** (inter simple sequence repeats) – межмикросателлитные последовательности.
- **RAPD** (random amplified polymorphic DNA) – случайно амплифицированная полиморфная ДНК.
- **RFLP** (restriction fragment length polymorphism) – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов.
- **SCAR** (sequence characterized amplified region) – амплифицированная область, охарактеризованная нуклеотидной последовательностью.
- **SNP** (single-nucleotide polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм.
- **SSAP** (sequence-specific amplification polymorphism) – полиморфизм сиквенс-специфичной амплификации.
- **SSCP** (single strand conformation polymorphism) – полиморфизм конформации одноцепочечной ДНК.
- **SSR** (simple sequence repeats) – простые повторяющиеся последовательности (микросателлиты).
- **STS** (sequence tagged site) – сайт/локус, маркированный нуклеотидной последовательностью.



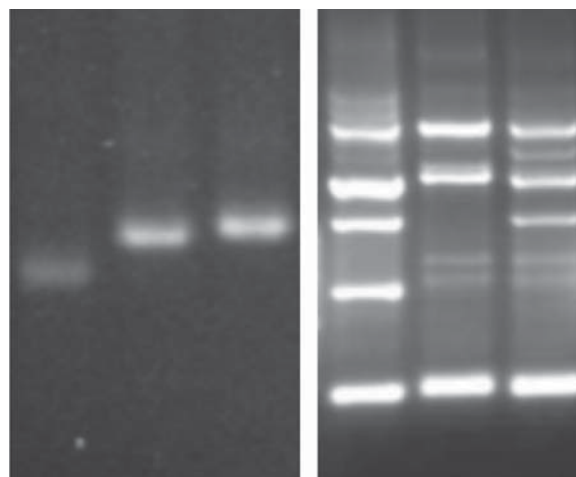
Данная классификация отражает процесс «эволюции» ДНК-маркеров. Первая из трех перечисленных выше групп представляет собой первое поколение ДНК-маркеров, получивших широкое распространение в 1980-е годы. В 1990-е годы ключевые позиции заняли ПЦР-маркеры, в 2000-е годы их существенно потеснили молекулярные маркеры, основанные на использовании ДНК-чипов. В последние 2–3 года для анализа полиморфизма ДНК все чаще используют метод прямого секвенирования генома или его отдельных участков.

К молекулярным маркерам наравне с классическими генетическими применяют термины «локус», «аллель», «доминантный», «кодоминантный». Молекулярные маркеры подразделяют на монолокусные и мультилокусные (рис. 2). Монолокусные маркеры наследуются чаще всего по кодоминантному типу, мультилокусные – по доминантному.

### ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ И ПРЕИМУЩЕСТВА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ

Среди молекулярных маркеров различают маркеры с известной локализацией (в определенной хромосоме или участке хромосомы, или вблизи конкретного гена) и маркеры, о локализации которых ничего не известно (как правило, это мультилокусные маркеры).

Как те, так и другие находят свое применение в генетических исследованиях и в селекции. Молекулярные маркеры с неизвестной локализацией нельзя использовать для маркирования определенного гена или хромосомы, зато их успешно применяют в филогенетических исследованиях, для паспортизации сортов растений и пород



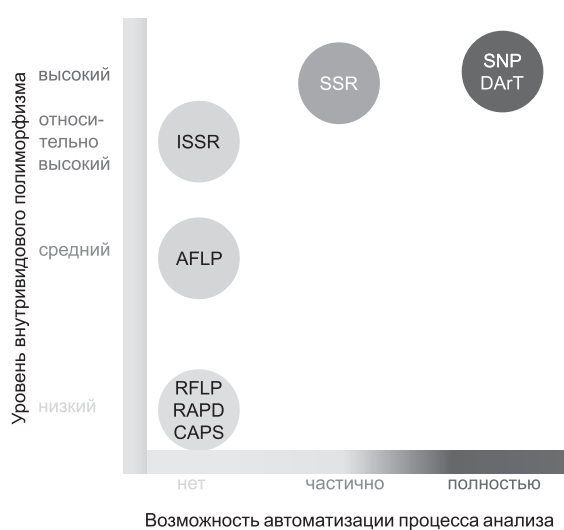
**Рис. 2.** Примеры монолокусного (слева) SSR-маркера и мультилокусного (справа) RAPD-маркера.

Разделение ПЦР-фрагментов в 5 %-м и 2 %-м агарозном геле соответственно.

животных. Некоторые мультилокусные маркеры подходят для создания генетических карт (DArT- и AFLP-маркеры), а также для геномной селекции (DArT). На выбор ДНК-маркеров подходящего типа для решения конкретной задачи влияют и такие характеристики, как уровень внутривидового полиморфизма и возможность автоматизации процесса анализа полиморфизма ДНК (рис. 3).

С внедрением ДНК-маркеров наибольший размах приобрели среди прочих такие направления, как построение молекулярных карт отдельных хромосом и геномов, **картирование** на них генов и локусов количественных признаков (**QTL**). В 1980 г. Дэвид Ботштейн (фото 1) совместно с Р. Уайтом, М. Школьником и Р. Дэвисом разработал первые монолокусные генетические маркеры на основе анализа полиморфизма ДНК (а именно полиморфизма длины рестриционных фрагментов – RFLP) и показал, что с их помощью можно проводить построение генетических карт (Botstein *et al.*, 1980).

За этой пионерской работой последовало создание RFLP-карт различных видов животных и растений. Насколько эффективно RFLP-маркеры позволили продвинуться в картировании геномов, иллюстрирует следующий пример. Первая RFLP-карта генома пшеницы (Liu, Tsunewaki, 1991) содержала в 1,5 раза больше локусов и была в 1,2 раза длиннее прежней



**Рис. 3.** Уровень внутривидового полиморфизма и возможность автоматизации анализа различных типов ДНК-маркеров (Хлесткина, 2011).

- **Основные направления использования монолокусных маркеров:**

- составление молекулярных карт хромосом и геномов;
- картирование генов и QTL;
- маркирование генов, хромосом и геномов;
- сравнительная генетика и геномика;
- отбор с помощью ДНК-маркеров в селекции;
- геномная селекция (только SNP-маркеры);
- молекулярная паспортизация сортов/пород;
- диагностика заболеваний;
- экологический мониторинг;
- исследование генетического разнообразия;
- филогенетические исследования;
- популяционная генетика.

- **Основные направления использования мультилокусных маркеров:**

- составление молекулярных карт хромосом и геномов (только AFLP- и DArT-маркеры);
- картирование генов и QTL (только AFLP- и DArT-маркеры);
- геномная селекция (DArT-маркеры);
- молекулярная паспортизация сортов/пород;
- экологический мониторинг;
- исследование генетического разнообразия ;
- филогенетические исследования;
- популяционная генетика.

классической генетической карты, ставшей результатом трудов многих исследователей в течение нескольких десятилетий.

Выяснилось, что RFLP-маркеры, разработанные для одного вида, могут использоваться для анализа геномов родственных видов и родов. Таким образом, стало возможным сравнительное картирование геномов, благодаря которому внутри отдельных семейств удалось выявить ряды ортологических генов и проследить преоб-

- **Картирование гена** – определение группы сцепления и положения картируемого гена относительно других генов и маркеров данной хромосомы.

- **QTL** (quantitative trait locus) – локус, связанный с определением количественного признака.



Фото 1



Фото 2

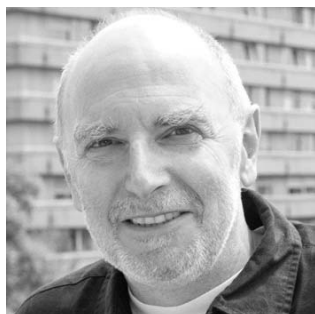


Фото 3



Фото 4

**Фото 1.** Дэвид Ботштейн, Стэнфордский университет, США. В 1980 г. вместе с Р. Уайтом, М. Школьником и Р. Дэвисом показал возможность использования ДНК-маркеров для построения генетических карт и сконструировал первую RFLP-карту генома человека. Их исследование стало одной из отправных точек для подготовки реализации процесса секвенирования генома человека (фото из Wikipedia).

**Фото 2.** Стивен Тэнкли, Корнелльский университет, США. В 1983 г. одним из первых предложил использовать ДНК-маркеры в селекции, является пионером в области позиционного клонирования генов (фото из Wikipedia).

**Фото 3.** Жак Бекман, Университет Лозанны, Швейцария. В 1983 г. одним из первых предложил использовать ДНК-маркеры в селекции растений и животных (фото в открытом доступе на сайте университета Лозанны, Швейцария [www.unil.ch](http://www.unil.ch)).

**Фото 4.** Дитхард Таутц, Институт эволюционной биологии Макса Планка, Германия. В 1989 г. впервые предложил использовать микросателлиты в качестве ДНК-маркеров (фото из <http://www.n-tv.de/wissen/Die-Maus-liebt-das-Vertraute-article3873166.html>).

разования структуры генома отдельных видов в ходе эволюции от общего предка. Результаты этих работ крайне важны для современных исследований в области сравнительной геномики (Moore *et al.*, 1995).

Благодаря использованию RFLP-карт появилась возможность определять точное положение отдельных генов в геноме и клонировать их последовательности на основе картирования (*map-based gene cloning* – позиционное клонирование генов). Пионером в области позиционного клонирования генов является американский исследователь Стивен Тэнкли (фото 2). Под его руководством при использовании данного метода был впервые клонирован ген устойчивости к бактериальной пятнистости плодов томата (*Mar-*

#### С помощью молекулярных маркеров можно:

- ускорять процесс селекции;
- сокращать площади, занятые селекционным материалом;
- достигать более высокой точности отбора;
- добиваться экономии трудовых и материальных ресурсов.

*tin et al.*, 1993). С. Тэнкли был первым и среди тех, кто оценил потенциальные преимущества отбора по генотипу и в 1983 г. одновременно с Жаком Бекманом (фото 3) предложил использовать ДНК-маркеры в селекции (Beckmann, Soller, 1983; Burr *et al.*, 1983; Tanksley, 1983).

Однако массовое распространение работ по картированию генов, а также локусов количественных признаков (QTL – quantitative trait loci) произошло не в эпоху RFLP-маркеров (из-за их высокой стоимости и необходимости использования радиоактивно меченных проб), а с появлением более дешевых и удобных в применении ПЦР-маркеров. Среди ПЦР-маркеров наиболее подходящими и востребованными для картирования генов и геномов оказались микросателлитные (SSR) маркеры. Использовать гипервариабельные последовательности, состоящие из простых повторов, в качестве маркеров впервые предложил в 1989 г. немецкий исследователь Дитхард Таутц (фото 4) (Tautz, 1989).

Именно с ПЦР-маркеров началось широкое внедрение ДНК-маркеров в селекционный процесс. С помощью молекулярных маркеров можно проводить отбор по генотипу, тогда как в традиционной селекции отбор индивидуумов для скрещиваний осуществляется на основе анализа фенотипа. Отбор по генотипу имеет ряд преимуществ по сравнению с отбором по фенотипу.

Процесс генотипирования может быть полностью или частично автоматизирован, тогда как методы автоматического фенотипирования развиваются очень медленно. Приборы для автоматического анализа фенотипа отличаются узкой специализацией и очень высокой стоимостью, в то время как устройства, необходимые для анализа генотипа, дешевле их и являются универсальными.

Анализ проявления того или иного признака осуществляется на строго определенной стадии развития. Образцы для генотипирования можно отобрать практически в любой удобный момент. Отбор проб для выделения необходимого количества ДНК на ранних стадиях развития селективируемых организмов позволяет своевременно изымать из селекционного процесса значительное количество материала, не потратив на анализ и уход за ним лишних средств.

На результаты фенотипирования влияют различные факторы окружающей среды. Генотип не зависит от изменения условий среды. Если отбор ведется на основании анализа фенотипа, то при полном доминировании невозможно отличить доминантные гомозиготы от гетерозигот и, следовательно, выбрать индивидуумы

для скрещивания в текущем поколении. С помощью ДНК-маркеров легко справиться с этой задачей.

Анализ ряда важных признаков растений проводится после стадии развития, на которой может быть осуществлена гибридизация, поэтому скрещивание отобранных образцов проводится уже в следующий вегетационный период. При использовании ДНК-маркеров можно подобрать подходящие пары и осуществить гибридизацию в текущем поколении. Это также ускоряет селекционный процесс.

Благодаря этим преимуществам применение молекулярных маркеров стало неотъемлемой частью селекционного процесса во многих странах мира (Moose, Mumm, 2008; European Cereals Genetics ..., 2012).

### МЕТОДЫ СЕЛЕКЦИИ, ОСНОВАННЫЕ НА ИСПОЛЬЗОВАНИИ ДНК-МАРКЕРОВ

Методы селекции, в которых применяются ДНК-маркеры, разделяют на две основные группы: **ОПМ** и **геномная селекция**.

Метод ОПМ предполагает использование ДНК-маркеров, тесно сцепленных с целевым геном, вместо или вместе с фенотипическим анализом. Маркеры, тесно сцепленные с целевым геном, являются надежным инструментом для предсказания фенотипа. Отбор нужного аллеля целевого гена осуществляется на основе тесно сцепленного с ним аллеля соседнего

- **ОПМ** – отбор с помощью маркеров (MAS – marker-assisted selection); синонимы: MAC (маркер-ассоциированная селекция) и МОС (маркер-опосредованная/ориентированная селекция). Подход в современной селекции растений и животных, позволяющий проводить отбор по генотипу при использовании ДНК-маркеров, тесно сцепленных с селективируемым геном.
- **Геномная селекция** (genomic selection). Метод современной селекции растений и животных, позволяющий при использовании равномерно распределенных по геному ДНК-маркеров проводить отбор по генотипу в отсутствие данных о генах, влияющих на признак.

маркерного локуса. Большая точность отбора достигается при использовании пары маркеров, расположенных вблизи гена по разные стороны от него (т. е. маркеров, фланкирующих целевой ген). Если ген отсеквенирован и выявлены различия нуклеотидной последовательности разных аллелей данного гена, то можно разработать так называемый «внутригенный маркер». Использование такого маркера позволит отбирать нужные генотипы с наиболее высокой точностью. При отсутствии внутригенного или тесно сцепленного с геном ДНК-маркера можно использовать более отдаленные маркеры, однако в таких случаях целесообразно сочетать ОПМ с последующим фенотипированием. Такой комбинированный подход называется «тандемным» отбором (tandem selection), или маркер-направленным фенотипированием (marker-directed phenotyping).

Метод ОПМ хорошо зарекомендовал себя при беккроссной и линейной селекции, а также при создании пирамид генов (Moose, Mumm, 2008).

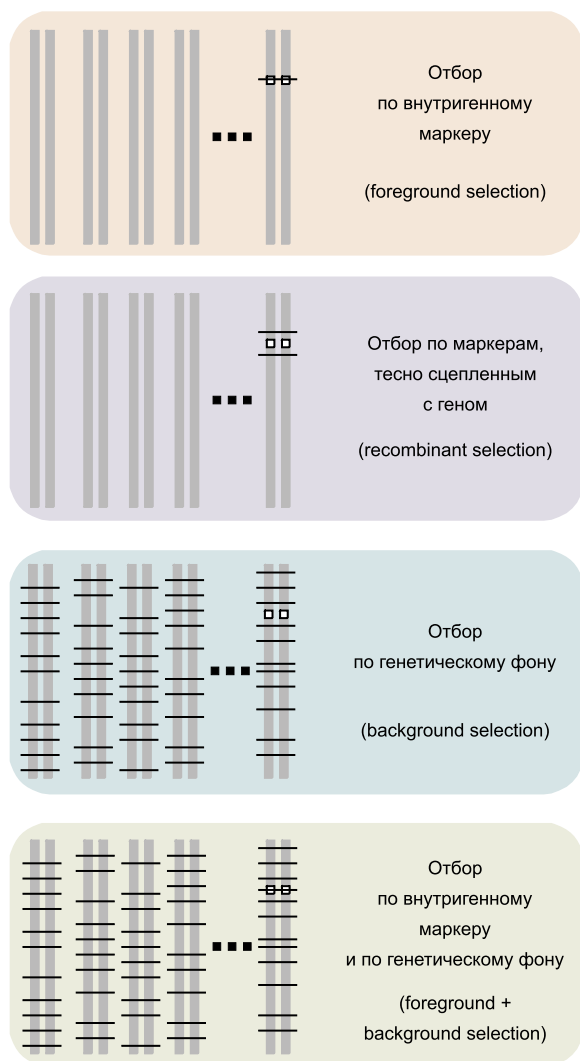
При беккроссной селекции можно вести отбор по внутригенному маркеру (foreground selection), по маркерам, тесно сцепленным с геном (recombinant selection), по генетическому фону (background selection), а также комбинировать отбор по генетическому фону с отбором по внутригенному маркеру или по маркерам, тесно сцепленным с геном (рис. 4). Два первых метода позволяют вести отбор только по целевому гену, контролируя передачу нужного аллеля от донора реципиенту в череде поколений возвратных скрещиваний. Использование значительно большего числа маркеров, равномерно распределенных по геному, позволяет не только контролировать передачу целевого гена от донора реципиенту, но и ускорять восстановление генома реципиента.

Для использования ДНК-маркеров в селекции по тому или иному признаку требуется информация о нуклеотидных последовательностях генов, контролирующих данный признак, или, по крайней мере, о локализации их в геноме, а также о тесно сцепленных с ними маркерах. Если исходные данные отсутствуют, то необходимые подготовительные исследования (рис. 5) могут занять не один год. С целью экономии времени и средств можно проводить молекулярно-генетический анализ и отбор од-

- **Беккроссная селекция на основе ОПМ** (marker-assisted backcrossing) – метод селекции, при котором в процессе последовательных возвратных скрещиваний передаются 1–2 целевых гена от сорта-донора сорту-реципиенту и происходит восстановление генотипа сорта-реципиента в оставшейся части генома; при этом отбор растений для каждого последующего скрещивания осуществляется с помощью ДНК-маркеров.
- **Линейная селекция на основе ОПМ с однократным генотипированием** (single-large scale marker-assisted selection – SLS-MAS) – метод селекции, отличающийся от традиционного метода линейной селекции (или метода педигри) тем, что в одном из ранних поколений с помощью маркеров проводится отбор растений для дальнейшей селекции, что позволяет сразу исключить нежелательные генотипы по некоторым признакам и тем самым существенно сократить объем последующих работ. Например, в случае одного основного гена, по которому ведется отбор, можно в поколении  $F_2$  исключить из дальнейшего анализа 75 % (3/4) нежелательных генотипов, в случае 2 генов – 94 % (15/16) нежелательных генотипов, в случае 3 генов – 98 % (63/64).
- **Создание пирамид генов** (marker-assisted pyramiding) – метод селекции, при котором с помощью ДНК-маркеров ведется отбор одновременно по нескольким генам, определяющим схожие признаки (как правило, в таких случаях отбор по фенотипу затруднен): например, отбор по нескольким генам, определяющим устойчивость к разным расам одного и того же патогена или устойчивость к разным патогенам, поражающим один и тот же орган.

новременно. Такой подход, сочетающий метод беккроссной селекции с QTL-анализом и отбором по генотипу (advanced backcross QTL analysis; рис. 6), в 1996 г. предложили использовать С. Тэнксли (фото 2) и Дж. Нельсон (Tanksley, Nelson, 1996).

Снижение стоимости секвенирования нуклеотидных последовательностей и развитие методов высокопроизводительного секвенирования открыли возможность массовой реализации программ полногеномного секвенирования.



**Рис. 4.** Условное расположение ДНК-маркеров (обозначены черными линиями), используемых при различных вариантах беккроссной селекции, относительно селективируемого гена (белый прямоугольник).

Серые линии – условное обозначение хромосом.

Число видов растений и животных, геном которых полностью секвенирован (как модельных, так и тех, что используются в сельском хозяйстве), стремительно возрастает (рис. 7).

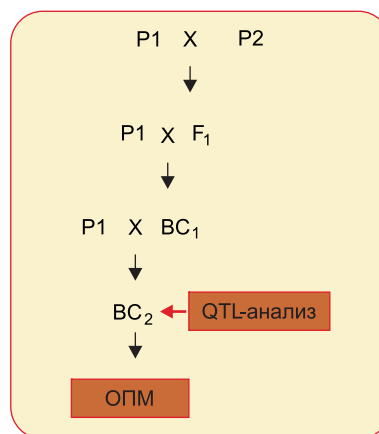
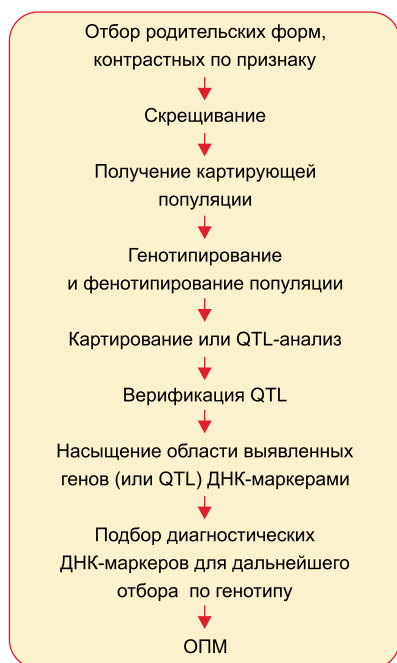
Секвенирование и сравнение генома разных представителей одного и того же вида (ресеквенирование генома) позволяют выявлять полиморфные участки генома и разрабатывать маркеры (как правило, SNP), равномерно и плотно покрывающие геном. К настоящему моменту разработаны полногеномные SNP-чипы для автоматического анализа полиморфизма ДНК

некоторых видов животных и растений, имеющих сельскохозяйственное значение. Внедрение методов высокопроизводительного генотипирования сельскохозяйственных объектов открыло путь для применения нового метода селекции, основанного на анализе большого числа ДНК-маркеров, равномерно распределенных по геному, – **геномной селекции** (Смарагдов, 2009).

Помимо видов, чей геном уже секвенирован, появилась перспектива применения геномной селекции и в отношении тех видов растений и животных, геном которых еще не секвенирован или вовсе не изучен. Не так давно на примере пшеницы было продемонстрировано, что в геномной селекции может быть использован другой метод высокопроизводительного генотипирования – DArT-маркеры (Charmet, 2012). DArT отличаются от SNP тем, что для их разработки не требуются данные по секвенированию генома.

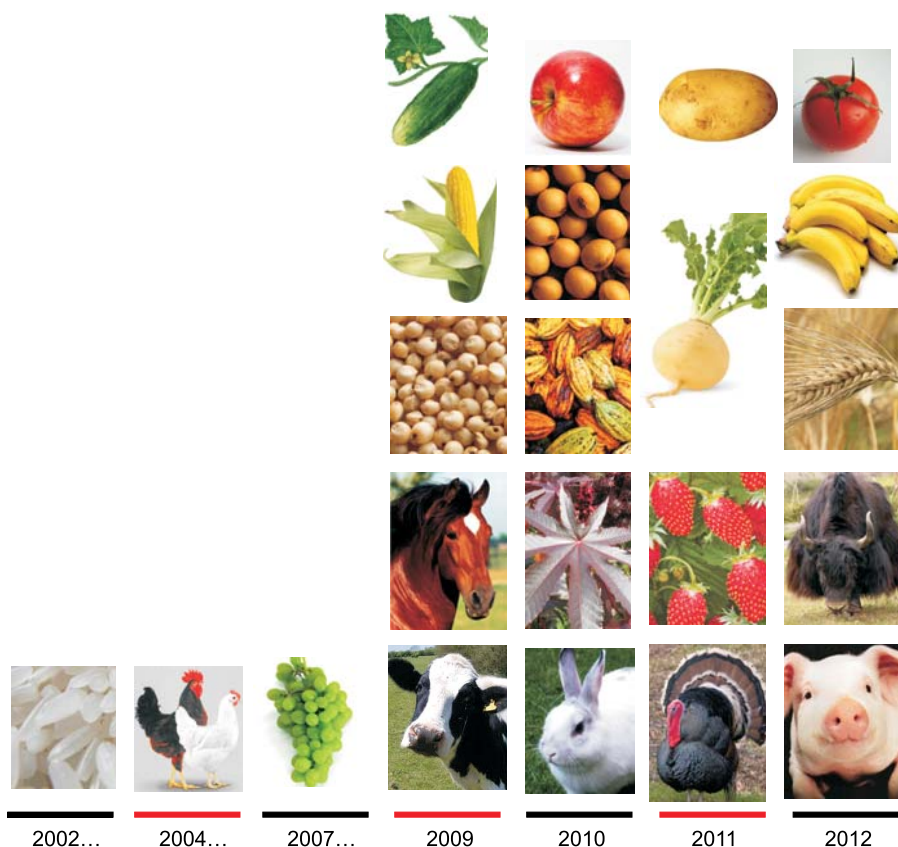
Геномная селекция, как и ОПМ, подразумевает использование ДНК-маркеров и отбор по генотипу. Чем же геномная селекция принципиально отличается от ОПМ? Во-первых, для геномной селекции не требуются знания о генах, влияющих на признаки, а значит не нужны многолетние генетические исследования, предшествующие селекционному процессу. Во-вторых, геномная селекция имеет преимущество при отборе по признакам, имеющим сложный полигенный контроль, тогда как метод ОПМ, как правило, эффективен лишь в случае моно- или олигогенного контроля признаков. Тем не менее, если процесс геномной селекции приведет к нежелательной коселекции признаков (например, повышенной молочной продуктивности и предрасположенности к маститу у крупного рогатого скота), избежать дополнительных генетических исследований, подобных тем, что требуются для ОПМ (рис. 5), не удастся.

Процесс геномной селекции включает три этапа: анализ «тренировочных поколений» (training generations) с использованием методов фенотипирования и генотипирования, выявление корреляций между фенотипом и генотипом, дальнейший отбор по генотипу среди «кандидатов на селекцию» (selection candidates). Установлено, что с помощью ДНК-маркеров можно отбирать устойчивые генные сети, сохраняющиеся в поколениях. Однако необходимыми усло-



**Рис. 6.** Схема подхода, сочетающего метод бек-кроссной селекции с QTL-анализом и отбором по генотипу (advanced backcross QTL analysis).

**Рис. 5.** Схема подготовительных работ для дальнейшего применения метода ОПМ.



**Рис. 7.** Завершение полногеномного секвенирования сельскохозяйственных видов растений и животных.

Слева направо снизу вверх: рис (2002); курица (2004); виноград (2007); корова, лошадь, сорго, кукуруза, огурец (2009); кролик, клещевина, какао, соя, яблоня (2010); индейка, земляника, репа, картофель (2011); свинья, ячмень, банан, томат (2012).



виями для успешного осуществления геномной селекции являются адекватное количество тренировочных поколений, используемых маркеров и правильное соотношение числа маркеров и исследуемых генотипов.

В настоящее время наиболее активно развиваются программы по геномной селекции свиньи (организации TOPIGS в Нидерландах и INRA во Франции), крупного рогатого скота (INRA во Франции, КазАгроИнновация в Казахстане, VikingGenetics в Дании и Швеции, LFL-LGL-ZuchtData в Германии и Австрии, а также ряд компаний в США) и пшеницы (INRA во Франции, CIMMYT в Мексике). Экономическую выгоду от геномной селекции хорошо иллюстрируют данные по селекции крупного рогатого скота. Геномная селекция позволяет сэкономить до 92 % средств, затрачиваемых на оценку быков-производителей, и сократить время оценки с 6 лет до 1 года и 9 месяцев (Смарагдов, 2009).

Таким образом, молекулярные (или ДНК-) маркеры – это новое поколение генетических маркеров, отличающихся от прежних большим количеством и частой встречаемостью в геномах эукариот и основанных на универсальных, а значит широко востребованных и постоянно развивающихся методах анализа. Целесообразным и экономически оправданным оказалось использование ДНК-маркеров в прикладных областях, в частности в селекции, а их применение в фундаментальных исследованиях позволило выйти на новый уровень понимания организации и эволюции геномов изучаемых объектов.

Статья подготовлена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (12\_04\_33027\_мол\_а\_вед), Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и гранта Президента Российской Федерации для молодых докторов наук (МД\_2615.2013.4).

## ЛИТЕРАТУРА

- Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А. Полиморфизм ДНК в популяционной генетике // *Генетика*. 2002. Т. 38. С. 1173–1195.
- Банникова А.А. Молекулярные маркеры и современная филогенетика млекопитающих // *Журн. общей биологии*. 2004. Т. 65. С. 278–305.
- Матвеева Т.В., Павлова О.А., Богомаз Д.И. и др. Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений // *Экол. генетика*. 2011. Т. 9. С. 32–43.
- Серебровский А.С. Генетический анализ. М.: Наука, 1970. 342 с.
- Смарагдов М.Г. Тотальная геномная селекция с помощью SNP как возможный ускоритель традиционной селекции // *Генетика*. 2009. Т. 45. С. 725–728.
- Сулимова Г.Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения // *Усп. соврем. биологии*. 2004. Т. 124. С. 260–271.
- Хлесткина Е.К. Молекулярные методы анализа структурно-функциональной организации генов и геномов высших растений // *Вавилов. журн. генет. и селекции*. 2011. Т. 15. № 4. С. 757–768.
- Beckmann J.S., Soller M. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs // *Theor. Appl. Genet.* 1983. V. 67. P. 35–43.
- Botstein D., White R.L., Scolnick M., Davis R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms // *Am. J. Hum. Genet.* 1980. V. 32. P. 314–331.
- Burr B., Evola S.V., Burr F.A., Beckmann J.S. The application of restriction fragment length polymorphism to plant breeding / Eds J.K. Setlow *et al.* Genetic Engineering. N.Y.: Plenum Press, 1983. P. 45–59.
- Charmet G., Storlie E. Implementation of genome-wide selection in wheat // *Вавилов. журн. генет. и селекции*. 2012. Т. 16. С. 61–68.
- European Cereals Genetics Co-operation Newsletter // *Proc. of the 15th Intern. EWAC Conf.* / Eds A. Börner, B. Kobijlski. Novi Sad, Serbia. 2012. 204 p.
- Liu Y.G., Tsunewaki K. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis in wheat. II. Linkage maps of the RFLP sites in common wheat // *Jap. J. Genet.* 1991. V. 66. P. 617–634.
- Martin G.B., Brommonschenkel S.H., Chunwongse J. *et al.* Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato // *Science*. 1993. V. 262. P. 1432–1436.
- Moore G., Devos K.M., Wang Z., Gale M.D. Grasses, line up and form a circle // *Curr. Biol.* 1995. V. 5. P. 737–739.
- Moose S.P., Mumm R.H. Molecular plant breeding as the foundation for 21<sup>st</sup> century crop improvement // *Plant Physiol.* 2008. V. 147. P. 969–977.
- Tanksley S.D. Molecular markers in plant breeding // *Plant Mol. Biol. Rep.* 1983. V. 1. P. 3–8.
- Tanksley S.D., Nelson J.C. Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines // *Theor. Appl. Genet.* 1996. V. 92. P. 191–203.
- Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers // *Nucl. Acids Res.* 1989. V. 17. P. 6463–6471.

**MOLECULAR MARKERS IN GENETIC STUDIES AND BREEDING****E.K. Khlestkina**

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,

e-mail: khlest@bionet.nsc.ru

**Summary**

Back in the early decades in Genetics, it became clear that genetic markers may be useful in the analysis of complex traits. However, the low occurrence and a number of other shortcomings hampered wide application of classical genetic markers, and later then protein markers in the breeding. The latest generation of genetic markers (molecular or DNA markers) are characterized by frequent occurrence in the genome, and are based on universal (and hence highly demanded and constantly developing) methods of analysis. This became the key to the rapid development of genetics and breeding areas related to the use of DNA markers. This article provides a brief overview of the main types of molecular markers and the fields of their application

**Key words:** genetic markers, DNA markers, molecular markers, classification of DNA markers, genome mapping, marker-assisted selection, genomic selection.

УДК 576.5

## ТРАНСГЕННЫЕ ЖИВОТНЫЕ: ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ

© 2013 г. **О.Л. Серов**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия, e-mail:

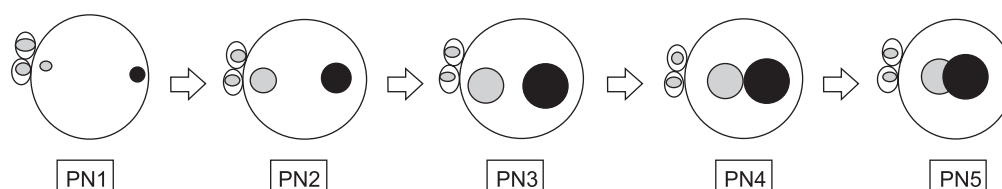
Поступила в редакцию 5 июня 2013 г. Принята к публикации 1 ноября 2013 г.

Геном клетки любого животного и растения постоянно контактирует с чужеродной ДНК других видов или прокариотической ДНК бактерий, грибов, вирусов и т. д. Как правило, цитоплазма клетки «справляется» с этим потоком чужеродной ДНК, поступающей с продуктами питания, расщепляя ее до нуклеотидов в специализированных цитоплазматических структурах, таких как лизосомы. В результате чужеродная ДНК не доходит до ядра клеток и, следовательно, лишена возможности «включиться» в ее геном. Исключением являются ретровирусы, способные проникать через клеточные мембраны и достигать ядра клетки и даже встраиваться в ее геном, становясь его облигатным наследуемым компонентом. Это отдельная тема, связанная с эволюцией взаимоотношений геномов вирусов (паразитов) и клеток животных и растений, в ходе которой выработался специальный механизм, позволяющий чужеродной ДНК встраиваться в геном клеток-мишеней, тем самым его модифицируя.

Немногим более 30 лет назад исследователи разработали способ переноса генов, чужерод-

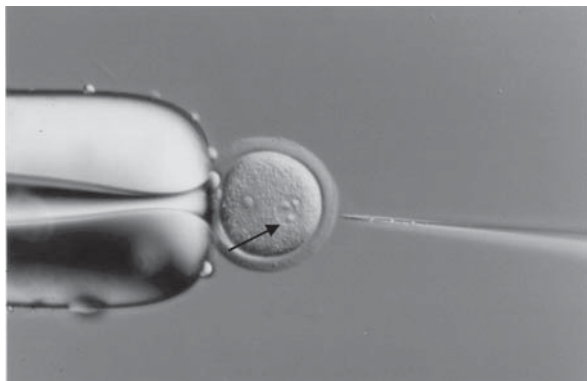
ной ДНК от одного вида животных к другому (Gordon *et al.*, 1980; Brinster *et al.*, 1981). Учитывая решающую роль цитоплазмы в «охране» генома от чужеродной ДНК, авторы разработали метод прямой микроинъекции рекомбинантной ДНК в мужской пронуклеус (на стадии P3–P4) (рис. 1) зигот мыши. Пронуклеус – аналог ядра – практически не содержит ферментов, деградирующих ДНК, потому инжецированная ДНК может сохраняться продолжительное время, не менее одного клеточного цикла, а в реальности сохраняется даже после 3–5 делений.

Сама процедура инъекции в пронуклеус осуществляется под микроскопом с помощью микроманипулятора (рис. 2), в результате чего в пронуклеус инжецируется 2000–4000 копий рекомбинантной ДНК в объеме 1–2 пкл. После микроинъекции пронуклеус увеличивается в объеме, что является свидетельством успешности процедуры. Поскольку процедура травматична, экспериментальные зиготы после инъекции кратковременно культивируют (2–3 ч), затем визуально идентифицируют и удаляют поврежденные зиготы. Неповрежденные



**Рис. 1.** Схема развития одноклеточного эмбриона мыши.

Хроматин мужского (отцовский) и женского (материнский) пронуклеусов представлены темным и серым цветами соответственно. PN1 – небольшие пронуклеусы расположены по периферии эмбриона; PN2 – пронуклеусы увеличиваются в размерах и начинают двигаться к центру эмбриона; PN3 – пронуклеусы продолжают увеличиваться в размерах и сближаться; PN4 – большие пронуклеусы находятся рядом в центре эмбриона; PN5 – пронуклеусы сливаются и вступают в митоз.



**Рис. 2.** Начальный момент подведения микропипетки с раствором ДНК (справа) к зиготе мыши, удерживаемой пипеткой-присоской.

Справа в зиготе хорошо виден мужской пронуклеус (показан стрелкой), а слева – женский.

экспериментальные зиготы трансплантируют хирургическим путем в воронку матки суперовулированных (псевдобеременных) самок (рис. 3). Несмотря на сложность процедуры микроинъекции ДНК в зиготы, квалифицированный оператор способен инъектировать 50–70 зигот за один опыт и затем трансплантировать приемным матерям.

Судьба инъектированной ДНК в зиготах складывается по-разному. В небольшом объеме ядра введенная ДНК присутствует в высокой концентрации, что приводит к образованию конкатенатов, т. е. комплексов из нескольких молекул, связанных нековалентными связями. Как отмечалось выше, введение рекомбинантной ДНК осуществляется на стадии P3–P4 (рис. 1), т. е. в тот период, когда идет активная репликация ДНК в пронуклеусах реципиентного генома. Именно в ходе репликации, в момент образования репликационных вилок, создаются условия физического контакта хромосомной и экзогенной ДНК через образование нековалентных связей. Следствием такого контакта являются «вовлечение» экзогенной ДНК в репликацию хромосомной ДНК и встраивание (интеграция) чужеродной ДНК в хромосому реципиентного генома. Интегрированную чужеродную ДНК в реципиентном геноме принято называть **трансгеном**, так как она становится компонентом генома и, следовательно, способна наследоваться в последующих клеточных поколениях. Важно подчеркнуть, что, как правило,

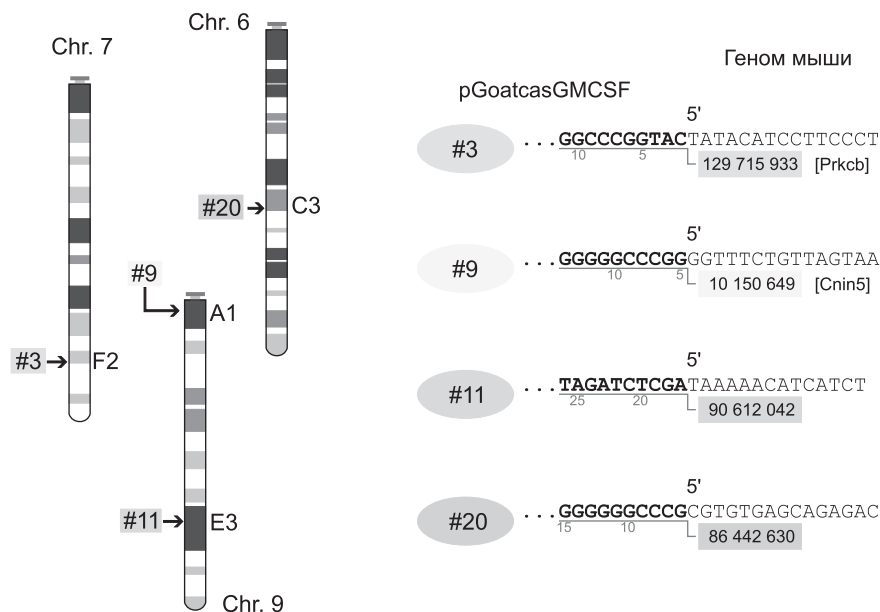


**Рис. 3.** Схема получения трансгенных животных путем инъекции чужеродной ДНК в зиготы.

интеграция происходит в одно место реципиентного генома, что иллюстрирует рис. 4. Важно отметить, что зачастую интеграция осуществляется в нескольких копиях, благодаря конкатенатам, образовавшимся до интеграции, о чем упоминалось выше.

Идентификация трансгенных животных среди родившихся особей из инъектированных зигот проводится с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) по присутствию фрагментов ДНК ожидаемого размера (рис. 5). Нередко последовательности ДНК трансгенов не имеют гомологичных последовательностей в геноме реципиента, и потому подбором праймеров можно надежно идентифицировать трансгенных животных.

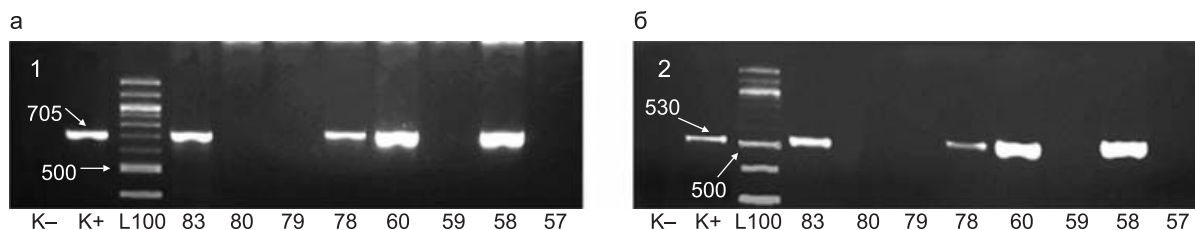
Сама процедура введения в геном животных чужеродной ДНК получила название **трансгенез** или реже **трансгеноз**. Однако, если интеграция чужеродной ДНК не произошла на



**Рис. 4.** Хромосомная локализация трансгена pGoatcasGMCSF у 4 трансгенных мышей #3, #9, #11 и #20, ставших основателями линий (Burkov *et al.*, 2013. P. 949–964).

Видно, что у трансгенных мышей #3 и #20 интеграция трансгена произошла в хромосомы 6 (Ch. 6) и 7 (Ch. 7), а у двух других интеграция прошла в хромосому 9 (Ch. 9), но в разные ее районы.

Справа представлены последовательности ДНК (выделены серым цветом) в местах инсерций трансгена (выделены черным цветом) на физической карте мыши.

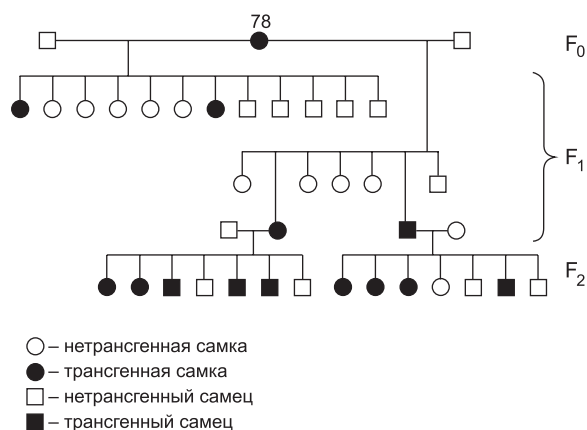


**Рис. 5.** Идентификация трансгенных животных с помощью ПЦР и с использованием праймеров, комплементарных (а) к 5'-последовательности промотора трансгена и последовательности внутри гена *hG-CSF* (кодирует гранулоцит-колониестимулирующий фактор человека); к правой части гена *hG-CSF* и 3'-нетранслируемой области трансгена (справа) (б) (Serova *et al.*, 2011). Видно, что среди 8 исследованных животных 4: #83, #78, #60 и #58 позитивны по присутствию фрагментов ДНК ожидаемого размера, 705 п.о. (слева) и 530 п.о. (справа) соответственно. Позитивный контроль (K+) – рекомбинантная ДНК трансгена; негативный контроль (K-) – ДНК отсутствует; L100 – фрагменты маркерной ДНК разного молекулярного веса с шагом 100 п.о.

одноклеточной стадии, она может произойти на более поздней стадии, например на стадии 2 или 4 клеток. В этом случае развивающийся эмбрион будет мозаиком, состоящим из двух типов клеток, которые содержат трансген, и клеток, в которых он отсутствует, поскольку они являются потомками трансгенных и нетрансгенных бластомеров.

Другим важным последствием мозаицизма является то, что и гаметы трансгенного живот-

ного будут представлены также двумя типами – с трансгеном и без трансгена. В результате этого мозаицизма гамет в потомстве  $F_1$  таких трансгенных животных от скрещивания с нетрансгенными животными будет наблюдаться отклонение от менделевского расщепления 1 : 1 (рис. 6) в пользу увеличения нетрансгенных потомков. Рис. 6 и 7 иллюстрируют мозаичное и менделевское наследование трансгенов у двух трансгенных животных. Частота мозаицизма варьирует от

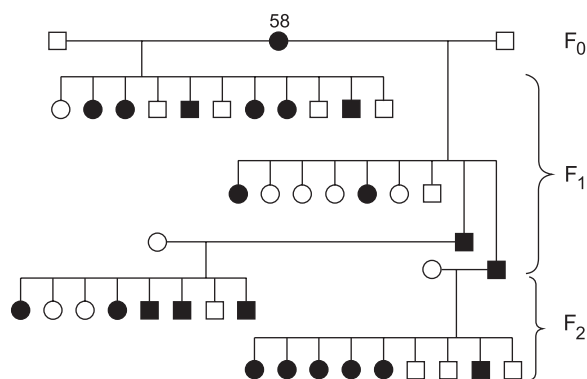


**Рис. 6.** Мозаичный тип наследования трансгена в потомстве  $F_1$  трансгенной самки #78 от скрещивания ее с 2 нетрансгенными самцами.

Видно значительное отклонение от ожидаемого 1 : 1 у потомков  $F_1$ , однако в последующих поколениях наблюдается менделевское расщепление, близкое к 1 : 1.

10 до 20 % среди трансгенных животных так называемого поколения  $F_0$ , т. е. родившихся и развившихся из инъектированных зигот.

Как отмечалось выше, интеграция трансгена происходит случайным образом, т. е. трансген попадает в разное хромосомное окружение (контекст). Следствием этого является достаточно выраженная вариабельность в экспрессии трансгена у разных трансгенных животных, от полного отсутствия экспрессии до уровня, сопоставимого с таковым аутентичного гена. В работах первых десятилетий такая вариабельность объяснялась именно влиянием хромосомного окружения трансгена. По мере накопления знаний о регуляции генов стало очевидным, что первоначальное упрощенное представление о достаточности «минимального» промотора для обеспечения надежной экспрессии трансгена распространялось слишком широко. Поводом послужило исследование трансгенных мышей, несущих конструкцию, включающую ген гормона роста человека, «слитого» с промотором гена эластазы крыс размером 213 п.о. (Ornitz *et al.*, 1985). Эти авторы наблюдали экспрессию гена гормона роста человека только в ацинарных клетках поджелудочной железы, т. е. в клетках, в которых активен ген эластазы. Однако большинство генов, особенно характеризующихся тканеспецифичной или стадиеспецифичной экспрессией, регулируются многими транскрипционными факторами, сайты



**Рис. 7.** Менделевское наследование трансгена в  $F_1$  и  $F_2$  трансгенной самки #58 от скрещивания с нетрансгенными животными.

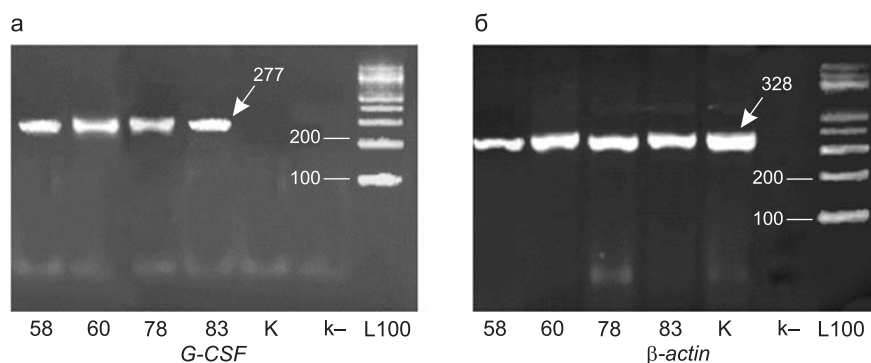
Обозначения те же, что и в рис. 6.

которых могут располагаться на протяженных 5'-фланговых последовательностях промоторов, нередко превышающих 10 и более тыс. п.о. С учетом этого неременным условием при создании конструкций является сохранение ключевых регуляторных элементов в промоторах, контролирующих экспрессию целевого гена. В качестве примера можно рассмотреть создание конструкции, в которой 5'-фланговый район гена  $\alpha S_1$ -казеина козы был «слит» с полноразмерным геном *G-CSF* (кодирует гранулоцит-колониестимулирующий фактор) человека и 3'-нетранслируемым районом гена  $\alpha S_1$ -казеина коровы (Sergova *et al.*, 2011) (рис. 8). Присутствие 3409 п.о. фрагмента промотора  $\alpha S_1$ -казеина козы в конструкции достаточно для корректной экспрессии гена *G-CSF* человека у трансгенных мышей в молочной железе, и только в период лактации (рис. 9).

Тем не менее до сих пор не существует способов предотвращения эктопической экспрессии трансгенов, т. е. предсказуемый профиль экспрессии трансгена по органам и тканям может в реальности наблюдаться в тканях и клетках, в которых используемый промотор в норме неактивен. Большинство исследователей полагают, что причиной эктопической экспрессии является то, что в конструкции трансгена не представлены регуляторные последовательности, в норме расположенные за десятки тыс. п.о. от самого гена. Действительно, такие отдаленные системы



**Рис. 8.** Схема организации трансгена, содержащего 5'-фланкирующую последовательность вместе с промотором гена  $\alpha S_1$ -казеина козы размером 3409 п.о., ген *G-CSF* человека и 3'-фланкирующую последовательность гена  $\alpha S_1$ -казеина коровы (Serova *et al.*, 2011).



**Рис. 9.** Анализ транскриптов гена *G-CSF* человека (а) и гена  $\beta$ -actin (б) в молочной железе у лактирующих трансгенных самок мышей: #58, #60, #78 и #83 и нетрансгенной самки (К). Видно, что транскрипт гена *G-CSF* человека ожидаемого размера (277 п.о.) присутствует у трансгенных самок, отсутствует у нетрансгенной, тогда как транскрипт (328 п.о.) гена  $\beta$ -actin (активен во всех клетках) определяется у всех анализируемых самок.

К – отрицательный контроль ОТ-ПЦР (не добавлена мРНК); L100 – маркер молекулярной массы.

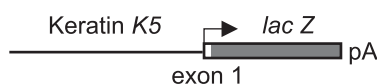
регуляции показаны для ряда генов, хотя для большинства генов это нехарактерно.

Для того чтобы преодолеть эктопическую экспрессию трансгенов, было предложено использовать большие фрагменты геномной ДНК (размером от 100 до 500 тыс. п.о.), включающей целевой ген. Для этого предлагается использовать векторы на основе ВАС клонов или искусственных хромосом (YAC клоны). Однако, как показали более поздние исследования, при инъекции гигантскими молекулами геномной ДНК имеет место их физическая «поломка» или перестройки при интеграции в хромосому реципиентного генома (Chandler *et al.*, 2007; Le Saux *et al.*, 2010).

За прошедшие более 30 лет с момента разработки технологии трансгенеза животных этот подход эффективно использовался и активно

применяется в настоящее время как в фундаментальных, так и прикладных исследованиях. Наиболее популярным методом анализа функции гена является маркировка его экспрессии в клетках в ходе развития трансгенных животных. Стратегия такого подхода основана на создании конструкций, в которых промотор разного размера анализируемого гена «слит» с геном-репортером, например, *lacZ* (кодирует бета-галактозидазу *E. coli*) (рис. 10) или GFP (кодирует «зеленый флюоресцентный белок», green fluorescent protein) (рис. 11).

Будучи введенным в геном животных, такой трансген позволяет визуализировать клетки, в которых активен анализируемый ген, путем гистохимического окрашивания их на активность бета-галактозидазы (в геноме млекопитающих такого фермента нет) (рис. 12).



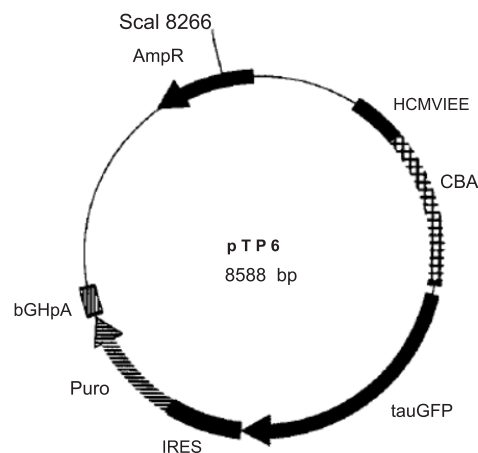
**Рис. 10.** Структура трансгена K5Z, в котором промотор гена кератина коровы размером 5300 п.о. «слит» с геном-репортером *lacZ E. coli* вместе с сигнальной последовательностью полиаденилирования SV40 (pA) (Ramírez *et al.*, 2001. P. 341–350).

Другой пример с использованием *GFP* позволяет визуализировать клетки, позитивные по экспрессии трансгена. На рис. 11 показана конструкция, несущая ген *GFP* под контролем промотора гена  $\beta$ -актина, активного в клетках любого типа.

Трансгенные мыши, несущие такой трансген в своем геноме, содержат меченые зеленым флюоресцентным белком клетки (рис. 13).

Визуализация экспрессии трансгена позволяет оценивать функцию промоторов с использованием в конструкциях разные их размеры. Такая стратегия позволила выявить функциональные регуляторные сайты у многих генов, имеющих клеточно- или тканеспецифичную экспрессию.

Разработанные экспериментальные подходы по получению трансгенных животных неизбежно привели к использованию трансгенных животных в прикладных целях в качестве «био-реакторов»-продуцентов биологически ценных белков человека. Наиболее популярными и продвинутыми технологиями является получение трансгенных животных (козы, овцы, коровы и т. д.), в геном которых введены конструкции, находящиеся под контролем промоторов «молочных генов», как это показано на рис. 8. «Молочные гены» – это группа генов, которые экспрессируются исключительно в эпителиальных клетках молочной железы, причем особенно активно в период лактации. Белки молока млекопитающих представлены главным образом  $\alpha S_1$ -,  $S_2$ -,  $\beta$ - и  $\kappa$ -казеинами (более 70 % всех белков молока), а также лактальбуминами и лактаглобулинами. У грызунов в молочной железе активен еще один ген, *acid whey*, кодирующий «кислый» белок. В качестве примера можно рассмотреть конструкцию, представленную на рис. 8, в которой 5'-фланкирующая последовательность, включающая промотор гена  $\alpha S_1$ -казеина козы, «слита» с полноразмерным



**Рис. 11.** Конструкция tauGFP с геном-репортером «зеленый белок» (*GFP*) под контролем промотора гена  $\beta$ -актина курицы (CBA) и селективируемым геном устойчивости к пуромицину (Puro) (Pratt *et al.*, 2000. P. 19–28).

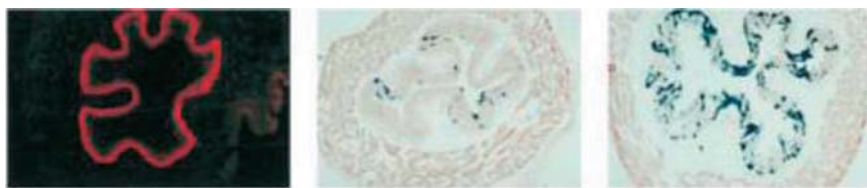
геном *G-CSF* человека и 3'-фланкирующей последовательностью гена  $\alpha S_1$ -казеина коровы. При создании этой конструкции предусматривалось, что при введении ее в геном мышей или коз она будет обеспечивать экспрессию гена *G-CSF* человека в молочной железе трансгенных животных. Анализ экспрессии гена *G-CSF* человека у трансгенных мышей показал присутствие транскриптов этого гена только в молочной железе (рис. 9). Более того, иммунофлюоресцентный анализ с использованием меченых антител против гранулоцит-колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) человека показал, что этот белок присутствует только в эпителиальных клетках молочной железы (рис. 14).

Независимый Вестерн-блот анализ Г-КСФ в молоке трансгенных мышей показал присутствие белка, причем в двух формах – гликозилированной и негликозилированной (рис. 15). Важно отметить, что гликозилированная форма Г-КСФ человека функционально соответствует той форме, которая синтезируется в норме у человека, тогда как негликозилированная менее активна.

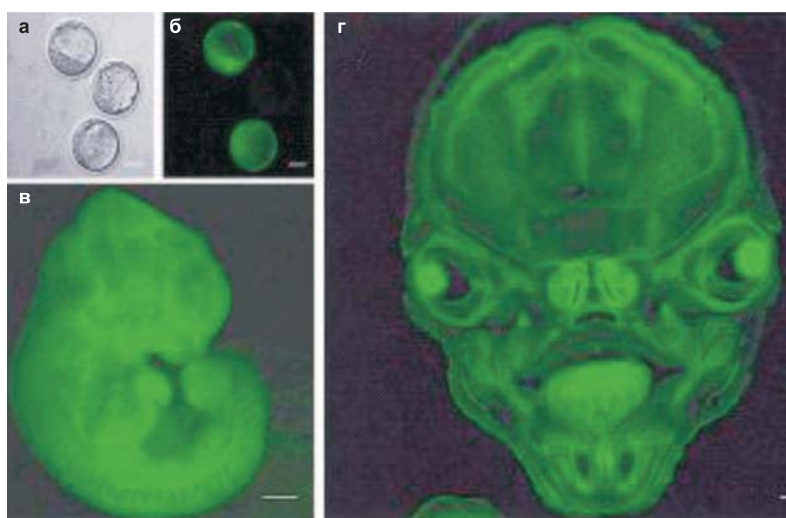
Важно отметить, что секретируемый белок Г-КСФ человека в молоке трансгенных мышей (рис. 16) обладает функциональными свойствами, сопоставимыми с нативным Г-КСФ человека.

На рис. 17 показаны результаты колониеобразующей активности образцов молока по стимулированию пролиферации клеток-предшест-

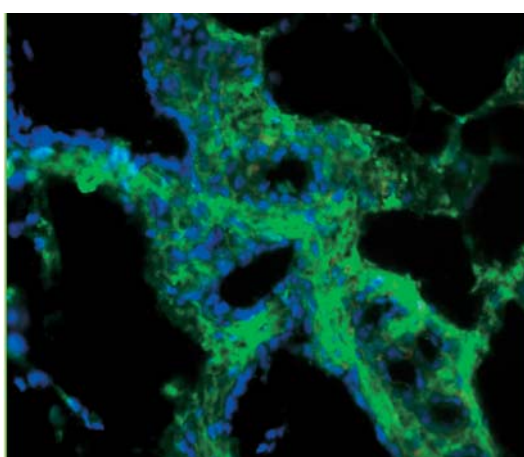




**Рис. 12.** Сравнение экспрессии эндогенного гена *keratin 5* в клетках пищевода (крайний слева, окраска с мечеными антителами против кератина 5) и трансгена K5Z в двух трансгенных линиях мышей в клетках пищевода (в середине и крайний справа, гистохимическая окраска на  $\beta$ -галактозидазу *E. coli*). Видно, что у одного трансгенного животного экспрессия трансгена K5Z (крайний справа) напоминает таковую эндогенного гена, тогда как у другого только часть клеток эпителия пищевода экспрессирует трансген K5Z (в центре), т. е. имеет место мозаичный тип экспрессии (Ramírez *et al.*, 2001. P. 341–350).

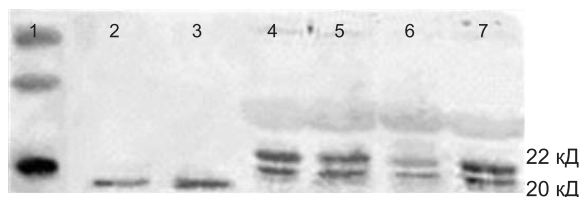


**Рис. 13.** Экспрессия репортерного гена *GFP* у гетерозиготных по трансгену двух (б) из трех бластоцист (а), у эмбриона 10-го дня развития (в); г – распределение «зеленого белка» в структурах головы эмбриона. Можно видеть, что все клетки позитивны по экспрессии *GFP* на всех стадиях развития (Pratt *et al.*, 2000. P. 19–28).



**Рис. 14.** Иммунофлюоресцентный анализ Г-КСФ человека в молочной железе трансгенной самки мыши на 10-й день лактации.

Видно, что большинство эпителиальных клеток позитивны по Г-КСФ (зеленый цвет). ДНК ядер клеток подкрашены DAPI.



**Рис. 15.** Результаты Вестерн-блот анализа молока трансгенных мышей с использованием антител против Г-КСФ человека.

1 – маркеры с различными молекулярными весами в кД; 2, 3 – препараты рекомбинантного Г-КСФ человека (негликозилированный -20 кД); 4–7 – молоко трансгенных самок, содержащее как гликозилированную форму Г-КСФ с молекулярным весом 22 кД, так и негликозилированную форму.

венников гранулоцитарного ряда на примере пуповинной крови человека. Видно, что колонии содержат клетки гранулоцитарного ряда на разных стадиях дифференцировки. Клетки пуповинной крови обработаны молоком трансгенной самки мыши, разведенным в 30000 раз.

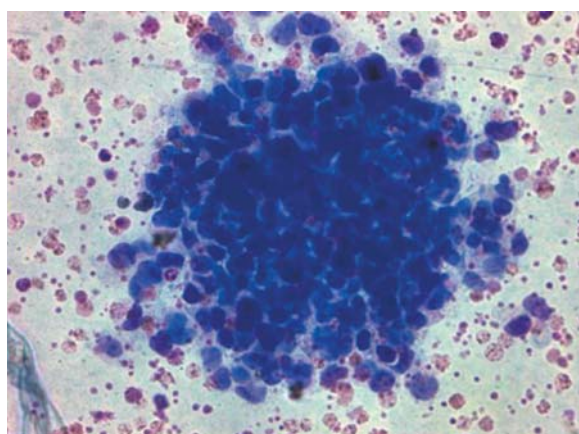
Суммируя результаты, полученные на трансгенных мышах, несущих ген *G-CSF* человека под контролем регуляторной последовательности гена  $\alpha S_1$ -казеина козы, следует добавить, что продукция белка Г-КСФ человека достигала 1 мг в миллилитре молока. Из этого следует, что молоко с таким содержанием целевого белка может служить источником для его очистки. Вполне понятно, что мыши для этой цели не подходят. Однако полученные данные о параметрах экспрессии данной конструкции привлекательны и могут быть использованы для получения трансгенных коз как продуцентов Г-КСФ человека.

Такой эксперимент провели, были получены трансгенные козы, несущие такую же конструкцию. Анализ молока трансгенных коз подтвердил, что в период лактации уровень Г-КСФ человека в молоке достигал 2 мл/мл. Это достаточный уровень для использования молока трансгенных коз в качестве источника для выделения Г-КСФ человека для медицинских целей.

В настоящее время получены различные виды трансгенных животных, секретирующих с молоком рекомбинантные белки человека. Некоторые из таких белков находятся на стадии клинических испытаний либо уже представлены на фармацевтическом рынке (табл.).



**Рис. 16.** Образец молока трансгенной мыши.



**Рис. 17.** Колония клеток-предшественников гранулоцитарного ряда, полученная из клеток пуповинной крови человека после обработки молоком трансгенной мыши (разведение 30000 раз).

Так, например, белок антитромбин-3 человека (торговая марка ATryn, GTC Biotherapeutics, USA), продуцируемый в молочной железе трансгенных коз, успешно прошел все фазы преclinical и клинических испытаний и в данный момент представлен на рынке. ATryn используется в клинике для восстановительной терапии пациентов, перенесших кардиопульмонарное шунтирование. В настоящее время компанией GTC Biotherapeutics с использованием «молочных биореакторов» получены, по крайней мере, еще 11 различных ценных белков человека. Другая биотехнологическая компания, Pharming BV, наладила выпуск фермента

Таблица

Перечень белков, получаемых из молока трансгенных животных, отобранных для создания терапевтических препаратов (Niemann, Kues, 2007; Kues, Niemann, 2011)

Препарат	Компания	Биореактор	Стадия подготовки препарата
АТгуп (рекомбинантный антитромбин III человека)	GTC Biotherapeutics	Коза	Европа: Одобрено EMEA США: одобрено FDA
Ингибитор С-1-эстеразы	Pharming	Кролик	Фаза 3
ММ-093 ( $\alpha$ -фетопротеин)	Merrimack and GTC Biotherapeutics	Коза	Фаза 2
$\alpha$ -глюкозидаза	Pharming	Кролик	Фаза 3 Европа: одобрено EMEA
Гормон роста человека	BioSidus	Корова	Преclinical испытания
Альбумин	GTC Biotherapeutics	Корова	Преclinical испытания
Фибриноген	Pharming	Корова	Преclinical испытания
Коллаген	Pharming	Корова	Преclinical испытания
Лактоферин	Pharming	Корова	Преclinical испытания
$\alpha$ -1-антитрипсин	GTC Biotherapeutics	Коза	Преclinical испытания
Малаярийная вакцина	GTC Biotherapeutics	Коза	Преclinical испытания
Моноклональные антитела CD 137 (4-1BB)	GTC Biotherapeutics	Коза	Преclinical испытания

альфа-глюкозидазы человека, продуцируемого в молоке трансгенных кроликов.

В трансгенезе сельскохозяйственных животных представляет интерес также относительно новое направление – продукция в молочной железе особых рекомбинантных белков-антидотов. В частности, это антитела против фосфорорганических соединений, используемых в химической промышленности и в качестве инсектицидов в сельском хозяйстве. Одним из таких белков является фермент бутирилхолинэстераза. К настоящему времени рекомбинантная бутирилхолинэстераза уже получена в молочной железе трансгенных мышей и коз, ее концентрация в молоке составляет до 5 г/л.

Суммируя выше описанное, можно констатировать, что использование трансгенных животных в качестве биореакторов – реальность с хорошей перспективой развития в будущем.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Brinster R.L., Chen H.Y., Trumbauer M. *et al.* Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs // *Cell*. 1981. V. 27. No. 1. Pt 2. P. 223–231.
- Burkov I.A., Serova I.A., Battulin N.R. *et al.* Expression of the human granulocyte–macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) gene under control of the 50-regulatory sequence of the goat alpha-S1-casein gene with and without a MAR element in transgenic mice // *Transgenic Res.* 2013. V. 22. P. 949–964.
- Chandler K.J., Chandler R.L., Broeckelmann E.M. *et al.* Relevance of BAC transgene copy number in mice: transgene copy number variation across multiple transgenic lines and correlations with transgene integrity and expression // *Mamm. Genome*. 2007. V. 18. P. 693–708.
- Gordon J.W., Scangos G.A., Plotkin D.J. *et al.* Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1980. V. 77. P. 7380–7384.
- Kues W.A., Niemann H. Advances in farm animal transgenesis // *Prev. Vet. Med.* 2011. V. 102. P. 146–156.
- Le Saux A., Houdebine L.-M., Jolivet G. Chromosome integration of BAC (bacterial artificial chromosome): evidence of multiple rearrangements // *Transgenic Res.* 2010. V. 19. P. 923–931.
- Niemann H., Kues W.A. Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine // *Anim. Reprod. Sci.* 2003. V. 79. P. 291–317.
- Niemann H., Kues W.A. Transgenic farm animals: an update // *Reprod. Fertil. Dev.* 2007. V. 19. P. 762–770.
- Ornitz D.M., Palmiter R.D., Hammer R.E. *et al.* Specific expression of an elastase-human growth hormone fusion gene in pancreatic acinar cells of transgenic mice // *Nature*. 1985. V. 13. P. 600–602.

- Pratt T., Sharp L., Nichols J. *et al.* Embryonic stem cells and transgenic mice ubiquitously expressing a Tau-tagged green fluorescent protein // *Dev. Biol.* 2000. V. 228. P. 19–28.
- Ramírez A., Milot E., Ponsa I. *et al.* Sequence and chromosomal context effects on variegated expression of keratin 5/lacZ constructs in stratified epithelia of transgenic mice // *Genetics.* 2001. V. 158. P. 341–350.
- Serova I.A., Dvoryanchikov G.A., Andreeva L.E. *et al.* A 3,387 bp 50-flanking sequence of the goat alpha-S1-casein gene provides correct tissue-specific expression of human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) in the mammary gland of transgenic mice // *Transgenic Res.* 2011. V. 21. P. 485–498.

