



ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

**Сергей Георгиевич Инге-Вечтомов** — академик РАН.  
Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики  
им. Н.И. Вавилова РАН (Санкт-Петербург, Россия)

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

**Людмила Алексеевна Лутова** (зам. главного редактора),  
профессор. Санкт-Петербургский государственный университет,  
(Санкт-Петербург, Россия)

**Владислав Сергеевич Баранов** (зам. главного редактора), член-  
корреспондент РАН. НИИ акушерства, гинекологии и репродук-  
тологии им. Д.О. Отта (Санкт-Петербург, Россия)

**Игорь Анатольевич Тихонович**, академик РАН. Всероссийский  
научно-исследовательский институт сельскохозяйственной  
микробиологии (Санкт-Петербург, Россия)

**Илья Артемьевич Захаров-Гезехус**, член-корреспондент РАН.  
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова (Москва, Россия)

**Сергей Васильевич Шестаков**, академик РАН. Московский  
государственный университет им. М.В. Ломоносова  
(Москва, Россия)

**Владимир Константинович Шумный**, академик РАН.  
Институт цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск,  
Россия)

**Николай Александрович Колчанов**, академик РАН. Институт  
цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия)

**Николай Казимирович Янковский**, академик РАН.  
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова  
(Москва, Россия)

EDITOR-IN-CHIEF

**Sergey G. Inge-Vechtomov**, Full Member of the Russian  
Academy of Sciences St. Petersburg branch of N.I. Vavilov  
Institute of General Genetics (St. Petersburg, Russia)

EDITORIAL BOARD

**Ludmila A. Lutova** (Deputy Editors-in-Chief), Professor,  
St. Petersburg State University  
(St. Petersburg, Russia)

**Vladislav S. Baranov** (Deputy Editors-in-Chief),  
Correspondence Member of Russian Academy of Sciences  
D.O. Ott Research Institute (St. Petersburg, Russia)

**Igor A. Tikhonovich**, Full Member of Russian Academy  
of Sciences. Research Institute of Agricultural Microbiology  
(St. Petersburg, Russia)

**Ilya A. Zakharov-Gezekhus**, Correspondence Member of Rus-  
sian Academy of Sciences. N.I. Vavilov Institute of General  
Genetics (Moscow, Russia)

**Sergey V. Shestakov**, Full Member of Russian Academy  
of Sciences. M.V. Lomonosov Moscow State University  
(Moscow, Russia)

**Vladimir K. Shumny**, Full Member of Russian Academy  
of Sciences. Institute of Cytology and Genetics (Novosibirsk,  
Russia)

**Nikolai A. Kolchanov**, Full Member of Russian Academy  
of Sciences, Institute of Cytology and Genetics  
(Novosibirsk, Russia)

**Nikolai K. Yankovskiy**, Full Member of Russian Academy  
of Sciences. N.I. Vavilov Institute of General Genetics  
(Moscow, Russia)

Экологическая генетика /  
Ecological genetics

Рецензируемый  
научно-практический журнал

Основан в 2003 году  
в Санкт-Петербурге

ISSN 1811-0932

Key title: *Ėkologiġeskaâ genetika*  
Abbreviated key title: *Ėkol. genet.*

Ежеквартальное издание

Рекомендован ВАК для публикаций  
научных работ, отражающих  
основное содержание докторских  
и кандидатских диссертаций

Индексация: SCOPUS, RSCI, Ядро  
РИНЦ, CNKI, Cyberleninka, DOAJ,  
Google Scholar, Ulrich's Periodicals Directory

*Проект реализован при финансовой  
поддержке Комитета по науке и выс-  
шей школе Правительства  
Санкт-Петербурга*

Журнал реферируется РЖ ВИНТИ

При содействии: Санкт-Петербургского  
научного центра РАН; Вавиловского  
общества генетиков и селекционеров;  
кафедры генетики и биотехнологии Санкт-  
Петербургского государственного университета;  
НОЦ «Молекулярно-биологические  
основы здоровья человека и окружающей  
среды Северо-Запада России»

Журнал зарегистрирован Государственным  
комитетом РФ по печати  
ПИ № 77-65617 от 04 мая 2016 года

Проект-макет: Равдоникас Ф. В.  
Издатель, учредитель: ООО «Эко-Вектор»  
Наумов П. А. (ген. директор)  
Мыльников С. В. (выпускающий редактор)  
Еленин В. А. (верстка)  
Смирнова И. В. (корректор)

Адрес ООО «Эко-Вектор»: 191186, Санкт-Петер-  
бург, Аптекарский пер. д. 3, литера А, пом. 1Н  
тел./факс: (812) 648-83-66; 648-83-60.  
E-mail: [nl@eco-vector.com](mailto:nl@eco-vector.com)

Распространяется по подписке:  
Печатная версия (бумажная) — индекс издания  
25 603 по каталогу агентства «Роспечать»;  
Электронная версия — <http://www.elibrary.ru>  
<http://journals.eco-vector.com/index.php/ecolgenet>

Формат 60 × 90/8. Усл.-печ. л. 17,25. Тираж 300 экз.  
Цена свободная. Оригинал-макет изготовлен  
ООО «Эко-Вектор». Отпечатано ООО «АЛЬГИЗ»,  
199106, Санкт-Петербург, Московское шоссе, 25.  
Заказ 59. Подписано в печать 23.06.2020.

Полное или частичное воспроизведение материалов,  
содержащихся в настоящем издании, допускается  
только с письменного разрешения редакции. Ссылка  
на журнал «Ecological genetics/Экологическая гене-  
тика» обязательна

Address for correspondence: Ekologicheskaya  
Genetika, Department of Genetics and Biotechno-  
logy, St. Petersburg State University, Universitet-  
skaya nab., 7/9, St. Petersburg, 199034 Russia.  
Tel/Fax: +7(812)363-61-05. E-mail: [ecolgenet@list.ru](mailto:ecolgenet@list.ru).



**Любовь Владимировна Хотылева**, академик НАН Белоруссии.  
Институт генетики и цитологии НАН Беларуси  
(Минск, Белоруссия)

**Евгений Владиславович Даев**, д-р биол. наук, профессор. Санкт-Петербургский государственный университет  
(Санкт-Петербург, Россия)

**Юрий Иванович Павлов**, д-р биол. наук. Медицинский центр университета штата Небраска (США)

**Геннадий Ильич Лазюк**, член-корреспондент РАН и НАН.  
Белорусский государственный медицинский университет  
(Минск, Белоруссия)

**Александр Владимирович Кильчевский**, член-корреспондент НАН Белоруссии. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (Минск, Белоруссия)

**Сергей Владимирович Мыльников** (ответственный секретарь), канд. биол. наук, доцент. НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта (Санкт-Петербург, Россия)

**Елена Игоревна Степченкова** (куратор раздела), канд. биол. наук. Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики им. Н.И. Вавилова (Санкт-Петербург, Россия)

**Татьяна Валерьевна Матвеева** (куратор раздела), д-р биол. наук. Санкт-Петербургский государственный университет (Санкт-Петербург, Россия)

**Владимир Александрович Жуков** (куратор раздела), канд. биол. наук. Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии (Санкт-Петербург, Россия)

#### РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

**Андрей Петрович Козлов**, профессор. Биомедицинский центр (Санкт-Петербург, Россия)

**Валентин Алексеевич Тарасов**, Институт аридных зон Южного НЦ РАН, отдел молекулярной биологии (Ростов-на-Дону, Россия)

**Марлен Мкртычевич Аслanian**, профессор. Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова (Москва, Россия)

**Виктория Николаевна Горбунова**, профессор. Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет (Санкт-Петербург, Россия)

**Lubov' V. Khotyleva**, Full Member of Belarus National Academy of Sciences Institute of Genetics and Cytology (Minsk, Belarus)

**Eugene V. Daev**, St. Petersburg State University (St. Petersburg, Russia)

**Yuri I. Pavlov**, University of Nebraska Medical Center (USA)

**Gennadiy I. Lazyuk**, Correspondence Member of Russian Academy of Sciences. Belorussian State Medical University (Minsk, Belarus)

**Alexandr V. Kilchevskiy**, Correspondence Member of National Academy of Sciences of Belarus. Institute of Genetics and Cytology (Minsk, Belarus)

**Sergey V. Mylnikov** (Managing Editor), D.O. Ott Research Institute (St. Petersburg, Russia)

**Elena I. Stepchenkova** (Supervisor), St. Petersburg Branch of N.I. Vavilov Institute of General Genetics (St. Petersburg, Russia)

**Tatyana V. Matveeva** (Supervisor), St. Petersburg State University (St. Petersburg, Russia)

**Vladimir A. Zhukov** (Supervisor), Research Institute of Agricultural Microbiology (St. Petersburg, Russia)

#### EDITORIAL COUNCIL

**Andrey P. Kozlov**, Biomedical Centre (St. Petersburg, Russia)

**Valentin A. Tarasov**, Institute of Arid Zones (Rostov on Done, Russia)

**Marlen M. Aslanyan**, M.V. Lomonosov State University (Moscow, Russia)

**Viktoria N. Gorbunova**, St. Petersburg State Pediatric Medical University (St. Petersburg, Russia)

Материалы для публикации просим подавать в электронном варианте через официальный сайт журнала <http://journals.eco-vector.com/ecolgenet>.

Адрес редакции: 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9, кафедра генетики и биотехнологии.

Тел./факс: (812) 363-61-05, e-mail: [ecolgenet@list.ru](mailto:ecolgenet@list.ru). Электронная версия журнала: <http://journals.eco-vector.com/ecolgenet>

## СОДЕРЖАНИЕ / TABLE OF CONTENTS

### ✿ МНЕНИЯ, ГИПОТЕЗЫ, ДИСКУССИОННЫЕ ВОПРОСЫ

А.Ю. Аксенова

Фактор фон Виллебранда и повреждение эндотелия:  
возможная связь с COVID-19 ..... 135

### ✿ OPINIONS, DISCUSSIONS

A.Yu. Aksenova

Von Willebrand factor and endothelial damage:  
a possible association with COVID-19 ..... 135

### ✿ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЭВОЛЮЦИИ ЭКОСИСТЕМ

И.Г. Захожий, Д.М. Шадрин, Я.И. Пылина,  
И.Ф. Чадин, Т.К. Головки

Генетическая дифференциация двух фенотипов  
*Plantago media* L. на Южном Тимане ..... 139

### ✿ GENETIC BASIS OF ECOSYSTEMS EVOLUTION

I.G. Zakhoshy, D.M. Shadrin, Ya.I. Pylina,  
I.F. Chadin, T.K. Golovko

Genetic differentiation of two phenotypes of *Plantago media* L. in South Timan ..... 139

Н.В. Мироненко, А.С. Орина, Н.М. Коваленко

Экспрессия генов *ToxA* и *PtrPf2* фитопатогенного  
гриба *Pyrenophora tritici-repentis* в начале  
инфекционного процесса ..... 149

N.V. Mironenko, A.S. Orina, N.M. Kovalenko

Expression of the *ToxA* and *PtrPf2* genes of the  
phytopathogenic fungus *Pyrenophora tritici-repentis*  
at the beginning of the infection process ..... 149

Ан.Х. Баймиев, А.А. Владимирова,  
Е.С. Акимова, Р.С. Гуменко, А.А. Мулдашев,  
А.В. Чемерис, Ал.Х. Баймиев

Филогенетическая характеристика клубеньковых  
бактерий эндемичных для Южного Урала видов рода  
*Oxytropis* (Fabaceae) ..... 157

An.Kh. Baymiev, A.A. Vladimirova,  
E.S. Akimova, R.S. Gumenko, A.A. Muldashev,  
A.V. Chemeris, Al.Kh. Baymiev

Phylogenetic characteristic of nodul bacteria  
endemic for Southern Ural species of the genus  
*Oxytropis* (Fabaceae) ..... 157

Е.Н. Васильева, Г.А. Ахтемова, А.М. Афонин,  
А.Ю. Борисов, И.А. Тихонович, В.А. Жуков

Культивируемые эндофитные бактерии стеблей  
и листьев гороха посевного (*Pisum sativum* L.) ..... 169

E.N. Vasileva, G.A. Akhtemova, A.M. Afonin,  
A.Yu. Borisov, I.A. Tikhonovich, V.A. Zhukov

Culturable endophytic bacteria from stems and leaves  
of garden pea (*Pisum sativum* L.) ..... 169

А.А. Ильинов, Б.В. Раевский, О.В. Чирва

Состояние генофондов основных лесообразующих видов  
водосбора Белого моря (на примере *Picea × fennica*  
(Regel) Ком. и *Pinus sylvestris* L.) ..... 185

A.A. Ilinov, B.V. Raevsky, O.V. Chirva

The state of gene pool of the basic forest-forming  
species of the White Sea watershed (on the example of  
a *Picea × fennica* (Regel) Kom. and *Pinus sylvestris* L.)... 185

### ✿ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ

А.К. Жанатаев, Е.А. Анисина, К.Л. Плигина,  
А.А. Лисицын, А.Д. Дурнев

Технические аспекты проведения этапа электрофореза  
в методе ДНК-комет ..... 203

### ✿ GENETIC TOXICOLOGY

A.K. Zhanataev, E.A. Anisina, K.L. Pligina,  
A.A. Lisitsyn, A.D. Durnev

Technical aspects of the electrophoresis stage  
in the comet assay ..... 203

### ✿ ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ГЕНЕТИКА ЧЕЛОВЕКА

Ю.Э. Азарова, Е.Ю. Клёсова, М.И. Чурилин,  
Т.А. Самгина, А.И. Конопля, А.В. Полоников

Генетико-биохимическое исследование роли гамма-  
глутамилциклотрансферазы в формировании  
предрасположенности к сахарному диабету 2-го типа .... 215

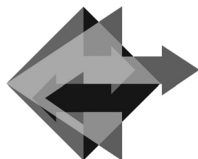
### ✿ HUMAN ECOLOGICAL GENETICS

Iu.E. Azarova, E.Yu. Klyosova, M.I. Churilin,  
T.A. Samgina, A.I. Konoplya, A.V. Polonikov

Genetic and biochemical investigation of the gamma-  
glutamylcyclotransferase role in predisposition to type 2  
diabetes mellitus ..... 215

## СОДЕРЖАНИЕ / TABLE OF CONTENTS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>П.А. Мелентьев, О.Е. Агранович, С.В. Саранцева</i><br>Заболевания человека, ассоциированные<br>с геном <i>NTE</i> ..... 229                                                                                                                                                                                                                    | <i>P.A. Melentev, O.E. Agranovich, S.V. Sarantseva</i><br>Human diseases associated<br>with <i>NTE</i> gene ..... 229                                                                                                                                                                                                                           |
| <i>Б.А. Малярчук</i><br>Полиморфизм гена <i>GC</i> , кодирующего<br>витамин D-связывающий белок, у коренного<br>населения Сибири ..... 243                                                                                                                                                                                                        | <i>B.A. Malyarchuk</i><br>Polymorphism of <i>GC</i> gene, encoding<br>vitamin D binding protein, in aboriginal populations<br>of Siberia ..... 243                                                                                                                                                                                              |
|  <b>МЕТОДОЛОГИЯ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ<br/>ГЕНЕТИКИ</b><br><br><i>Д.М. Музаев, А.М. Румянцев,<br/>У.Р. Аль Шанаа, Е.В. Самбук</i><br>Селективная система на основе фрагментов<br>вируса М1 для отбора трансформантов дрожжей<br><i>Saccharomyces cerevisiae</i> ..... 251 |  <b>METHODOLOGY IN ECOLOGICAL<br/>GENETICS</b><br><br><i>D.M. Muzaev, A.M. Rumyantsev,<br/>O.R. Al Shanaa, E.V. Sambuk</i><br>Selective system based on fragments of the<br>M1 virus for the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i><br>transformation ..... 251 |
|  <b>ВЫ СПРАШИВАЕТЕ</b><br>Правила для авторов ..... 264                                                                                                                                                                                                          |  <b>YOUR QUESTIONS</b><br>Rules for authors ..... 264                                                                                                                                                                                                          |



## VON WILLEBRAND FACTOR AND ENDOTHELIAL DAMAGE: A POSSIBLE ASSOCIATION WITH COVID-19

© A.Yu. Aksenova

Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

Cite this article as: Aksenova AY. Von Willebrand factor and endothelial damage: a possible association with COVID-19. *Ecological genetics*. 2020;18(2):135-138. <https://doi.org/10.17816/ecogen33973>.

Received: 01.05.2020

Revised: 11.05.2020

Accepted: 23.06.2020

✿ COVID-19 caused by the SARS-CoV-2 virus is a new type of infection which has caused an enormous social and economic burden across the world. While most people will develop a mild-to-moderate form of the disease or even stay asymptomatic, a certain proportion will get critically ill. COVID-19 mortality risk is higher in elderly patients and in patients with cardiovascular diseases and diabetes. Molecular mechanisms which underlie these risks are not yet understood for COVID-19. Here I discuss a possible association of COVID-19 complications with von Willebrand factor (VWF) level and endothelial damage. VWF is an important prognostic marker of endothelial dysfunction and its level fluctuates depending on age. VWF level is also variable depending on sex and race. Importantly, chloroquine, a drug that showed potential efficacy for COVID-19 treatment, can influence VWF secretion and consequently its level and activity. I propose that VWF level and activity might be predictors of the COVID-19 morbidity and mortality; moreover the VWF might be involved in the pathogenesis of the disease. I suggest that a comprehensive study of VWF level in SARS-CoV-2 positive groups of people with mild and severe course of the disease should be undertaken.

✿ **Keywords:** von Willebrand factor; COVID-19; SARS-CoV-2; endothelial damage.

## ФАКТОР ФОН ВИЛЛЕБРАНДА И ПОВРЕЖДЕНИЕ ЭНДОТЕЛИЯ: ВОЗМОЖНАЯ СВЯЗЬ С COVID-19

© А.Ю. Аксенова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования  
«Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург

Для цитирования: Аксенова А.Ю. Фактор фон Виллебранда и повреждение эндотелия: возможная связь с COVID-19 // Экологическая генетика. — 2020. — Т. 18. — № 2. — С. 135–138. <https://doi.org/10.17816/ecogen33973>.

Поступила: 01.05.2020

Одобрена: 11.05.2020

Принята: 23.06.2020

✿ Пандемия COVID-19, вызванная новым вирусом SARS-CoV-2, привела к развитию тяжелых социально-экономических последствий по всему миру. Хотя у большинства людей наблюдается легкое или среднетяжелое течение болезни, а некоторые даже переносят заражение без развития симптомов, у определенной доли людей развивается критически тяжелое состояние. Текущая статистика показывает, что смертность от COVID-19 выше среди пожилых пациентов и у пациентов с определенными заболеваниями, такими как сердечно-сосудистые заболевания и диабет. Молекулярные механизмы, которые лежат в основе этих рисков, пока еще не понятны для COVID-19. В данном сообщении я обсуждаю возможную ассоциацию осложнений COVID-19 с фактором фон Виллебранда (ФВ) и повреждением эндотелия сосудов. ФВ является важным прогностическим фактором дисфункции эндотелия сосудов и его уровень в плазме меняется с возрастом. Уровень ФВ также подвержен вариации в зависимости от пола и расовой принадлежности. Важно, что хлорохин — препарат, который в предварительных испытаниях показал эффективность при лечении COVID-19, влияет на секрецию ФВ и может влиять на его количество и активность в плазме. Я предполагаю, что уровень и активность ФВ могут являться важными прогностическими факторами заболеваемости и смертности от COVID-19, а сам ФВ может оказаться вовлеченным в патогенез заболевания. Масштабное и тщательное исследование уровня и активности ФВ у групп людей, инфицированных SARS-CoV-2, у которых наблюдается легкое или тяжелое течение инфекции, должно быть предпринято в ближайшее время.

✿ **Ключевые слова:** фактор фон Виллебранда; COVID-19; SARS-CoV-2; повреждение эндотелия.

SARS-CoV-2, a novel type of coronavirus caused an outbreak of coronavirus disease 2019 (COVID-19) that led to more than 3 millions of total confirmed cases and more than 200,000 deaths worldwide by the end of April 2020. The COVID-19 spread in Wuhan in China, then in the European countries and in the US has shown what certain population groups are at higher risk than the others. The mortality is higher in elderly people and in people with existing co-morbidities such as cardiovascular diseases and diabetes [1, 2]. Gender and race biases were also reported: i. e. men are affected more than women and mortality among African-American is higher than in Caucasians [3, 4]. Pulmonary lesions are diagnostic feature of COVID-19. Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) was reported in almost 30% cases of patients with severe illness [5].

Several recent studies point at coagulation problems found in patients with severe COVID-19 infection [6–8]. It has been proposed that COVID-19 can lead to hypercoagulability and development of disseminated intravascular coagulation (DIC) [6, 9, 10]. Infection-induced endothelial cells dysfunction can result in a hypercoagulable state characterized by excessive thrombin level, elevated D-Dimer, and problems with fibrinolysis which along with hypoxia was suggested to stimulate thrombosis in COVID-19 patients with severe infection [7, 9]. Early anticoagulant treatment with heparin blocked clotting formation and was associated with better prognosis in COVID-19 patients with sepsis-induced coagulopathy (SIC) [7]. Additionally, anticoagulation drug Dipyridamole can be beneficial as prophylaxis for COVID-19 complications [11].

Here I would like to point at a possible connection of von Willebrand factor (VWF) and severity of the COVID-19. VWF is an essential factor of the blood coagulation system which is synthesized and secreted by the endothelial cells. VWF multimers secretion from intracellular organelles known as Weibel-Palade bodies is required for platelet adhesion to the damaged vessel walls. Importantly, VWF level in plasma is an indicator of endothelial activation and damage [12]. VWF is also a marker of pulmonary endothelial injury and some studies suggest that level of VWF can be linked to ARDS and Acute Lung Injury (ALI) [13, 14]. It should be noted that autophagy plays an essential role in VWF secretion [15]. Moreover, chloroquine the drug that showed potential efficacy for COVID-19 treatment

inhibits autophagy and therefore can influence the level of secreted VWF multimers [15, 16].

Cell angiotensin-converting enzyme 2, ACE2, is used by Spike protein of the SARS-CoV-2 to penetrate the cell. ACE2 is expressed in many tissues including endothelium and lung parenchyma and plays a major role in the renin-angiotensin regulatory system. It removes terminal amino acid from Angiotensin I and Angiotensin II to produce Angiotensin (1–9) and Angiotensin (1–7) correspondingly: the peptides which promote vasodilation and counteract pro-inflammatory Angiotensin II effects. ACE2 protects endothelial cells from damage upon inflammation [17, 18]. It also plays an important role in preventing lung injuries: in mice it counteracts ALI induced by sepsis or acid [19]. Additionally, the level of ACE2 has inverse correlation with the development of ARDS/ALI caused by the closely-related SARS-CoV virus [18]. Interaction of SARS viruses with ACE2 was proposed to inhibit ACE2 activity and downregulate ACE2 expression on the cell surface [18, 20]. Consequently, this should promote ACE1/ACE2 imbalance and increase in the Angiotensin II level [21]. Such a disbalance in the renin-angiotensin signaling was proposed to mediate lung injury in COVID-19 [22]. Interestingly, VWF might be a missing link in Angiotensin II-mediated endothelial dysfunction [23]. For instance, VWF gene silencing counteracts Angiotensin II-dependent endothelium dysfunction in a porcine model [24]. In addition, the protective role of Angiotensin (1–9) has been linked to the decrease in VWF expression [25]. It is an important question whether a disbalance in the renin-angiotensin system upon COVID-19 infection can lead to a change in VWF production, processing or secretion in the endothelium. Recent reports showing significantly elevated VWF level and activity in a small cohort of intubated COVID-19 patients is in accord with idea that COVID-19 might provoke endothelial activation and dysfunction [26, 27]. It is of great interest if hypercoagulability, ARDS and other symptoms observed in COVID-19 patients could be explained through VWF-dependent mechanism.

Some population studies indirectly suggest that development of severe COVID-19 infection might be linked to the increased VWF level or activity. First, preliminary data show that the risk of developing COVID-19 is somewhat decreased in people with

blood group 0 (this blood group is characterized by the lower level of VWF) [28, 29]. Second, it worth noting that level of VWF depends on age: it tends to be lower in children than in adults and it rises in elderly population [30, 31]. This can explain why risks of COVID-19 are higher for elderly population while children suffering less from the disease. Third, the VWF level demonstrates race and gender differences: for instance it is higher in males vs. females and it is higher in African-American compared to Caucasians [29, 32, 33]. These facts correlate well with factors associated with COVID-19 symptoms severity and mortality, i. e. gender (males are more affected than females), age (older population is of higher risk) and race (African-American are more affected than Caucasians). Moreover, VWF level and activity are essential prognostic biomarkers in cardiovascular, metabolic, and inflammatory diseases [29, 34].

Summarizing these facts, I hypothesize that VWF level/activity might be used as a predictor of COVID-19 symptoms severity. I suggest that comprehensive studies of VWF level/activity correlation with COVID-19 symptoms and mortality rate shall be performed. In addition, it can be assumed that medication improving the endothelium function and antagonizing inflammation in vessels could be beneficial for COVID-19 therapy and as a prophylaxis of severe complications of COVID-19.

**Acknowledgments:** I would like to thank Dr. Vasilisa Aksenova, Dr. Mikhail Liskovych and Prof. Andrei Viktorovich Koloskov for critical reading of the manuscript, discussion and help with text preparation. I am grateful to Prof. Allan V. Kalueff for critical evaluation of the manuscript and discussion.

## REFERENCES

- Huang I, Lim MA, Pranata R. Diabetes mellitus is associated with increased mortality and severity of disease in COVID-19 pneumonia – A systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Diabetes Metab Syndr*. 2020;14(4):395-403. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2020.04.018>.
- Adams ML, Katz DL, Grandpre J. Population-Based Estimates of Chronic Conditions Affecting Risk for Complications from Coronavirus Disease, United States. *Emerg Infect Dis*. 2020;26(8). <https://doi.org/10.3201/eid2608.200679>.
- La Vignera S, Cannarella R, Condorelli RA, et al. Sex-Specific SARS-CoV-2 Mortality: Among Hormone-Modulated ACE2 Expression, Risk of Venous Thromboembolism and Hypovitaminosis D. *Int J Mol Sci*. 2020;21(8). <https://doi.org/10.3390/ijms21082948>.
- Yancy CW. COVID-19 and African Americans. *JAMA*. 2020. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.6548>.
- Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020;395(10223):497-506. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30183-5).
- Obe BH, Retter A, McClintock C. Practical guidance for the prevention of thrombosis and management of coagulopathy and disseminated intravascular coagulation of patients infected with COVID-19. 2020.
- Tang N, Bai H, Chen X, et al. Anticoagulant treatment is associated with decreased mortality in severe coronavirus disease 2019 patients with coagulopathy. *J Thromb Haemost*. 2020;18(5):1094-1099. <https://doi.org/10.1111/jth.14817>.
- Han H, Yang L, Liu R, et al. Prominent changes in blood coagulation of patients with SARS-CoV-2 infection. *Clin Chem Lab Med*. 2020. <https://doi.org/10.1515/cclm-2020-0188>.
- Li T, Lu H, Zhang W. Clinical observation and management of COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect*. 2020;9(1):687-690. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1741327>.
- Lillicrap D. Disseminated intravascular coagulation in patients with 2019-nCoV pneumonia. *J Thromb Haemost*. 2020;18(4):786-787. <https://doi.org/10.1111/jth.14781>.
- Liu X, Li Z, Liu S, et al. Potential therapeutic effects of dipyridamole in the severely ill patients with COVID-19. *Acta Pharm Sin B*. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.04.008>.
- Kawecki C, Lenting PJ, Denis CV. von Willebrand factor and inflammation. *J Thromb Haemost*. 2017;15(7):1285-1294. <https://doi.org/10.1111/jth.13696>.
- Ware LB, Eisner MD, Thompson BT, et al. Significance of von Willebrand factor in septic and non-septic patients with acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170(7):766-772. <https://doi.org/10.1164/rccm.200310-1434OC>.

14. El Wahsh R, Amin S, Essa E. Diagnostic value of von Willebrand factor (VWF) in patients suffering from respiratory distress. *Eur Respir J*. 2011;38:1686.
15. Torisu T, Torisu K, Lee IH, et al. Autophagy regulates endothelial cell processing, maturation and secretion of von Willebrand factor. *Nat Med*. 2013;19(10):1281-1287. <https://doi.org/10.1038/nm.3288>.
16. Mauthe M, Orhon I, Rocchi C, et al. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*. 2018;14(8):1435-1455. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1474314>.
17. Lovren F, Pan Y, Quan A, et al. Angiotensin converting enzyme-2 confers endothelial protection and attenuates atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295(4): H1377-1384. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00331.2008>.
18. Kuba K, Imai Y, Rao S, et al. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat Med*. 2005;11(8): 875-879. <https://doi.org/10.1038/nm1267>.
19. Imai Y, Kuba K, Rao S, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature*. 2005;436(7047):112-116. <https://doi.org/10.1038/nature03712>.
20. Zhang H, Penninger JM, Li Y, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. *Intensive Care Med*. 2020;46(4):586-590. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-05985-9>.
21. Tiganelli CJ, Ingraham NE, Sparks MA, et al. Antihypertensive drugs and risk of COVID-19? *Lancet Respir Med*. 2020;8(5): e30-e31. [https://doi.org/10.1016/s2213-2600\(20\)30153-3](https://doi.org/10.1016/s2213-2600(20)30153-3).
22. Sriram K, Insel PA. A hypothesis for pathobiology and treatment of COVID-19: the centrality of ACE1/ACE2 imbalance. *Br J Pharmacol*. 2020. <https://doi.org/10.1111/bph.15082>.
23. Agostini S, Lionetti V. New insights into the non-hemostatic role of von Willebrand factor in endothelial protection. *Can J Physiol Pharmacol*. 2017;95(10):1183-1189. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2017-0126>.
24. Dushpanova A, Agostini S, Ciofini E, et al. Gene silencing of endothelial von Willebrand factor attenuates angiotensin II-induced endothelin-1 expression in porcine aortic endothelial cells. *Sci Rep*. 2016;6:30048. <https://doi.org/10.1038/srep30048>.
25. Cha SA, Park BM, Kim SH. Angiotensin-(1-9) ameliorates pulmonary arterial hypertension via angiotensin type II receptor. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2018;22(4):447-456. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2018.22.4.447>.
26. Panigada M, Bottino N, Tagliabue P, et al. Hypercoagulability of COVID-19 patients in Intensive Care Unit. A Report of Thromboelastography Findings and other Parameters of Hemostasis. *J Thromb Haemost*. 2020. <https://doi.org/10.1111/jth.14850>.
27. Escher R, Breakey N, Lammle B. Severe COVID-19 infection associated with endothelial activation. *Thromb Res*. 2020;190:62. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2020.04.014>.
28. Zhao J, Yang Y, Huang H, et al. Relationship between the ABO Blood Group and the COVID-19 Susceptibility. *MedRxiv*. 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.03.11.20031096>.
29. Swystun LL, Lillicrap D. Genetic regulation of plasma von Willebrand factor levels in health and disease. *J Thromb Haemost*. 2018;16(12):2375-2390. <https://doi.org/10.1111/jth.14304>.
30. Gill JC, Conley SF, Johnson VP, et al. Low VWF levels in children and lack of association with bleeding in children undergoing tonsillectomy. *Blood Adv*. 2020;4(1):100-105. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000992>.
31. Laffan M. Can you grow out of von Willebrand disease? *Haemophilia*. 2017;23(6):807-809. <https://doi.org/10.1111/hae.13325>.
32. Miller CH, Dilley A, Richardson L, et al. Population differences in von Willebrand factor levels affect the diagnosis of von Willebrand disease in African-American women. *Am J Hematol*. 2001;67(2): 125-129. <https://doi.org/10.1002/ajh.1090>.
33. Sarji KE, Graves JM, Colwell JA. Von Willebrand factor activity in normal subjects: Sex difference and variability. *Thromb Res*. 1975;7(6):885-895. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(75\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0049-3848(75)90092-4).
34. Gragnano F, Sperlongano S, Golia E, et al. The Role of von Willebrand Factor in Vascular Inflammation: From Pathogenesis to Targeted Therapy. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:1-13. <https://doi.org/10.1155/2017/5620314>.

## ✉ Информация об авторе

Анна Юрьевна Аксенова — канд. биол. наук, старший научный сотрудник, лаборатория биологии амилоидов. ФГБОУ ВО СПбГУ, Санкт-Петербург. SPIN: 4914-7675. E-mail: aksena@gmail.com.

## ✉ Author and affiliations

Anna Yu. Akse nova — Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher. Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia. SPIN: 4914-7675. E-mail: aksena@gmail.com.





## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ДВУХ ФЕНОТИПОВ *PLANTAGO MEDIA* L. НА ЮЖНОМ ТИМАНЕ

© И.Г. Захожий, Д.М. Шадрин, Я.И. Пылина, И.Ф. Чадин, Т.К. Головки

Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, Сыктывкар

Для цитирования: Захожий И.Г., Шадрин Д.М., Пылина Я.И., и др. Генетическая дифференциация двух фенотипов *Plantago media* L. на Южном Тимане // Экологическая генетика. — 2020. — Т. 18. — № 2. — С. 139–148. <https://doi.org/10.17816/ecogen15605>.

Поступила: 09.08.2019

Одобрена: 16.01.2020

Принята: 23.06.2020

✿ Исследован уровень генетической дифференциации двух фенотипических вариаций *Plantago media* L. на Южном Тимане. Популяционно-генетический анализ с использованием межмикросателлитных маркеров (ISSR) по 210 локусам выявил два кластера, границы которых совпадали с границами между растениями светового и темного фенотипа. Результаты дискриминационного анализа главных компонент и AMOVA ( $F_{ST} = 0,07$ ,  $p = 0,001$ ) подтвердили, что на фоне высокого генетического сходства существуют статистически значимые генетические различия между этими фенотипами. Полученные результаты свидетельствуют о роли экологических факторов в адаптивной дифференциации и проявлении генетического полиморфизма растений.

✿ **Ключевые слова:** *Plantago media* L.; популяционный генетический анализ; межмикросателлитные маркеры; генетический полиморфизм; экологические условия; адаптация; свет; фенотип.

## GENETIC DIFFERENTIATION OF TWO PHENOTYPES OF *PLANTAGO MEDIA* L. IN SOUTH TIMAN

© I.G. Zakhoshy, D.M. Shadrin, Ya.I. Pylina, I.F. Chadin, T.K. Golovko

Institute of Biology of Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russia

Cite this article as: Zakhoshy IG, Shadrin DM, Pylina YaI, et al. Genetic differentiation of two phenotypes of *Plantago media* L. in South Timan. *Ecological genetics*. 2020;18(2):139-148. <https://doi.org/10.17816/ecogen15605>.

Received: 09.08.2019

Revised: 16.01.2020

Accepted: 23.06.2020

✿ **Background.** The investigation of the genetic nature of plant phenotypic variability is of great importance for understanding biological diversity, distribution and adaptation of plants to environmental conditions. **The aim** of our work was to study the genetic differentiation of two phenotypes of *Plantago media* in South Timan. **Materials and methods.** The genetic differentiation of light and shadow phenotypes of *Plantago media* plants was evaluated using intersimple sequence repeats (ISSR) markers. **Results.** The population-genetic analysis of 210 loci revealed two clusters, which boundaries coincided with the boundaries between plants of light and shadow phenotypes. The results of the discriminatory analysis of the main components and AMOVA ( $F_{ST} = 0.07$ ,  $p = 0.001$ ) confirmed that there are statistically significant genetic differences between these phenotypes even though they possess a high genetic similarity. **Conclusion.** Light and shadow *Plantago media* phenotypes adapted to different ecological conditions are genetically differentiated. The population genetic analysis using ISSR markers is a sensitive tool for identifying the genetic diversity of phenotypic plant variations formed under the influence of environmental factors.

✿ **Keywords:** *Plantago media* L.; genetic analysis of population; microsatellite markers; genetic polymorphism; environmental condition; adaptation; light; phenotype.

## ВВЕДЕНИЕ

Способность того или иного генотипа быть пластичным, то есть выражать различные фенотипические состояния, имеет адаптивное значение и контролируется генетически. В адаптации к конкретным условиям окружающей среды могут участвовать

как отдельные гены, так и группы генов. Другими словами, пределы модификационной изменчивости определяются заданной генотипом нормой реакции организма на воздействие внешней среды. Полагают, что некоторые адаптивные модификации могут сказываться на наследственной изменчивости [1].

В последнее время проявляется все большее внимание к генетическим и молекулярным механизмам пластичности и роли экологической гетерогенности среды обитания в структуре генетической дифференциации растений [2]. Исследования генетической природы модификационной изменчивости растений в природных популяциях имеют особое значение для понимания их распространения, колонизации конкретной среды обитания и поддержания себя в этой среде. Следует, однако, иметь в виду, что в отличие от животных, фенотипы растений не столь жестко канализированы, что затрудняет выявление генотипической основы (если таковая имеется) наблюдаемой фенотипической вариации в природных популяциях.

*Plantago media* L. (подорожник средний) — многолетнее травянистое короткокорневищностержнекорневое растение сем. *Plantaginaceae*. Ареал охватывает Европу, Сибирь, Переднюю и Среднюю Азию. На европейском северо-востоке России он доходит до Арктики (Воркута), вероятно, как заносное растение [3]. Встречается на пойменных лугах, в разреженных лесах, сельскохозяйственных угодьях, по обочинам дорог, зачастую выступает пионером на отмелях и обнажениях известняков. *P. media*, как и многие другие виды рода *Plantago* L., характеризуется высокой фенотипической пластичностью [4]. Габитус растений, размер и форма листьев, длина черешка листа и цветочной стрелки, накопление и распределение биомассы по органам, семенная продуктивность в значительной степени зависят от экологических факторов среды (температурного и светового режимов, химического состава почв и др.).

Проведенные нами ранее исследования показали, что растения *P. media*, обитающие на открытом, хорошо освещаемом склоне в несомкнутом ценозе, отличались от растений затененных местообитаний по морфологическим показателям и активности процессов жизнедеятельности [5–7]. Анализ анатомо-морфологической структуры листьев, содержания и соотношения пигментов, интенсивности фотосинтеза и ряда других показателей растений позволил отнести их к световому и теневому фенотипам, а наблюдаемые различия — к адаптивным модификациям [5].

Целью данной работы было исследовать уровень генетической дифференциации двух фено-

типических вариантов растений *Plantago media*, произрастающих в различающихся по световому режиму условиях.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор растений и оценку почвенно-климатических условий проводили в июле 2014 г. в среднем течении р. Сойва (приток р. Печора) на территории Троицко-Печорского р-на (Республика Коми). Район исследований входит в Тиманскую таежную провинцию Восточно-Европейской таежной зоны. Ценопопуляции растений *P. media* локализовались на контрастных по условиям инсоляции и тепловому режиму участках: 1) на осыпном склоне от водораздела к надпойменной террасе р. Сойва (62.74908° с. ш., 55.82615° в. д.). Экспозиция склона юго-восточная, крутизна около 30°, растительный покров слабо развит; 2) на водоразделе (62.74761° с. ш., 55.82187° в. д.) под пологом древесного и травянистого ярусов в ельнике разнотравном. Площадь, занимаемая каждой из ценопопуляций, составляла около 350 м<sup>2</sup>. Расстояние между наиболее удаленными точками сбора образцов в двух ценопопуляциях составляло около 400 м, ближними — в 2 раза меньше. Параллельно с отбором проб *P. media* были взяты образцы листьев *P. major* (подорожник большой), произрастающего на прилегающей к району проведения работ территории.

Для изучения морфометрических признаков в каждой ценопопуляции в фазу начала цветения (первая декада июля) отбирали по 30 типичных растений *P. media*. Для каждого растения определяли количество листьев, длину, ширину и площадь листа со средней части розетки, сырую массу надземной и подземной части, длину корней (укороченное корневище + главный корень). Удельную поверхностную плотность листьев рассчитывали как соотношение массы высушенного при 80 °С листа к его площади.

Измерения микроклиматических показателей (температуры, освещенности в области 400–700 нм — фотосинтетически активная радиация (ФАР)) проводили с помощью портативной метеостанции (Data Logger LI-1400, США), поступление к растениям ультрафиолетового (УФ) излучения в диапазоне длин волн 400–315 нм (УФ-А) и 315–280 нм (УФ-Б) оценивали с помощью

УФ-радиометра (ТКА-ПКМ 12, Россия). Почвенные образцы отбирали на глубине корнеобитаемого слоя (0–10 см). Анализ физико-химических свойств почв и элементного состава растений выполняли в соответствии с общепринятыми методами [8]. Содержание азота оценивали методом газовой хроматографии с применением специализированного элементного CHNS-O-анализатора в ЦКП «Хроматография» Института биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН (Сыктывкар).

Генетическую дифференциацию растений двух ценопопуляций *P. media* оценивали с помощью межмикросателлитных маркеров (intersimple sequence repeats, ISSR). Для проведения анализа в каждой ценопопуляции отбирали функционально зрелые листья срединной формации (по одному с каждого из 30 растений), фиксировали в жидком азоте и хранили при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ . Для сравнительных исследований были также отобраны образцы листьев 5 растений *P. major*. Всего для дальнейших лабораторных исследований было собрано 65 образцов листьев.

Тотальную ДНК выделяли с помощью набора реагентов FastDNA Spin Kit (QBioGene). Реакцию амплификации проводили в объеме 50 мкл. Реакционная смесь включала флуоресцентно-меченный праймер (Applied Biosystems, США) — 20 мкл, 10 мкл Screenmix (Applied Biosystems), 18 мкл свободной от нуклеаз воды (Ambion, США) и 2 мкл выделенной ДНК. Использовали два праймера ISSR-1.2 ((GT)<sub>7</sub>-YG) и ISSR-AG8 ((AG)<sub>8</sub>-YT), меченных флуоресцентным красителем 6FAM<sup>TM</sup>. Полимеразную цепную реакцию проводили согласно протоколу: начальная денатурация — 5 мин при  $94^{\circ}\text{C}$ ; 5 циклов по схеме  $90^{\circ}\text{C}$  (30 с),  $45^{\circ}\text{C}$  (60 с),  $72^{\circ}\text{C}$  (90 с); 27 циклов по схеме  $90^{\circ}\text{C}$  (30 с),  $55^{\circ}\text{C}$  (45 с),  $72^{\circ}\text{C}$  (60 с) и конечная элонгация 5 мин при  $72^{\circ}\text{C}$ . Денатурацию продукта амплификации проводили с использованием формамида (Applied Biosystems) в течение 3 мин при  $95^{\circ}\text{C}$ . Полученные образцы анализировали на генетическом анализаторе ABI PRISM 310 (Applied Biosystems) на базе ЦКП «Молекулярная биология» ИБ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН. Все образцы были проанализированы в трехкратной аналитической повторяемости.

Для установления длин полученных фрагментов электрофореграммы анализировали с исполь-

зованием внутреннего стандарта в программе GeneMapper 5.0 (Applied Biosystems). ISSR-маркеры относятся к маркерам доминантного типа наследования, полиморфизм которых тестируется по наличию/отсутствию фрагмента. Фрагменты, различающиеся по длине менее чем на одну пару нуклеотидов (п. н.), объединяли вручную. В анализ были включены фрагменты размером от 20 до 600 п. н. Наличие или отсутствие фрагментов кодировалось как «1» или «0» соответственно. Матрицы, содержащие длины полученных фрагментов и соответствующие им высоты пиков из трехкратной аналитической повторяемости, были объединены с использованием программы на языке R [9] собственной разработки [10]. Популяционно-генетический анализ проводили с использованием локусов, воспроизводившихся в трех аналитических повторностях.

Молекулярный дисперсионный анализ (Analysis of molecular variance — AMOVA), в том числе определение индекса фиксации  $F_{ST}$ , выполнен в среде R с использованием пакета «rpoprg» [11]. Индекс фиксации  $F_{ST}$  означает меру генетической дифференциации подразделенной популяции, измеряет межпопуляционные генетические различия и является количественной мерой дивергенции субпопуляций. Варьирует от 0 (панмиксия, равные частоты аллелей в субпопуляциях, нет дивергенции) до 1 (полная изоляция, крайняя дифференциация, субпопуляции фиксированы по различным аллелям, чистые линии). Дискриминационный анализ главных компонент был выполнен в этой же среде при помощи пакета «adegenet» [12]. Кластеризацию на основе моделей, описанных в работах [13, 14], выполняли с помощью программы STRUCTURE v. 2.3.4. Полученные с помощью STRUCTURE результаты обрабатывали в онлайн-сервисе CLUMPAK (<http://clumpak.tau.ac.il/>), включая определение наиболее вероятного числа кластеров по методу, описанному в работе [15].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Микроклиматические и почвенные условия местообитаний

Почва на участке 1 (средняя часть осыпного склона) слаборазвитая, с прерывистым, гумусово-аккумулятивным горизонтом, сформирована

Таблица 1

Физико-химические свойства корнеобитаемого слоя почвы (0–10 см) в местообитаниях *Plantago media* на Южном Тимане

| Местообитание  | pH (водн.) | N (общ.), % | Ca (обм.), ммоль/100 г | Mg (обм.), ммоль/100 г | K <sub>2</sub> O (подв.), мг/кг | P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (подв.), мг/кг | Fe (общ.), г/кг | Al (общ.), г/кг |
|----------------|------------|-------------|------------------------|------------------------|---------------------------------|----------------------------------------------|-----------------|-----------------|
| Открытый склон | 7,6 ± 0,1* | 0,12 ± 0,2  | 20,9 ± 1,6             | 13,8 ± 1,0             | 126 ± 15                        | 17 ± 4                                       | 15 ± 4          | 16 ± 4          |
| Лес            | 7,2 ± 0,1  | 0,27 ± 0,4  | 21,7 ± 1,6             | 12,3 ± 1,0             | 81 ± 12                         | 14 ± 3                                       | 15 ± 4          | 15 ± 4          |

Примечание. \* ±Δ — граница интервала абсолютной погрешности результата измерений при  $p = 0,95$ .

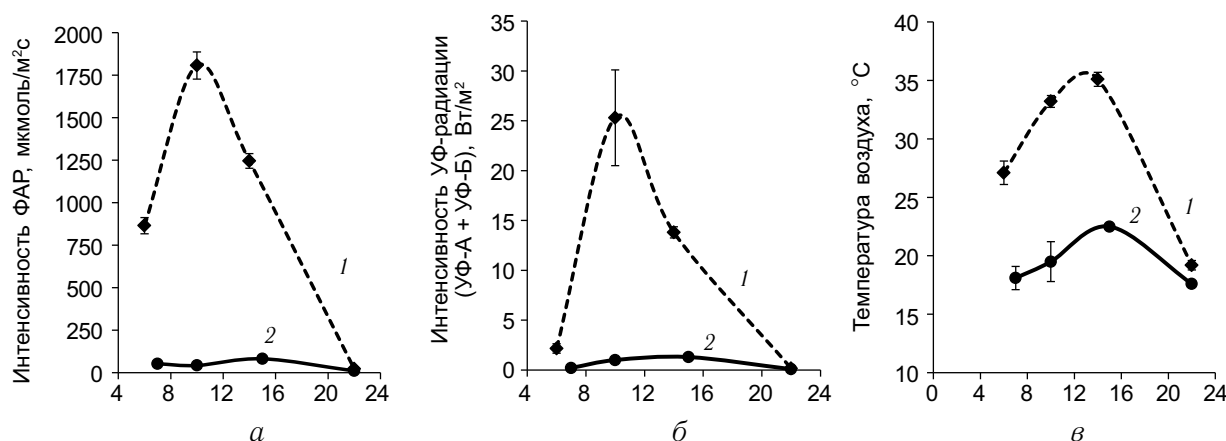


Рис. 1. Суточные изменения освещенности (а), интенсивности ультрафиолетовой радиации (б) и температуры воздуха (в) в местообитаниях *Plantago media*: 1 — на открытом склоне, 2 — в лесу. Измерения выполнены в первой декаде июля 2014 г. в ясный солнечный день. ФАР — фотосинтетически активная радиация

на щебнисто-мелкоземистой толще с близким подстиланием крупных обломков карбонатных пород. Почва участка 2 (лес) сформирована на карбонатных породах, мощность подстилки 3–5 см, гумусово-аккумулятивный горизонт хорошо развит. Корнеобитаемый слой почвы имеет слабощелочную реакцию среды (табл. 1) и относительно высокое содержание обменных форм кальция и магния, что обусловлено близким залеганием карбонатных пород. Верхний слой почвы водораздельного участка под ельником разнотравным отличается более высоким содержанием общего азота. Разница в валовом содержании фосфора, калия, алюминия и железа менее значительна.

Местообитания *P. media* существенно отличались по микроклиматическим условиям. В ясные солнечные дни растения на склоне получали на порядок больше фотосинтетически активной радиации и УФ-радиации (рис. 1). Максимальная температура воздуха в полуденные часы в травостое под лесным пологом была на 10–12 °C ниже, чем на открытом склоне под прямыми солнечными лучами.

### Морфофизиологические показатели растений

Сравнительный анализ выявил достоверные различия между растениями двух ценопопуляций по ряду морфометрических показателей (табл. 2). Растения на склоне имели существенно меньший габитус, мелкие, более опушенные листья, и накапливали меньше биомассы по сравнению с растениями лесного экотопа. Листовые пластинки отличались и по величине удельной поверхностной плотности, косвенно характеризующей фотосинтетическую активность листа. Следует отметить более высокое соотношение надземная/подземная масса у растений из лесного экотопа.

Листья растений лесного экотопа содержали больше калия и фосфора, тогда как растения на склоне накапливали больше железа и алюминия (табл. 3). Несмотря на отличия почв участков по содержанию азота, разница в содержании этого элемента в листьях растений была незначительной.

### Генетическая дифференциация растений

Согласно полученным данным, количество фрагментов ДНК, интерпретируемых при популяционно-генетическом анализе как локусы,

Таблица 2

Морфометрические показатели растений *Plantago media*, обитающих на открытом склоне и в лесу

| Показатель                                            | Открытый склон  | Лес             | <i>p</i> -значение для <i>t</i> -критерия |
|-------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|-------------------------------------------|
| Количество листьев, шт./растение                      | $6,2 \pm 1,2$   | $6,0 \pm 1,1$   | 0,544                                     |
| Длина листовой пластинки*, см                         | $4,6 \pm 2,0$   | $9,2 \pm 2,4$   | <0,001                                    |
| Ширина листовой пластинки*, см                        | $4,2 \pm 1,7$   | $3,0 \pm 0,7$   | <0,001                                    |
| Площадь листовой пластинки*, см <sup>2</sup>          | $12,5 \pm 4,2$  | $19,0 \pm 7,5$  | <0,001                                    |
| Удельная поверхностная плотность*, г/дм <sup>2</sup>  | $0,76 \pm 0,02$ | $0,36 \pm 0,02$ | <0,001                                    |
| Длина черешка листа*, см                              | $1,5 \pm 0,5$   | $4,2 \pm 1,9$   | <0,001                                    |
| Масса надземной части, г/растение                     | $1,5 \pm 1,1$   | $3,1 \pm 1,3$   | <0,001                                    |
| Длина корней, см                                      | $13,6 \pm 3,4$  | $10,1 \pm 3,2$  | <0,001                                    |
| Масса корней, г/растение                              | $1,2 \pm 0,8$   | $1,5 \pm 0,5$   | 0,144                                     |
| Соотношение масс надземной и подземной части растений | $1,3 \pm 0,7$   | $2,1 \pm 0,9$   | <0,001                                    |

Примечание. \* Данные представлены для листьев срединной формации.

Таблица 3

Валовое содержание химических элементов в листьях *Plantago media*, мг/г сухого растительного материала

| Местообитание  | N                | Ca          | Mg            | K           | P             | Fe              | Al              |
|----------------|------------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-----------------|-----------------|
| Открытый склон | $10,8 \pm 1,9^*$ | $35 \pm 10$ | $6,6 \pm 2$   | $20 \pm 8$  | $1,3 \pm 0,4$ | $0,38 \pm 0,11$ | $0,46 \pm 0,12$ |
| Лес            | $13,8 \pm 2,5$   | $31 \pm 9$  | $6,1 \pm 1,8$ | $31 \pm 12$ | $2,5 \pm 0,8$ | $0,25 \pm 0,07$ | $0,29 \pm 0,08$ |

Примечание. \*  $\pm \Delta$  — граница интервала абсолютной погрешности результата измерений при  $p = 0,95$ .

Таблица 4

Результаты анализа молекулярной дисперсии между группами растений *Plantago major* и *Plantago media*, и между группами растений *Plantago media*, произрастающих в контрастных по условиям освещенности местообитаниях (AMOVA)

| Источник изменчивости                                                    |                                                           | Степени свободы | Сумма квадратов отклонений | Процент изменчивости |
|--------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-----------------|----------------------------|----------------------|
| Две группы:<br><i>P. media</i> и <i>P. major</i>                         | Между группами                                            | 1               | 95,0                       | 37,7                 |
|                                                                          | Внутри каждой из групп<br>$F_{ST} = 0,38$ ( $p = 0,001$ ) | 63              | 909,9                      | 62,3                 |
| Две группы: <i>P. media</i> на склоне и <i>P. media</i> в лесном экотопе | Между группами                                            | 1               | 44,7                       | 6,8                  |
|                                                                          | Внутри каждой из групп<br>$F_{ST} = 0,07$ ( $p = 0,001$ ) | 58              | 809,2                      | 93,2                 |

различалось между тремя повторными анализами одних и тех же образцов *P. media* и *P. major*. Количество полиморфных локусов, воспроизводившихся в трех аналитических повторностях — 210; в двух из трех аналитических повторностей — 397; в одной повторности — 592. Молекулярный дисперсионный анализ (AMOVA), с использованием 210 локусов, ожидаемо показал значительную дифференциацию между растениями двух видов рода *Plantago*: индекс фиксации ( $F_{ST}$ ) составил 0,38 ( $p = 0,001$ ) (табл. 4). Величина  $F_{ST}$  между растениями *P. media*, обитающими на открытом склоне и в лесном экотопе, была равна 0,07 ( $p = 0,001$ ). Таким образом,

тест AMOVA показывает наличие небольших, но статистически значимых различий между двумя фенотипами *P. media*.

Генетическую структуру изученной совокупности растений оценивали с использованием двух методов кластеризации. Один метод основан на теоретической модели распределения частот встречаемости аллелей в популяции диплоидных организмов, размножающихся половым путем [13]. Предполагается, что выявляемые в ходе анализа кластеры (популяции) находятся в равновесии Харди – Вайнберга. Изучаемые локусы должны наследоваться независимо друг от друга и не проявлять неравновесного сцепления генов. Этот метод

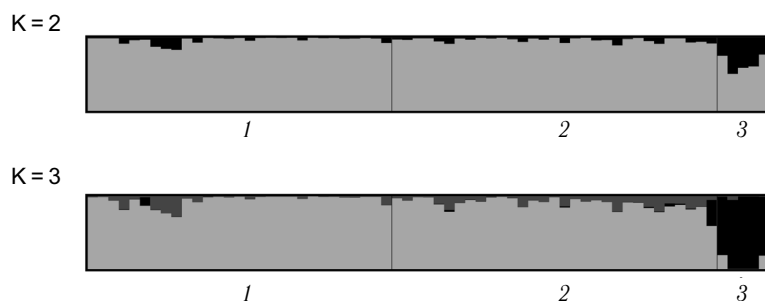
анализа был выполнен с помощью компьютерной программы STRUCTURE [13].

Другой метод позволяет проверить один из априори заданных вариантов кластеризации. За счет сокращения размерности данных методом главных компонент с последующим применением дискриминантного анализа для выбора тех главных компонент, которые наилучшим образом разграничивают заданные исследователем кластеры. Метод не накладывает ограничений на свойства исходных данных [12]. Анализ был реализован в среде R при помощи пакета adegenet [16].

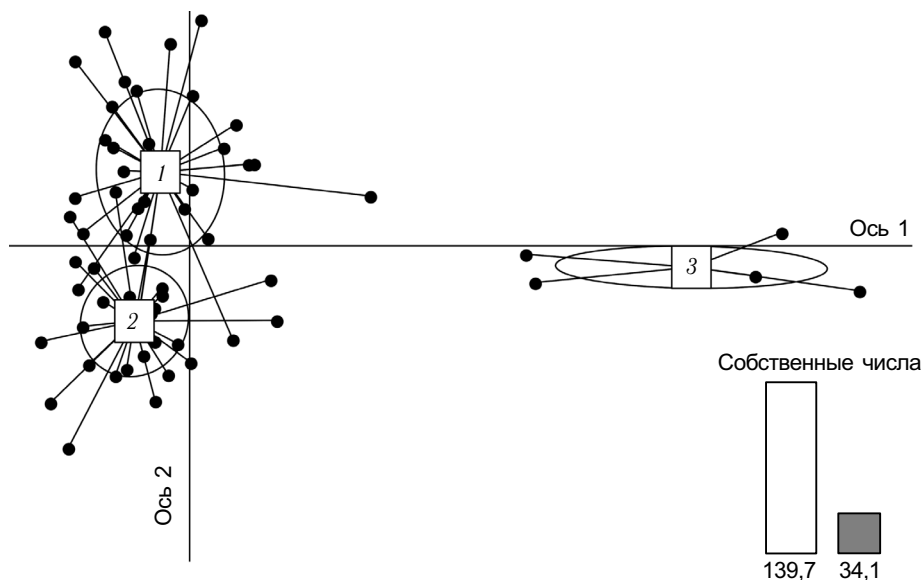
Кластеризация результатов ISSR-анализа образцов растений рода *Plantago* по 210 локусам в программе STRUCTURE выявила два четко разделяю-

щих кластера, совпадающих с разделением образцов на виды *P. media* и *P. major* (рис. 2). Повторный анализ выборки, включающий только образцы растений *P. media*, позволил выявить два кластера, границы которых во многом совпадают с границами между растениями разных ценопопуляций.

В результате дискриминационного анализа главных компонент (DAPC) все три группы (растения *P. media* на склоне и лесном экотопе и растения *P. major*) надежно разделялись (рис. 3). Растения двух ценопопуляций *P. media* оказались гораздо ближе друг к другу, чем к растениям *P. major*. Качество кластеризации особей методом DAPC напрямую зависит от количества главных компонент, использованных для дискриминационного анализа.



**Рис. 2.** Результаты кластеризации образцов растений *P. media* и *P. major* по 210 ISSR-локусам в программе STRUCTURE [13]. По горизонтали: каждый отдельный столбец соответствует одному образцу; 1 и 2 — теневые и световые растения *P. media*; 3 — растения *P. major*. По вертикали — вероятность отнесения каждого образца (особи) к одному из кластеров. Варианты количества кластеров указаны над графиками: K = 2 — наиболее вероятное число кластеров, определенное по методу Evanno [15]; K = 3 — количество кластеров, соответствующее числу изучаемых групп растений



**Рис. 3.** Диаграмма рассеяния, построенная по результатам дискриминационного анализа главных компонент (DAPC) бинарной матрицы, содержащей 210 ISSR-локусов растений *P. media* и *P. major* с использованием 5 главных компонент. 1 и 2 — растения *P. media* из лесного экотопа и на открытом склоне соответственно, 3 — растения *P. major*. Ось 1 — значения дискриминационной функции 1, ось 2 — значения дискриминационной функции 2. В нижнем правом углу графика представлены относительные величины собственных чисел DAPC

Обычно при увеличении количества главных компонент (вплоть до количества анализируемых локусов) происходит увеличение качества разделения кластеров. Оценить успешность классификации можно с помощью случайного отбора 10 % особей, сведения о которых не будут использоваться при построении кластеров. Далее эти 10 % особей классифицируются по кластерам, с использованием значений дискриминантных функций, рассчитанных на 90 % выборки. Эта процедура повторяется многократно для оценки средних значений результатов испытаний. В нашем случае различия между кластерами сохранялись при использовании минимального количества главных компонент, равного 5, и достигали оптимума при числе главных компонент равном 20 (доля успешно классифицированных особей в этом случае составила 91 % при среднеквадратичной ошибке классификации равной 11 %).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наши исследования показали, что адаптация растений *Plantago media* к разным эколого-физиологическим условиям проявляется в формировании фенотипов, свойства которых свидетельствуют о селективном действии светового фактора. Считается, что распределение растений по экотопам с различным световым режимом зависит от генотипически обусловленной изменчивости структуры листьев [17]. Анатомо-морфологические и функциональные характеристики листьев растений теневого и светового типа изучены достаточно полно [18–22].

Весь комплекс морфофизиологических показателей растений *P. media*, обитающих на открытом склоне и под пологом в лесу, свидетельствует о выраженной реакции на световой режим (табл. 1) и подтверждает полученные нами ранее данные о высокой пластичности данного вида по отношению к свету [5, 6]. Растения на склоне получали на порядок больше солнечного света, чем в лесу (рис. 1). При этом местообитания различались не только по интенсивности освещения, но и по спектральному составу света, поступающего к растениям. Растения на открытом склоне получали прямой солнечный свет, обогащенный синими лучами (400–500 нм), и большую часть дня подвергались воздействию УФ-радиации (280–400 нм). Прямые измерения показали, что интенсивность УФ-Б-радиации (280–315 нм)

на открытом склоне достигала 1,5 Вт/м<sup>2</sup>, тогда как под пологом леса была ничтожно малой (менее 0,1 Вт/м<sup>2</sup>). Контрастные условия инсоляции сочетались с различиями в терморежиме. Наши данные показывают, что теплообеспеченность растений на склоне заметно выше, чем под лесным пологом. Растения на склоне подвержены также действию более значительного перепада дневных и ночных температур. Высокая фенотипическая пластичность листьев растений *P. media*, произрастающих при разной освещенности, обеспечивает оптимальную среду для функционирования фотосинтетического аппарата.

Что касается условий почвенного питания (табл. 1), то различия в обеспеченности растений основными биогенными элементами (азот, фосфор, калий, кальций и магний) были не столь выражены, как условия воздушного питания. Нами также не выявлено существенных различий в содержании в корнеобитаемом слое почвы микроэлементов: меди, цинка, марганца, бора и молибдена (данные не приводятся). Элементный состав надземной биомассы растений, обитающих на склоне и в лесу, не имел выраженных отличий (табл. 3), что, по всей видимости, отражает сходный режим минерального питания.

В литературе имеются сведения о фенотипической лабильности и физиологических реакциях некоторых видов рода *Plantago* по отношению к освещенности [23], условиям минерального питания [24], влажности почвы [25]. В комплексном исследовании четырех видов рода *Plantago*, проведенном экологами, физиологами и популяционными генетиками в Нидерландах [4] отмечено, что высокая фенотипическая пластичность, свойственная представителям данного рода, может контролироваться генетически и иметь генетическую основу. Показано, что генетическое разнообразие может являться одним из факторов, обеспечивающих способность *Plantago lanceolata* существовать в разных сообществах [26].

Проведенный нами популяционно-генетический анализ с использованием ISSR-маркеров по 210 локусам выявил два кластера, границы которых совпадали с границами между растениями *P. media* светового и теневого фенотипа. Результаты дискриминационного анализа главных компонент подтвердили, что на фоне высокого генетиче-

ского сходства существуют статистически значимые генетические различия между этими фенотипами, что свидетельствует о генетической дифференциации двух фенотипов *P. media*, произрастающих в разных экологических условиях. По-видимому, различия экологических условий, проявляющиеся в первую очередь в световом и температурном режиме местообитаний, оказывали определенное селективное воздействие. Однако, несмотря на близость локализации ценопопуляций, нельзя полностью исключить наличие репродуктивных барьеров, снижающих обмен генетической информацией. *P. media* является ветроопыляемым травянистым многолетником, семена которого не имеют приспособлений для распространения на большие расстояния. Кроме того, перенос пыльцы воздушными потоками к растениям, обитающим в лесном экотопе, может быть ограничен из-за слабого проникновения ветра под лесной полог. Это затрудняет выявление причин генетической дифференциации близкорасположенных ценопопуляций.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обитание в разных эколого-ценотических условиях приводит к формированию адаптивных морфофизиологических реакций. Световая и теневая формы *Plantago media* на Южном Тимане имели высокое генетическое сходство, но вместе с тем проявляли статистически значимую генетическую дифференциацию, о чем свидетельствует полиморфизм генетических маркеров. Следовательно, можно полагать, что фенотипические вариации генетически обусловлены по крайней мере частично. Поддержание определенного уровня генетического разнообразия в популяциях важно для сохранения вида и проявления его потенциала. Популяционный генетический анализ с использованием ISSR-маркеров является чувствительным инструментом для выявления генетического разнообразия и дифференциации популяций растений в зависимости от экологических факторов.

Работа выполнена в рамках темы госбюджетных НИОКТР «Физиология и стресс-устойчивость фотосинтеза растений и пойкилогидрических фотоавтотрофов в условиях Севера» (№ АААА-А17-117033010038-7) и поддержана Проектом Комплексной программы фундаментальных исследований УрО РАН «Фототрофные организмы как компонент живой природы

и индикатор климатических изменений» (№ 18-4-4-20)

## ЛИТЕРАТУРА

1. Инге-Вечтомов С.Г. Что мы знаем об изменчивости? // Экологическая генетика. — 2010. — Т. 8. — № 4. — С. 4–9. [Inge-Vechtomov S.G. What do we know about variability? *Ecological genetics*. 2010;8(4):4-9. (In Russ.)]
2. Sultan SE. Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. *Trends Plant Sci*. 2000;5(12):537-542. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01797-0](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01797-0).
3. Флора Северо-Востока Европейской части СССР. Семейства Umbelliferae-Compositae / Под ред. А.И. Толмачева. Т. 4. — Л.: Наука. Ленингр. отд-ние, 1977. — 312 с. [Flora Severo-Vostoka Evropeiskoi chasti SSSR. Semeistva Umbelliferae-Compositae. Vol. 4. Ed. by A.I. Tolmachev. Leningrad: Nauka. Leningr. otd-nie; 1977. 312 p. (In Russ.)]
4. Kuiper PJ, Bos M. Plantago: a multidisciplinary study. *Ecological Studies*. 1992. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-76392-2>.
5. Golovko TK, Dalke IV, Zakhochiy IG, et al. Functional plasticity of photosynthetic apparatus and its resistance to photoinhibition in *Plantago media*. *Russ J Plant Physiol*. 2011;58:549-59. <https://doi.org/10.1134/S1021443711040054>.
6. Golovko T, Dymova O, Zakhochiy I, et al. Photoprotection by carotenoids of *Plantago media* photosynthetic apparatus in natural conditions. *Acta Biochimica Polonica*. 2012;59:145-7. [https://doi.org/10.18388/abp.2012\\_2192](https://doi.org/10.18388/abp.2012_2192).
7. Rozentsvet OA, Golovko TK, Bogdanova ES, et al. Polar lipid pool modification in leaves of hoary plantain (*Plantago media* L.) plants during their light adaptation under natural conditions. *Biology Bulletin*. 2013;40:138-145. <https://doi.org/10.1134/S1062359013020118>.
8. Воробьева Л.А. Теория и практика химического анализа почв. — М.: Изд-во МГУ, 2006. — 400 с. [Vorob'eva LA. Teoriya i praktika khimicheskogo analiza pochv. Moscow: Publishing house Moscow State University; 2006. 400 p. (In Russ.)]
9. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2015.



10. ISSR321 – The R-script for merging ISSR data replications [Online] GitHub / Accessed 16.08.2016. Доступно по: <https://github.com/chadinkomi/ISSR321>. Ссылка активна на 06.08.2019.
11. Kamvar ZN, Tabima JF, Grünwald NJ. Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *Peer J*. 2014;2:e281. <https://doi.org/10.7717/peerj.281>.
12. Jombart T, Devillard S, Balloux F. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genet*. 2010;11:94. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-94>.
13. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000;155(2):945-959.
14. Falush D, Stephens M, Pritchard JK. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Mol Ecol Notes*. 2007;7(4):574-578. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x>.
15. Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol Ecol*. 2005;14(8):2611-2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>.
16. Jombart T. Adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*. 2008;24(11):1403-1405. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129>.
17. Bazzaz FA. Plants in changing environments: linking physiological, population, and community ecology. Cambridge; New York: Cambridge University Press; 1996.
18. Любименко В.Н. Избранные труды. Работы по фотосинтезу и приспособлению растений к свету. Т. 1 / под ред. А.С. Оканенко. — Киев: Изд-во АН Украинской ССР, 1963. — 614 с. [Lyubimenko VN. Izbrannyye trudy. Raboty po fotosintezu i prispособleniyu rastenii k svetu. Vol. 1. Kiev: Izdatel'stvo AN Ukrainskoi SSR; 1963. 614 p. (In Russ.)]
19. Горышина Т.К., Заботина Л.Н., Пружина Л.Г. Пластидный аппарат травянистых растений в разных условиях освещения // Экология. — 1975. — № 5. — С. 15–22. [Goryshina TK, Zabolina LN, Pruzhina LG. Plastidnyi apparat travyanistykh rastenii v raznykh usloviyakh osveshcheniya. *Ekologiya*. 1975;(5):15-22. (In Russ.)]
20. Boardman NK. Comparative photosynthesis of sun and shade plants. *Annu Rev Plant Physiol*. 1977;28(1):355-377. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.28.060177.002035>.
21. Masarovicová E, Štefančík L. Some ecophysiological features in sun and shade leaves of tall beech trees. *Biol Plant*. 1990;32(5):374-387. <https://doi.org/10.1007/BF02898503>.
22. Larcher W. Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups. 4<sup>th</sup> ed. Berlin; New York: Springer; 2003.
23. Kuiper D, Smid A. Genetic differentiation and phenotypic plasticity in *Plantago major* ssp. I. The effect of differences in level of irradiance on growth, photosynthesis, respiration and chlorophyll content. *Physiol Plant*. 1985;65(4):520-528. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1985.tb08684.x>.
24. Lambers H, Posthumus F, Stulen I, et al. Energy metabolism of *Plantago major* ssp. major as dependent on the supply of mineral nutrients. *Physiol Plant*. 1981;51(1):85-92. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1981.tb00883.x>.
25. Mudrik V, Kosobrukhov A, Knyazeva I, Pigulevskaya T. Changes in the photosynthetic characteristics of *Plantago major* plants caused by soil drought stress. *Plant Growth Regulation*. 2003;40(1):1-6. <https://doi.org/10.1023/A:1023009025426>.
26. Odat N, Hellwig FH, Jetschke G, Fischer M. On the relationship between plant species diversity and genetic diversity of *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae) within and between grassland communities. *J Plant Ecology*. 2010;3(1):41-48. <https://doi.org/10.1093/jpe/rtp017>.

## ✳ Информация об авторах

Илья Григорьевич Захожий — канд. биол. наук, научный сотрудник, лаборатория экологической физиологии растений. ИБ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар. SPIN: 3615-9301. E-mail: [zakhozhiy@ib.komisc.ru](mailto:zakhozhiy@ib.komisc.ru).

## ✳ Authors and affiliations

Ilya G. Zakhoshy — PhD, Researcher, Laboratory of Ecological Physiology of Plants, Institute of Biology of Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russia. SPIN: 3615-9301. E-mail: [zakhozhiy@ib.komisc.ru](mailto:zakhozhiy@ib.komisc.ru).

## ✿ Информация об авторах

**Дмитрий Михайлович Шадрин** — канд. биол. наук, научный сотрудник, Центр коллективного пользования «Молекулярная биология». ИБ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар. SPIN: 1453-3893. E-mail: shdimas@yandex.ru.

**Яна Игоревна Пылина** — мл. научный сотрудник, Центр коллективного пользования «Молекулярная биология». ИБ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар. SPIN: 5636-5693. E-mail: yanapylina@yandex.ru.

**Иван Федорович Чадин** — канд. биол. наук, руководитель, Центр коллективного пользования «Молекулярная биология». ИБ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар. SPIN: 9787-2449. E-mail: chadin@ib.komisc.ru.

**Тамара Константиновна Головки** — д-р биол. наук, главный научный сотрудник, лаборатория экологической физиологии растений. ИБ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар. SPIN: 4344-7144. E-mail: golovko@ib.komisc.ru.

## ✿ Authors and affiliations

**Dmitry M. Shadrin** — PhD, Researcher, Center for Collective Use “Molecular Biology”, Institute of Biology of Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russia. SPIN: 1453-3893. E-mail: shdimas@yandex.ru.

**Yana I. Pylina** — Junior Research Scientist, Center for Collective Use “Molecular Biology”. Institute of Biology of Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russia. SPIN: 5636-5693. E-mail: yanapylina@yandex.ru.

**Ivan F. Chadin** — PhD, Head of Molecular Biology Core Facility. Institute of Biology of Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russia. SPIN: 9787-2449. E-mail: chadin@ib.komisc.ru.

**Tamara K. Golovko** — Doctor of Science, Main Researcher, Laboratory of Ecological Physiology of Plants. Institute of Biology of Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russia. SPIN: 4344-7144. E-mail: golovko@ib.komisc.ru.

## ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ *ToxA* И *PtrPf2* ФИТОПАТОГЕННОГО ГРИБА *PYRENOPHORA TRITICI-REPENTIS* В НАЧАЛЕ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА

© Н.В. Мироненко, А.С. Орина, Н.М. Коваленко

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений», Пушкин, Санкт-Петербург

Для цитирования: Мироненко Н.В., Орина А.С., Коваленко Н.М. Экспрессия генов *ToxA* и *PtrPf2* фитопатогенного гриба *Pyrenophora tritici-repentis* в начале инфекционного процесса // Экологическая генетика. — 2020. — Т. 18. — № 2. — С. 149–155. <https://doi.org/10.17816/ecogen16362>.

Поступила: 07.10.2019

Одобрена: 23.12.2019

Принята: 23.06.2020

✿ Для анализа уровня экспрессии гена *ToxA*, кодирующего синтез белкового некроз-индуцирующего токсина Ptr ToxA, и гена фактора транскрипции *PtrPf2* фитопатогенного гриба *Pyrenophora tritici-repentis* в растении были выбраны два изолята, различающихся способностью вызывать некроз на листьях восприимчивого сорта пшеницы Glenlea (nec<sup>+</sup> и nec<sup>-</sup>) и уровнем экспрессии этих генов *in vitro*. Показано, что ген некротрофного эффектора *ToxA* дифференциально экспрессируется у изолятов *P. tritici-repentis* в разные временные периоды после инокуляции сорта Glenlea, имеющего доминантную аллель гена *Tsn1*, которая контролирует чувствительность к некроз-индуцирующему токсину Ptr ToxA. Уровень экспрессии *ToxA* резко увеличивается в процессе заражения пшеницы изолятами *P. tritici-repentis* ToxA<sup>+</sup> по сравнению с результатами, ранее полученными *in vitro*. Причем, у вирулентного (nec<sup>+</sup>) изолята наблюдали более сильную экспрессию гена через 48 ч после инокуляции по сравнению с авирулентным (nec<sup>-</sup>) изолятом. Уровни экспрессии *ToxA* в образцах существенно различались через 24, 48 и 96 ч после инокуляции, однако динамика изменения признака у обоих изолятов во времени была одинаковой. Другой характер изменчивости экспрессии гена наблюдали для фактора транскрипции *PtrPf2*, регулирующего экспрессию *ToxA*: экспрессия этого гена в растении мало отличалась от экспрессии в культуре, два изолята лишь незначительно различались в точке максимальной экспрессии *ToxA*, то есть через 48 ч. Очевидно, роль грибного фактора транскрипции в регуляции экспрессии гена эффектора в растении незначительна, и в силу вступают другие механизмы регуляции экспрессии генов патогена на биотрофной стадии развития болезни.

✿ **Ключевые слова:** *Pyrenophora tritici-repentis*; желтая пятнистость пшеницы; ген чувствительности к токсину Ptr ToxA *Tsn1*, ген эффектор *ToxA*; ген фактора транскрипции *PtrPf2*.

## EXPRESSION OF THE *ToxA* AND *PtrPf2* GENES OF THE PHYTOPATHOGENIC FUNGUS *PYRENOPHORA TRITICI-REPENTIS* AT THE BEGINNING OF THE INFECTION PROCESS

© N.V. Mironenko, A.S. Orina, N.M. Kovalenko

All-Russian Institute for Plant Protection, Pushkin, Saint Petersburg, Russia

Cite this article as: Mironenko NV, Orina AS, Kovalenko NM. Expression of the *ToxA* and *PtrPf2* genes of the phytopathogenic fungus *Pyrenophora tritici-repentis* at the beginning of the infection process. *Ecological genetics*. 2020;18(2):149-155. <https://doi.org/10.17816/ecogen16362>.

Received: 07.10.2019

Revised: 23.12.2019

Accepted: 23.06.2020

✿ **Background.** *Pyrenophora tritici-repentis* causing a tan spot of wheat produces host-specific toxins. **Materials and methods.** Two *P. tritici-repentis* isolates with different ability to cause necrosis on the leaves of wheat cultivar Glenlea (nec<sup>+</sup> and nec<sup>-</sup>) and with different expression level of *ToxA* and *PtrPf2* (factor transcription gene) *in vitro* were used for analysis. *ToxA* gene expression in *P. tritici-repentis* isolates *in planta* was characterized using quantitative PCR. **Results.** The expression of the *ToxA* gene in *P. tritici-repentis* ToxA<sup>+</sup> isolates significantly increased when infected the wheat leaves compared to *ToxA* expression results obtained *in vitro*. The levels of *ToxA* expression in both isolates differed significantly after 24, 48 and 96 h after inoculation, however, the dynamics of the trait change over time were similar. However, the highest *ToxA* expression in the virulent (nec<sup>+</sup>) isolate in contrast with the avirulent (nec<sup>-</sup>) isolate was observed at a point of 48 h. Whereas the expression of regulating transcription factor *PtrPf2* *in planta* differed imperceptibly from expression *in vitro* throughout the observation period. **Conclusion.** Obviously, the role of the fungal transcription factor in regulating the effector gene expression weakens *in planta*, and other mechanisms regulating the expression of pathogen genes at the biotrophic stage of the disease develop.

✿ **Keywords:** *Pyrenophora tritici-repentis*; tan spot of wheat; gene of sensitivity to Ptr ToxA *Tsn1*, effector gene *ToxA*; gene of transcription factor *PtrPf2*.

## ВВЕДЕНИЕ

Желтая пятнистость листьев пшеницы — болезнь, появившаяся в 40-е годы прошлого столетия, и с тех пор охватившая практически всю территорию выращивания пшеницы в мире. Вредоносность возбудителя болезни гриба *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechsler связывают с его способностью продуцировать хозяин-специфичные токсины, индуцирующие некроз и хлороз листьев на восприимчивых сортах. Известно, что гриб *P. tritici-repentis* продуцирует хозяин-специфичные фитотоксины: Ptr ToxA и Ptr ToxB — белки, индуцирующие некроз и хлороз соответственно на восприимчивых сортах пшеницы, которые считаются основными факторами патогенности, и Ptr ToxC — низкомолекулярное соединение небелковой природы [1, 2]. Токсины Ptr ToxA и Ptr ToxB детерминированы генами *ToxA* и *ToxB* соответственно, для детекции наличия которых в геноме сконструированы геноспецифичные праймеры. До сих пор расовый состав популяций патогена определяют с помощью заражения сортов-дифференциаторов, позволяющих различить 8 рас согласно сочетаниям трех фитотоксинов в изолятах гриба [3, 4]. Однако в последнее время становится очевидным, что число рас может быть больше благодаря обнаружению новых некроз-индуцирующих токсинов [5–9], поэтому фенотипическая оценка изолятов, отнесенных к определенной расе, может не совпадать с их генетической характеристикой. Например, обнаружено, что в российских популяциях встречаются изоляты, несущие ген *ToxA* (*ToxA*<sup>+</sup>), но не индуцирующие некроз на восприимчивых сортах (пес<sup>–</sup>). В связи с этим была выдвинута гипотеза, что данный феномен обусловлен отсутствием или низкой экспрессией гена *ToxA* [10].

Известно, что *P. tritici-repentis* продуцирует токсин Ptr ToxA, который индуцирует некроз только на листьях сортов мягкой пшеницы, имеющих в геноме доминантную аллель гена *Tsn1*, контролирующую чувствительность к токсину Ptr ToxA [11]. Ген *Tsn1* схож по структуре с R-генами устойчивости растений к болезням: включает домены S/TPK (серин/треонин специфическую протеинкиназу) и NBS-LRR (сайт связывания нуклеотидов и обогащенный лейцином повтор) [12].

Данные о связи экспрессии *ToxA* в изолятах *P. tritici-repentis* в культуре с их способностью индуцировать некроз на восприимчивых сортах, а также механизмах регуляции экспрессии этого гена эффектора крайне ограничены. Важно, что ген *ToxA* в геноме гриба *P. tritici-repentis* имеет природу чужеродного элемента, перенесенного из другого вида гриба — *Parastagonospora nodorum* (Berk.) Quaedv., Verkley & Crous, который вызывает очень распространенное заболевание — септориоз пшеницы [13]. В 2018 г. появилось первое сообщение об обнаружении в изолятах *P. tritici-repentis* гена фактора транскрипции, который кодирует продукт, регулирующий экспрессию гена *ToxA*. Этот ген, обозначенный *PtrPf2*, оказался ортологом гена *PnPf2* — фактора транскрипции для эффекторов *SnToxA* и *SnTox3* *Parastagonospora nodorum* [14].

Ранее нами были проанализированы две группы изолятов *P. tritici-repentis* из разных популяций патогена по признаку конститутивной экспрессии гена эффектора *ToxA* и гена фактора транскрипции *PtrPf2*. Впервые продемонстрирована внутри- и межпопуляционная изменчивость патогена по признакам экспрессии *ToxA* и *PtrPf2* *in vitro* [15].

Цель данного исследования — определить уровень экспрессии генов *ToxA* и *PtrPf2* у двух изолятов возбудителя болезни *P. tritici-repentis* в тканях восприимчивого сорта пшеницы с доминантной аллелью гена *Tsn1* на ранних стадиях инфицирования грибом.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для анализа экспрессии генов гриба в процессе заражения пшеницы были выбраны моноконидиальные изоляты из южно-казахстанской популяции (г. Алматы) 2018 г., Ptr1 и Ptr10, несущие ген эффектор *ToxA* и различающиеся по уровню экспрессии *in vitro*, которая была оценена ранее [15].

Культивирование штаммов *P. tritici-repentis*, индукцию образования конидий и инокуляцию растений пшеницы проводили по описанным методикам [16]. Вирулентность изолятов оценивали по способности индуцировать некроз на листьях проростков восприимчивого сорта пшеницы Glenlea, имеющего доминантную аллель *Tsn1*, по пятибалльной шкале [17]. Фитопатологический тест проводили в двух повторностях.

Для изучения экспрессии генов *P. tritici-repentis* в тканях растения пшеницы в процессе развития болезни использовали модифицированную методику [18]. Для этого отсеченные листья семидневных проростков пшеницы сорта Glenlea помещали в чашку Петри на поверхность 2 % агаровой среды, содержащей 70 мг/л бензидазола, фиксируя их с помощью агаровых блоков. На каждый лист наносили каплю 10 мкл суспензии конидий гриба с концентрацией 3500 конидий/мл. Каждый отсеченный лист представлял отдельное растение. Для каждого изолята были подготовлены по 3 чашки Петри с 10 отрезками листьев в каждой, которые заражали суспензией конидий одновременно. Чашки с инокулированными отрезками листьев помещали в светоустановку при температуре 22 °C и освещенности 1500 Лм, фотопериод составлял 12 ч. Биологический материал для последующего анализа транскрипционной активности генов собирали через 24, 48 и 96 ч. Вырезали по 10–15 отрезков растительной ткани из мест инокуляции патогеном размером 3 × 6 мм, помещали их в пробирку и сразу замораживали при –20 °C для последующего выделения РНК.

Выделение РНК проводили с помощью кита RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Германия). кДНК синтезировали методом ОТ-ПЦР на матрице тотальной РНК (1–2 мкг) с помощью набора реактивов MMLV RT kit (Евроген, Россия).

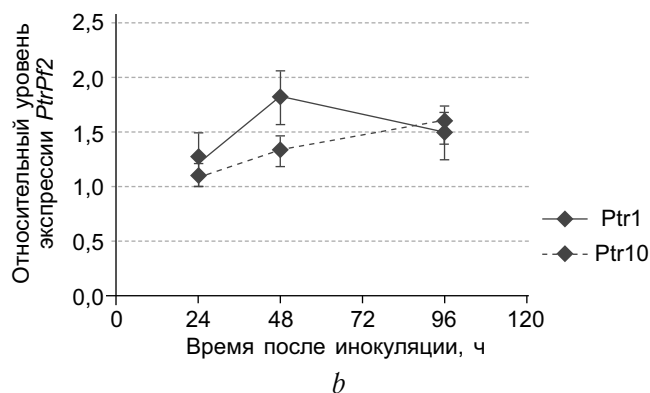
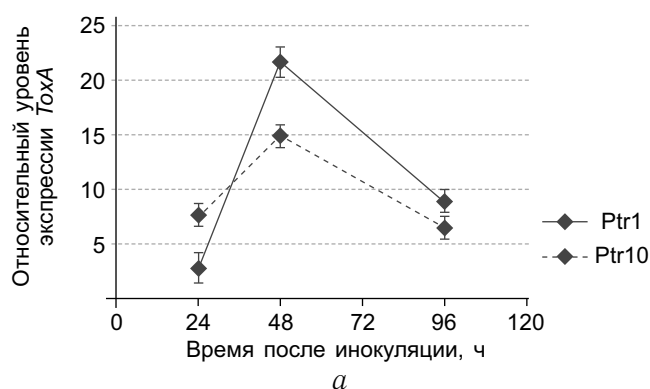
Оценку экспрессии генов *ToxA* и *PtrPf2* у изолятов *P. tritici-repentis* в тканях растения в разные временные интервалы после заражения проводили с помощью количественной ПЦР (кПЦР) с ген-специфичными праймерами [14]. В качестве референтного контроля был использован ген актина (*Act1*). Реакции кПЦР проводили в объеме 20 мкл, содержащем 4 мкл 5 × qPCRmix-HS SYBR мастер-микса (Евроген, Россия), 500 нМ каждого праймера и 2 мкл раствора кДНК с использованием следующего протокола амплификации: 50° — 2 мин; 95° — 15 мин; [95° — 15 с; 62° — 60 с] · 40 на термоциклере CFX96 Real-Time System (BioRad, США) трехкратно. Обработку первичных данных осуществляли с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager 1.6. Относительную экспрессию генов рассчитывали по формуле  $R = 2^{-\Delta\Delta C_t}$  [19].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате заражения проростков восприимчивого сорта пшеницы Glenlea двумя изолятами *ToxA*<sup>+</sup> *P. tritici-repentis* установлено, что изолят Ptr1 вызывал реакцию некроза на 3–4 балла и считается вирулентным (нес<sup>+</sup>), а изолят Ptr10 поражал пшеницу на 1–2 балла и считается слабовирулентным/авирулентным (нес<sup>–</sup>). Согласно нашим данным, уровень экспрессии генов *ToxA* и *PtrPf2* *in vitro* составляет  $0,67 \pm 0,01$  и  $0,90 \pm 0,03$  для изолята Ptr1 и  $0,92 \pm 0,1$  и  $1,00 \pm 0,05$  для Ptr10 соответственно [15].

В результате эксперимента, выполненного по описанным ранее методикам на целых растениях в стадии проростков, гены-мишени *ToxA* и *PtrPf2* в общей кДНК из неинокулированных растений не амплифицировались, тогда как в зараженных растениях активность этих генов была детектирована. Графическое выражение экспрессии генов *in planta* в течение 4 сут представлено на рисунке.

Очевидно, что в результате проникновения гриба внутрь растительной ткани происходит резкое увеличение уровня экспрессии гена *ToxA*



Уровни экспрессии генов *ToxA* (a) и *PtrPf2* (b) относительно гена актина *Act1* у изолятов *Pyrenophora tritici-repentis* Ptr1 и Ptr10 в тканях зараженных листьев пшеницы сорта Glenlea в разные периоды после инокуляции

по сравнению с конституционным — более чем в 4 раза у изолята Ptr1 и в 7 раз у изолята Ptr10 (через 24 ч после инокуляции). Через 48 ч после инокуляции отмечено максимальное значение относительного уровня экспрессии *in planta*, а через 96 ч — снижение экспрессии гена *ToxA* (см. рисунок, *a*). В то же время экспрессия гена фактора транскрипции *PtrPf2* не изменилась через 24 ч после инокуляции и лишь незначительно выросла через 48 ч по сравнению с экспрессией *in vitro* и практически не менялась в течение 4 сут наблюдения *in planta* (см. рисунок, *b*).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Уровни экспрессии генов *ToxA* и *PtrPf2* в отдельных изолятах фитопатогенных грибов при взаимодействии с растением-хозяином являются важной характеристикой патогенных свойств и могут быть использованы для анализа взаимодействия генов в патосистемах. Наличие или отсутствие экспрессии гена *ToxA*, отвечающего за синтез некроз-индуцирующего белкового токсина Ptr *ToxA*, можно заметить по фенотипическому проявлению реакции растений мягкой пшеницы, имеющих доминантную аллель гена восприимчивости *Tsn1*, в ответ на заражение изолятами *P. tritici-repentis* *ToxA*<sup>+</sup>. Однако многие исследователи наблюдали случаи отсутствия индуцирования некроза *ToxA*<sup>+</sup> изолятами [5, 6, 13, 20–23]. Были сделаны попытки объяснить данный факт мутациями в гене, но нуклеотидная последовательность *ToxA* у многих *ToxA*<sup>+</sup>пес<sup>-</sup>-изолятов *P. tritici-repentis* оказалась на редкость консервативной, что характерно для чужеродного генетического элемента, недавно попавшего в геном гриба [13]. Структура гена *ToxA*, недавно обнаруженного в геномах других патогенов пшеницы и ячменя *Cochliobolus sativus* (S. Ito & Kurib.) Drechsler ex Dastur и *P. teres* Drechsler, также отличается малой изменчивостью [22, 24, 25].

Известно, что экспрессия генов эффекторов фитопатогенных грибов определяется сетью сигнальных генов, включая факторы транскрипции, которая эволюционно сложилась в конкретных экологических условиях. Знаний о регуляции генов некротрофных эффекторов еще недостаточно. Из известных для всех организмов 37 суперсемейств ДНК-связывающих доменов у грибов об-

наружено 12 [26, 27]. Среди них три типа белков оказались специфичными для царства грибов, из которых фактор транскрипции «zinc finger transcription factor», кодируемый геном *PnPf2*, обнаружен у *Parastagonospora nodorum*, а его ортолог ген *PtrPf2* — у *P. tritici-repentis*. Это факторы транскрипции *PnPf2* и *PtrPf2* генов эффекторов *SnToxA* и *PtrToxA* двух грибных патогенов *Parastagonospora nodorum* и *P. tritici-repentis* соответственно [14].

Показано, что экспрессия *ToxA* в изолятах *P. tritici-repentis* значительно возрастает в процессе заражения растения на начальных этапах, и находится под контролем гена фактора транскрипции *PtrPf2* [14]. Авторы отмечали максимальную экспрессию *ToxA* на третий день после заражения восприимчивого сорта, тогда как *PtrPf2* экспрессировался равномерно в течение всего периода наблюдений (с 3-го по 10-й день) [14]. Наши результаты показали сходную картину: максимальную экспрессию гена *ToxA* через 48 ч после заражения растения и равномерную экспрессию *PtrPf2* в течение 4 сут наблюдения. Причем *in planta* экспрессия *ToxA* у вирулентного изолята была выше, чем у слабовирулентного во всех точках измерения, тогда как уровень экспрессии *PtrPf2* у обоих изолятов в растении не имел достоверных различий. Таким образом, два изолята *P. tritici-repentis* существенно отличались друг от друга по уровню относительной экспрессии гена *ToxA* в тканях восприимчивого сорта пшеницы в разных временных точках, хотя динамика изменчивости этого признака у них была одинакова. Межштаммовые различия по экспрессии гена эффектора, ассоциированные с проявлением болезни, обнаружены и у других фитопатогенных грибов. Например, у двух изолятов *Stagonospora nodorum* (Berk.) E. Castell. & Germano были выявлены различия в уровне экспрессии гена *SnToxA* через 26 ч после инокуляции восприимчивого сорта пшеницы более чем в два раза, причем более высокие уровни экспрессии ассоциируются с усилением болезни в патосистеме «пшеница — *S. nodorum*» [28]. Влияние уровня экспрессии некротрофных эффекторов на проявление болезни показано также в других работах [28, 29]. В патосистеме «пшеница — *Parastagonospora nodorum*» хорошо изучены три некротрофных эффектора *SnToxA*, *SnTox1*

и *SnTox3*, которые могут влиять друг на друга посредством эпистаза, подавляющего экспрессию. Например, экспрессия гена *SnTox3* может быть супрессирована геном *SnTox1* [29]. Эффекты взаимодействия *Tsn1* – *ToxA* на проявление болезни могут сильно варьировать в зависимости от генотипа сорта пшеницы, имеющего ген *Tsn1*. В частности, на сортах твердой пшеницы не выявлена значимая роль токсина Ptr *ToxA* и, наоборот, отмечается сильное влияние некротрофного эффектора *Parastagonospora nodorum SnToxA* при инокуляции сортов *Tsn1*<sup>+</sup> [30].

Роль генной экспрессии как главной причины изменчивости вирулентности в дополнение к различиям в нуклеотидной последовательности генов показана для изолятов *Zymoseptoria tritici* (Roberge ex Desm.) Quaedvl. & Crous [31].

Наши результаты и приведенные выше примеры из работ, посвященных анализу экспрессии генов эффекторов грибов в растении, подтверждают предлагаемую многими авторами идею, что, возможно, основным механизмом, влияющим на динамику расового состава в популяциях фитопатогенных грибов, является не изменение частот аллелей генов (а)вирулентности, а изменчивость регуляции экспрессии генов эффекторов, зависящая как от генотипа растения-хозяина, так и различных экологических условий.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспрессия гена *ToxA* резко увеличивается в процессе заражения восприимчивого сорта пшеницы Glenlea изолятами *P. tritici-repentis ToxA*<sup>+</sup> по сравнению с экспрессией *in vitro*. Изоляты *P. tritici-repentis* характеризуются дифференциальной экспрессией *ToxA* в растении: уровни экспрессии *ToxA* у обоих изолятов существенно различались через 24, 48 и 96 ч после инокуляции, однако динамика изменения признака во времени была одинаковой. У вирулентного изолята наблюдали более сильную экспрессию *ToxA* через 48 ч после инокуляции по сравнению с авирулентным изолятом.

Другой характер изменчивости экспрессии гена наблюдали для фактора транскрипции *PtrPf2*, регулирующего экспрессию *ToxA*: экспрессия этого гена в растении мало отличалась от экспрессии в культуре, два изолята лишь незначительно раз-

личались в точке максимальной экспрессии *ToxA*, то есть через 48 ч после инокуляции. Таким образом, предположение о существовании связи между уровнем экспрессии *PtrPf2 in vitro* и способностью изолятов индуцировать некроз на листьях восприимчивого сорта [15] не оправдалось. Очевидно, что роль грибного фактора транскрипции в регуляции экспрессии гена эффектора *in planta* незначительна, и в силу вступают другие механизмы регуляции экспрессии генов патогена на биотрофной стадии развития болезни.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-04-00128\_а.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ciuffetti LM, Tuori RP, Gaventa JM. A single gene encodes a selective toxin causal to the development of tan spot of wheat. *Plant Cell*. 1997;9(2):135-144. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.2.135>.
2. Martinez JP, Ottum SA, Ali S, et al. Characterization of the *ToxB* gene from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Mol Plant Microbe Interact*. 2001;14(5):675-677. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.5.675>.
3. Lamari L, Gilbert J, Tekauz A. Race differentiation in *Pyrenophora tritici-repentis* and survey of physiologic variation in western Canada. *Can J Plant Pathol*. 1998;20(4):396-400. <https://doi.org/10.1080/07060669809500410>.
4. Lamari L, Strelkov SE, Yahyaoui A, et al. The identification of two new races of *Pyrenophora tritici-repentis* from the host center of diversity confirms a one-to-one relationship in tan spot of wheat. *Phytopathology*. 2003;93(4):391-396. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.4.391>.
5. Andrie RM, Pandelova I, Ciuffetti LM. A combination of phenotypic and genotypic characterization strengthens *Pyrenophora tritici-repentis* race identification. *Phytopathology*. 2007;97(6):694-701. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-6-0694>.
6. Мироненко Н.В., Баранова О.А., Коваленко Н.М., Михайлова Л.А. Частота гена *ToxA* в популяциях *Pyrenophora tritici-repentis* на Северном Кавказе и северо-западе России // Микология и фитопатология. — 2015. — Т. 49. — № 5. — С. 325–329. [Mironenko NV,

- Baranova OA, Kovalenko NM, Mikhailova LA. Frequency of ToxA gene in North Caucasian and North-West Russian populations of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Mikologiya i fitopatologiya*. 2015;49(5):325-329. (In Russ.)]
7. Moreno MV, Stenglein S, Perello AE. Distribution of races and Tox genes in *Pyrenophora tritici-repentis* isolates from wheat in Argentina. *Trop Plant Pathol*. 2015;40(2):141-146. <https://doi.org/10.1007/s40858-015-0011-2>.
8. See PT, Marathamuthu KA, Iagallo EM, et al. Evaluating the importance of the tan spot ToxA-Tsn1 interaction in Australian wheat varieties. *Plant Pathol*. 2018;67(5):1066-1075. <https://doi.org/10.1111/ppa.12835>.
9. Guo J, Shi G, Liu Z. Characterizing virulence of the *Pyrenophora tritici-repentis* isolates lacking both ToxA and ToxB genes. *Pathogens*. 2018;7(3):74. <https://doi.org/10.3390/pathogens7030074>.
10. Мироненко Н.В., Коваленко Н.М., Баранова О.А. Характеристика географически отдаленных популяций *Pyrenophora tritici-repentis* по вирулентности и генам токсинообразования ToxA и ToxB // Вестник защиты растений. — 2019. — № 1. — С. 24–29. [Mironenko NV, Kovalenko NM, Baranova OA. Characteristics of the geographically distant populations of *Pyrenophora tritici-repentis* in terms of virulence and ToxA and ToxB toxin-forming gene. *Plant Protection News*. 2019;(1):24-29 (In Russ.)]. [https://doi.org/10.31993/2308-6459-2019-1\(99\)-24-29](https://doi.org/10.31993/2308-6459-2019-1(99)-24-29).
11. Strelkov SE, Lamari L. Host-parasite interactions in tan spot (*Pyrenophora tritici-repentis*) of wheat. *Can J Plant Pathol*. 2003;25(4):339-449. <https://doi.org/10.1080/07060660309507089>.
12. Faris JD, Zhang Z, Lu H, et al. A unique wheat disease resistance-like gene governs effector-triggered susceptibility to necrotrophic pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(30):13544-13549. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004090107>.
13. Friesen TL, Stukenbrock EH, Liu Z, et al. Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer. *Nat Genet*. 2006;38(8):953-956. <https://doi.org/10.1038/ng1839>.
14. Rybak K, See PT, Phan HT, et al. A functionally conserved Zn2Cys6 binuclear cluster transcription factor class regulates necrotrophic effector gene expression and host specific virulence of two major Pleosporales fungal pathogens of wheat. *Mol Plant Pathol*. 2017;18(3):420-434. <https://doi.org/10.1111/mpp.12511>.
15. Мироненко Н.В., Орина А.С., Коваленко Н.М. Межштаммовые различия *Pyrenophora tritici-repentis* по экспрессии генов ToxA и PtrPf2 в культуре // Генетика. — 2020. — Т. 56. — № 4. — С. 488–492. [Mironenko NV, Orina AS, Kovalenko NM. Differences among *Pyrenophora tritici-repentis* isolates in the expression of ToxA and PtrPf2 genes in culture (*in vitro*). *Genetika*. 2020;56(4):488-492. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.31857/S0016675820040086>.
16. Михайлова Л.А., Мироненко Н.В., Коваленко Н.М. Желтая пятнистость пшеницы. — СПб.: ВИЗР, 2012. — 56 с. [Mikhailova LA, Mironenko NV, Kovalenko NM. Zheltaya pyatnistost' pshenicy. Saint Petersburg: VIZR; 2012. 56 p. (In Russ.)]
17. Rees RG, Platz GJ, Mayer RJ. Susceptibility of Australian wheats to *Pyrenophora tritici-repentis*. *Aust J Agric Res*. 1988;39(2):141-151. <https://doi.org/10.1071/AR9880141>.
18. Moolhuijzen PM, See PT, Oliver R, Moffat CS. Genomic distribution of a novel *Pyrenophora tritici-repentis* ToxA insertion element. *PLoS One*. 2018;13(10): e0206586. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206586>.
19. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*. 2001;25(4):402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
20. Aboukhaddour R, Turkington TK, Strelkov SE. Race structure of *Pyrenophora tritici-repentis* (tan spot of wheat) in Alberta, Canada. *Can J Plant Pathol*. 2013;35(2):256-268. <https://doi.org/10.1080/07060661.2013.782470>.
21. Ali S, Gurung S, Adhikari TB. Identification and characterization of novel isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* from arkansas. *Plant Dis*. 2010;94(2):229-235. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-2-0229>.



22. Leišova-Svobodova L, Hanzalova A, Kucer L. Expansion and variability of the *Ptr Tox A* gene in populations of *Pyrenophora tritici-repentis* and *Pyrenophora teres*. *J Plant Pathol*. 2010;92(3): 729-735. <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v92i3.319>.
23. Benslimane H. Virulence phenotyping and molecular characterization of a new virulence type of *Pyrenophora tritici-repentis* the causal agent of tan spot. *Plant Pathol J*. 2018;34(2):139-142. <https://doi.org/10.5423/PPJ.NT.07.2017.0150>.
24. Friesen TL, Holmes DJ, Bowden RL, Faris JD. *ToxA* is present in the U.S. *Bipolaris sorokiniana* population and is a significant virulence factor on wheat harboring *Tsn1*. *Plant Dis*. 2018;102(12):2446-2452. <https://doi.org/10.1094/pdis-03-18-0521-re>.
25. McDonald MC, Ahren D, Simpfendorfer S, et al. The discovery of the virulence gene *ToxA* in the wheat and barley pathogen *Bipolaris sorokiniana*. *Mol Plant Pathol*. 2018;19(2):432-439. <https://doi.org/10.1111/mpp.12535>.
26. Shelest E. Transcription factors in fungi. *FEMS Microbiol Lett*. 2008;286(2):145-151. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01293.x>.
27. Todd RB, Zhou M, Ohm RA, et al. Prevalence of transcription factors in ascomycete and basidiomycete fungi. *BMC Genomics*. 2014;15:214. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-214>.
28. Faris JD, Zhang Z, Rasmussen JB, Friesen TL. Variable expression of the *Stagonospora nodorum* effector SnToxA among isolates is correlated with levels of disease in wheat. *Mol Plant Microbe Interact*. 2011;24(12): 1419-1426. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-11-0094>.
29. Phan HT, Rybak K, Furuki E, et al. Differential effector gene expression underpins epistasis in a plant fungal disease. *Plant J*. 2016;87(4): 343-354. <https://doi.org/10.1111/tpj.13203>.
30. Viridi SK, Liu Z, Overlander ME, et al. New insights into the roles of host gene-necrotrophic effector interactions in governing susceptibility of durum wheat to tan spot and *Septoria nodorum* blotch. *G3 (Bethesda)*. 2016;6(12):4139-4150. <https://doi.org/10.1534/g3.116.036525>.
31. Palma-Guerrero J, Ma X, Torriani SF, et al. Comparative transcriptome analyses in *Zymoseptoria tritici* reveal significant differences in gene expression among strains during plant infection. *Mol Plant Microbe Interact*. 2017;30(3): 231-244. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-16-0146-R>.

#### ✿ Информация об авторах

**Нина Васильевна Мироненко** — д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник, лаборатория иммунитета растений к болезням. ФГБНУ ВИЗР, Пушкин, Санкт-Петербург. SPIN: 2047-7349. E-mail: nina2601mir@mail.ru.

**Александра Станиславовна Орина** — канд. биол. наук, научный сотрудник, лаборатория микологии и фитопатологии. ФГБНУ ВИЗР, Пушкин, Санкт-Петербург. SPIN: 8590-0092. E-mail: orina-alex@yandex.ru.

**Надежда Михайловна Коваленко** — канд. биол. наук, старший научный сотрудник, лаборатория иммунитета растений к болезням. ФГБНУ ВИЗР, Пушкин, Санкт-Петербург. SPIN: 9610-4614. E-mail: nadyakov@mail.ru.

#### ✿ Authors and affiliations

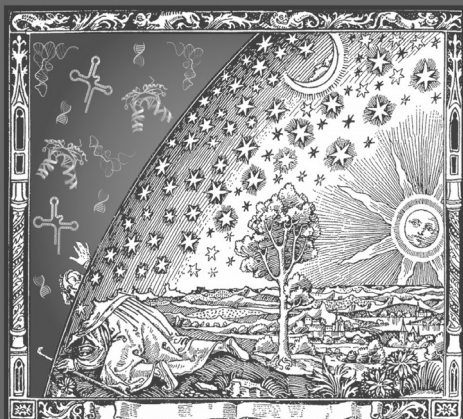
**Nina V. Mironenko** — Doctor of Science, Leading Researcher, Laboratory of Plant Resistance to Diseases. All-Russian Institute for Plant Protection, Pushkin, Saint Petersburg, Russia. SPIN: 2047-7349. E-mail: nina2601mir@mail.ru.

**Aleksandra S. Orina** — PhD, Researcher, Laboratory of Mycology and Phytopathology. All-Russian Institute for Plant Protection, Pushkin, Saint Petersburg, Russia. SPIN: 8590-0092. E-mail: orina-alex@yandex.ru.

**Nadezhda M. Kovalenko** — PhD, Senior Researcher, Laboratory of Plant Resistance to Diseases. All-Russian Institute for Plant Protection, Pushkin, Saint Petersburg, Russia. SPIN: 9610-4614. E-mail: nadyakov@mail.ru.

А. Н. Миронова, М. В. Падкина, Е. В. Самбук

# РНК: СИНТЕЗ И ФУНКЦИИ



ЭКО-ВЕКТОР



**Людмила Николаевна Миронова** — доктор биологических наук, профессор. Область научных интересов: генетический контроль матричных процессов, терминация трансляции, прионы дрожжей. Опубликовала около 70 научных работ. Автор курсов «Молекулярная генетика», «Генетика митохондрий», «Геномика и геносистематика», «Мир РНК», «Пост-трансляционная судьба белков» и др., читаемых на биологическом факультете СПбГУ.



**Марина Владимировна Падкина** — доктор биологических наук, профессор. Область научных интересов: регуляция экспрессии генов у эукариот, экспрессия гетерологичных генов в дрожжах, биотехнология, протеомика. Опубликовала около 60 научных работ. Разработала и читает на биологическом факультете СПбГУ курсы «Молекулярная биология», «Фолдинг белка», «Посттрансляционные модификации белков», «Протеомика».



**Елена Викторовна Самбук** — доктор биологических наук, профессор. Область научных интересов: генетический контроль межорганелльных взаимодействий, механизмы регуляции метаболизма у эукариот, пространственная организация транскрипции в ядре эукариот. Опубликовала более 50 научных работ. Разработала и читает на биологическом факультете СПбГУ курсы «Генетика эукариот», «Репликация, репарация, мутагенез», «Транскрипция и мир РНК».

Настоящее издание представляет собой учебное пособие, предназначенное для студентов и аспирантов, специализирующихся в области молекулярной биологии и генетики. В нем освещены проблемы, связанные с биогенезом и функциями одного из основных биологических полимеров — РНК. Неослабевающий интерес биологов к этому типу макромолекул обусловлен многообразием функций РНК, перечень которых продолжает расширяться. Совмещение способности к хранению и воспроизведению генетической информации с каталитическими и регуляторными способностями, наблюдаемое только у РНК, позволяет думать, что именно с этих молекул началась эволюция жизни на нашей планете. В книге подробно рассмотрены процессы синтеза и деградации РНК, известные к настоящему моменту свойства РНК, а также клеточные процессы, в которых молекулы РНК играют ту или иную роль.

---

Эту книгу можно приобрести в интернет-магазине издательства «Эко-Вектор» по адресу:

[www.eco-vector.com/books](http://www.eco-vector.com/books)

## ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ ЭНДЕМИЧНЫХ ДЛЯ ЮЖНОГО УРАЛА ВИДОВ РОДА *OXYTROPIS* (FABACEAE)

© Ан.Х. Баймиев, А.А. Владимирова, Е.С. Акимова, Р.С. Гуменко, А.А. Мулдашев, А.В. Чемерис, Ал.Х. Баймиев  
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Уфа

Для цитирования: Баймиев Ан.Х., Владимирова А.А., Акимова Е.С., и др. Филогенетическая характеристика клубеньковых бактерий эндемичных для Южного Урала видов рода *Oxytropis* (Fabaceae) // Экологическая генетика. — 2020. — Т. 18. — № 2. — С. 157–167. <https://doi.org/10.17816/ecogen17805>.

Поступила: 18.11.2019

Одобрена: 06.04.2020

Принята: 23.06.2020

✿ Проведен анализ полиморфизма и филогении клубеньковых бактерий эндемичных для Южного Урала четырех видов бобовых растений рода *Oxytropis* секции *Orobia*: *O. kungurensis*, *O. baschkiriensis*, *O. approximata*, *O. gmelinii*, характеризующихся пространственной разобщенностью мест произрастания, также называемой сегрегацией растений. Показано, что несмотря на определенные филогенетические различия бактерий, все они относятся к роду *Mesorhizobium*. Анализ симбиотических генов исследуемых штаммов на основании сравнительного анализа последовательностей генов *nifH* и *nodC* выявил определенные различия их филогении с коровой частью генома. Обнаружено, что микросимбионты растений *O. baschkiriensis* по филогении гена *nodC* отличаются от ризобий, полученных из клубеньков других изученных видов рода *Oxytropis* и близки к микросимбионтам растений рода *Lupinaster*, произрастающих на Южном Урале. Приобретение свойства вступать в симбиоз с клубеньковыми бактериями, характерными для растений рода *Lupinaster*, могло быть следствием сегрегации *O. baschkiriensis* от других родственных видов рода *Oxytropis*.

✿ **Ключевые слова:** ризобия; симбиоз; *Oxytropis*; филогения; симбиотические гены.

## PHYLOGENETIC CHARACTERISTIC OF NODUL BACTERIA ENDEMIC FOR SOUTHERN URAL SPECIES OF THE GENUS *OXYTROPIS* (FABACEAE)

© An.Kh. Baymiev, A.A. Vladimirova, E.S. Akimova, R.S. Gumenko, A.A. Muldashev, A.V. Chemeris, Al.Kh. Baymiev

Institute of Biochemistry and Genetics — Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

Cite this article as: Baymiev AnKh, Vladimirova AA, Akimova ES, et al. Phylogenetic characteristic of nodul bacteria endemic for Southern Ural species of the genus *Oxytropis* (Fabaceae). *Ecological genetics*. 2020;18(2):157-167. <https://doi.org/10.17816/ecogen17805>.

Received: 18.11.2019

Revised: 06.04.2020

Accepted: 23.06.2020

✿ **Background.** An analysis of the spatial distribution of some taxonomically and ecologically related legumes in the Ural showed a nontrivial spatial distribution of related species of the genus *Oxytropis* DC of the *Orobia* Bunge section within the Uchalinsky uplands. Despite the similarities in ecology, these species practically do not grow together. Explicit spatial segregation of closely related plants over a relatively small area allows this phenomenon to be used as a convenient model for studying the effect of segregation of closely related legume species on the genetic composition of their nodule bacteria. **Materials and methods.** The genetic diversity of nodule bacteria entering into symbiosis with *O. kungurensis*, *O. baschkiriensis*, *O. approximata* and *O. gmelinii* plants was studied. In addition, the polymorphism of their symbiotic genes has also been analyzed. **Results.** Phylogenetic characteristics of nodule bacteria endemic for the Southern Ural belonging to 4 species of leguminous plants of the genus *Oxytropis* of the section *Orobia*: *O. kungurensis*, *O. baschkiriensis*, *O. approximata*, *O. gmelinii* which are characterized by spatial separation of the growth sites, also called plant segregation, are given. It was shown that all of them belong to the genus *Mesorhizobium* despite certain phylogenetic differences of bacteria. Analysis of the symbiotic genes of the analyzed strains revealed a lack of congruence of their phylogeny with the core part of the genome. It was found that the microsymbionts of *O. baschkiriensis* plants differ in the phylogeny of nod-genes from nodule bacteria of other plants of the *Oxytropis* genus and are close to microsymbionts of plants of the *Lupinaster* genus growing in the Southern Urals. **Conclusion.** Acquisition of the property to enter into symbiosis with nodule bacteria of plants of the genus *Lupinaster* may turn out to be an adaptive mechanism that arose as a result of segregation of *O. baschkiriensis* from other species of *Oxytropis*.

✿ **Keywords:** rhizobia; symbiosis; *Oxytropis*; phylogeny; symbiotic genes.

## ВВЕДЕНИЕ

Клубеньковые бактерии (ризобии) — обширная, генетически разнородная группа почвенных граммотрицательных микроорганизмов, способных вступать во внутриклеточный симбиоз с бобовыми растениями и обеспечивать фиксацию атмосферного азота.

В ходе продолжительной совместной эволюции бобовых растений и ризобий возникла сигнальная система взаимодействия между симбионтами, обеспечивающая специфическое узнавание партнеров и ведущая к их генетической интеграции [1]. Для бобовых умеренных широт, где обитают наиболее специализированные и эволюционно молодые представители подсемейства мотыльковых, характерно высокоспецифичное взаимодействие по типу «групп перекрестной инокуляции», при котором ризобии определенного вида или даже биотипа вступают в эффективный симбиоз с представителями лишь определенного рода или нескольких близких родов растений [2]. Такое повышение специфичности взаимодействия партнеров эволюционно сопровождалось с одной стороны увеличением азотфиксирующей активности [3], с другой — увеличением зависимости бобовых растений от своих микросимбионтов. Поэтому на ареал распространения дикорастущих бобовых умеренной зоны в связи с их тесной взаимосвязью с клубеньковыми бактериями и относительно высокой специфичностью их взаимодействия наряду с эдафическими и климатическими факторами не исключено и влияние микробиома почвы [4, 5].

Анализируя особенности пространственного распределения некоторых таксономически и экологически близких видов бобовых растений на Урале, М.С. Князевым [5] был отмечен ряд нетривиальных случаев, объяснение которых может пролить свет на пространственное распределение этих растений. Наиболее четко своеобразие отмечаемого феномена проявляется на примере пространственного распределения близких видов рода *Oxytropis* DC секции *Orobia* Bunge в пределах Учалинского мелкосопочника, который представляет серию невысоких предгорных пологих хребтов, подножье которых покрыто редколесьями, а вершины заняты участками горных степей. Таким образом, произрастающие здесь степные виды, приуроченные большей частью к вершинам

холмов, представлены серией обособленных популяций. Учалинский мелкосопочник — флористически оригинальная территория; ряд видов уральской флоры произрастает только или преимущественно в пределах этого района, в том числе есть узкие эндемики Учалинского мелкосопочника. Только здесь отмечается перекрывание ареалов сразу пяти видов (в том числе одного гибридогенного) рода *Oxytropis* секции *Orobia*: *O. kungurensis* Knjasev subsp. *demidovii* (Knjasev) Knjasev (далее *O. kungurensis*), *O. baschkiriensis* Knjasev subsp. *skvortsovii* Knjasev (далее *O. baschkiriensis*), *O. approximata* Less., *O. gmelinii* Fisch. ex Boriss., *O. spicata* (Pall.) O. et B. Fedtach., *O. × lessingiana* Knjasev. Данные таксоны являются экологическими двойниками, растут в сходных сообществах. Несмотря на сходство экологии, эти виды практически не произрастают совместно. Данное явление было обозначено под термином сегрегации растений. В качестве весьма характерного примера сегрегации следует привести распределение местонахождений двух видов *O. baschkiriensis* и *O. gmelinii* на участке мелкосопочника, обрамляющем правобережье р. Урал на протяжении 20 км долины севернее устья р. Миндяк. Непосредственно близ устья р. Миндяк на небольших холмах отмечается произрастание только *O. Gmelinii*; 2 км севернее, на сопке Туйтюбе (575 м), в тех же условиях — только *O. baschkiriensis*, на соседней сопке с Туйтюбе — только *O. approximata*; еще 2–4 км севернее на ряде вершин хр. Улутау произрастает *O. gmelinii* [5].

Явная пространственная сегрегация близкородственных растений на относительно небольшой территории делает возможным использовать это явление в качестве удобной модели для исследования влияния пространственной разобщенности близкородственных видов бобовых на генетический состав их клубеньковых бактерий.

*Цель работы* — проверка генетических различий ризобий, полученных из клубеньков близкородственных видов остролодочников, подверженных сегрегации.

В связи с этим нами было исследовано генетическое разнообразие и филогения клубеньковых бактерий, вступающих в симбиоз с растениями *O. kungurensis*, *O. baschkiriensis*, *O. approximata*, *O. gmelinii* и проведен анализ филогении их сим-

биотических генов *nifH* (кодирует структуру белков нитрогеназы) и *nodC* (кодирует структуру ко-ровой части молекулы Nod-фактора, участвующего в сигналинге при образовании клубеньков).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Бактериальные штаммы и условия культивирования

В работе были использованы изоляты клубеньковых бактерий, выделенные из клубеньков растений *O. kungurensis*, *O. baschkiriensis* s. l., *O. approximata*, *O. gmelinii*, произрастающих на Южном Урале в районе Учалинского мелкосопочника.

Бактерии из клубеньков изолировали методом получения пункций из зоны размножения бактерий и рассевом ее на питательной агаризованной среде YM (0,1 % дрожжевой экстракт, 1 % маннит, 0,05 %  $K_2HPO_4$ , 0,05 %  $MgSO_4$ , 0,01 % NaCl, 1,5 % агар) до отдельных колоний [6]. Из каждого клубенька получали по одной чистой культуре бактерий. Предварительную проверку изолятов на принадлежность их к группе клубеньковых бактерий проверяли методом ПЦР-анализа наличия гена *nifH*, характерного для всех видов ризобий.

### Выделение тотальной ДНК

ДНК из бактерий выделяли методом термокоагуляции. Для этого в пробирки объемом 1,5 мл со 100 мкл 1 % Triton X100 и 1 % суспензии смолы Chelex100 (Bio-Rad, США) помещали небольшое количество бактериальной массы и после суспензирования инкубировали при температуре 95 °C 10 мин. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием при 12000 g в течение 3 мин. Надосадочную жидкость брали в качестве матрицы для ПЦР.

### Генетический анализ штаммов

Генетическое разнообразие собранных штаммов исследовали с помощью RAPD-анализа (Random Amplified Polymorphic DNA) [7] с использованием следующих «случайных» праймеров: 1) 5'-ggggcgtg-3'; 2) 5'-caggcccatc-3'; 3) 5'-gcgtccattc-3'. Данный анализ также позволил сократить количество образцов, за счет объединения микроорганизмов с идентичными RAPD-профилями в гомогенные группы, из которых в последующем в работу брали только по одному образцу.

ПЦР-ПДРФ-анализ (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов) [8] гена *16S* рРНК проводили с использованием мелкощепящих эндонуклеаз рестрикции *Kzo91* и *HaeIII*. Для амплификации гена *16S* рРНК были использованы универсальные праймеры fD1 5'-cccgggatccaagcttaaggaggtgatccagcc-3', rD1 5'-ccgaattcgctcgacaacagagtttgatcctggctcag-3', фланкирующие фрагмент гена размером около 1500 п. н. [9], для амплификации генов *recA* были использованы праймеры RecAF 5'-ggcagttcggaagggtcgat-3' и RecAR5'-atctggttgatgaagatcaccat-3', для амплификации генов *nifH* — NifHF 5'-ttctatggaaagggcgccattggcaagct-3' и NifHR5'-atctgcgcggacatgacgatataaatttc-3', для амплификации генов *nodC* — NodCF 5'-cgtttcgttctatgcggtgctc-3' и NodCR5'-cagctgcgtctcgtattgat-3' [10].

Определение нуклеотидных последовательностей проводили на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3500 фирмы Applied Biosystems, Inc. (США) с использованием наборов Big Dye Terminator v.3.1.

### Филогенетический анализ

Филогенетический анализ исследуемых штаммов осуществляли на основании множественного выравнивания (ClustalW) секвенированных фрагментов генов *16S* рРНК, *recA*, *nodC* и *nifH*. Построение филогенетических деревьев производили с помощью программы Megalign из пакета программ Lasergene с использованием метода «neighbor-joining» (NEIGHBOR). Нуклеотидные последовательности для сравнительного анализа были взяты из базы данных GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Статистическую достоверность ветвления («bootstrap-анализ») оценивали с использованием соответствующей функции программы Megalign на основе 1000 альтернативных деревьев.

Нуклеотидные последовательности генов *16S* рРНК, *recA*, *nodC* и *nifH* исследованных штаммов депонированы в базе GenBank под следующими номерами: МК402237-МК402258, МК511967-МК511971, МК511979, МК511980.

### Опыты по перекрестной инокуляции

Анализ клубенекообразующей способности штаммов на корнях исследуемых видов растений проводили методом предпосевной инокуляции семян.

Обработанные суспензией бактерий ( $3-7 \times 10^6$  КОЕ/мл) семена высаживали в отдельные горшочки со стерильным песком. Через 30–40 дней корни растений анализировали визуально на наличие образовавшихся клубеньков. Опыты проводили в 5-кратной повторности.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования генетического разнообразия микросимбионтов с корнями исследуемых растений, произрастающих на территории Южного Урала, были собраны клубеньки, из которых были изолированы чистые культуры ризобий. Так, из клубеньков 19 растений *O. approximata* были получены 32 чистые культуры бактерий, из клубеньков 28 растений *O. baschkiriensis* 56 культур, из клубеньков 8 растений *O. kungurensis* — 16, и из клубеньков 4 растений *O. gmelinii* — 6. Такое соотношение количества чистых культур и растений вызвано тем, что на корнях каждого растения обнаруживалось не более 2–3 клубеньков. В дальнейшем с каждого клубенька получали по одной чистой культуре бактерий. Исследование генетического разнообразия полученных изолятов методом RAPD-анализа выявил определенный полиморфизм ДНК исследуемых образцов, которые формировали 27 генетически однородных групп. Так, изоляты, полученные из клубеньков *O. Approximata*, относились к 7 генетически однородным группам, изоляты, полученные из клубеньков *O. baschkiriensis* s. l., — к 13, *O. kungurensis* s. l. — к 6, *O. Gmelinii* — к одной группе (рис. 1).

Предварительный филогенетический анализ, проведенный посредством 16S-ПДРФ, выявил, что штаммы образуют, в свою очередь, 8 монофилетических групп. Соответственно, штаммы ризобий из клубеньков *O. kungurensis* образовали 2 группы,

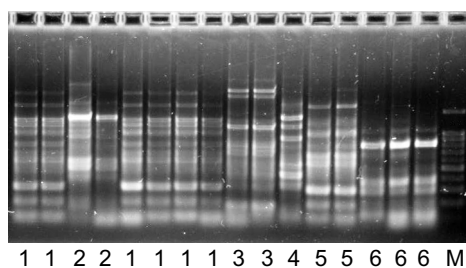


Рис. 1. Фореграмма RAPD-анализа ДНК ризобий, изолированных из клубеньков *O. kungurensis*. Цифрами обозначены номера генетически однородных групп. М — маркер 100 п. н.

*O. baschkiriensis* s. l. — 3, *O. approximata* — 2, и *O. gmelinii* — 1 монофилетическую группу.

С целью определения филогенетической принадлежности представителей выявленных групп микроорганизмов было проведено секвенирование консервативных генов (*16S* рРНК и *recA*) и их сравнительный анализ с другими аналогичными генами, депонированными в GenBank. Результаты показали, что исследуемые штаммы ризобий хотя и имеют некоторые филогенетические отличия, но тем не менее все относятся к роду *Mesorhizobium*. По гену *16S* рРНК сходство штаммов составило от 98,4 до 99,8 %, а по гену *recA* — от 89,7 до 96,7 %. Степень филогенетического родства штаммов не зависела от того, являются ли они симбионтами одного вида растения или разных, поскольку у растений одного вида в клубеньках обнаруживались бактерии, имеющие большие филогенетические различия, чем у бактерий, выделенных из клубеньков разных видов *Oxytropis* (рис. 2, 3). Таким образом, пространственное разделение и отсутствие совместного произрастания исследуемых растений нельзя объяснить влиянием видового состава и филогенетических различий их ризобий.

За взаимодействие с макросимбионтом у клубеньковых бактерий отвечают продукты специализированных *sym*-генов. Они включают в себя ответственные за фиксацию азота *nif*-гены, кодирующие синтез и регуляцию фермента нитрогеназы; *nod*-гены, кодирующие синтез Nod-факторов (НФ), отвечающих за инициацию и специфичность образуемого симбиоза; а также *fix*-гены, которые также необходимы для азотфиксации, часто сцепленные с *nif*-генами, но не гомологичные с ними [11, 12].

На сегодняшний день проведено большое количество исследований, свидетельствующих о высокой мобильности *sym*-генов и подверженности их горизонтальному переносу (ГПГ) [13–18]. Доказано, что данный процесс является неотъемлемой частью эволюции бобово-ризобиальных взаимоотношений [19–22] и зачастую приводит к появлению штаммов с измененной хозяйской специфичностью или к приобщению новых видов микроорганизмов к группе клубеньковых бактерий [23]. Участие ГПГ в эволюции ризобий подтверждается локализацией *sym*-генов на мобильных генетических элементах (плазмиды или хромосомные островки,

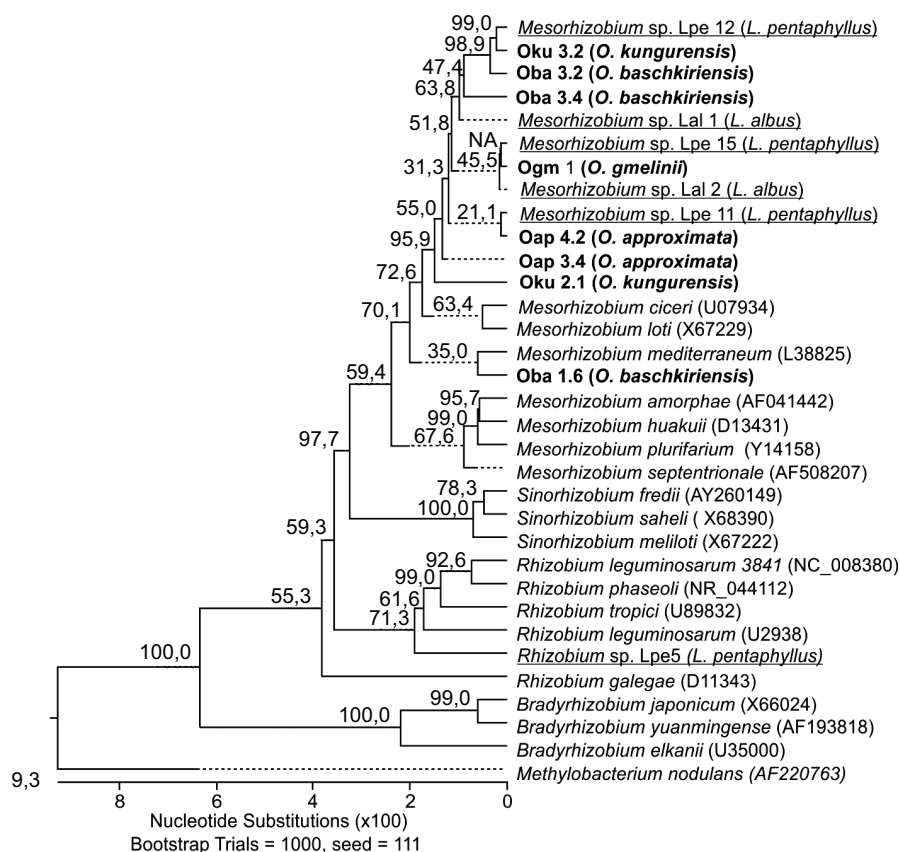


Рис. 2. Филогенетическое древо клубеньковых бактерий, построенное на основании сравнительного анализа последовательностей гена 16S рРНК. Жирным шрифтом отмечены штаммы микроорганизмов, исследованных в данной работе, подчеркиванием обозначены штаммы, выделенные из клубеньков *L. pentaphyllus* и *L. albus*

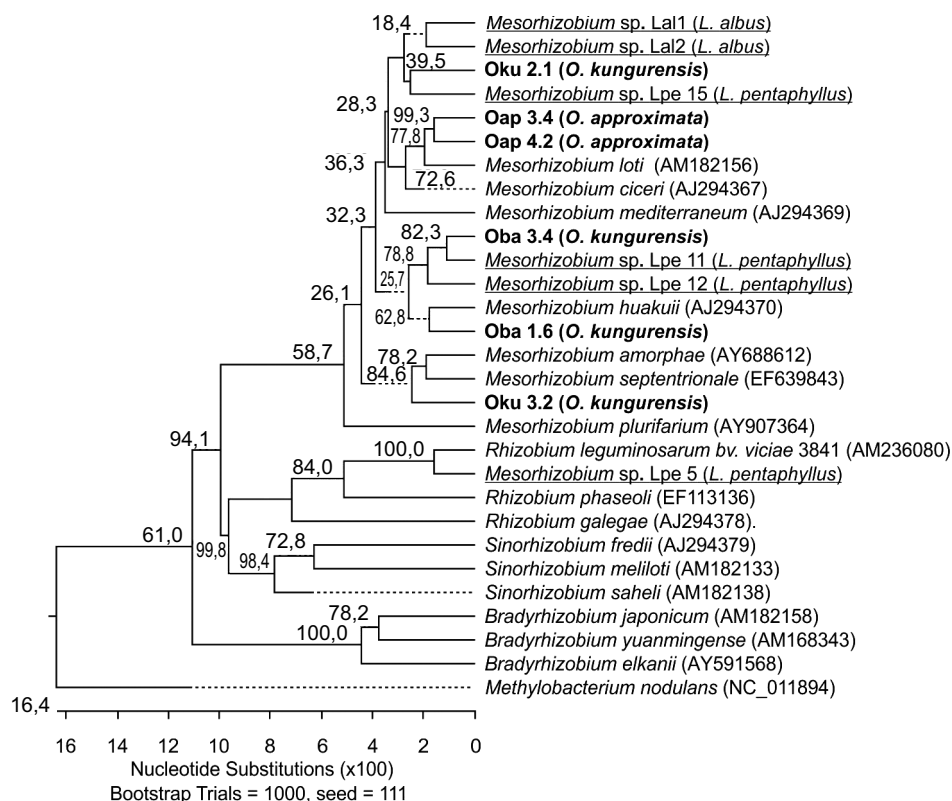


Рис. 3. Филогенетическое древо клубеньковых бактерий, построенное на основании сравнительного анализа последовательностей гена *recA*. Жирным шрифтом отмечены штаммы микроорганизмов, исследованных в данной работе, подчеркиванием обозначены штаммы, выделенные из клубеньков *L. pentaphyllus* и *L. albus*

ограниченные IS-подобными элементами), а также характерной для них панмиктической структурой популяций [24]. Широкая экспансия *sym*-генов в ассоциированных с растениями бактериальных сообществах посредством ГПГ, как считается, является наиболее вероятным способом формирования современного разнообразия ризобий и проявляется в различиях филогении симбиотических генов и генов «домашнего хозяйства» [14, 25]. Поэтому анализ симбиотических генов является неотъемлемой частью работы по исследованию разнообразия клубеньковых бактерий.

В данной работе исследование филогении симбиотических генов штаммов проводили на основании сравнительного анализа последовательностей генов *nodC* и *nifH* с аналогичными последовательностями других клубеньковых бактерий, взятых из базы данных GenBank (рис. 4, 5).

Исследование филогении гена *nifH* всех анализируемых бактерий показало их близость с аналогичными генами, преимущественно обнаруживаемыми у бактерий рода *Mesorhizobium*. При этом различия в нуклеотидных последовательностях *nifH* всех анализируемых бактерий были весьма незначительные. Наибольшая разница обнаружена между последовательностями гена *nifH* двух штаммов Оку 3.2 и Оку 2.1, вступающих в симбиоз с растениями *O. kungurensis*. Тем не менее схожесть между ними составила 92 %, что говорит о консервативности генов нитрогеназы данных бактерий.

Исследование же последовательностей *nod*-генов выявило некоторые интересные закономерности. ПЦР-ПДРФ-анализ гена *nodC* представителей всех гомогенных групп исследуемых микроорганизмов показал разделение бактерий на две группы по схожести полос на фореграмме. Первую группу составляли микроорганизмы, выделенные из клубеньков *O. baschkiriensis*, вторую — микроорганизмы, выделенные из клубеньков других исследованных растений (данные не представлены). При анализе филогении гена *nodC* на основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей было обнаружено, что клубеньковые бактерии растений *O. baschkiriensis* по гену *nodC* значительно отличаются от ризобий других представителей рода *Oxytropis*, произрастающих на Южном Урале (74,5–78 % схожести). Одновременно с этим они имеют 99 % и более схожести

с микросимбионтами растений рода *Lupinaster* Fabr. (*L. pentaphyllus* и *L. albus*), исследованных нами ранее [26], которые произрастают совместно с видами *Oxytropis* (см. рис. 4). Надо отметить, что в настоящее время систематическое положение растений рода *Lupinaster* спорно и общая точка зрения в этом вопросе пока не сформирована. Ранее нами было обнаружено, что данные растения вступают в симбиоз с бактериями рода *Mesorhizobium*, что не характерно для растений трибы *Trifolieae*, к которым их причисляют [26]. Но, несмотря на спорную ситуацию с систематическим положением рода *Lupinaster*, очевидно, что данные растения не родственны с растениями рода *Oxytropis*. Наличие в составе генома клубеньковых бактерий *O. baschkiriensis* гена *nodC*, почти идентичного аналогичным генам ризобий растений *Lupinaster*, свидетельствует о неких приспособительных эволюционных процессах. Остается пока неясным, явилось ли предпочтение *O. baschkiriensis* вступать в симбиоз с клубеньковыми бактериями с генами *nodC*, не характерными для других видов остролодочников, произрастающих на Южном Урале, причиной сегрегации или же следствием пространственного разделения данного вида от других видов остролодочника. По крайней мере выявлена определенная закономерность различия в составе клубеньковых бактерий сегрегирующих видов растений, что может послужить ключом к разгадке эндемичности некоторых видов бобовых растений. Следует также подчеркнуть, что для *O. baschkiriensis* на Учалинском мелкосопочнике не выявлено ни одного случая отступления от правила сегрегации, в то время как для некоторых других остролодочников единичные случаи встречаются (например, совместное произрастание *O. kungurensis* s. l. и *O. approximata*). *O. baschkiriensis* был выделен относительно недавно [27] из широко распространенного вида *O. ambigua* (Pall.) DC. s. l. (Восточная Европа — до Вологодской обл. на западе, Западная и Восточная Сибирь, Монголия) [28] и отличается от него непринципиальными признаками. Возможно, столь обширный ареал *O. ambigua* s. l. (включая *O. baschkiriensis* s. str.), нехарактерный для видов секции *Orobia*, связан с генетической схожестью ризобий *Lupinaster pentaphyllus* s. l., характеризующийся также широким распространением



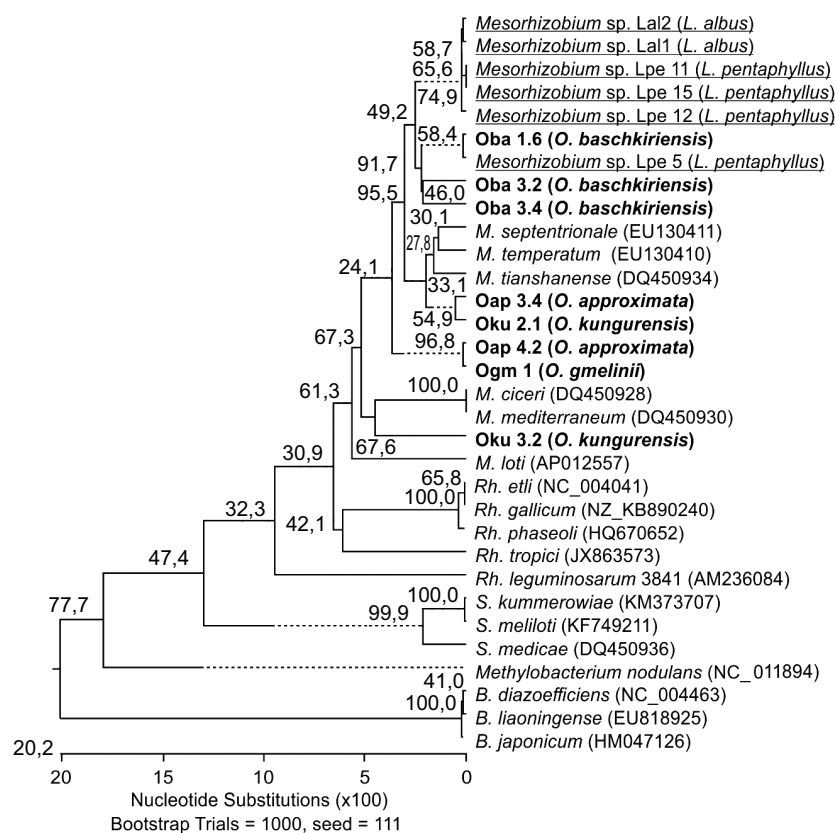


Рис. 4. Филогенетическое древо клубеньковых бактерий, построенное на основании сравнительного анализа последовательностей гена *nifH*. Жирным шрифтом отмечены штаммы микроорганизмов, исследованных в данной работе, подчеркиванием обозначены штаммы, выделенные из клубеньков *L. pentaphyllus* и *L. albus*

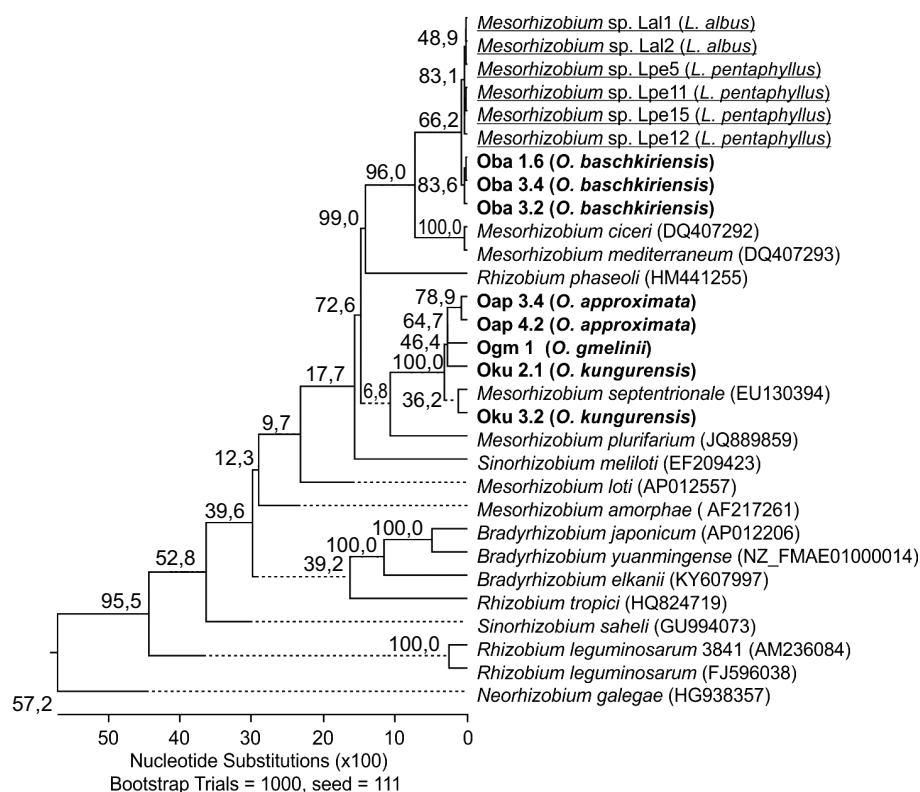


Рис. 5. Филогенетическое древо клубеньковых бактерий, построенное на основании сравнительного анализа последовательностей гена *nodC*. Жирным шрифтом отмечены штаммы микроорганизмов, исследованных в данной работе, подчеркиванием обозначены штаммы, выделенные из клубеньков *L. pentaphyllus* и *L. albus*

(от Восточной Европы до Монголии и Дальнего Востока).

Кроме того, сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей выявил значительные отличия симбиотических *nod*-генов клубеньковых бактерий растений *O. baschkiriensis* и растений рода *Lupinaster* от всех известных *nod*-генов, описанных ранее у бактерий рода *Mesorhizobium*, что выводит их в отдельную кладу на филогенетическом древе (рис. 4). При этом, сами симбионты растений *O. baschkiriensis*, *L. pentaphyllus* и *L. albus* имеют между собой 99 % и более сходства по этому гену, независимо от филогении самих бактерий. Это говорит о том, что у данных растений должна быть высокая и уникальная специфичность со своими микросимбионтами, и, скорее всего, данные растения не входят в одну группу перекрестной инокуляции с другими растениями, вступающими в симбиоз с бактериями рода *Mesorhizobium*.

Наши исследования подтвердили это предположение. Опыты по перекрестной инокуляции *O. baschkiriensis* и *O. approximata* клубеньковыми бактериями, выделенными из клубеньков этих растений, показали, что многочисленные розовые (активные) клубеньки формируются только в случае взаимодействия растений со штаммами, выделенными из клубеньков того же вида; при инокуляции же растений ризобиями другого вида в обоих случаях клубеньки не образуются или формируются малочисленные мелкие белого цвета, что говорит о слабой функциональности этих клубеньков. В то же время, перекрестная инокуляция растений *O. baschkiriensis*, *L. pentaphyllus* и *L. albus* их микросимбионтами приводит к образованию активных клубеньков во всех комбинациях, что говорит о принадлежности вышеперечисленных видов к одной группе перекрестной инокуляции.

Различия в филогении *nod*- и *nif*-генов анализируемых штаммов, вероятно, объясняются тем, что полиморфизм *nod*-генов больше коррелирует с таксономией растений-хозяев, нежели с коровыми элементами своего генома. А гены, ответственные за азотфиксацию, в свою очередь, в связи с консервативностью функции кодируемых ими белков, менее вариабельны, и их полиморфизм часто имеет большую корреляцию с дивергенцией коровой части генома бактерий. В то же время эти две группы генов способны придавать бактериям

свойства симбиотической азотфиксации только совместно, в геноме они формируют у бактерий рода *Mesorhizobium* островки симбиоза и поэтому при ГПГ передаются тоже вместе. Это, в свою очередь, также сказывается на их эволюции, и приводит к неполному совпадению филогении *nif*-генов и коровой части генома [30, 31].

Таким образом, нами было обнаружено, что сегрегации близкородственных бобовых растений может приводить в некоторых случаях к изменению генетического состава их клубеньковых бактерий, что приводит к невозможности их перекрестной инокуляции. Для растений *O. baschkiriensis* приобретение свойства вступать в симбиоз с аборигенными штаммами клубеньковых бактерий *Mesorhizobium*, содержащих уникальные *nod*-гены, обнаруживаемые, на сегодняшний день, только у клубеньковых бактерий бобовых Южного Урала, могло стать приспособительным механизмом, который мог поспособствовать к закреплению *O. baschkiriensis* в новых ареалах.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 17-44-020201.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Тихонович И.А., Борисов А.Ю., Цыганов В.Е., и др. Интеграция генетических систем растений и микроорганизмов при симбиозе // Успехи современной биологии. — 2005. — Т. 125. — № 3. — С. 227–238. [Tihonovich IA, Borisov AYU, Cyganov VE, et al. Integration of plant and microbial genetic systems in symbiosis. *Advances in modern biology*. 2005;125(3):227-238. (In Russ.)]
2. Проворов Н.А. Специфичность взаимодействия клубеньковых бактерий с бобовыми растениями и эволюция бобово-ризобияльного симбиоза // Сельскохозяйственная биология. — 1985. — Т. 20. — № 3. — С. 34–47. [Provorov NA. Specifichnost' vzaimodejstviya kluben'kovykh bakterij s bobovymi rasteniyami i evolyuciya bobovo-rizobial'nogo simbioza. *Sel'skokhoziaistvennaia biologiya*. 1985;20(3):34-47. (In Russ.)]
3. Парийская А.Н., Клевенская И.Л. Распространение в природе и возможные пути эволюции азотфиксирующего симбиоза // Успехи микробиологии. — 1979. — Т. 14. — С. 124–147. [Parijskaya AN, Klevenskaya IL. Rasprostranenie

- v prirode i vozmozhnye puti evolyucii azotfik-siruyushchego simbioza. *Uspekhi mikrobiologii*. 1979;14:124-147. (In Russ.)]
4. La Pierre KJ, Simms EL, Tariq M, et al. Invasive legumes can associate with many mutualists of native legumes, but usually do not. *Ecol Evol*. 2017;7(20):8599-8611. <https://doi.org/10.1002/ece3.3310>.
  5. Simonsen AK, Dinnage R, Barrett LG, et al. Symbiosis limits establishment of legumes outside their native range at a global scale. *Nat Commun*. 2017;8:14790. <https://doi.org/10.1038/ncomms14790>.
  6. Князев М.С. Бобовые (Fabaceae LINDL.) Урала: видообразование, географическое распространение, историко-экологические свиты: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. — СПб., 2015. — 40 с. [Knyazev MS. Bobovyie (Fabaceae LINDL.) Urala: vidoobrazovaniye, geograficheskoye rasprostraneniye, istoriko-ekologicheskkiye svity. [dissertation abstract] Saint Petersburg; 2015. 40 p. (In Russ.)]. Доступно по: <https://search.rsl.ru/ru/record/01005560640>. Ссылка активна на 02.02.2020.
  7. Баймиев А.Х., Птицын К.Г., Баймиев А.Х. Влияние интродукции караганы древовидной на состав ее клубеньковых бактерий // Микробиология. — 2010. — Т. 79. — № 1. — С. 123–128. [Baymiev AnK, Ptitsyn KG, Baimiev AlK. Influence of the introduction of Caragana arborescens on the composition of its root nodule bacteria. *Microbiology*. 2010;79(1):123-128. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.1134/S0026261710010157>.
  8. Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*. 1990;18(22):6531-6535. <https://doi.org/10.1093/nar/18.22.6531>.
  9. Laguerre G, Mavingui P, Allard MR, et al. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. *Appl Environ Microbiol*. 1996;62(6):2029-2036. <https://doi.org/10.1128/aem.62.6.2029-2036.1996>.
  10. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*. 1991;173(2):697-703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>.
  11. Баймиев А.Х., Иванова Е.С., Гуменко Р.С., и др. Анализ симбиотических генов клубеньковых бактерий бобовых растений Южного Урала // Генетика. — 2015. — Т. 51. — № 12. — С. 1359–1367. [Baymiev AK, Ivanova ES, Gumenko RS, et al. Analysis of symbiotic genes of leguminous root nodule bacteria grown in the Southern Urals. *Genetika*. 2015;51(12):1359-1367. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.7868/S001667581511003X>.
  12. Проворов Н.А. Эволюция генетических систем симбиоза у клубеньковых бактерий // Генетика. — 1996. — Т. 32. — № 8. — С. 1029–1040. [Provorov NA. Evolution of symbiotic genetic systems in rhizobia. *Genetika*. 1996;32(8):1029-1040. (In Russ.)]
  13. Franche C, Lindström K, Elmerich C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil*. 2009;321(1-2):35-59. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9833-8>.
  14. Fischer HM. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol Rev*. 1994;58(3):352-386. <https://doi.org/10.1128/mmbr.58.3.352-386.1994>.
  15. Проворов Н.А., Воробьев Н.И. Эволюционная генетика клубеньковых бактерий: молекулярные и популяционные аспекты // Генетика. — 2000. — Т. 36. — № 12. — С. 1573–1587. [Provorov NA, Vorob'ev NI. Evolutionary genetics of nodule bacteria: Molecular and population aspects. *Genetika*. 2000;36(12):1573-1587. (In Russ.)]
  16. Nandasena KG, O'hara GW, Tiwari RP, Howieson JG. Rapid in situ evolution of nodulating strains for *Biserrula pelecinus* L. through lateral transfer of a symbiosis island from the original mesorhizobial inoculant. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(11):7365-7367. <https://doi.org/10.1128/AEM.00889-06>.
  17. Andam CP, Mondo SJ, Parker MA. Monophyly of *nodA* and *nifH* genes across Texan and Costa Rican populations of *Cupriavidus* nodule symbionts. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(14):4686-4690. <https://doi.org/10.1128/AEM.00160-07>.

18. Barcellos FG, Menna P, da Silva Batista JS, Hungria M. Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian Savannah soil. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(8):2635-2643. <https://doi.org/10.1128/AEM.01823-06>.
19. Zhao CT, Wang ET, Chen WF, Chen WX. Diverse genomic species and evidences of symbiotic gene lateral transfer detected among the rhizobia associated with *Astragalus* species grown in the temperate regions of China. *FEMS Microbiol Lett.* 2008;286(2):263-273. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01282.x>.
20. Bailly X, Olivieri I, Brunel B, et al. Horizontal gene transfer and homologous recombination drive the evolution of the nitrogen-fixing symbionts of *Medicago* species. *J Bacteriol.* 2007;189(14):5223-5236. <https://doi.org/10.1128/JB.00105-07>.
21. Freiberg C, Fellay R, Bairoch A, et al. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature.* 1997;387(6631):394-401. <https://doi.org/10.1038/387394a0>.
22. Estrella MJ, Muñoz S, Soto MJ, et al. Genetic diversity and host range of rhizobia nodulating *Lotus tenuis* in typical soils of the Salado River Basin (Argentina). *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(4):1088-1098. <https://doi.org/10.1128/AEM.02405-08>.
23. Marchetti M, Capela D, Glew M, et al. Experimental evolution of a plant pathogen into a legume symbiont. *PLoS Biol.* 2010;8(1):e1000280. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000280>.
24. Zaneveld JR, Nemergut DR, Knight R. Are all horizontal gene transfers created equal? Prospects for mechanism-based studies of HGT patterns. *Microbiology.* 2008;154(Pt 1):1-15. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/011833-0>.
25. Provorov NA, Vorobyov NI. Simulation of legume-rhizobia symbiosis evolution under the multi-strain competition of bacteria for inoculation of symbiotic habitats. *Ecol Gen.* 2008;6(4):3-11. <https://doi.org/10.17816/ecogen643-11>.
26. Проворов Н.А., Воробьев Н.И. Роль горизонтального переноса генов в эволюции клубеньковых бактерий, направляемой растением-хозяином // Успехи современной биологии. — 2010. — Т. 130. — № 4. — С. 336–345. [Provorov NA, Vorob'ev NI. Impact of horizontal gene transfer on evolution of root nodule bacteria directed by host plant. *Advances in modern biology.* 2010;130(4):336-345. (In Russ.)]
27. Баймиев А.Х., Акимова Е.С., Гуменко Р.С., и др. Генетическое разнообразие и филогения клубеньковых бактерий, выделенных из клубеньков растений рода *Lupinaster*, произрастающих на Южном Урале // Генетика. — 2019. — Т. 55. — № 1. — С. 52–59. [Baymiev AK, Akimova ES, Gumenko RS, et al. Genetic diversity and phylogeny of root nodule bacteria isolated from nodules of plants of the *Lupinaster* genus inhabiting the Southern Urals. *Genetika.* 2019;55(1): 52-59. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.1134/S0016675819010028>.
28. Князев М.С. Заметки по систематике и хорологии видов рода *Oxytropis* (Fabaceae) на Урале. II. Виды родства *Oxytropis ambigua* // Ботанический журнал. — 2001. — Т. 86. — № 1. — С. 126–134. [Knyazev MS. Zametki po sistematike i horologii vidov roda *Oxytropis* (Fabaceae) na Urale. II. Vidy rodstva *Oxytropis ambigua*. *Botanicheskij zhurnal.* 2001;86(1): 126-134. (In Russ.)]
29. Акулова З.В., Бобров Е.Г., Васильева Л.И., и др. Флора европейской части СССР. Т. VI / отв. ред. А.А. Федоров. — Л.: Наука, 1987. — 254 с. [Akulova ZV, Bobrov EG, Vasil'eva LI, et al. Flora evropeyskoy chasti SSSR. Vol. VI. Ed by A.A. Fedorov. Leningrad: Nauka; 1987. 254 p. (In Russ.)]
30. Карасев Е.С., Чижевская Е.П., Симаров Б.В., и др. Сравнительный анализ филогений симбиотических генов клубеньковых бактерий с использованием метадеревьев // Сельскохозяйственная биология. — 2017. — Т. 52. — № 5. — С. 995–1003. [Karasev ES, Chizhevskaya EP, Simarov BV, et al. Comparative phylogenetic analysis of symbiotic genes of different nodule bacteria groups using the meta-trees method. *Sel'skokhoziaistvennaia biologiya.* 2017;52(5):995-1003. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.5.995rus>.

31. Карасев Е.С., Андронов Е.Е., Аксенова Т.С., и др. Эволюции ризобий козлятника (*Neorhizobium galegae*): анализ полиморфизма генов фиксации азота и развития клубеньков // Генетика. — 2019. — Т. 55. — № 2. — С. 234–238. [Karasev ES, Andronov EE, Aksenova TS, et al.

Evolution of Goat's Rue Rhizobia (*Neorhizobium galegae*): analysis of polymorphism of the nitrogen fixation and nodule formation genes. *Genetika*. 2019;55(2): 234-238. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.1134/S0016675819020085>.

#### ✿ Информация об авторах

**Андрей Ханифович Баймиев** — д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов, Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение. ФГБНУ УФИЦ РАН, Уфа. SPIN: 1919-5236. E-mail: baymiev@anrb.ru.

**Анастасия Андреевна Владимирова** — аспирант лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов. Институт биохимии и генетики. ФГБНУ УФИЦ РАН, Уфа. E-mail: vladimirovaw@bk.ru.

**Екатерина Сергеевна Акимова** — канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов. Институт биохимии и генетики. ФГБНУ УФИЦ РАН, Уфа. SPIN: 6595-2452. E-mail: iv.katerina-bio@yandex.ru.

**Роман Сергеевич Гуменко** — младший научный сотрудник лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов. Институт биохимии и генетики. ФГБНУ УФИЦ РАН, Уфа. SPIN: 4216-4301. E-mail: r.gumenko@yandex.ru.

**Альберт Акрамович Мулдашев** — канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории геоботаники и охраны растительности. Уфимский институт биологии. ФГБНУ УФИЦ РАН, Уфа. SPIN: 1362-7915. E-mail: muldashev\_ural@mail.ru.

**Алексей Викторович Чемерис** — д-р биол. наук, главный научный сотрудник лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов. Институт биохимии и генетики. ФГБНУ УФИЦ РАН, Уфа. SPIN: 1248-2582. E-mail: chemeris@anrb.ru.

**Алексей Ханифович Баймиев** — д-р биол. наук, заведующий лабораторией биоинженерии растений и микроорганизмов. Институт биохимии и генетики. ФГБНУ УФИЦ РАН, Уфа. SPIN: 3771-4063. E-mail: baymiev@mail.ru.

#### ✿ Authors and affiliations

**Andrei Kh. Baymiev** — PhD, Leading Researcher, Laboratory of Plant and Microbial Bioengineering. Institute of Biochemistry and Genetics. Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia. SPIN: 1919-5236. E-mail: baymiev@anrb.ru.

**Anastasiya A. Vladimirova** — Graduate Student, Laboratory of Plant and Microbial Bioengineering. Institute of Biochemistry and Genetics. Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia. E-mail: vladimirovaw@bk.ru.

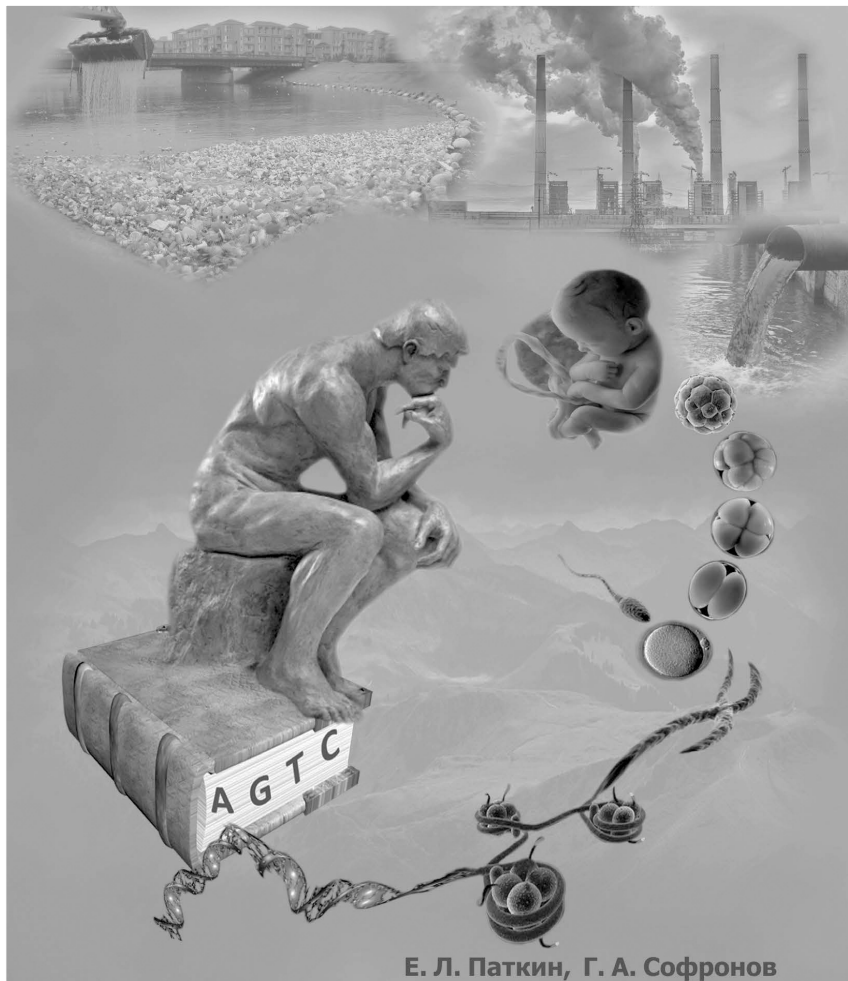
**Ekaterina S. Akimova** — PhD, Researcher, Laboratory of Plant and Microbial Bioengineering. Institute of Biochemistry and Genetics. Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia. SPIN: 6595-2452. E-mail: iv.katerina-bio@yandex.ru.

**Roman S. Gumenko** — Junior Researcher, Laboratory of Plant and Microbial Bioengineering. Institute of Biochemistry and Genetics. Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia. SPIN: 4216-4301. E-mail: r.gumenko@yandex.ru.

**Albert A. Muldashev** — PhD, Senior Researcher, Ufa Institute of Biology. Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia. SPIN: 1362-7915. E-mail: muldashev\_ural@mail.ru.

**Alexei V. Chemeris** — PhD, Laboratory of Plant and Microbial Bioengineering. Institute of Biochemistry and Genetics. Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia. SPIN: 1248-2582. E-mail: chemeris@anrb.ru.

**Alexei Kh. Baymiev** — PhD, Head of Laboratory of Plant and Microbial Bioengineering. Institute of Biochemistry and Genetics. Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia. SPIN: 3771-4063. E-mail: baymiev@mail.ru.



## ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ

### КАК ОБЩИЙ МЕХАНИЗМ ЗАБОЛЕВАНИЙ, СТАРЕНИЯ И ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ



**ЕВГЕНИЙ ЛЬВОВИЧ  
ПАТКИН**

Доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярной цитогенетики млекопитающих отдела молекулярной генетики в Научно-исследовательском институте экспериментальной медицины Российской академии медицинских наук, Санкт-Петербург



**ГЕНРИХ АЛЕКСАНДРОВИЧ  
СОФРОНОВ**

Академик Российской академии медицинских наук, профессор, доктор медицинских наук, заслуженный деятель науки Российской Федерации

В книге рассмотрены эпигенетические эффекты со многих точек зрения. Отдельные главы посвящены основным молекулярным механизмам, осуществляющим эпигенетическую регуляцию в онтогенезе, и процессам, основанным на этом типе регуляции. В книге рассмотрены основные эпигенетические механизмы, включая метилирование ДНК, модификацию белков хроматина, некодирующие РНК, организацию хроматина высшего порядка, в том числе гетерохроматин и эухроматин, пространственную организацию клеточного ядра. Обсуждена роль эпигенетических механизмов в развитии, старении и этиологии ряда распространенных патологий человека. Суммированы данные, полученные авторами, по асимметричной организации сестринских хроматид метафазных хромосом и влиянию на этот феномен экотоксикантов. Большое внимание уделено роли изменений метилирования ДНК и структуры хроматина при воздействии экотоксикантов, в особенности бисфенол А, а также анализу роли эпигенетического трансгенерационного наследования в связи с воздействием экотоксикантами. Рассмотрены эпигеномные и эпигенетические подходы в токсикологических исследованиях.

Эту книгу можно приобрести в интернет-магазине издательства «Эко-Вектор» по адресу:  
[www.eco-vector.com/books](http://www.eco-vector.com/books)

## КУЛЬТИВИРУЕМЫЕ ЭНДОФИТНЫЕ БАКТЕРИИ СТЕБЛЕЙ И ЛИСТЬЕВ ГОРОХА ПОСЕВНОГО (*PISUM SATIVUM* L.)

© Е.Н. Васильева<sup>1</sup>, Г.А. Ахтемова<sup>1</sup>, А.М. Афонин<sup>1</sup>, А.Ю. Борисов<sup>1</sup>, И.А. Тихонович<sup>1,2</sup>, В.А. Жуков<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Санкт-Петербург;

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург

Для цитирования: Васильева Е.Н., Ахтемова Г.А., Афонин А.М., и др. Культивируемые эндофитные бактерии стеблей и листьев гороха посевного (*Pisum sativum* L.) // Экологическая генетика. — 2020. — Т. 18. — № 2. — С. 169–184. <https://doi.org/10.17816/ecogen17915>.

Поступила: 28.11.2019

Одобрена: 06.04.2020

Принята: 23.06.2020

✿ Эндофитные микроорганизмы населяют внутренние ткани практически каждого растения. В данной работе изучено разнообразие культивируемых эндофитных бактерий гороха *Pisum sativum*, изолированных из предварительно стерилизованных надземных частей растения — стеблей и листьев. Исследование проводилось на трех генотипах гороха: К-8274, К-3358 и коммерческом селекционном сорте Триумф. В общей сложности удалось получить 118 морфотипов культивируемых эндофитных бактерий, для 80 из которых было определено их таксономическое положение путем секвенирования диагностического фрагмента гена 16S рРНК. Доминирующими оказались представители порядков *Proteobacteria* и *Firmicutes*. Кроме того, были обнаружены минорные представители порядка *Actinobacteria*. Идентифицированные представители микрофлоры гороха были проверены на способность проявлять ростостимулирующую активность, которая оценивалась по тесту на корнях кресс-салата (*Lepidium sativum* L.). По результатам теста, 8 изолятов эндофитных бактерий проявили способность стимулировать рост корневой системы кресс-салата, для одного из них — KV17, относящегося к роду *Rahnella*, — эта способность сохранилась при длительном хранении и пассировании.

✿ **Ключевые слова:** эндофитные бактерии; культивируемые бактерии; бобовые растения; горох посевной; *Pisum sativum*.

## CULTURABLE ENDOPHYTIC BACTERIA FROM STEMS AND LEAVES OF GARDEN PEA (*PISUM SATIVUM* L.)

© E.N. Vasileva<sup>1</sup>, G.A. Akhtemova<sup>1</sup>, A.M. Afonin<sup>1</sup>, A.Yu. Borisov<sup>1</sup>, I.A. Tikhonovich<sup>1,2</sup>, V.A. Zhukov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, Russia;

<sup>2</sup> Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

Cite this article as: Vasileva EN, Akhtemova GA, Afonin AM., et al. Culturable endophytic bacteria from stems and leaves of garden pea (*Pisum sativum* L.).

*Ecological genetics*. 2020;18(2):169-184. <https://doi.org/10.17816/ecogen17915>.

Received: 28.11.2019

Revised: 06.04.2020

Accepted: 23.06.2020

✿ **Background.** Endophytic microorganisms inhabit internal tissues of most plants. However, little is known about endophytic community of the garden pea (*Pisum sativum* L.), an agriculturally important crop. **Materials and methods.** Culturable endophytic bacteria were isolated from sterilized stems and leaves of three pea genotypes: K-8274 (cv. Vendevil), K-3358 (unnamed cultivar), and cv. Triumph. The taxonomic position of isolates was determined by 16S rRNA gene sequencing. The plant growth-promoting capability of identified bacteria was tested on the roots of watercress (*Lepidium sativum* L.). **Results.** In total, out of 118 morphotypes of culturable endophytic bacteria identified, for 80 the taxonomic position was determined. *Proteobacteria* and *Firmicutes* were dominant phyla, and *Actinobacteria* were present in minority. Eight bacterial isolates demonstrated the plant growth-promoting capability, and one of them — KV17 (*Rahnella* sp.) maintained this capability after several passages and prolonged storage. **Conclusion.** The plant growth-promoting bacteria isolated from pea stems and leaves can become a component of microbiological preparations.

✿ **Keywords:** Endophytic bacteria; culturable bacteria; legumes; garden pea; *Pisum sativum*.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время очевидно, что прокариотические микроорганизмы распространены практи-

чески повсеместно, так или иначе взаимодействуя с другими обитателями биосферы. Эти взаимоотношения вызывают большой интерес со стороны



исследователей, поскольку являются предметом для изучения фундаментальных основ симбиоза, а также позволяют обнаружить новые пути практического применения такого рода отношений. Управление растительно-микробными взаимоотношениями особенно перспективно в области сельского хозяйства ввиду способности некоторых представителей микрофлоры оказывать положительное влияние на рост и развитие растений [1]. Так, клубеньковые бактерии (ризобии), вступая в симбиоз с растениями сем. Бобовые, фиксируют атмосферный азот, что приводит к улучшению азотного питания растений и, как следствие, к повышению урожайности и улучшению характеристик почвы. Грибы арбускулярной микоризы улучшают снабжение растений труднорастворимыми фосфатами и водой [2], а ризобактерии группы PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) оказывают ростостимулирующий эффект и защищают растения от последствий стрессовых факторов, как биотических, так и абиотических [3, 4]. Представителей микробиоты, населяющих внутренние ткани растений, называют эндофитными микроорганизмами.

Впервые понятие «эндофит» предложил Антон де Бари, немецкий микробиолог и ботаник, в 1866 г.; относился этот термин исключительно к локализации организма, то есть эндофитом мог считаться любой микроорганизм, населяющий внутренние ткани растения [5]. Со временем данный термин так или иначе уточнялся, появлялись новые трактовки [6]. В настоящее время все еще не существует единой концепции, давшей бы достаточно точное и емкое определение понятию «эндофит», поэтому стоит отметить, что в данной работе эндофитами называются микроорганизмы, выделенные из поверхностно стерилизованных тканей растений, не вызывающие патологических эффектов и какого-либо заметного отрицательного влияния на развитие растения [1, 7].

Согласно исследованиям, эндофитные бактерии способны улучшать рост, развитие и общее состояние растения-хозяина ввиду способности модулировать уровень растительных гормонов, синтезировать витамины, улучшать снабжение растения питательными веществами [8]. На основе этих микроорганизмов создаются высокоэффективные биопрепараты, применяемые в практике сельского хозяйства уже в наши дни [9, 10].

Интерес к таким симбиозам постоянно растет, а вместе с этим все больше внимания уделяется изучению бактериальных эндофитов различных сельскохозяйственных растений, например гороха посевного (*Pisum sativum* L.). В настоящее время ученые чаще обращаются к исследованию эндофитов корней и клубеньков гороха, а работы по биоразнообразию тканей листьев и стеблей встречаются реже [11]. Так, были изучены ассоциации эндофитных бактерий из клубеньков гороха и фасоли, и обнаружены бактерии, демонстрирующие ростостимулирующую активность [12]. В последующих исследованиях были выделены и охарактеризованы новые штаммы бактерий из родов *Serratia* и *Pseudomonas* из корней гороха [13], а также проведена работа по выделению эндофитных бактерий из клубеньков гороха и определению их биологической активности [14]. В частности, были опубликованы данные по перспективному ростостимулирующему штамму клубеньковых эндофитов (Ent16), принадлежащих к роду *Serratia*, для которого, помимо общей характеристики, был также продемонстрирован путь проникновения в эндосферу гороха [15]. Кроме того, в ряде работ описано разнообразие неризобияльных бактерий, населяющих клубеньки гороха [16, 17]. Работы по изучению биоразнообразия тканей стеблей и листьев гороха встречаются реже. Так, с помощью определения профиля жирных кислот было показано присутствие в листьях и стеблях гороха бактерий родов *Bacillus*, *Pseudomonas* и *Pantoea* [18].

Так как горох посевной является ценной сельскохозяйственной культурой, целесообразно исследовать и, по возможности, улучшать его симбиотический потенциал, то есть отзывчивость на инокуляцию симбиотическими микроорганизмами [2, 19]. В ранее проведенных исследованиях в условиях совместной инокуляции клубеньковыми бактериями и грибами арбускулярной микоризы было показано, что различные генотипы гороха отличаются по признаку отзывчивости на инокуляцию [20, 21]. Однако способность гороха к образованию симбиозов с эндофитными микроорганизмами и вопрос об эффективности таких симбиозов (в отношении пользы для растения) изучены значительно хуже [22]. В связи с этим в настоящей работе исследовано биоразнообразие культивируемых представителей эндосферы гороха, а также



проведены тесты, выявляющие штаммы, претендующие на роль ростостимулирующих эндофитов, которые в дальнейшем могли бы быть использованы для создания на их основе микробиологических препаратов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Растительный материал и постановка вегетационного эксперимента

Эксперимент проводили на базе ФГБНУ ВНИИСХМ (Пушкин, Санкт-Петербург) в летних вегетационных домиках, в которых температурные условия и освещенность определялись погодными условиями. Использовали следующие генотипы гороха посевного *P. sativum*: 1) К-8274 (сорт Vendevil, Франция) — из коллекции ФГБНУ ВИР им. Вавилова, является «отзывчивым» при взаимодействии с полезной почвенной микрофлорой (ППМ) (смесью клубеньковых бактерий и грибов арбускулярной микоризы); 2) К-3358 (формообразец из Саратовской обл.) — из коллекции ФГБНУ ВИР им. Вавилова, является «неотзывчивым» [23]; 3) селекционный сорт Триумф — из коллекции ФГБНУ ВНИИЗБК, полученный методом насыщающих скрещиваний линии К-8274 и сорта Classic (Дания) и унаследовавший признак «отзывчивости» на инокуляцию ППМ от К-8274 и безлисточковый тип стебля от сорта Classic [2, 24]. Под «отзывчивостью» понимается способность генотипа гороха к увеличению биомассы и семенной продуктивности при инокуляции ППМ. Следует отметить также, что, согласно данным трехлетних полевых экспериментов, генотип К-3358 характеризуется более высокой семенной продуктивностью и биомассой, чем К-8274 и Триумф [21].

Растения выращивали в сосудах объемом 5 л, в качестве субстрата использовали дерново-подзолистую легкосуглинистую почву (ФГБНУ ЛенНИИСХ «Белогорка», Ленинградская обл.). В каждый сосуд высаживали по 5 растений одного генотипа. Повторность опыта шестикратная, для выделения эндофитных бактерий использовали по 3 сосуда. Урожайность генотипов гороха оценивали в оставшихся трех сосудах в конце вегетационного периода. Полив производили по весу до 60 % полной влагоемкости почвы (аналогично эксперименту, описанному в работе В.А. Жуко-

ва и др. в 2017 г. [23]). Растительный материал был собран в фазу цветения растений, в момент наибольшей активности ризосферной микробиоты и формирования на корнях активных клубеньков (4 недели после посадки). Далее из полученных образцов выделяли эндофитные бактерии.

### Подготовка растительного материала

Растительный материал промывали под проточной водой, из трех отобранных случайно растений каждой линии готовили среднесмешанные образцы стеблей (3-е и 4-е междоузлия) и листьев (начиная с 3-го узла). Концы фрагментов листьев и стеблей парафинировали и проводили стерилизацию поверхности в три последовательных этапа: обработка 70 % этиловым спиртом (1 мин), затем 5 % гипохлоритом натрия ( $\text{NaClO}$ ) (5 мин) и повторная обработка 70 % спиртом (30 с). Каждый этап при этом сопровождался трехкратным промыванием в дистиллированной воде [25].

Часть образцов использовали для постановки контролей на чистоту стерилизации поверхности растений. Для выделения культивируемых эндофитных бактерий образцы растений измельчали в стерильной фарфоровой ступке до однородной массы. Далее гомогенат высевали на твердые микробиологические среды, инкубировали при температуре 28 °C в течение 3–4 сут.

### Микробиологические исследования

Все колонии бактерий описывали по морфолого-культуральным признакам, присваивали индивидуальный номер и далее проводили манипуляции по получению чистых культур.

Эндофитные бактерии выделяли и культивировали на питательных средах TSA и 1/20 TSA (Tryptone soya agar CM0131, Oxoid, Англия), а также на микробиологической среде № 79, состав (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,2;  $\text{NaCl}$  — 0,1;  $\text{CaCO}_3$  — следовые количества; маннит — 10; дрожжевой экстракт — 0,4; агар — 15.

Триптон-соевый агар (TSA) использовали для выделения гетеротрофных бактерий; разведенный TSA (1/20) использовали для выделения олиготрофных бактерий, которым достаточны низкие концентрации питательных элементов; селективную микробиологическую среду (№ 79) применяли для роста клубеньковых бактерий (ризобий).

### Молекулярно-генетические исследования

Выделение ДНК из полученных культур проводили с использованием фенол-хлороформного метода [26]. Биомассу бактерий с твердых питательных сред отмывали от слизи в буфере (0,5 М EDTA; 4 М NaCl; H<sub>2</sub>O). Осадок ресуспендировали в 567 мкл TE (pH 8), к нему добавляли 30 мкл SDS (10 %) и 3 мкл протеиназы К. При необходимости для улучшения лизиса использовали 6 мкл лизоцима (25 мг/мл). Далее смесь инкубировали при температуре 37 °С 1 ч. К раствору добавляли 110 мкл 5 М NaCl и 80 мкл СТАВ/NaCl и вновь инкубировали 10 мин при 65 °С.

К полученной смеси добавляли 0,7 объема хлороформа, перемешивали и центрифугировали 15 мин (13000 об./мин). Супернатант отбирали в отдельную пробирку, к нему добавляли равный объем фенол-хлороформной смеси (в объемном соотношении 1 : 1). Раствор перемешивали и центрифугировали в тех же условиях. Надосадочную жидкость переносили в новую пробирку, осаждение ДНК проводилось с использованием изопропанола (0,6 объема). Концентрация соли в растворе уже была достаточно велика, а потому ее добавление не требовалось. Раствор центрифугировали 15 мин (13000 об./мин), осадок промывали 70 % этиловым спиртом. Остатки спирта удаляли при помощи центрифужного испарителя Concentrator plus (Eppendorf, Германия). Осадок растворяли в 100 мкл TE (pH 8) в течение суток при 4 °С.

### Идентификация культивируемых эндофитных бактерий

Идентификация бактерий была проведена при помощи секвенирования диагностического фрагмента гена *16S* рРНК (V3-V9) с использованием праймеров 642F и 1451R, либо секвенирования полного гена (праймеры 27F и 1451R). Последовательности использованных праймеров приведены в Приложении 1. Для амплификации фрагмента проводилась полимеразная цепная реакция с использованием смеси ScreenMix (Evrogen, Москва, Россия) при следующих условиях: 34 цикла, денатурация 30 с при 95 °С, отжиг 45 с при 55,5 °С, элонгация 1 мин 45 с при 72 °С.

Очистку амплифицированных фрагментов проводили смесью ферментов экзонуклеазы 1 (Exo1)

и термочувствительной щелочной фосфатазы (FastAP) (Thermo Scientific, США). Для этого использовали 5 мкл продукта полимеразной цепной реакции, 1 мкл FastAP, 0,5 мкл Exo1, раствор инкубировали 15 мин при 37 °С и 15 мин при 85 °С. Очищенные продукты секвенировали на приборе ABI Prism 3500XL (Applied Biosystems, США) по протоколу производителя. Полученные последовательности сравнивали с представленными в базе Nucleotide collection при помощи программы NCBI BLASTN 2.6.1 [27].

### Оценка ростостимулирующей активности выделенных штаммов

Ростостимулирующую активность бактериальных эндофитов оценивали по способности положительно влиять на рост корней тестового растения кресс-салата (*Lepidium sativum* L.). Использовали семена кресс-салата сорта Забава (Агрофирма АЭЛИТА, Россия). Два диска фильтровальной бумаги помещали в чашки Петри, смачивали дистиллированной водой (контроль) или культуральной жидкостью. Бактерии выращивали в жидкой питательной среде TSA в течение 2 сут. до получения титра бактерий 10<sup>9</sup> КОЕ. Затем готовили разведения культуральной жидкости в соотношениях 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000 для достижения необходимого титра (10<sup>8</sup>, 10<sup>7</sup> и 10<sup>6</sup> соответственно). Семена кресс-салата стерилизовали при помощи 70 % этилового спирта, после чего промывали в дистиллированной воде и выкладывали на фильтровальную бумагу по 20 семян на чашку Петри. Семена проращивались в фитотронах Vötsch Industrietechnik VB1014 (Германия) в течение 3 сут. при заданных параметрах: день/ночь — 16/8 часов, 21 °С, относительная влажность воздуха 75 %, освещенность 7–8 тыс. люкс. Через три дня измеряли длину корня каждого растения [28].

### Статистическая обработка данных ростостимуляции

Результаты, полученные при проведении теста на корнях кресс-салата, обработали при помощи программы GraphPad Prism v7.00 (GraphPad Software, США, <https://www.graphpad.com>). Статистическая значимость влияния эндофитных бактерий на рост корневой системы определялась непараметрическим критерием Данна. Этот критерий

был выбран ввиду того, что в тестах длина корней не соответствовала распределению Гаусса, а потому применение параметрических критериев было невозможно.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Результаты вегетационного эксперимента

Из поверхностно стерилизованных листьев и стеблей четырехнедельных растений гороха посевного трех генотипов было выделено 118 морфотипов эндофитных бактерий (табл. 1). Наибольшее количество морфотипов эндофитных бактерий (50), было обнаружено в растениях гороха «отзывчивого» генотипа К-8274. Сопоставимое количество морфотипов бактерий (49) было выделено из растений «неотзывчивого» генотипа К-3358. Из растений коммерческого сорта гороха Триумф было выделено наименьшее число культивируемых бактериальных эндофитов. Следует отметить, что у растений всех генотипов количество морфотипов, выделенных из стеблей, было ниже, чем выделенных из листьев (прилистников). Морфотипы колоний эндофитных бактерий, выделенных из эндосферы растений, приведены на рис. 1. Стоит отметить, что колонии в основном имели круглую форму с ровными или фестончатыми краями. Цвет колоний был, как правило, неярким: чаще всего встречались колонии белого, бежевого, кремового цветов или полупрозрачные колонии. Так, штамм KV75.1 имел белые выпуклые колонии среднего размера с ровным гладким краем. Также присутствовали колонии складчатой формы и колонии, имеющие лопастной край или край неправильной формы. К редким морфотипам относились колонии, имевшие яркую окраску (желтую, оранжевую, розовую).

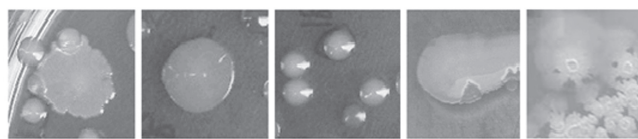


Рис. 1. Морфотипы эндофитных бактерий, изолированные из внутренних тканей стеблей и листьев гороха

В конце вегетационного периода (3 мес.) учитывали урожайность гороха посевного (сухую вегетативную массу и массу семян) (Приложение 2). Полученные значения соответствуют таковым из экспериментов других лет, проведенных в тех же условиях [23, 29].

### Результаты микробиологических исследований, молекулярно-генетическая идентификация

Все 118 изолятов эндофитных бактерий, выделенных из поверхностно стерилизованных органов растений гороха посевного, культивировали на твердых питательных средах для получения чистых культур и дальнейшей их идентификации. Часть из выделенных эндофитных бактерий оказалась не способна поддерживать рост на твердых питательных средах сразу после их первичного выделения. Другая часть утрачивала способность к росту спустя некоторое количество пассажей. По этим причинам около  $1/5$  изолятов не удалось выделить в чистые культуры. Некоторые колонии эндофитов разделились на 2 или 3 морфотипа после пассирования. В целом, из 118 морфотипов было получено 80 чистых культур эндофитных бактерий. Все чистые культуры поддерживались на чашках Петри, а также хранились при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Идентификация чистых культур эндофитных бактерий методом секвенирования гена *16S rDNA*

Таблица 1

Количество выделенных морфотипов эндофитных бактерий с указанием соответствующих питательных сред

| Генотип растения | Орган растений, из которого был выделен эндофит |         |    |         |         |    | Всего |
|------------------|-------------------------------------------------|---------|----|---------|---------|----|-------|
|                  | лист/прилистник                                 |         |    | стебель |         |    |       |
|                  | TSA                                             | 1/20TSA | 79 | TSA     | 1/20TSA | 79 |       |
| Сорт Триумф      | 5                                               | 5       | 2  | 3       | 2       | 2  | 19    |
| К-8274           | 21                                              | 17      | 5  | 4       | 1       | 2  | 50    |
| К-3358           | 8                                               | 14      | 6  | 5       | 8       | 8  | 49    |
| Всего            | 34                                              | 36      | 13 | 12      | 11      | 12 | 118   |

Примечание. Поскольку Триумф является безлисточковым сортом, для него были проанализированы прилистники вместо отсутствующих листьев.

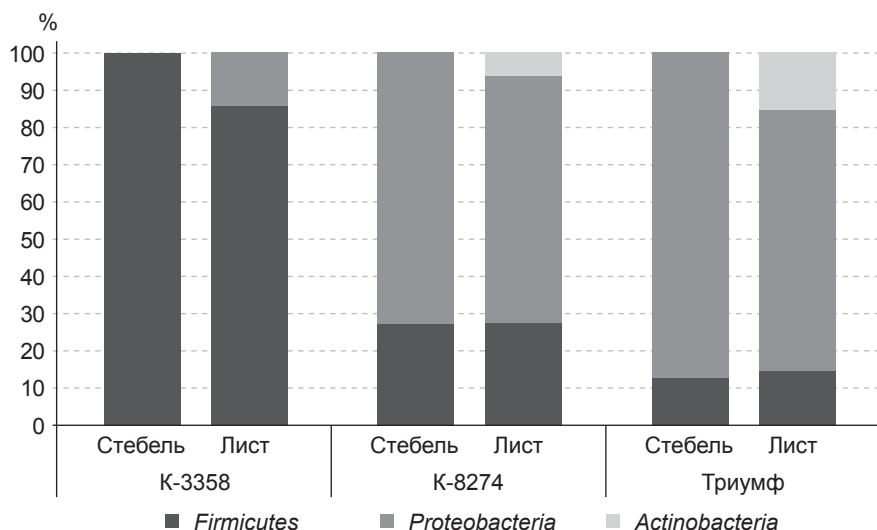


Рис. 2. Представленность фил эндифитных бактерий, изолированных из стеблей и листьев растений гороха различных генотипов (в случае растений безлисточкового сорта Триумф вместо листьев исследовали прилистники)

показала, что в растениях гороха посевного (как в листьях, так и в стеблях) присутствуют бактерии из фил *Proteobacteria*, *Firmicutes* и *Actinobacteria*. Стебли «неотзывчивого» генотипа К-3358 в основном населяли бактерии филы *Proteobacteria* с доминированием семейств *Yersiniaceae* и *Pseudomonadaceae*. Из листьев К-3358 были выделены, в основном, бактерии, принадлежащие к филе *Firmicutes*, которая была представлена семейством *Bacillaceae* и доминировала в данном сообществе. Бактерии из филы *Proteobacteria* занимали здесь небольшую долю по отношению к грамположительным спорообразующим бактериям (рис. 2).

В стеблях и в листьях «отзывчивого» генотипа К-8274 доминировали эндифитные бактерии филы *Proteobacteria*, представленной семействами *Bradyrhizobiaceae*, *Yersiniaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Oxalobacteraceae*, *Ralstoniaceae* и *Sphingomonadaceae*. Фила *Firmicutes* была второй по представленности как стеблей, так и листьев в эндифитном сообществе К-8274. Кроме того, в листьях растений К-8274 были найдены эндифитные бактерии, принадлежащие к филе *Actinobacteria* (рис. 3).

Эндифитное сообщество стеблей и прилистников гороха сорта Триумф по содержанию представителей фил сходно с генотипом К-8274: здесь так же доминирует фила *Proteobacteria* (в которой преобладающим семейством оказалось *Yersiniaceae*), на втором месте — фила *Firmicutes*. Также в при-

листниках растений сорта Триумф были выявлены бактерии филы *Actinobacteria*, обнаруженные в листьях К-8274, но не К-3358.

Рассматривая более подробно разнообразие эндифитных бактерий, можно отметить, что в листьях «неотзывчивого» генотипа К-3358 доминирующее положение в бактериальном сообществе занимают грамположительные бактерии из рода *Bacillus*, а в листьях «отзывчивого» генотипа К-8274 — бактерии из родов *Serratia* и *Bacillus*. Вместе с тем, в листьях этой линии обнаружены грамотрицательные бактерии из родов *Rahnella*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Enterobacter* и *Acinetobacter*.

В стеблях «неотзывчивого» генотипа К-3358 доминируют грамотрицательные бактерии из родов *Rahnella* и *Pseudomonas* и в минорном положении находятся бактерии из родов *Enterobacter* и *Luteibacter*.

В стеблях «отзывчивого» генотипа К-8274 обнаружены представители шести родов грамотрицательных бактерий: *Rahnella*, *Ralstonia*, *Sphingomonas*, *Herbaspirillum*, *Bradyrhizobium*, и два различных штамма грамположительных бактерий из рода *Bacillus*.

В органах растений гороха коммерческого сорта Триумф наблюдается равномерное распределение в бактериальном сообществе по разнообразию родов. В стеблях присутствуют бактерии из родов *Rahnella*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* и *Staphylococcus*. В прилистниках

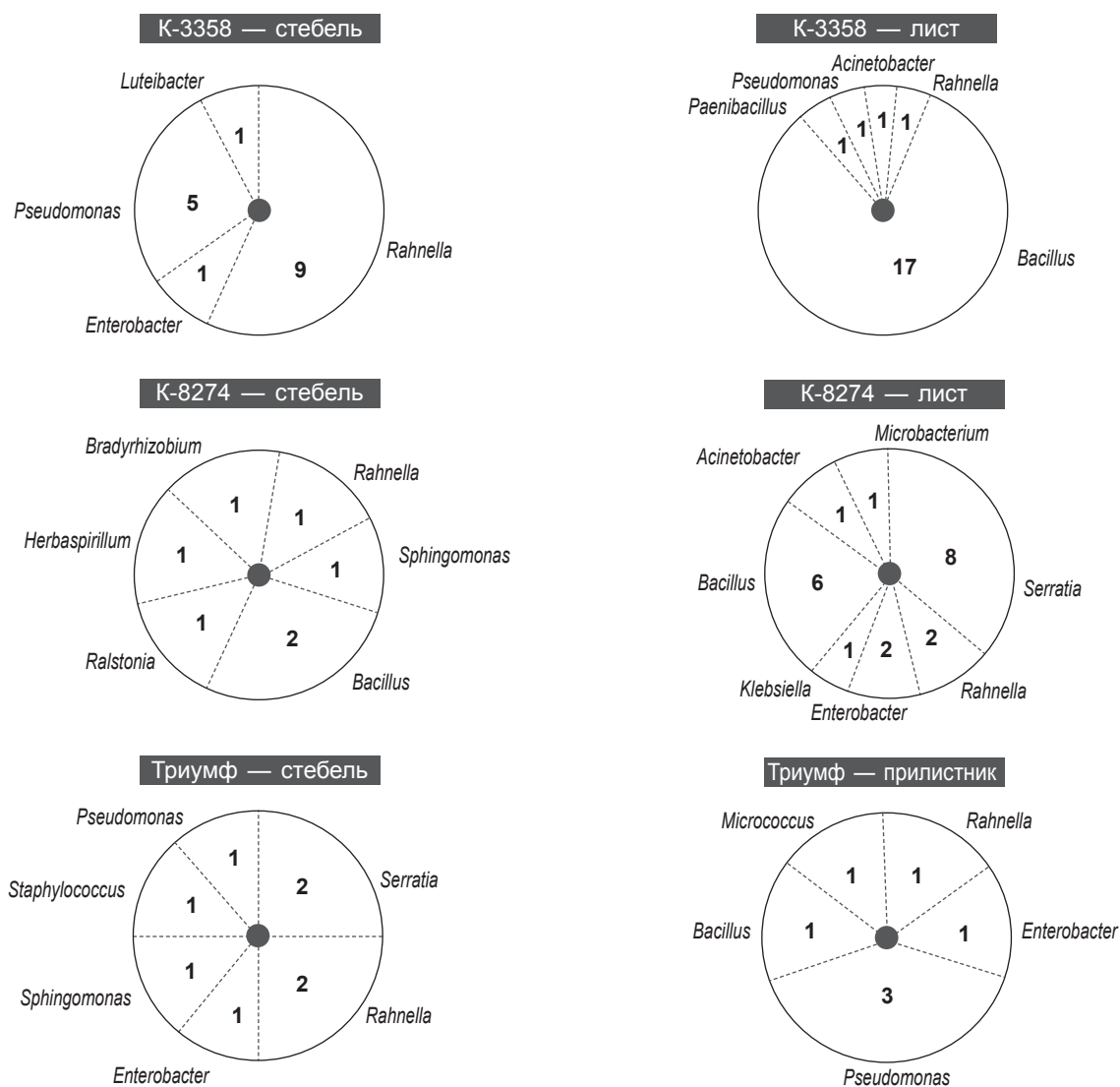


Рис. 3. Представители эндофитного сообщества растений гороха. На диаграммах показано количество представителей различных родов бактерий

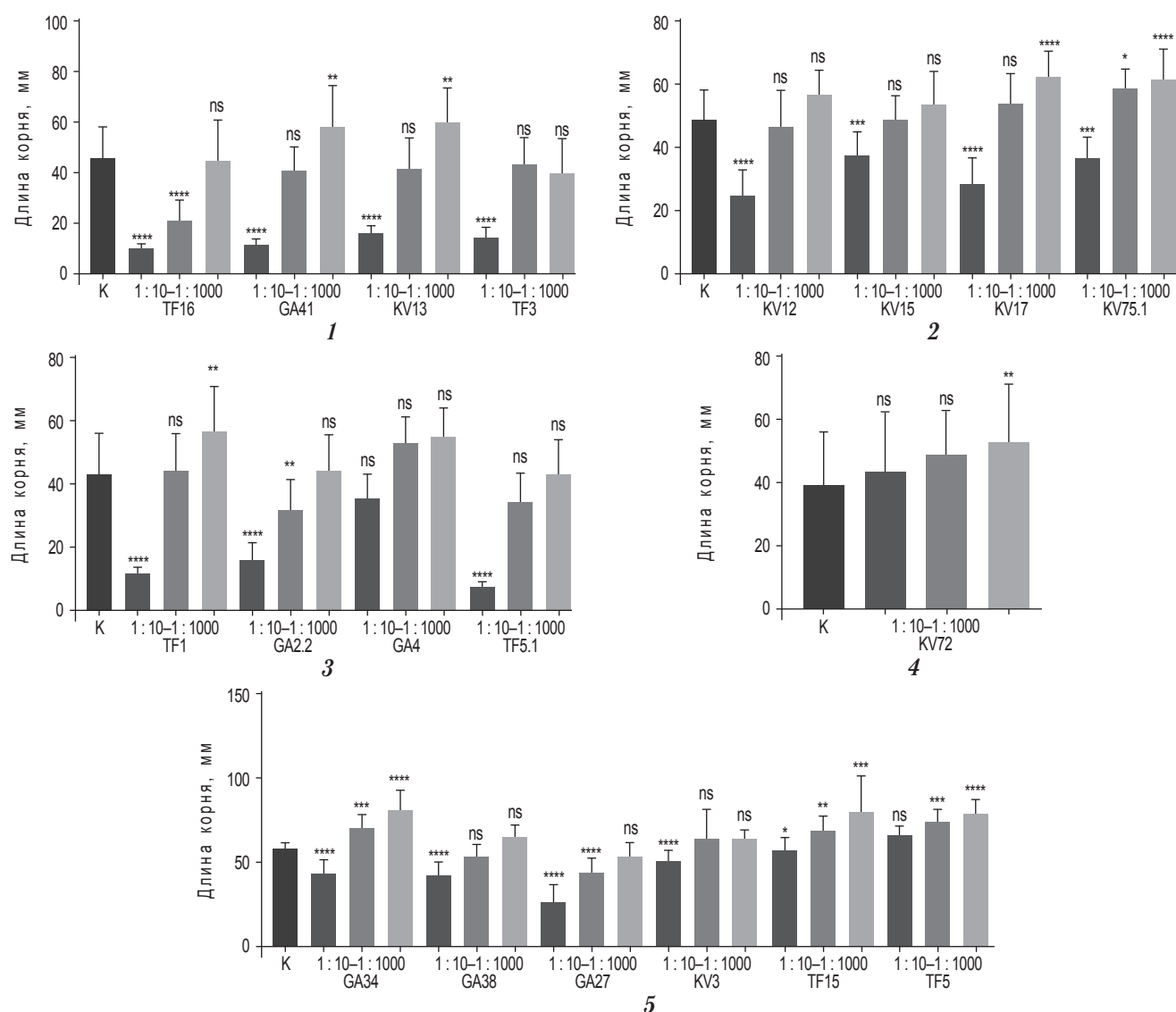
гороха сорта Триумф обнаружены бактерии из родов *Bacillus*, *Rahnella*, *Enterobacter*, *Micrococcus* и *Pseudomonas* (доминирующая группа).

### Результаты теста на ростостимулирующую активность изолированных из гороха штаммов с использованием кресс-салата в качестве тест-растения

Из 80 изолятов эндофитных бактерий, выделенных из гороха трех генотипов, были выбраны 36 штаммов для определения их ростостимулирующей активности. В эксперименте по оценке ростостимулирующей активности эндофитных бактерий было установлено, что большинство бактерий в используемых концентрациях не оказывали стимулирующего воздействия на рост корней кресс-

салата. Для 28 штаммов наблюдалась следующая закономерность: суспензия бактерий в культуральной жидкости при разведении 1 : 10, как правило, оказывала ингибирующее воздействие на рост корней, по сравнению с контролем (дистиллированная вода). При разведении 1 : 100 влияние на рост корней было незначительным. Суспензия клеток некоторых бактерий в культуральной жидкости в разведении 1 : 1000 стимулировала рост корней кресс-салата (рис. 4, Приложение 3). Штаммы, оказавшие наиболее выраженные ростостимулирующие свойства, представлены с указанием их родовой принадлежности в табл. 2. Всего 8 штаммов из 36 протестированных оказались способны стимулировать рост корневой системы кресс-салата.





**Рис. 4.** Длина корня кресс-салата при инокуляции эндофитными бактериями, выделенными из стеблей и листьев (прилистников). Номерами 1–5 обозначены эксперименты, для каждого из которых был поставлен отдельный контроль. Достоверность отличия длины корней растений от контроля: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; ns — отсутствие достоверных различий

Таблица 2

**Бактериальные эндофиты, проявившие ростостимулирующие свойства**

| Генотип растения | Орган растения | Порядковый № | Штамм  | Таксономическая принадлежность | Прирост средней длины корня, % |
|------------------|----------------|--------------|--------|--------------------------------|--------------------------------|
| Сорт Триумф      | Стебель        | 1            | TF1    | <i>Serratia</i> sp.            | 33,63                          |
|                  |                | 2            | TF5    | <i>Rahnella</i> sp.            | 27,79                          |
|                  | Прилистник     | 3            | TF15   | <i>Enterobacter</i> sp.        | 30,27                          |
| К-3358           | Стебель        | 4            | KV13   | <i>Rahnella</i> sp.            | 47,55                          |
|                  |                | 5            | KV17   | <i>Rahnella</i> sp.            | 28,61                          |
|                  | Лист           | 6            | KV72   | <i>Bacillus</i> sp.            | 36,73                          |
|                  |                | 7            | KV75.1 | <i>Acinetobacter</i> sp.       | 30,48                          |
| К-8274           | Лист           | 8            | GA34   | <i>Serratia</i> sp.            | 38,18                          |

Как видно из табл. 2, все три исследованных генотипа гороха содержали в эндосфере бактерии, проявляющие способность стимулировать рост и развитие растений. Повторный тест на ростостимуляцию, проведенный для штамма KV17, показал, что данный штамм сохраняет свои свойства после длительного хранения и пассирования (рис. 5). Прирост средней длины корня относительно контроля составил 23,53 %.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В работе были исследованы эндофитные сообщества листьев (прилистников) и стеблей гороха трех различных генотипов: К-8274, К-3358, а также селекционного сорта Триумф. Ранее, в полевых испытаниях, генотип К-3358 показал более высокую семенную продуктивность и биомассу по сравнению с К-8274 и Триумфом [21]. В настоящей работе в вегетационном эксперименте К-3358 сформировал на 37,83 % большую биомассу, чем К-8274 и на 26,46 %, чем Триумф. Также его семенная продуктивность превосходила эти генотипы на 39,07 и 22,81 % соответственно.

Из растительного материала удалось выделить 118 морфотипов культивируемых эндофитных бактерий. Стоит заметить, что примерно сходное количество изолятов (99) было получено в работе с растениями фасоли (*Phaseolus vulgaris* L.) [30]. Установлено, что у гороха всех трех генотипов количество выявленных эндофитных бактерий в листьях выше по сравнению с числом бактерий, обитающих в стеблях (табл. 1). Возможно, листья являются более благоприятной нишей для жизни бактерий, либо проникновение в листья (через устьица) более легко осуществимо, чем в стебли (для чего необходимо поранение стебля или корня, либо нарушение внешних тканей корня в ходе образования боковых корней [15, 31]). При этом эндофитное сообщество листьев растений гороха генотипа К-8274 оказалось самым разнообразным по сравнению с другими генотипам, а у наиболее продуктивного К-3358, напротив, наибольшее разнообразие было характерно для стеблевых эндофитов. Коммерческий сорт гороха посевного Триумф, в свою очередь, содержал небольшое количество эндофитных бактерий в прилистниках и стеблях.

Наибольшее разнообразие эндофитов стебля у генотипа К-3358, а также наличие в сте-

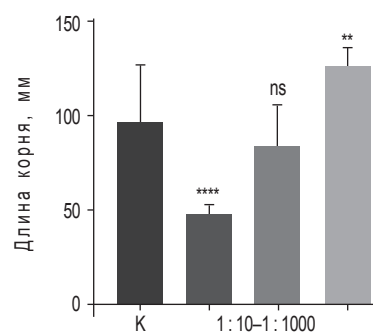


Рис. 5. Результаты повторного теста KV17 на ростостимулирующую активность. Достоверность отличия длины корней растений от контроля: \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; ns — отсутствие достоверных различий

блях и листьях активных и стабильных штаммов ростостимуляторов из родов *Rahnella* (KV17) и *Acinetobacter* (KV75.1) может влиять на увеличение вегетативной массы растений (как видно по результатам оценки урожайности, Приложение 2) и, соответственно, с наибольшим размером растения. Возможно, ростостимулирующие эндофитные бактерии способствуют увеличению вегетативной массы растения и его урожайности, однако для подтверждения этого тезиса требуются дальнейшие исследования.

Ранее генотипы гороха К-3358, К-8274 и Триумф были охарактеризованы в отношении признака «эффективность взаимодействия с полезной почвенной микрофлорой» (ЭВППМ) [21]. Под ЭВППМ, также называемой «отзывчивостью», понимается способность генотипа гороха к увеличению биомассы и семенной продуктивности при инокуляции ППМ. Показано, что генотип К-3358, характеризующийся большей биомассой и семенной продуктивностью, является при этом «неотзывчивым», в отличие от К-8274 и его потомка Триумфа (унаследовавшего признак «отзывчивости» на инокуляцию ППМ от К-8274) [21]. Учитывая, что генотип К-3358, в котором обнаружено наибольшее количество эндофитов, проявивших ростостимулирующие свойства, является «неотзывчивым» на инокуляцию клубеньковыми бактериями и грибами арбускулярной микоризы (в отличие от К-8274 и сорта Триумф) [29], можно предполагать существование различных механизмов позитивного воздействия на урожай стеблевых эндофитов (потенциальных ростостимуляторов), клубеньковых бактерий и грибов арбускулярной микоризы.

Молекулярно-генетическая идентификация эндофитных штаммов позволила определить состав эндофитного сообщества в надземных частях у разных генотипов гороха. Так, из всех образцов были выделены культивируемые эндофитные бактерии, относящиеся к филе *Proteobacteria*, и во всех изученных тканях, кроме стеблей К-3358, присутствовали представители филы *Firmicutes*. В листьях генотипов К-8274 и Триумф были обнаружены представители филы *Acinetobacter*. По богатству родов и разнообразию семейств выделялся «отзывчивый» генотип К-8274, в эндосфере стеблей которого были выявлены 6, а в листьях 5 представителей различных семейств бактерий. В целом, бактериальное сообщество эндофитов, выделенных из растений сорта Триумф, сходно с сообществом эндофитов генотипа К-8274. Это может быть объяснено тем, что генотип К-8274 является родительской формой для коммерческого сорта Триумф, однако, вопрос влияния генотипа растения на состав эндофитного сообщества должен стать предметом более масштабного генетического анализа.

Согласно многочисленным литературным данным (см. обзор Е.Н. Васильевой и коллег [11]), многие представители эндофитной микробиоты способны оказывать стимулирующее влияние на рост и развитие растения. Полученные в настоящем исследовании штаммы культивируемых эндофитов были протестированы на присутствие ростостимулирующей активности в модельной системе (удлинение корней кресс-салата). В результате чего удалось выявить 8 потенциальных штаммов бактерий, для одного из которых (KV17, отнесенного к роду *Rahnella*) было подтверждено сохранение ростостимулирующей активности после длительного хранения и пассирования. Этот и подобные ему штаммы могут в дальнейшем послужить основой для создания микробного препарата после проведения дополнительных тестов на других сельскохозяйственных культурах. Так, на основе штамма *Rahnella aquatilis* БИМ В-704Д, штамма *Pseudomonas putida* БИМ В-702Д, а также гриба арбускулярной микоризы из рода *Glomus* в 2015 г. был создан препарат «Бактопин», используемый для предпосевной обработки семян, а также вегетирующих растений. Препарат показал улучшение приживаемости сеянцев,

увеличение их высоты, а также способствовал раннему началу фаз бутонизации и цветения [32]. Сообщалось и о других штаммах рода *Rahnella*, демонстрирующих ценные для практики сельского хозяйства свойства: синтез ауксинов [33, 34] и сидерофоров, а также способность переводить азот и фосфор в доступную для растений форму [34].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время растения, вступающие в симбиоз с ППМ, рассматриваются как надорганизменные системы, в которых геном растения дополняется генами микроорганизмов («принцип дополнительности геномов») [35]. Таким образом, эндофитное сообщество, формируемое внутри тканей растения, может придавать растению дополнительные свойства, что приводит к повышению адаптивного потенциала растительно-микробной системы как «холобионта». Для выяснения деталей взаимовыгодного влияния микроорганизмов на растения необходимо использование подходов метагеномики для максимально полной характеристики микробных сообществ, населяющих ткани растения. Секвенирование геномов штаммов эндофитных бактерий, проявляющих ростостимулирующие свойства, также позволит выявить их ключевые особенности и таким образом продвинуться в понимании механизмов полезного влияния эндофитных бактерий на растения.

Горох посевной (*Pisum sativum* L.) является важной сельскохозяйственной культурой в Российской Федерации и в мире (FAOSTAT, 2018), а также ценным модельным объектом для изучения различных растительно-микробных симбиозов. Применение микробиологических препаратов способно стабилизировать урожай гороха, в том числе снизить потери, связанные с воздействием стрессовых факторов. Отобранные в настоящем исследовании ростостимулирующие бактерии могут стать одним из компонентов микробиологических препаратов.

## Благодарности

Работа Е.Н. Васильевой и В.А. Жукова по выделению эндофитных бактерий из растений сорта Триумф и их молекулярно-генетической



идентификации выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-016-00194. Работа Г.А. Ахтемовой, А.М. Афонина, А.Ю. Борисова и И.А. Тихоновича по оценке ростостимулирующей активности бактерий осуществлена при поддержке гранта РНФ № 17-76-30016. Авторы статьи выражают благодарность Людмиле Евгеньевне Дворяниновой и Наталье Николаевне Степановой (Новоселовой) за помощь в проделанной работе.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Partida-Martínez LP, Heil M. The microbe-free plant: fact or artifact? *Front Plant Sci.* 2011;2:100. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00100>.
2. Штарк О.Ю., Жуков В.А., Сулима А.С., и др. Перспективы использования многокомпонентных симбиотических систем бобовых // Экологическая генетика. — 2015. — Т. 13. — № 1. — С. 33–46. [Shtark OYu, Zhukov VA, Sulima AS, et al. Prospects for the use of multi-component symbiotic systems of the legumes. *Ecological genetics.* 2015;13(1):33-46. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17816/ecogen13133-46>.
3. Bais HP, Weir TL, Perry LG, et al. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol.* 2006;57:233-266. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>.
4. Цавкелова Е.Л., Климова С.Ю., Чердынцева Т.Л., Нетрусов Л.И. Микроорганизмы-продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. — 2006. — Т. 42. — № 2. — С. 133–143. [Tsavkelova EA, Klimova SYu, Cherdyntseva TL, Netrusov LI. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya.* 2006; 42(2): 133-143. (In Russ.)]
5. Wilson D. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos.* 1995;73(2):274-276. <https://doi.org/10.2307/3545919>.
6. Hardoim PR, van Overbeek LS, Elsas JD. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol.* 2008;16(10):463-471. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.07.008>.
7. Compant S, Clément C, Sessitsch A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol Biochem.* 2010;42(5): 669-678. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>.
8. Santoyo G, Moreno-Hagelsieb G, Orozco-Mosqueda Mdel C, Glick BR. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiol Res.* 2016;183:92-99. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>.
9. Чеботарь В.К., Макарова Н.М., Шапошников А.И., Кравченко Л.В. Антифунгальные и фитостимулирующие свойства ризосферного штамма *Bacillus subtilis* Ч-13 продуцента биопрепаратов // Прикладная биохимия и микробиология. — 2009. — Т. 45. — № 4. — С. 465–469. [Chebotar VK, Makarova NM, Shaposhnikov AI, Kravchenko LV. Antifungal and phytostimulating characteristics of *Bacillus subtilis* Ch-13 rhizospheric strain, producer of biopreparations. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya.* 2009;45(4):465-469. (In Russ.)]
10. Чеботарь В.К., Заплаткин А.Н., Щербakov А.В. и др. Микробные препараты на основе эндофитных и ризобактерий, которые перспективны для повышения продуктивности и эффективности использования минеральных удобрений у ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.) и овощных культур // Сельскохозяйственная биология. — 2016. — Т. 51. — № 3. — С. 335–342. [Chebotar VK, Zaplatkin AN, Shcherbakov AV, et al. Microbial preparations on the basis of endophytic and rhizobacteria to increase the productivity in vegetable crops and spring barley (*Hordeum vulgare* L.), and the mineral fertilizer use efficiency. *Sel'skokhoziaistvennaya biologiya.* 2016;51(3):335-342. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2016.3.335rus>.
11. Васильева Е.Н., Ахтемова Г.А., Жуков В.А., Тихонович И.А. Эндофитные микроорганизмы в фундаментальных исследованиях и сельском хозяйстве // Экологическая генетика. — 2019. — Т. 17. — № 1. — С. 19–32. [Vasileva EN, Akhtemova GA, Zhukov VA,

- Tikhonovich IA. Endophytic microorganisms in fundamental research and agriculture. *Ecological genetics*. 2019;17(1):19-32. (In Russ.). <https://doi.org/10.17816/ecogen17119-32>.
12. Гарипова С.Р., Гарифуллина Д.В., Маркова О.В., и др. Изучение бактериальных ассоциаций эндофитов клубеньков, способствующих увеличению продуктивности бобовых растений // *Агрохимия*. — 2010. — № 11. — С. 50–58. [Garipova SR, Garifullina DV, Markova OV, et al. Bacterial endophyte associations of nodules increasing the productivity of legumes. *Agrochemistry*. 2010;(11):50-58. (In Russ.)]
  13. Гарифуллина Д.В. Эндофитные бактерии растений гороха как активный компонент бобово-ризобияльной симбиотической системы: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Уфа, 2012. [Garifullina DV. Endofitnyye bakterii rasteniy gorokha kak aktivnyy komponent bobovo-rizobial'noy simbioticheskoy sistemy. [dissertation abstract] Ufa; 2012. (In Russ.)]. Доступно по: [https://revolution.allbest.ru/agriculture/00982191\\_0.html](https://revolution.allbest.ru/agriculture/00982191_0.html). Ссылка активна на 02.02.2020.
  14. Гарипова С.Р., Гарифуллина Д.В., Маркова О.В., и др. Комплексная биологическая активность *in vitro* эндофитных бактерий, выделенных из клубеньков гороха и фасоли // *Известия Уфимского научного центра Российской академии наук*. — 2015. — № 4–1. — С. 25–28. [Garipova SR, Garifullina DV, Markova OV, et al. Complex biological activity in vitro of endophytic bacteria isolated from pea and bean nodules. *Izvestiya Ufimskogo Nauchnogo Tsentra Rossiyskoy Akademii Nauk*. 2015;(4-1):25-28. (In Russ.)]
  15. Гарипова С.Р., Гарифуллина Д.В., Баймиев А.Х., Хайруллин Р.М. Межмикробные взаимоотношения бактерий *Serratia* sp. Ent16 — симбионта клубенька гороха и колонизация ими эндоризосферы хозяина // *Прикладная биохимия и микробиология*. — 2017. — Т. 53. — № 3. — С. 299–307. [Garipova SR, Garifullina DV, Baimiev AH, Khairullin RM. Intermicrobial relationships of the pea nodule symbiont *Serratia* sp. Ent16 and its colonization of the host endorhizosphere. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 2017;53(3):299-307. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.7868/S0555109917030060>.
  16. Selvakumar G, Kundu S, Gupta AD, et al. Isolation and characterization of nonrhizobial plant growth promoting bacteria from nodules of *Kudzu* (*Pueraria thunbergiana*) and their effect on wheat seedling growth. *Curr Microbiol*. 2008;56(2):134-139. <https://doi.org/10.1007/s00284-007-9062-z>.
  17. Tariq M, Hameed S, Yasmeen T, Ali A. Non-rhizobial bacteria for improved nodulation and grain yield of mung bean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]. *Afr J Biotechnol*. 2012;11:15012-15019. <https://doi.org/10.5897/AJB11.3438>.
  18. Elvira-Recuenco M, van Vuurde JW. Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. *Can J Microbiol*. 2000;46(11):1036-1041. <https://doi.org/10.1139/w00-098>.
  19. Shtark OY, Borisov AY, Zhukov VA, Tikhonovich IA. Mutually beneficial legume symbioses with soil microbes and their potential for plant production. *Symbiosis*. 2012;58(1-3):51-62. <https://doi.org/10.1007/s13199-013-0226-2>.
  20. Штark О.Ю., Данилова Т.Н., Наумкина Т.С., и др. Анализ исходного материала гороха посевного (*Pisum sativum* L.) для селекции сортов с высоким симбиотическим потенциалом и выбор параметров для его оценки // *Экологическая генетика*. — 2006. — Т. 4. — № 2. — С. 22–28. [Shtark OYu, Danilova TN, Naumkina TS et al. Analysis of pea (*Pisum sativum* L.) source material for breeding of cultivars with high symbiotic potential and choice of criteria for its evaluation. *Ecological genetics*. 2006;4(2):22-28. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17816/ecogen4222-28>.
  21. Данилова Т.Н. Эффективность взаимодействия гороха (*Pisum sativum* L.) с комплексом полезной почвенной микрофлоры. Новый признак селекции зернобобовых культур: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — СПб., 2011. — 18 с. [Danilova T.N. Effektivnost' vzaimodeistviya gorokha (*Pisum sativum* L.) s kompleksom poleznoi pochvennoi microflory. Novyi priznak selektsii zarnobobovykh kul'tur. [dissertation abstract] Saint Petersburg; 2011. 18 p. (In Russ.)]. Доступно по: <https://search.rsl.ru/ru/record/01004859442>. Ссылка активна на 02.02.2020.

22. Гарипова С.Р. Экологическая роль эндофитных бактерий в симбиозе с бобовыми растениями и их применение в растениеводстве // Успехи современной биологии. — 2012. — Т. 132. — № 5. — С. 493–505. [Garipova SR. The ecological role of endophytic bacteria in symbiosis with legumes and their use in plant breeding. *Advances in modern biology*. 2012;132(5): 493-505. (In Russ.)]
23. Жуков В.А., Ахтемова Г.А., Жернаков А.И., и др. Симбиотическая эффективность генотипов гороха посевного (*Pisum sativum* L.) при моделировании в вегетационном эксперименте // Сельскохозяйственная биология. — 2017. — Т. 52. — № 3. — С. 607–614. [Zhukov VA, Akhtemova GA, Zhernakov AI, et al. Evaluation of the symbiotic effectiveness of pea (*Pisum sativum* L.) genotypes in pot experiment. *Sel'skokhoziaistvennaia biologiya*. 2017;52(3):607-614. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.3.607rus>.
24. Наумкина Т.С., Борисов А.Ю., Штарк О.Ю., и др. Использование симбиозов бобовых при создании высокоэффективных растительно-микробных систем для адаптивного растениеводства // Аграрная Россия. — 2011. — № 3. — С. 35–37. [Naumkina TS, Borisov AYu, Shtark OYu, et al. Use of symbioses of pod-bearing plants for building of highly effective plant-microbic systems for adaptive plant growing. *Agrarian Russia*. 2011;3:35-37. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.30906/1999-5636-2011-3-35-37>.
25. Hallmann J, Berg G. Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes. In: Schulz BJ, Boyle CJ, Sieber TN, eds. *Microb. Root Endophytes*. Part of the Soil Biology book series (SOILBIOL, vol. 9). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2006. P. 15-31. [https://doi.org/10.1007/3-540-33526-9\\_2](https://doi.org/10.1007/3-540-33526-9_2).
26. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Curr Protoc Mol Biol*. 2001; Ch. 2: Unit 2.4. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0204s56>.
27. Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol*. 2000;7(1-2):203-214. <https://doi.org/10.1089/10665270050081478>.
28. Берестецкий О.А. Фитотоксины почвенных микроорганизмов и их экологическая роль. Фитотоксические свойства почвенных микроорганизмов. — Л.: Изд-во ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, 1978. — С. 7–31. [Berestetskiy O.A. Fitotoksiny pochvennykh mikroorganizmov i ikh ekologicheskaya rol'. Fitotoksicheskiye svoystva pochvennykh mikroorganizmov. Leningrad: Izd-vo VNII sel'skokhozyaystvennoy mikrobiologii; 1978. P. 7-31. (In Russ.)]
29. Mamontova T, Afonin AM, Ihling C, et al. Profiling of seed proteome in pea (*Pisum sativum* L.) lines characterized with high and low responsiveness to combined inoculation with nodule bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi. *Molecules*. 2019;24(8). pii: E1603. <https://doi.org/10.3390/molecules24081603>.
30. López-López A, Rogel MA, Ormeño-Orrillo E, et al. Phaseolus vulgaris seed-borne endophytic community with novel bacterial species such as *Rhizobium endophyticum* sp. nov. *Syst Appl Microbiol*. 2010;33(6):322-327. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.07.005>.
31. Dong Y, Iniguez AL, Triplett EW. Quantitative assessments of the host range and strain specificity of endophytic colonization by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Plant Soil* 2003;257(1):49-59. <https://doi.org/10.1023/A:1026242814060>.
32. Соловьева Е.А., Алещенкова З.М., Сафронова Г.В., и др. Микробный препарат Бактопин в технологии возделывания однолетних цветочных растений // Роль ботанических садов и дендрариев в сохранении, изучении и устойчивом использовании разнообразия растительного мира: Материалы Международной научной конференции, посвященной 85-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси: в 2-х частях. — Минск, 2017. — С. 284–287. [Solovyova EA, Aleshenkova ZM, Safronova GV, et al. Application of microbial preparation Bactopin in technology of growing ornamental plants. (Conference proceedings) Rol' botanicheskikh sadov i dendrariyev v sohranении, izuchenii i ustojchivom ispol'zovanii raznoobraziya rastitel'nogo mira: Materialy Mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii, posvyashchennoy 85-letiyu Tsentral'nogo

- botanicheskogo sada Natsional'noy akademii nauk Belarusi: v 2-kh chastyakh. Minsk; 2017. P. 25-28. (In Russ.)]
33. Malfanova N, Kamilova F, Validov S, et al. Characterization of *Bacillus subtilis* HC8, a novel plant-beneficial endophytic strain from giant hogweed. *Microb Biotechnol.* 2011;4(4):523-532. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00253.x>.
34. Kandel SL, Firrincieli A, Joubert PM, et al. An *in vitro* study of bio-control and plant growth promotion potential of salicaceae endophytes. *Front Microbiol.* 2017;8:386. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00386>.
35. Тихонович И.А., Андронов Е.Е., Борисов А.Ю., и др. Принцип дополнительности геномов в расширении адаптационного потенциала растений // Генетика. — 2015. — Т. 51. — № 9. — С. 973. [Tikhonovich IA, Andronov EE, Borisov AYU, et al. The principle of genome complementarity in the enhancement of plant adaptive capacities. *Genetika.* 2015;51(9):973. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.7868/S001667581509012X>.

## Приложение 1

Праймеры, использованные в исследовании

| Название праймера | Последовательность    |
|-------------------|-----------------------|
| 27F               | AGAGTTTGATCMTGGCTCAG  |
| 642F              | CCATGUGACCATCCAATGACC |
| 1451R             | TTAAGCGACGGAAAGCCTTC  |

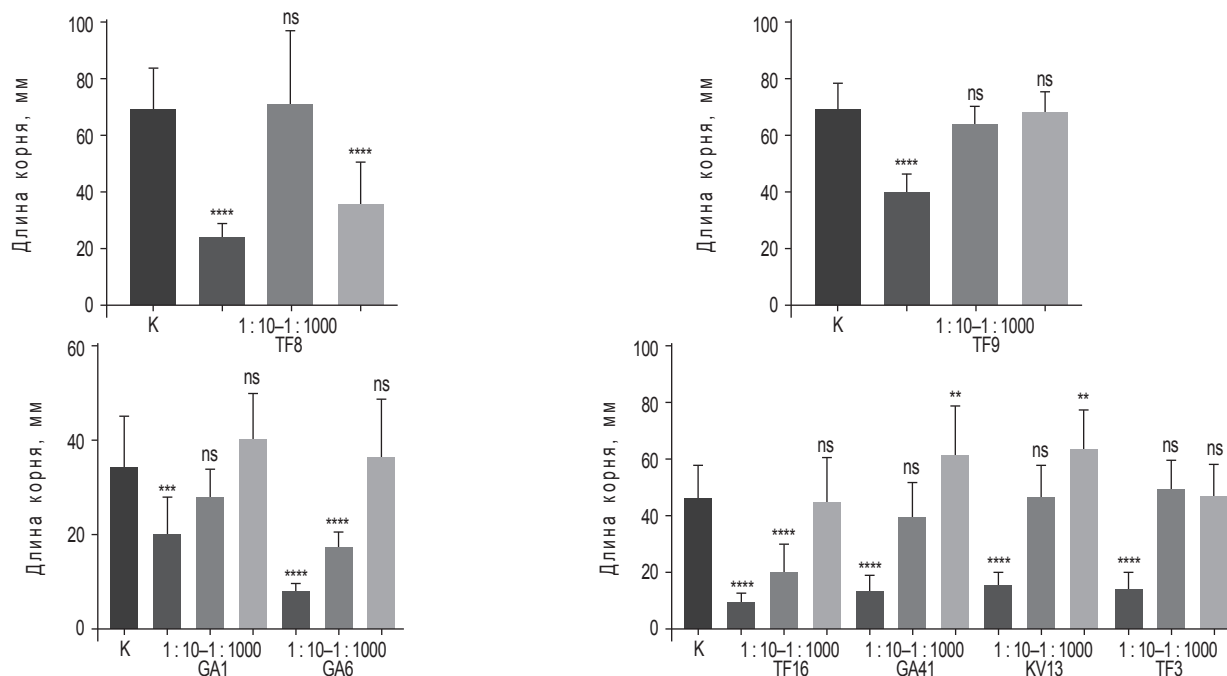
## Приложение 2

Урожай растений. Вегетативная масса семян растений гороха посевного *Pisum sativum* L.

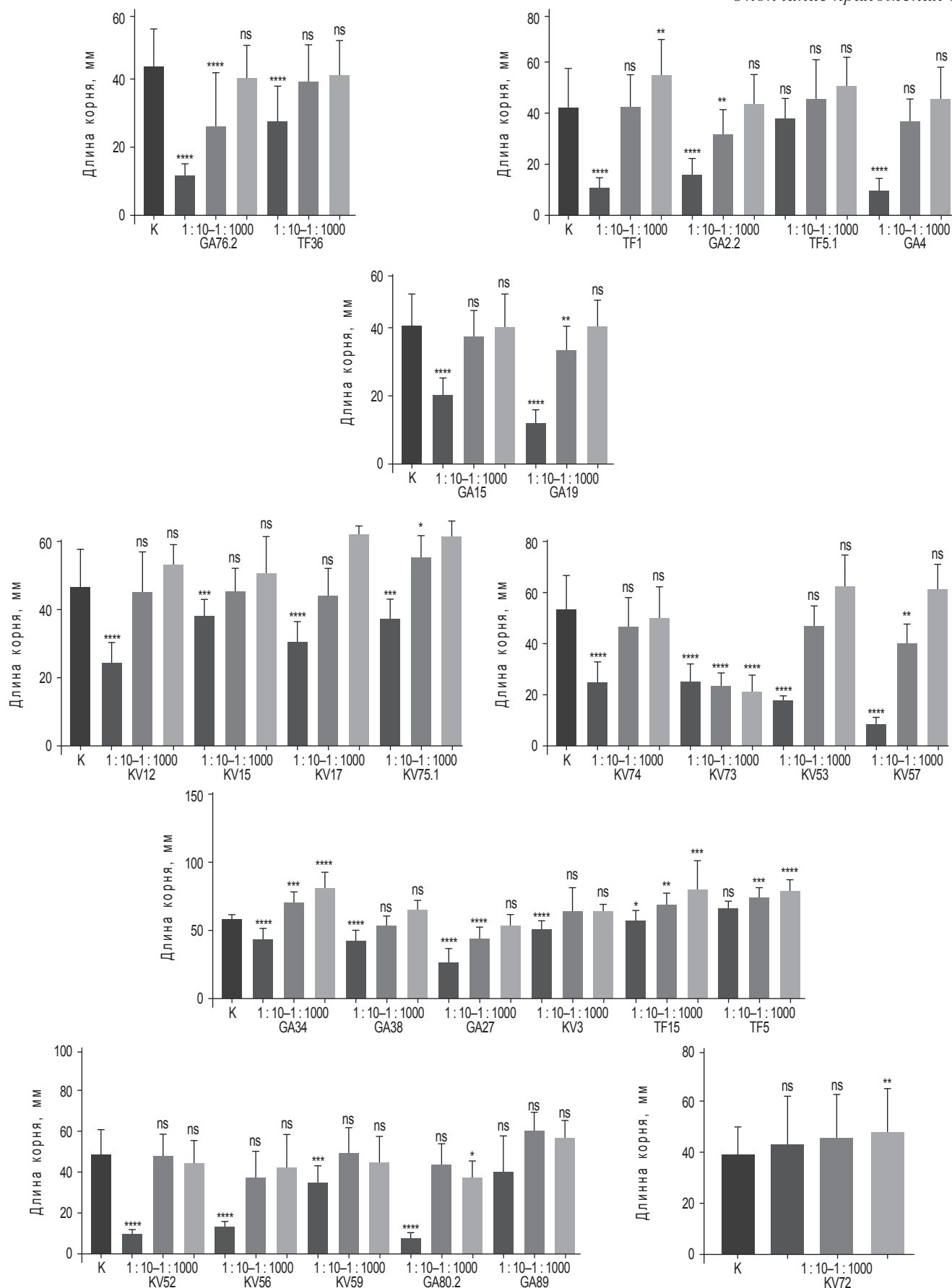
| Генотип гороха | Среднее значение вегетативной массы растений, г | Среднее значение массы семян растений, г |
|----------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------|
| К-3358         | 3,68 ± 0,38                                     | 2,10 ± 0,22                              |
| К-8274         | 2,67 ± 0,04                                     | 1,51 ± 0,02                              |
| Сорт Триумф    | 2,91 ± 0,13                                     | 1,71 ± 0,07                              |

## Приложение 3

Результаты тестов эндофитных бактерий на ростостимулирующую активность. Достоверность отличия длины корней растений от контроля: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; ns — отсутствие достоверных различий



Окончание приложения 3



## ✿ Информация об авторах

**Екатерина Николаевна Васильева** — техник 1-й категории, лаборатория генетики растительно-микробных взаимодействий. ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург. E-mail: [evasilieva@arriam.ru](mailto:evasilieva@arriam.ru).

**Гульнар Асановна Ахтемова** — канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории генетики растительно-микробных взаимодействий. ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург. E-mail: [ahgulya@yandex.ru](mailto:ahgulya@yandex.ru).

**Алексей Михайлович Афонин** — аспирант, лаборатория генетики растительно-микробных взаимодействий. ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург. E-mail: [afoninalexeym@gmail.com](mailto:afoninalexeym@gmail.com).

**Алексей Юрьевич Борисов** — д-р биол. наук, главный научный сотрудник. ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург. E-mail: [ayborisov@yandex.ru](mailto:ayborisov@yandex.ru).

**Игорь Анатольевич Тихонович** — д-р биол. наук, научный руководитель, ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург; профессор, декан биологического факультета. СПбГУ, Санкт-Петербург. E-mail: [arriam2008@yandex.ru](mailto:arriam2008@yandex.ru).

**Владимир Александрович Жуков** — канд. биол. наук, заведующий лабораторией генетики растительно-микробных взаимодействий. ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург. E-mail: [vzhukov@arriam.ru](mailto:vzhukov@arriam.ru).

## ✿ Authors and affiliations

**Ekaterina N. Vasileva** — Technician, Laboratory of Genetics of Plant-Microbe Interactions. Federal State Budget Scientific Institution All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, Russia. E-mail: [evasilieva@arriam.ru](mailto:evasilieva@arriam.ru).

**Gulnar A. Akhtemova** — PhD, Senior Scientist, Laboratory of Genetics of Plant-Microbe Interactions. Federal State Budget Scientific Institution All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, Russia. E-mail: [ahgulya@yandex.ru](mailto:ahgulya@yandex.ru).

**Alexey M. Afonin** — PhD student, Laboratory of Genetics of Plant-Microbe Interactions. Federal State Budget Scientific Institution All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, Russia. E-mail: [afoninalexeym@gmail.com](mailto:afoninalexeym@gmail.com).

**Alexey Yu. Borisov** — DSc, Chief Researcher. Federal State Budget Scientific Institution All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, Russia. E-mail: [ayborisov@yandex.ru](mailto:ayborisov@yandex.ru).

**Igor A. Tikhonovich** — DSc, Scientific Director, Federal State Budget Scientific Institution All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, Russia; Professor, Dean, Faculty of Biology, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia. E-mail: [arriam2008@yandex.ru](mailto:arriam2008@yandex.ru).

**Vladimir A. Zhukov** — PhD, Head, Laboratory of Genetics of Plant-Microbe Interactions. Federal State Budget Scientific Institution All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, Russia. E-mail: [vzhukov@arriam.ru](mailto:vzhukov@arriam.ru).



## СОСТОЯНИЕ ГЕНОФОНДОВ ОСНОВНЫХ ЛЕСООБРАЗУЮЩИХ ВИДОВ ВОДОСБОРА БЕЛОГО МОРЯ (НА ПРИМЕРЕ *PICEA* × *FENNICA* (REGEL) KOM. И *PINUS SYLVESTRIS* L.)

© А.А. Ильинов<sup>1</sup>, Б.В. Раевский<sup>2</sup>, О.В. Чирва<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Карельский научный центр Российской академии наук», Институт леса, Петрозаводск, Республика Карелия;

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Карельский научный центр Российской академии наук», Петрозаводск, Республика Карелия

Для цитирования: Ильинов А.А., Раевский Б.В., Чирва О.В. Состояние генофондов основных лесобразующих видов водосбора Белого моря (на примере *Picea* × *fennica* (Regel) Kom. и *Pinus sylvestris* L.) // Экологическая генетика. — 2020. — Т. 18. — № 2. — С. 185–202. <https://doi.org/10.17816/ecogen19006>.

Поступила: 30.12.2019

Одобрена: 30.04.2020

Принята: 23.06.2020

✿ С использованием ядерных микросателлитных локусов дана оценка состояния генофондов ели финской и сосны обыкновенной в западной части водосбора Белого моря. Северотаежные популяции ели финской характеризовались средними ( $H_o = 0,20$ ,  $H_e = 0,27$ ), а периферические — максимальными значениями параметров генетического разнообразия ( $H_o = 0,46$ ,  $H_e = 0,47$ ), различия между этими двумя группами популяций были статистически достоверными. Анализ  $F$ -статистик выявил уникальность генетической структуры периферических популяций ели, с чем может быть связан высокий уровень их генетической обособленности ( $F_{ST} = 0,33$ ). Все исследованные популяции сосны обыкновенной отличались более высоким по сравнению с елью финской уровнем генетического разнообразия ( $H_o = 0,50$ ,  $H_e = 0,63$ ), причем различия между периферическими и остальными популяциями были статистически недостоверными. Результаты анализа  $F$ -статистик популяций сосны свидетельствуют об однородности генофонда вида в регионе. Выявленный уровень генетического полиморфизма популяций сосны обыкновенной и ели финской в западной части водосбора Белого моря свидетельствует, что при принятии мер по сохранению и поддержанию генетических ресурсов этих видов (мониторинг состояния, содействие естественному возобновлению, создание лесных культур и т. п.) будут обеспечены необходимые условия для минимизации отрицательных последствий антропогенного воздействия и глобального изменения климата.

✿ **Ключевые слова:** *Pinus sylvestris* L.; *Picea* × *fennica* (Regel) Kom.; периферические популяции; микросателлитные локусы; генетическое разнообразие.

## THE STATE OF GENE POOL OF THE BASIC FOREST-FORMING SPECIES OF THE WHITE SEA WATERSHED (ON THE EXAMPLE OF A *PICEA* × *FENNICA* (REGEL) KOM. AND *PINUS SYLVESTRIS* L.)

© A.A. Ilinov<sup>1</sup>, B.V. Raevsky<sup>2</sup>, O.V. Chirva<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Forest Research Institute of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia;

<sup>2</sup> Karelian Research Centre of the Russian Academy of Science, Petrozavodsk, Russia

Cite this article as: Ilinov AA, Raevsky BV, Chirva OV. The state of gene pool of the basic forest-forming species of the White Sea watershed (on the example of a *Picea* × *fennica* (Regel) Kom. and *Pinus sylvestris* L.). *Ecological genetics*. 2020;18(2):185–202. <https://doi.org/10.17816/ecogen19006>.

Received: 30.12.2019

Revised: 30.04.2020

Accepted: 23.06.2020

✿ **Background.** The genetic diversity of forest tree species populations is a key factor contributing to their resistance against negative effects of human activity, and the global climate change. The aim of the present study was to evaluate the state of gene pools of the main forest-forming species in the White Sea watershed. **Materials and methods.** Five populations of Norway spruce and seven populations of Scotch pine have been selected within the Arctic zone of the European part of Russia (the western part of the White Sea watershed), along with two boundary ones located near the northern borders of the abovementioned species areas. The analysis of the spruce samples had been performed using five nuclear SSR loci, while for the pine samples it was four. DNA fragments were separated on a sequencer CEQ 8000. The main criteria of the genetic diversity ( $A_{99\%}$ ,  $H_o$ ,  $H_e$ ) and  $F$ -statistics were calculated. **Results.** The marginal spruce populations were characterized by the largest magnitude of the genetic diversity ( $H_o = 0.46$ ;  $H_e = 0.47$ ) and isolation ( $F_{ST} = 0.33$ ) compared to other populations of the same species. The differences were statistically significant. All pine populations studied demonstrated a higher level of genetic

diversity ( $H_o = 0.50$ ,  $H_e = 0.63$ ) compared to spruce populations. The differences between the boundary and in-area populations were not statistically reliable ( $F_{ST} = 0.04$ ). **Conclusion.** Our investigation revealed a sufficiently high level of spruce and pine northern populations' genetic diversity making them able to withstand expected negative effects of anthropogenic activity and global climate change.

✿ **Keywords:** *Pinus sylvestris* L.; *Picea × fennica* (Regel) Kom.; marginal populations; microsatellite loci; genetic diversity.

## ВВЕДЕНИЕ

Арктика, по определению Межправительственной группы экспертов, относится к регионам, наиболее уязвимым в плане глобального изменения климата [1]. Природные комплексы Арктики, характеризующиеся экстремальными климатическими и геофизическими условиями, являются особо уязвимыми, неустойчивыми к внешним воздействиям, обладают пониженной способностью к восстановлению и самоочищению [2]. Белое море, включая водосбор, имеет ключевое значение в рамках программы изучения и освоения ресурсов Арктики, поскольку оно представляет собой относительно небольшой, полузамкнутый водоем, для которого достаточно просто, по сравнению с другими морями Арктики, можно организовать проведение комплексных фундаментальных и прикладных исследований [3].

Водосбор Белого моря занимает большую часть арктической зоны Европейского Севера России, включая территории Мурманской и Архангельской областей, а также Республики Карелии. Они отнесены к первой группе территорий, непосредственно примыкающих к морю и оказывающих существенное воздействие на его экосистему [4]. Территории представлены двумя природными зонами — тундрой и тайгой, преимущественно лесами северотаежной подзоны. Актуальность сохранения биологического разнообразия наземных экосистем этого региона диктуется разнообразием и многочисленностью экосистемных услуг, которые человек получает от них. Особое место в этом аспекте принадлежит бореальным лесам, занимающим большую часть территории и выполняющим функции, критически важные на всех уровнях — местном, региональном и глобальном. Для местного населения очень важны такие экосистемные функции, предоставляемые лесом, как рыбная ловля, охота, досуг, духовная деятельность и экономические возможности. В глобальном масштабе бореальные леса — один из важнейших регуляторов

климата планеты посредством обмена энергией и водой. Они также хранят громадное количество биогенного углерода — по величине не меньше, чем тропические леса. Вклад лесов и лесонасаждений в решение насущных проблем современности, в частности таких, как снижение рисков от антропогенных воздействий и глобального изменения климата, в обеспечении устойчивого развития исследуемого региона, зависит в том числе и от наличия богатого межвидового и внутривидового разнообразия древесных пород. Лесные экосистемы остаются основным убежищем для сохранения биоразнообразия. Важной составляющей этого вклада является генетическое разнообразие — биоразнообразие на внутривидовом уровне основных лесообразующих видов, обеспечивающее выживание, адаптацию и развитие древесных лесных пород в меняющихся условиях окружающей среды. Оно также поддерживает жизнеспособность лесов и обеспечивает устойчивость к стрессам, таким как вредители и болезни [5]. Кроме того, поддержание высокого уровня генетического разнообразия необходимо для проведения селекционных программ с целью создания адаптированных сортов клонов или закрепления полезных признаков. Сохранение генетического потенциала лесных древесных видов, особенно в таком крайне уязвимом регионе, каким является Арктика, имеет жизненно важное значение, так как он представляет собой уникальный и невозполнимый ресурс для будущего.

*Цель исследования* — оценка современного состояния генофондов основных лесообразующих видов водосбора Белого моря и прогноз влияния на них антропогенных факторов, включая глобальное изменение климата.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами исследования явились популяции ели финской и сосны обыкновенной, расположенные в подзоне северной тайги, а также по 2 периферические популяции сосны и ели, произраста-



ющие на северном пределе распространения этих видов в переходной лесотундровой зоне (рис. 1, табл. 1). При подборе объектов исследования на основании комплекса лесотаксационных показателей определялась категория лесного биогеоценоза (насаждения). Дендроценозы, возникшие в результате естественных процессов, после тех или иных природных катастрофических событий различной интенсивности и не испытавшие сильного антропогенного воздействия, относились к категории «коренные малонарушенные». Наличие следов

выборочных (приисковых) рубок слабой интенсивности в этом случае считалось допустимым. Насаждения, сформировавшиеся после тотального антропогенного нарушения (сплошной рубки) за счет предварительного и последующего естественного возобновления, характеризовались как «производные».

В естественных сосняках и ельниках в пределах западной части водосбора Белого моря (северная подзона тайги Карелии и Мурманской обл.) были заложены постоянные пробные площади (ППП,

Таблица 1

## Характеристика исследованных популяций сосны и ели

| Популяции          | Расположение популяций    | Географические координаты (град. с. ш./в. д.) | Категория насаждения                    | Возраст древостоя, лет |
|--------------------|---------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------|
| Ель финская        |                           |                                               |                                         |                        |
| Пасвик_Е 1         | МО*, Печенгский район     | 69,27669/29,40130                             | Коренное малонарушенное                 | >180                   |
| Мурманск_Е 2       | МО, Кольский район        | 68,87333/33,24000                             | Производное, естественное возобновление | >100                   |
| Паанаярви_Е 3      | РК**, Лоухский район      | 66,30634/30,44258                             | Коренное малонарушенное                 | >200                   |
| Паанаярви_Е 4      | То же                     | 66,30093/30,45887                             | То же                                   | >200                   |
| Кивакка_Е 5        | >>                        | 66,20677/30,53473                             | >>                                      | >140                   |
| Кивакка_Е 6        | >>                        | 66,20574/30,53897                             | Не определено (горная тундра)           | >100                   |
| Поньгома_Е 7       | РК, Кемский район         | 65,33901/34,40335                             | Коренное малонарушенное                 | >120                   |
| Поньгома_Е 8       | То же                     | 65,35168/34,36869                             | То же                                   | >140                   |
| Пожостров_Е 9      | >>                        | 65,33981/34,47903                             | >>                                      | >160                   |
| Сосна обыкновенная |                           |                                               |                                         |                        |
| Пасвик_С1          | МО, Печенгский район      | 68,99571/28,98872                             | Коренное малонарушенное                 | >140                   |
| Мурманск_С2        | МО, Кольский район        | 68,89139/33,33194                             | Производное, естественное возобновление | >80                    |
| Алакертти_С3       | МО, Кандалакшский район   | 66,95278/29,61083                             | Коренное малонарушенное                 | >180                   |
| Гридино_С4         | РК, Кемский район         | 65,96686/34,65734                             | То же                                   | >180                   |
| Пяозеро_С5         | РК, Лоухский район        | 65,94450/31,08857                             | >>                                      | >140                   |
| Войница_С6         | РК, Калевальский район    | 65,15505/30,19625                             | >>                                      | >120                   |
| Маслозеро_С7       | РК, Медвежьегорский район | 63,52453/32,78677                             | >>                                      | >240                   |

Примечание. \* МО — Мурманская область; \*\* РК — Республика Карелия



Таблица 2

Характеристика микросателлитных праймеров, использованных для анализа популяций сосны обыкновенной и ели финской

| Локус              | Мотив                                                                                | Температура отжига, $t$ , °C | Количество аллелей | Размер фрагментов, п. н.* |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|--------------------|---------------------------|
| Ель финская        |                                                                                      |                              |                    |                           |
| UAPgTG25           | (TG) <sub>27</sub>                                                                   | 62                           | 8                  | 100–116                   |
| UAPgAG150          | (AG) <sub>11</sub>                                                                   | 54                           | 4                  | 160–166                   |
| UAPgAG105          | (AG) <sub>19</sub>                                                                   | 56                           | 8                  | 144–158                   |
| EATC2C06           | (CAT) <sub>7</sub>                                                                   | 58                           | 10                 | 136–166                   |
| EATC1C10           | (GA) <sub>8</sub>                                                                    | 53                           | 4                  | 150–159                   |
| Сосна обыкновенная |                                                                                      |                              |                    |                           |
| Spac11,8           | (TG) <sub>16</sub>                                                                   | 55                           | 13                 | 132–160                   |
| Spac12,5           | (GT) <sub>20</sub> (GA) <sub>10</sub>                                                | 54                           | 29                 | 129–199                   |
| PtTX2123           | (AGC) <sub>8</sub>                                                                   | 57                           | 3                  | 192–201                   |
| PtTX2146           | (GAG) <sub>5</sub> ...(GAG) <sub>8</sub> CGG(GAG) <sub>7</sub> CGG(GAG) <sub>4</sub> | 57                           | 13                 | 180–249                   |

Примечание. \* — пар нуклеотидных оснований.

ние и определение фрагментов ДНК осуществляли с помощью системы капиллярного электрофореза на приборе CEQ 8000 (Beckman Coulter).

Основные показатели генетической изменчивости (среднее число аллелей на локус  $A_{99\%}$ , среднее число аллелей с частотой  $>5\%$ ,  $A_{95\%}$ , среднее эффективное число аллелей  $n_e$ , индекс фиксации Райта  $F$ , наблюдаемая  $H_o$  и ожидаемая  $H_e$  гетерозиготность), а также показатели  $F$ -статистик Райта и генетические дистанции по Нею [10] определяли с помощью программы GenAlEx 6.5 [11]. Построение дендрограмм сходства популяций сосны и ели производили с использованием программы POPTREE [12].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Ель финская.** Анализ генетической структуры популяций ели финской показал, что все использованные микросателлитные локусы оказались полиморфными. Всего было выявлено 34 аллеля (табл. 3).

Северотаежные популяции Поньгома\_Е7, Поньгома\_Е8 и островная Пижостров\_Е9 оказались мономорфными по локусу UAPsTG25, популяция Поньгома\_Е8 — также по локусу EATC2C06, а Кивакка\_Е6 — по локусу UAPgAG105. Практически все популяции ели западного водосбора Белого моря характеризовались одинаковым общим количеством аллелей — 16, за исключением

ели, произрастающей на вершине горы, в условиях горной тундры (Кивакка\_Е6) и отличающейся минимальным их количеством (12). В то же время, периферические популяции Пасвик\_Е1 и Мурманск\_Е2, находящиеся на северном пределе ареала вида, характеризовались максимальным количеством обнаруженных аллелей (18 и 17 соответственно). Таким образом, исследованные популяции ели различались как по аллельному составу, так и по соотношению аллелей, причем у краевых популяций выявлено максимальное их количество.

Результаты анализа генетического, в том числе аллельного, разнообразия популяций ели финской представлены в табл. 4. По параметрам аллельного разнообразия периферические популяции в целом превосходили северотаежные ( $A_{99\%} = 3,500$  и  $3,029$ ,  $A_{95\%} = 2,835$  и  $2,336$ ,  $n_e = 1,995$  и  $1,619$  соответственно). Показатель наблюдаемой гетерозиготности  $H_o$  варьировал у северотаежных популяций ели от  $0,127$  (Поньгома\_Е8) до  $0,300$  (Панаярви\_Е3 и Кивакка\_Е6), составив в среднем  $0,204$ . По уровню ожидаемой гетерозиготности  $H_e$  минимальное значение было обнаружено для Поньгома\_Е7 ( $0,221$ ), максимальное — для Поньгома\_Е8 ( $0,310$ ), в среднем  $0,266$ . Мурманские популяции Пасвик\_Е1 и Мурманск\_Е2 и здесь характеризовались максимальными значениями параметров генетической изменчивости, причем

Таблица 3

Генетическая структура популяций ели финской, выраженная в частотах встречаемости аллелей

| Локус          | Аллель | Популяции |       |       |       |       |       |       |       |       |
|----------------|--------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                |        | E1*       | E2    | E3    | E4    | E5    | E6    | E7    | E8    | E9    |
| Размер выборки |        | 19        | 20    | 30    | 31    | 29    | 10    | 30    | 30    | 30    |
| UAPgTG25       | 100    | 0,000     | 0,000 | 0,050 | 0,016 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
|                | 102    | 0,000     | 0,050 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
|                | 104    | 0,026     | 0,000 | 0,950 | 0,952 | 0,845 | 0,900 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |
|                | 106    | 0,605     | 0,875 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
|                | 110    | 0,000     | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,050 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
|                | 112    | 0,000     | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,017 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
|                | 114    | 0,079     | 0,000 | 0,000 | 0,016 | 0,138 | 0,050 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
|                | 116    | 0,289     | 0,075 | 0,000 | 0,016 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| UAPgAG105      | 160    | 0,711     | 0,525 | 0,867 | 0,984 | 0,983 | 1,000 | 0,983 | 0,967 | 0,917 |
|                | 162    | 0,000     | 0,050 | 0,067 | 0,016 | 0,000 | 0,000 | 0,017 | 0,000 | 0,000 |
|                | 164    | 0,289     | 0,325 | 0,067 | 0,000 | 0,017 | 0,000 | 0,000 | 0,033 | 0,083 |
|                | 166    | 0,000     | 0,100 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| UAPgAG150      | 144    | 0,000     | 0,000 | 0,733 | 0,581 | 0,552 | 0,850 | 0,800 | 0,300 | 0,317 |
|                | 146    | 0,868     | 0,650 | 0,067 | 0,048 | 0,034 | 0,050 | 0,017 | 0,017 | 0,083 |
|                | 148    | 0,053     | 0,350 | 0,033 | 0,226 | 0,241 | 0,000 | 0,033 | 0,000 | 0,217 |
|                | 150    | 0,026     | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,103 | 0,000 | 0,000 | 0,083 | 0,033 |
|                | 152    | 0,000     | 0,000 | 0,083 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,350 | 0,117 |
|                | 154    | 0,026     | 0,000 | 0,083 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,150 | 0,000 |
|                | 156    | 0,026     | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
|                | 158    | 0,000     | 0,000 | 0,000 | 0,145 | 0,069 | 0,100 | 0,150 | 0,100 | 0,233 |
| EATC2C06       | 136    | 0,000     | 0,000 | 0,133 | 0,065 | 0,138 | 0,000 | 0,100 | 0,000 | 0,017 |
|                | 139    | 0,079     | 0,325 | 0,733 | 0,839 | 0,724 | 0,950 | 0,800 | 1,000 | 0,933 |
|                | 142    | 0,684     | 0,450 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
|                | 145    | 0,158     | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
|                | 148    | 0,000     | 0,100 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
|                | 151    | 0,000     | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,017 |
|                | 154    | 0,053     | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,034 | 0,050 | 0,017 | 0,000 | 0,033 |
|                | 157    | 0,000     | 0,050 | 0,133 | 0,081 | 0,103 | 0,000 | 0,067 | 0,000 | 0,000 |
|                | 160    | 0,026     | 0,050 | 0,000 | 0,016 | 0,000 | 0,000 | 0,017 | 0,000 | 0,000 |
|                | 166    | 0,000     | 0,025 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| EATC1C10       | 150    | 0,500     | 0,500 | 0,833 | 0,903 | 0,983 | 0,450 | 0,767 | 0,200 | 0,783 |
|                | 153    | 0,500     | 0,500 | 0,133 | 0,097 | 0,017 | 0,000 | 0,050 | 0,300 | 0,150 |
|                | 156    | 0,000     | 0,000 | 0,033 | 0,000 | 0,000 | 0,150 | 0,050 | 0,200 | 0,067 |
|                | 159    | 0,000     | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,400 | 0,133 | 0,300 | 0,000 |

Примечание. \*Обозначение популяций в соответствии с рис. 1.

Таблица 4

## Уровень генетического разнообразия в популяциях ели финской

| Популяция                                           | <i>n</i> | $A_{99} \%$   | $A_{95} \%$   | $n_e$         | $H_o$          | $H_e$           | <i>F</i>         |
|-----------------------------------------------------|----------|---------------|---------------|---------------|----------------|-----------------|------------------|
| Периферические популяции (на границе леса и тундры) |          |               |               |               |                |                 |                  |
| Пасвик_Е1                                           | 19       | 3,600 ± 0,678 | 2,600 ± 0,400 | 1,839 ± 0,152 | 0,495 ± 0,134  | 0,439 ± 0,054   | −0,126 ± 0,237   |
| Мурманск_Е2                                         | 20       | 3,400 ± 0,748 | 3,200 ± 0,583 | 2,151 ± 0,307 | 0,420 ± 0,169  | 0,493 ± 0,077   | 0,109 ± 0,337    |
| В среднем                                           |          | 3,500 ± 0,477 | 2,835 ± 0,367 | 1,995 ± 0,170 | 0,457 ± 0,102* | 0,466 ± 0,045** | −0,008 ± 0,198   |
| Северотаежные популяции                             |          |               |               |               |                |                 |                  |
| Паанаярви_Е3                                        | 30       | 3,200 ± 0,490 | 2,800 ± 0,374 | 1,472 ± 0,131 | 0,300 ± 0,072  | 0,298 ± 0,064   | 0,004 ± 0,081    |
| Паанаярви_Е4                                        | 31       | 3,200 ± 0,490 | 2,000 ± 0,447 | 1,436 ± 0,256 | 0,200 ± 0,067  | 0,235 ± 0,098   | 0,045 ± 0,069    |
| Кивакка_Е5                                          | 29       | 3,200 ± 0,583 | 2,200 ± 0,583 | 1,574 ± 0,300 | 0,152 ± 0,053  | 0,280 ± 0,115   | 0,258 ± 0,128*   |
| Кивакка_Е6                                          | 10       | 2,400 ± 0,400 | 2,400 ± 0,400 | 1,458 ± 0,291 | 0,300 ± 0,158  | 0,232 ± 0,105   | −0,182 ± 0,085   |
| Поньгома_Е7                                         | 30       | 3,200 ± 0,735 | 2,200 ± 0,583 | 1,341 ± 0,134 | 0,187 ± 0,076  | 0,221 ± 0,084   | 0,102 ± 0,129    |
| Поньгома_Е8                                         | 30       | 2,800 ± 0,970 | 2,400 ± 0,872 | 2,176 ± 0,706 | 0,127 ± 0,095  | 0,310 ± 0,177   | 0,402 ± 0,213*** |
| Пежостров_Е9                                        | 30       | 3,200 ± 0,860 | 2,400 ± 0,748 | 1,873 ± 0,658 | 0,160 ± 0,096  | 0,283 ± 0,136   | 0,379 ± 0,176*** |
| В среднем                                           |          | 3,029 ± 0,237 | 2,336 ± 0,254 | 1,619 ± 0,150 | 0,204 ± 0,034  | 0,266 ± 0,040   | 0,131 ± 0,053    |
| Все популяции                                       |          |               |               |               |                |                 |                  |
| В среднем                                           |          | 3,133 ± 0,212 | 2,433 ± 0,216 | 1,702 ± 0,124 | 0,260 ± 0,038  | 0,310 ± 0,035   | 0,096 ± 0,061    |

Примечание. *n* — размер выборки; *A* — среднее число аллелей на локус;  $n_e$  — среднее эффективное число аллелей на локус;  $H_o$  и  $H_e$  — наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность соответственно (\*, \*\* — различия между периферическими и остальными популяциями ели достоверны при  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ); *F* — индекс фиксации Райта (\*, \*\*\* — разница между наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготностью достоверна при  $p < 0,05$ ;  $p < 0,001$ ).

разница между ними и северотаежными популяциями ели как по ожидаемой, так и наблюдаемой гетерозиготности оказалась статистически достоверной (табл. 4). Необходимо отметить, что для всех популяций ели, за исключением Пасвик\_Е1 и Кивакка\_Е6, выявлены положительные значения индекса фиксации Райта, причем для популяций Кивакка\_Е5, Поньгома\_Е8 и Пежостров\_Е9 они оказались статистически достоверны [13], что свидетельствует о дефиците гетерозигот в этих популяциях.

В целом, исследованные популяции ели финской характеризовались невысоким уровнем генетического разнообразия по микросателлитным локусам, хотя и превышающим таковой по аллозимным локусам [14].

Анализ с помощью *F*-статистик Райта (табл. 5), рассчитанных для характеристики подразделенности и оценки уровня дифференциации между исследованными популяциями внутри групп, выявил невысокие значения  $F_{ST}$  (0,051 и 0,102 для периферических и северотаежных популяций соответственно). Среднее значение показателя  $F_{ST}$  для всех популяций составило 0,33. Найденное

соотношение свидетельствует о крайне высоком уровне генетической дифференциации между периферическими и остальными популяциями.

Более наглядно результаты анализа межпопуляционной дифференциации ели финской в западной части водосбора Белого моря можно представить в виде дендрограммы сходства, построенной с помощью метода UPGMA на основе матрицы генетических дистанций по Неи (рис. 2). Все популяции разделены на две группы — северотаежные карельские и периферические мурманские. Внутри этих групп уровень дифференциации оказался относительно небольшим ( $D_N = 0,11$  и  $0,09$  для карельских и мурманских популяций соответственно). В то же время уровень дифференциации между северотаежными и периферическими популяциями ели оказался практически на порядок выше ( $D_N = 0,99$ ). Статистическая достоверность объединения в отдельные группы маргинальных и северотаежных популяций подтверждается высокими значениями бутстреп-вероятности ( $BP = 100 \%$ ) [15], свидетельствуя о генетической обособленности краевых (периферических) популяций ели.

Таблица 5

Значения *F*-статистики Райта для карельских популяций ели финской

| Локусы                   | <i>F</i> -статистики  |                       |                       |
|--------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                          | <i>F<sub>IS</sub></i> | <i>F<sub>IT</sub></i> | <i>F<sub>ST</sub></i> |
| Периферические популяции |                       |                       |                       |
| UAPgTG25                 | 0,264                 | 0,321                 | 0,077                 |
| UAPgAG105                | 0,097                 | 0,118                 | 0,023                 |
| UAPgAG150                | 0,622                 | 0,656                 | 0,090                 |
| EATC2C06                 | 0,296                 | 0,340                 | 0,063                 |
| EATC1C10                 | −1,000                | −1,000                | 0,000                 |
| В среднем                | 0,056 ± 0,277         | 0,087 ± 0,285         | 0,051 ± 0,017         |
| Северотаежные популяции  |                       |                       |                       |
| UAPgTG25                 | 0,111                 | 0,166                 | 0,061                 |
| UAPgAG105                | 0,220                 | 0,253                 | 0,042                 |
| UAPgAG150                | 0,261                 | 0,353                 | 0,125                 |
| EATC2C06                 | 0,090                 | 0,147                 | 0,062                 |
| EATC1C10                 | 0,322                 | 0,471                 | 0,219                 |
| В среднем                | 0,201 ± 0,044         | 0,278 ± 0,060         | 0,102 ± 0,032         |
| Все популяции            |                       |                       |                       |
| В среднем                | 0,156 ± 0,058         | 0,432 ± 0,088         | 0,334 ± 0,078         |

Примечание. *F<sub>IS</sub>* — коэффициент инбридинга особи относительно популяции; *F<sub>IT</sub>* — коэффициент инбридинга особи относительно всего вида; *F<sub>ST</sub>* — коэффициент инбридинга популяции относительно всего вида (показатель подразделенности популяций).

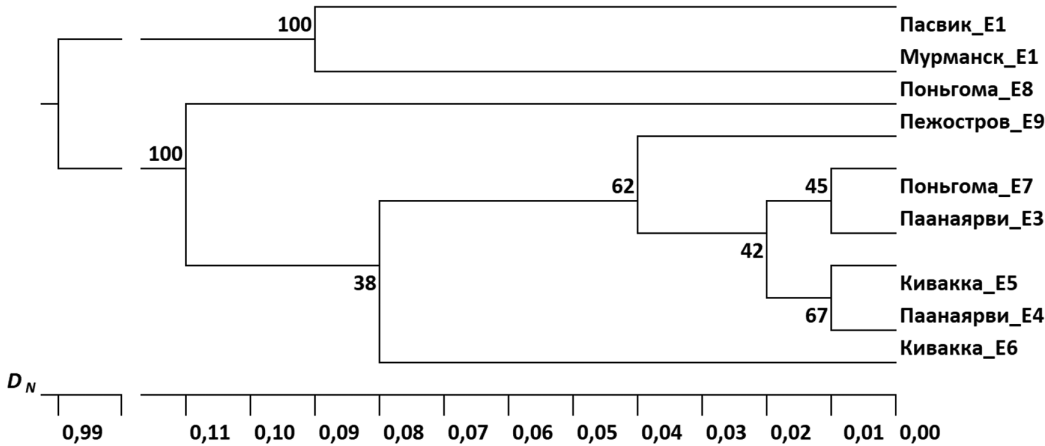


Рис. 2. Дендрограмма сходства карельских популяций ели финской по генетическому расстоянию Неи (*D<sub>N</sub>*); в узлах дендрограммы указана бутстреп-оценка вероятности *BP* в %

*Сосна обыкновенная.* Амплификация 4 микросателлитных локусов сосны из 7 естественных популяций позволила выявить 60 аллелей (табл. 6). Минимальное количество выявленных аллелей оказалось в популяциях из Мурманской области: Пасвик\_С1 (периферическая) и Алакуртти\_С3 (северотаежная) (по 30 аллелей в каждой), мак-

симальное (40) — в северотаежной Маслозеро\_С7. Анализ основных параметров генетического, в том числе аллельного, разнообразия (табл. 7) показал, что все популяции сосны обыкновенной отличаются высокими их значениями. Большим уровнем генетического разнообразия, за исключением наблюдаемой гетерозиготности *H<sub>e</sub>*, характеризовались

Таблица 6

Генетическая структура популяций сосны обыкновенной, выраженная в частотах встречаемости аллелей

| Локус          | Аллель | Популяции |       |       |       |       |       |       |
|----------------|--------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                |        | C1        | C2    | C3    | C4    | C5    | C6    | C7    |
| Размер выборки |        | 20        | 21    | 13    | 30    | 30    | 29    | 29    |
| PtTX2123       | 192    | 0,125     | 0,048 | 0,077 | 0,217 | 0,250 | 0,069 | 0,155 |
|                | 195    | 0,875     | 0,952 | 0,885 | 0,783 | 0,750 | 0,931 | 0,845 |
|                | 201    | 0,000     | 0,000 | 0,038 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| PtTX2146       | 180    | 0,000     | 0,024 | 0,000 | 0,017 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
|                | 183    | 0,175     | 0,143 | 0,231 | 0,200 | 0,233 | 0,224 | 0,190 |
|                | 186    | 0,000     | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,017 | 0,000 |
|                | 195    | 0,125     | 0,167 | 0,231 | 0,133 | 0,183 | 0,121 | 0,172 |
|                | 201    | 0,000     | 0,000 | 0,000 | 0,017 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
|                | 204    | 0,025     | 0,024 | 0,077 | 0,100 | 0,017 | 0,034 | 0,000 |
|                | 213    | 0,000     | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,017 |
|                | 219    | 0,000     | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,017 |
|                | 222    | 0,425     | 0,452 | 0,269 | 0,383 | 0,500 | 0,500 | 0,500 |
|                | 228    | 0,150     | 0,048 | 0,115 | 0,067 | 0,017 | 0,086 | 0,052 |
|                | 237    | 0,025     | 0,095 | 0,000 | 0,017 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
|                | 243    | 0,075     | 0,048 | 0,038 | 0,000 | 0,000 | 0,017 | 0,017 |
|                | 249    | 0,000     | 0,000 | 0,038 | 0,067 | 0,050 | 0,000 | 0,034 |
| Spac11.8       | 132    | 0,000     | 0,024 | 0,000 | 0,067 | 0,000 | 0,103 | 0,017 |
|                | 134    | 0,150     | 0,024 | 0,077 | 0,133 | 0,133 | 0,017 | 0,155 |
|                | 136    | 0,500     | 0,452 | 0,346 | 0,433 | 0,450 | 0,362 | 0,655 |
|                | 138    | 0,225     | 0,333 | 0,423 | 0,267 | 0,283 | 0,207 | 0,121 |
|                | 140    | 0,000     | 0,000 | 0,038 | 0,000 | 0,017 | 0,052 | 0,000 |
|                | 142    | 0,025     | 0,071 | 0,000 | 0,017 | 0,033 | 0,000 | 0,017 |
|                | 144    | 0,000     | 0,048 | 0,038 | 0,000 | 0,017 | 0,121 | 0,017 |
|                | 146    | 0,050     | 0,000 | 0,000 | 0,033 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
|                | 148    | 0,000     | 0,000 | 0,000 | 0,017 | 0,033 | 0,103 | 0,000 |
|                | 150    | 0,000     | 0,000 | 0,000 | 0,033 | 0,033 | 0,034 | 0,000 |
|                | 154    | 0,000     | 0,000 | 0,077 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,017 |
|                | 158    | 0,050     | 0,024 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
|                | 160    | 0,000     | 0,024 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |

Продолжение табл. 6

| Локус    | Аллель | Популяции |       |       |       |       |       |       |
|----------|--------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|          |        | C1        | C2    | C3    | C4    | C5    | C6    | C7    |
| Spac12.5 | 129    | 0,000     | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,033 | 0,000 | 0,017 |
|          | 131    | 0,000     | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,033 | 0,000 | 0,034 |
|          | 133    | 0,000     | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,033 | 0,034 | 0,103 |
|          | 135    | 0,000     | 0,000 | 0,000 | 0,050 | 0,017 | 0,000 | 0,017 |
|          | 137    | 0,000     | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,033 | 0,000 | 0,000 |
|          | 141    | 0,000     | 0,000 | 0,038 | 0,000 | 0,017 | 0,000 | 0,000 |
|          | 143    | 0,000     | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,017 | 0,000 | 0,000 |
|          | 145    | 0,000     | 0,024 | 0,038 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
|          | 147    | 0,300     | 0,119 | 0,038 | 0,117 | 0,050 | 0,034 | 0,000 |
|          | 149    | 0,200     | 0,024 | 0,192 | 0,083 | 0,100 | 0,034 | 0,069 |
|          | 151    | 0,075     | 0,190 | 0,000 | 0,083 | 0,017 | 0,052 | 0,034 |
|          | 153    | 0,025     | 0,095 | 0,000 | 0,050 | 0,000 | 0,069 | 0,034 |
|          | 155    | 0,000     | 0,048 | 0,000 | 0,067 | 0,183 | 0,121 | 0,086 |
|          | 157    | 0,025     | 0,024 | 0,038 | 0,033 | 0,050 | 0,086 | 0,069 |
|          | 159    | 0,050     | 0,095 | 0,192 | 0,117 | 0,017 | 0,155 | 0,017 |
|          | 161    | 0,025     | 0,048 | 0,038 | 0,117 | 0,167 | 0,017 | 0,052 |
|          | 163    | 0,050     | 0,071 | 0,000 | 0,033 | 0,033 | 0,052 | 0,086 |
|          | 165    | 0,100     | 0,095 | 0,115 | 0,033 | 0,000 | 0,052 | 0,069 |
|          | 167    | 0,000     | 0,024 | 0,000 | 0,033 | 0,000 | 0,017 | 0,052 |
|          | 169    | 0,025     | 0,024 | 0,115 | 0,000 | 0,033 | 0,052 | 0,052 |
|          | 171    | 0,050     | 0,000 | 0,038 | 0,083 | 0,017 | 0,069 | 0,052 |
|          | 173    | 0,000     | 0,000 | 0,038 | 0,000 | 0,033 | 0,000 | 0,017 |
|          | 175    | 0,050     | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,034 | 0,000 |
|          | 177    | 0,000     | 0,095 | 0,115 | 0,067 | 0,050 | 0,034 | 0,052 |
|          | 179    | 0,000     | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,052 | 0,034 |
|          | 181    | 0,000     | 0,000 | 0,000 | 0,033 | 0,033 | 0,017 | 0,000 |
|          | 183    | 0,025     | 0,024 | 0,000 | 0,000 | 0,033 | 0,017 | 0,000 |
|          | 189    | 0,000     | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,034 |
|          | 199    | 0,000     | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,017 |

северотаежные популяции. Однако, несмотря на это, не выявлено статистически значимых различий в уровне генетической изменчивости у периферических и северотаежных популяций сосны обыкновенной, что свидетельствует о высокой степени однородности генофонда вида в западной части водосбора Белого моря и достаточной его представленности у краевых популяций сосны обыкновенной.

Как и в случае с елью финской, для популяций сосны обыкновенной выявлен более высокий уро-

вень ожидаемой гетерозиготности  $H_e$  по сравнению с наблюдаемой  $H_o$ . Однако разница оказалась статистически значимой только у Пяозеро\_C5, указывая на дефицит гетерозигот в этой популяции. В целом, исследованные популяции *Pinus sylvestris* характеризуются большим уровнем генетического разнообразия, выявленного с помощью микросателлитного анализа, по сравнению с данными, полученными ранее с помощью анализа изоферментов, для популяций из этой части ареала сосны обыкновенной [16].



Таблица 7

Уровень генетического разнообразия в популяциях *P. sylvestris*

| Популяция                | <i>n</i> | $A_{99} \%$       | $A_{95} \%$       | $N_e$             | $H_o$             | $H_e$             | $F$                 |
|--------------------------|----------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|
| Периферические популяции |          |                   |                   |                   |                   |                   |                     |
| Пасвик_С1                | 21       | $7,000 \pm 2,273$ | $3,500 \pm 0,645$ | $3,654 \pm 1,077$ | $0,512 \pm 0,46$  | $0,616 \pm 0,140$ | $0,110 \pm 0,107$   |
| Мурманск_С2              | 20       | $8,000 \pm 2,449$ | $5,000 \pm 1,472$ | $4,367 \pm 1,807$ | $0,513 \pm 0,164$ | $0,600 \pm 0,175$ | $0,126 \pm 0,162$   |
| Среднее                  |          | $7,500 \pm 1,558$ | $4,230 \pm 0,833$ | $4,010 \pm 0,983$ | $0,512 \pm 0,102$ | $0,608 \pm 0,104$ | $0,118 \pm 0,090$   |
| Северотаежные популяции  |          |                   |                   |                   |                   |                   |                     |
| Алакютти_С3              | 13       | $7,000 \pm 1,871$ | $4,000 \pm 0,707$ | $4,368 \pm 1,441$ | $0,558 \pm 0,167$ | $0,643 \pm 0,149$ | $0,107 \pm 0,151$   |
| Гридино_С4               | 30       | $8,500 \pm 2,661$ | $5,500 \pm 1,708$ | $5,455 \pm 2,372$ | $0,542 \pm 0,132$ | $0,688 \pm 0,124$ | $0,179 \pm 0,162$   |
| Пяозеро_С5               | 30       | $9,250 \pm 4,110$ | $3,750 \pm 0,854$ | $4,715 \pm 2,140$ | $0,417 \pm 0,135$ | $0,660 \pm 0,110$ | $0,333 \pm 0,207^*$ |
| Войница_С6               | 29       | $9,000 \pm 3,582$ | $5,500 \pm 1,708$ | $5,512 \pm 2,643$ | $0,474 \pm 0,158$ | $0,629 \pm 0,174$ | $0,164 \pm 0,186$   |
| Маслозеро_С7             | 29       | $9,500 \pm 4,052$ | $5,000 \pm 2,041$ | $5,774 \pm 3,590$ | $0,491 \pm 0,114$ | $0,603 \pm 0,142$ | $0,156 \pm 0,110$   |
| Среднее                  |          | $8,650 \pm 1,354$ | $4,840 \pm 0,756$ | $5,165 \pm 1,015$ | $0,496 \pm 0,058$ | $0,644 \pm 0,057$ | $0,188 \pm 0,068$   |
| Все популяции            |          |                   |                   |                   |                   |                   |                     |
| В среднем                |          | $8,321 \pm 1,054$ | $4,695 \pm 0,602$ | $4,835 \pm 0,774$ | $0,501 \pm 0,049$ | $0,634 \pm 0,049$ | $0,168 \pm 0,055$   |

Примечание. \*Разница между наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготностью достоверна при  $p < 0,05$ .

Таблица 8

Значения  $F$ -статистики Райта для популяций *P. sylvestris*

| Локусы    | $F$ -статистики   |                   |                   |
|-----------|-------------------|-------------------|-------------------|
|           | $F_{IS}$          | $F_{IT}$          | $F_{ST}$          |
| PtTX2123  | 0,003             | 0,044             | 0,041             |
| PtTX2146  | -0,091            | -0,070            | 0,019             |
| Spac11.8  | 0,570             | 0,586             | 0,037             |
| Spac12.5  | 0,233             | 0,264             | 0,041             |
| В среднем | $0,179 \pm 0,147$ | $0,206 \pm 0,144$ | $0,035 \pm 0,005$ |

Примечание.  $F_{IS}$  — коэффициент инбридинга особи относительно популяции;  $F_{IT}$  — коэффициент инбридинга особи относительно всего вида;  $F_{ST}$  — коэффициент инбридинга популяции относительно всего вида (показатель подразделенности популяций).

Результаты анализа подразделенности и межпопуляционной дифференциации с помощью  $F$ -статистик Райта представлены в табл. 8. Локусы PtTX2123 и PtTX2146, в отличие от Spac11.8 и Spac12.5, характеризовались минимальными значениями показателей  $F_{IS}$  и  $F_{IT}$ .

Коэффициент  $F_{ST}$ , показатель подразделенности популяций, варьировал от 0,019 для PtTX2146 до 0,041 для Spac12.5 и PtTX2123, составляя в среднем 0,035. Таким образом, большая часть общей генетической дисперсии (96,5 %), обнаруженной на основе исследования микросателлитных локусов, приходится на изменчивость внутри популяций сосны. Результаты анализа свидетельствуют о низком уровне межпопуляционной дифференци-

ации сосны обыкновенной в изученной части ареала и об однородности генофонда вида в западной части водосбора Белого моря.

Это подтверждается дендрограммой сходства, построенной с помощью метода UPGMA на основе матрицы генетических дистанций по Неи (рис. 3). В основную группу ( $D_N$  от 0,04 до 0,07) вошли с достоверной вероятностью ( $BP = 100 \%$ ) все популяции сосны обыкновенной — и периферические, и северотаежные, за исключением Алакютти\_С3, генетическое расстояние с которой у остальных популяций оказалось максимальным ( $D_N = 0,09$ ). Одной из причин относительно высокой генетической обособленности этой популяции может быть небольшой размер выборки ( $n = 13$ ).

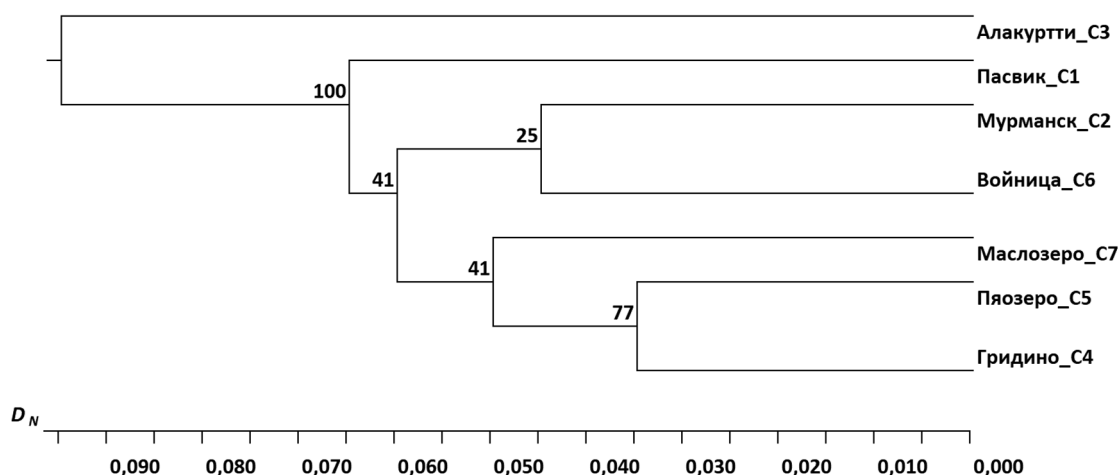


Рис. 3. Дендрограмма сходства карельских популяций сосны обыкновенной по генетическому расстоянию Ней ( $D_N$ ); в узлах дендрограммы указана бустреп-оценка BP в %

## ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, полученные данные относительно состояния генофонда основных лесообразующих видов — сосны обыкновенной и ели финской в западной части водораздела Белого моря — свидетельствуют о более высоком уровне генетического, в том числе аллельного, разнообразия у изученных популяций сосны и ели по микросателлитным локусам по сравнению с аналогичными результатами, полученными для этих и других хвойных видов с помощью изоферментов [14, 16–19]. В то же время данные относительно генетического разнообразия различных видов сосен и елей, полученные с помощью микросателлитных маркеров, свидетельствуют о более высоких значениях параметров их генетической изменчивости по сравнению с популяциями сосны обыкновенной и ели финской западной части водосбора Белого моря [20–23]. Причина такого уровня генетической изменчивости популяций в исследованной части ареала сосны и ели по ядерным микросателлитным локусам может быть связана с несколькими причинами. Одной из них является сравнительно недавнее (менее 10 000 лет назад) расселение в послеледниковый период рассматриваемых видов в Арктической зоне европейской части России. Другой причиной могут быть особенности распределения генетического разнообразия выбранных нами локусов среди изученных популяций этих видов.

В исследованной части ареала в некоторых популяциях как *Pinus sylvestris*, так и *Picea × fennica* (Regel) Ком. выявлен дефицит гетерозигот.

Подобное явление не редкость для популяций хвойных видов [19, 24]. Во многих публикациях отмечено, что подобный дефицит является нормальной составляющей генетической структуры популяций хвойных и может быть вызван инбридингом вследствие частичного самоопыления, эффектом Валунда — близкородственным скрещиванием при наличии семейной пространственной структуры насаждений, наличием нуль-аллелей и другими причинами [25–29].

Периферические популяции как сосны (Пасвик\_С1, Мурманск\_С2), так и ели (Пасвик\_Е1, Мурманск\_Е2), произрастающие на северной границе ареалов, не обнаружили снижения генетического разнообразия по сравнению с северотаежными популяциями этих видов. Напротив, периферические популяции ели характеризовались более высокими значениями основных параметров генетического, в том числе аллельного, разнообразия по сравнению с северотаежными. До сих пор нет единой точки зрения относительно того, какой уровень генетического полиморфизма должен быть в периферических (маргинальных, крайних) популяциях, находящихся на границе ареала. Существует мнение, подтвержденное исследованиями [30, 31], что уровень генетической изменчивости максимален в зоне оптимума и снижается по направлению к периферии ареала распространения вида. Однако результаты некоторых исследований [32, 33] фиксируют уровень генетического разнообразия у маргинальных популяций, сходный с центральными.

В последние годы появилась новая гипотеза, согласно которой пространственное распределение генетического разнообразия популяций большинства видов бореальной зоны, в том числе и хвойных древесных, обусловлено, главным образом, климатическими изменениями, происшедшими в четвертичный период [34]. Существует мнение, что периферические популяции, находящиеся на северной границе ареала, вследствие глобального потепления осваивающие новые территории, пригодные для произрастания и размножения, оказываются более приспособленными к меняющимся условиям по сравнению с популяциями противоположной, южной границы ареала [35].

В нашем случае, с учетом данных относительно повышения среднегодовой температуры, происходящего особенно быстро в Арктической зоне [36], высокий уровень генетической изменчивости в периферических популяциях может быть обусловлен как продвижением границы ареалов сосны обыкновенной и ели финской дальше на север, благодаря складывающимся на этой территории более благоприятным условиям, так и упомянутой выше историей послеледникового расселения этих видов.

Особый интерес к проблеме состояния и сохранения генетических ресурсов бореальных древесных видов диктуется фиксируемым в настоящее время и прогнозируемым в будущем влиянием на их генетическое разнообразие глобального изменения климата [37]. По данным исследований, посвященных этому вопросу, в последнее десятилетие выявлено рекордно быстрое за последние 100 лет повышение среднегодовой температуры [38].

Ю.Н. Кондрашева и др. [39] считают, что глобальное увеличение концентрации углекислого газа в атмосфере Земли создаст более благоприятные условия для роста, развития и процесса фотосинтеза высших растений. Это, в конечном счете, приведет к приросту биомассы в лесах. Однако повышение приземной температуры воздуха может сопровождаться увеличением частоты засух и жарких периодов, сокращением количества осадков, нарушением почвенно-гидрологического режима, увеличением частоты лесных пожаров и другими неблагоприятными для растений явлениями [40].

Некоторые ученые считают, что прогнозируемые изменения температуры могут привести к смещению границ климатических зон к северу [39, 41]. Даже незначительные колебания температуры в текущем столетии вызвали изменения ареалов распространения отдельных видов [42]. Однако эти изменения происходят медленно. Для древесных видов средняя скорость смещения ареала составляет несколько десятков километров в столетие [41]. Таким образом, сдвиг растительных зон будет отставать от климатических изменений. Отмечается также запаздывание ответной реакции лесных экосистем на климатические изменения, которое может составлять от десятков до сотен лет [41].

Необходимо отметить, что климатические изменения сильнее отражаются на видах, адаптированных к определенным местообитаниям. Часто такие виды характеризуются более низким уровнем генетического разнообразия, чем виды, занимающие ареал с широким спектром экологических условий [43]. В то же время лесные экосистемы, включающие такие широко распространенные виды, как сосна обыкновенная и ель европейская (включая ель сибирскую и гибридную), имеют большие диапазоны толерантности, позволяющие им достаточно легко переносить неблагоприятные воздействия внешней среды. Кроме того, вышеописанные отрицательные последствия глобального изменения климата касаются, главным образом, южных границ ареалов бореальных видов, на северном же пределе распространения потепление, напротив, способствует улучшению условий произрастания, увеличению семенной продуктивности, повышению эффективной численности периферических популяций и, как следствие, повышению уровня их генетического разнообразия.

Тем не менее для минимизации возможных отрицательных последствий глобального изменения климата (нарушение гидрологического режима, вредители, и болезни и т. п.) на лесные экосистемы, в том числе на состояние генетических ресурсов основных лесообразующих видов, необходимо организовать мониторинг ответных реакций экосистем на наблюдаемые изменения климата. Это прежде всего касается таких уязвимых природных систем, как северотаежные леса

Арктической зоны, включая сосновые и еловые леса водосбора Белого моря.

Выше отмечалась большая уязвимость популяций видов, характеризующихся низким уровнем генетического разнообразия и резким сокращением эффективной численности, что может привести к инбридингу (то есть к скрещиванию между близкородственными деревьями, и к уменьшению жизнеспособности потомства) и, в результате, к местному вымиранию насаждений. Следовательно, одной из главных мер по минимизации отрицательных последствий как антропогенного воздействия, так и изменения климата на лесные экосистемы должно стать поддержание на необходимом уровне генетического потенциала видов-эдикторов, эффективной численности их популяций путем содействия естественному возобновлению и созданию, где это необходимо, лесных культур. В большей степени это касается изученных популяций ели финской, характеризующихся большей уязвимостью вследствие среднего уровня их генетического разнообразия и высокой степенью межпопуляционной дифференциации.

Авторы выражают благодарность д-ру биол. наук директору Института леса КарНЦ РАН А.М. Крышено и канд. с.-х. наук заместителю директора по научной работе С.А. Мошникову за предоставленный экспериментальный материал по периферическим популяциям сосны и ели (заповедник «Пасвик»).

Исследование выполнено в рамках государственного задания КарНЦ РАН и при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-05-60296.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Pachauri RK, Reisinger A. Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Geneva (CH): IPCC. Intergovernmental Panel on Climate Change; 2008. 104 p.
2. Чуприян А.П., Веселов И.А., Сорокина И.В., Наумова Т.Е. Мероприятия, проводимые МЧС России по предупреждению и ликвидации чрезвычайных ситуаций в Арктике // Арктика: экология и экономика. — 2013. — № 1. — С. 70–77.
3. Лисицын А.П., Немировская И.А. Система Белого моря. Рассеянный осадочный материал гидросферы, микробные процессы и загрязнения. — М.: Научный мир, 2013. — 668 с. [Lisitsyn AP, Nemirovskaya IA. Sistema Belogo morya. Rasseyannyi osadochnyi material gidrosfery, mikrobnnye protsessy i zagryazneniya. Moscow: Nauchnyi mir; 2013. 668 p. (In Russ.)]
4. Филатов Н.Н., Тержевик А.Ю. Белое море и его водосбор под влиянием климатических и антропогенных факторов. — Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2007. — 349 с. [Filatov NN, Terzhevik AYU. Beloe more i ego vodosbor pod vliyaniem klimaticheskikh i antropogennykh faktorov. Petrozavodsk: Karel'skii nauchnyi tsentr RAN; 2007. 349 p. (In Russ.)]
5. Global plan of action for the conservation, sustainable use and development of forest genetic resources. Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy; 2014. 32 p.
6. Hodgetts RB, Aleksuk MA, Brown A, et al. Development of microsatellite markers for white spruce (*Picea glauca*) and related species. *Theor Appl Genet.* 2001;102(8):1252-1258. <https://doi.org/10.1007/s00122-001-0546-0>.
7. Scotti I, Magni F, Paglia G, Morgante M. Trinucleotide microsatellites in Norway spruce (*Picea abies*): their features and the development of molecular markers. *Theor Appl Genet.* 2002;106(1):40-50. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-0986-1>.
8. Elsie CG, Minihan VT, Hall SE, et al. Low-copy microsatellite markers for *Pinus taeda* L. *Genome.* 2000;43(3):550-555. <https://doi.org/10.1139/gen-43-3-550>.
9. Soranzo N, Provan J, Powell W. Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. *Mol Ecol.* 1998;7(9):1260-1261.
10. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics.* 1978;89(3):583-590.

11. Peakall R, Smouse PE. GenALEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 2006;6(1):288-295. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>.
12. Takezaki N, Nei M, Tamura K. POPTREEW: Web Version of POPTREE for constructing population trees from allele frequency data and computing some other quantities. *Mol Biol Evol*. 2014;31(6):1622-1624. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu093>.
13. Ли Ч.Ч. Введение в популяционную генетику / пер. с англ. Е.А. Салменковой, Е.Я. Тетушкина, под ред. Ю.П. Алтухова, Л.А. Животовского. — М.: Мир, 1978. — 555 с. [Li ChCh. First course in population genetics. Transl. from English E.A. Salmenkova; ed. by E.Ya. Tetushkin, Yu.P. Altukhov, L.A. Zhivotovskiy. Moscow: Mir; 1978. 555 p. (In Russ.)]
14. Потенко В.В., Ильинов А.А., Гончаренко Г.Г. Изучение генетической дифференциации популяций ели в Карелии с использованием метода изоферментного анализа // Селекция и семеноводство в Карелии. — Петрозаводск: КарНЦ РАН, 1993. — С. 66–76. [Potenko VV, Il'inov AA, Goncharenko GG. Izuchenie geneticheskoi differentsiatsii populyatsii eli v Karelii s ispol'zovaniem metoda izofermentnogo analiza. In: Selektsiya i semenovodstvo v Karelii. Petrozavodsk: KarNTs RAN; 1993. P. 66-76. (In Russ.)]
15. Шитиков В.К., Розенберг Г.С. Рандомизация и бутстреп: статистический анализ в биологии и экологии с использованием R. — Тольятти: Кассандра, 2013. — 314 с. [Shitikov VK, Rozenberg GS. Randomizatsiya i butstrep: statisticheskii analiz v biologii i ekologii s ispol'zovaniem R. Tol'yatti: Kassandra; 2013. 314 p. (In Russ.)]
16. Янбаев Ю.А., Тренин В.В., Шигапов З.Х., и др. Генетическая изменчивость и дифференциация сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*) на территории Карелии // Сб. стат. «Научные основы селекции древесных растений Севера». Петрозаводск: КарНЦ РАН, 1998. — С. 25–32. [Yanbaev YuA, Trenin VV, Shigapov ZKh, Chistyakov BA, Bakhtiyarova RM. Geneticheskaya izmenchivost' i differentsiatsiya sosny obyknovnoy (*Pinus sylvestris*) na territorii Karelii. In: Collected papers: "Nauchnye osnovy selektzii drevesnykh rastenii Severa". Petrozavodsk: KarNTs RAN; 1998. P. 25-32. (In Russ.)]
17. Гончаренко Г.Г., Падутов В.Е., Силин А.Е. Генетическая структура, изменчивость и дифференциация в популяциях *Pinus sibirica* Du Tour // Генетика. — 1992. — № 28. — С. 114–128. [Goncharenko GG, Padutov VE, Silin AE. Geneticheskaya struktura, izmenchivost' i differentsiatsiya v populyatsiyakh *Pinus sibirica* Du Tour. *Genetika*. 1992;(28):114-128. (In Russ.)]
18. Кравченко А.Н., Экарт А.К., Ларионова А.Я. Аллозимное разнообразие и дифференциация популяций ели сибирской в западном Забайкалье и Монголии // Хвойные бореальной зоны. — 2012. — Т. 30. — № 1–2. — С. 97–101. [Kravchenko AN, Ekart AK, Larionova AY. Allozimnoe raznoobrazie i differentsiatsiya populyatsii eli sibirskoi v zapadnom Zabaikal'e i Mongolii. *Khvoynye boreal'noi zony*. 2012;30(1-2):97-101. (In Russ.)]
19. Сурсо М.В. Репродуктивная биология и полиморфизм хвойных видов (семейства *Pinaceae* Lindl., *Cupressaceae* Rich. ex Bartl.) Европейского Севера России (Архангельская обл.): Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. — Архангельск, 2013. — 43 с. [Surso MV. Reproduktivnaya biologiya i polimorfizm khvoynykh vidov (semeistva *Pinaceae* Lindl., *Cupressaceae* Rich. ex Bartl.) Evropeiskogo Severa Rossii (Arkhangel'skaya obl.) [dissertation abstract] Arkhangel'sk; 2013. 43 p. (In Russ.)]. Доступно по: <https://search.rsl.ru/ru/record/01005545202>. Ссылка активна на 15.03.2020.
20. Экарт А.К., Семерикова С.А., Семериков В.Л., и др. Применение различных типов генетических маркеров для оценки уровня внутривидовой дифференциации ели сибирской // Сибирский лесной журнал. — 2014. — № 4. — С. 84–91. [Ekart AK, Semerikova SA, Semerikov VL, et al. The use of genetic markers of various types for evaluation of intraspecific differentiation level of the siberian spruce. *Sibirskii lesnoi zhurnal*. 2014;(4):84-91. (In Russ.)]
21. Gutkowska J, Borys M, Tereba A, et al. Genetic variability and health of Norway spruce stands in the Regional Directorate of the State Forests in

- Krosno. *Forest Research Papers*. 2017;78(1):56-66. <https://doi.org/10.1515/frp-2017-0006>.
22. Stojnić S, Avramidou E, Fussi B, et al. Assessment of genetic diversity and population genetic structure of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karsten) at Its southern lineage in Europe. Implications for conservation of forest genetic resources. *Forests*. 2019;10(3):258. <https://doi.org/10.3390/f10030258>.
  23. Tóth EG, Tremblay F, Housset JM, et al. Geographic isolation and climatic variability contribute to genetic differentiation in fragmented populations of the long-lived subalpine conifer *Pinus cembra* L. in the western Alps. *BMC Evol Biol*. 2019;19(1):190. <https://doi.org/10.1186/s12862-019-1510-4>.
  24. Петрова Е.А., Горошкевич С.Н., Белоконов М.М., и др. Генетическое разнообразие кедров сибирского *Pinus sibirica* Du Tour: распределение вдоль широтного и долготного профилей // Генетика. — 2014. — Т. 50. — № 5. — С. 538. [Petrova EA, Goroshkevich SN, Belokon' MM, et al. Distribution of the genetic diversity of the Siberian stone pine, *Pinus sibirica* Du Tour, along the latitudinal and longitudinal profiles. *Genetika*. 2014;50(5):538. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.7868/s0016675814050105>.
  25. Hamrick JL, Godt MJ, Sherman-Broyles SL. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests*. 1992;6(1-4):95-124. <https://doi.org/10.1007/bf00120641>.
  26. Политов Д.В. Аллозимный полиморфизм, генетическая дифференциация и система скрещивания сибирской кедровой сосны *Pinus sibirica* Du Tour: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 1989. — 19 с. [Politov DV. Allozimnyi polimorfizm, geneticheskaya differentsiatsiya i sistema skreshchivaniya sibirskoi kedrovoy sosny *Pinus sibirica* Du Tour. [dissertation abstract] Moscow; 1989. 19 p. (In Russ.)]. Доступно по: <https://search.rsl.ru/ru/record/01000002947>. Ссылка активна на 15.03.2020.
  27. Politov D. Allozyme polymorphism, heterozygosity, and mating system of stone pines. Proceedings of the International Workshop on Subalpine Stone Pines and Their Environment, the Status of Our Knowledge. 1994:36-42.
  28. Lee S, Choi W, Norbu L, Pradhan R. Genetic diversity and structure of blue pine (*Pinus wallichiana* Jackson) in Bhutan. *Forest Ecol Management*. 1998;105(1-3):45-53. [https://doi.org/10.1016/s0378-1127\(97\)00268-5](https://doi.org/10.1016/s0378-1127(97)00268-5).
  29. Мудрик Е.А., Белоконов М.М., Белоконов Ю.С., Политов Д.В. Применение микросателлитных маркеров в геногеографических исследованиях хвойных // Мат. Всерос. конф. «Водные и наземные экосистемы: проблемы и перспективы исследований». — Вологда, 2008. — С. 78–81. [Mudrik EA, Belokon' MM, Belokon' YuS, Politov DV. Primenenie mikrosatelitnykh markerov v genogeograficheskikh issledovaniyakh khvoynykh. (Conference proceedings) Mat. Vseros. konf. "Vodnye i nazemnye ekosistemy: problemy i perspektivy issledovaniy". Vologda; 2008. P. 78-81. (In Russ.)]
  30. Aitken SN, Libby WJ. Evolution of the Pygmy-Forest Edaphic Subspecies of *Pinus contorta* A across an ecological staircase. *Evolution*. 1994;48(4):1009-1019. <http://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1994.tb05289.x>.
  31. Ledig FT. Founder effects and the genetic structure of Coulter pine. *J Hered*. 2000;91(4):307-315. <https://doi.org/10.1093/jhered/91.4.307>.
  32. Hamann A, El-Kassaby YA, Koshy MP, Namkoong G. Multivariate analysis of allozymic and quantitative trait variation in *Alnus rubra*: geographic patterns and evolutionary implications. *Canadian J Forest Research*. 1998;28(10):1557-1565. <https://doi.org/10.1139/x98-135>.
  33. Gamache I, Jaramillo-Correa JP, Payette S, Bousquet J. Diverging patterns of mitochondrial and nuclear DNA diversity in subarctic black spruce: imprint of a founder effect associated with postglacial colonization. *Mol Ecol*. 2003;12(4):891-901. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2003.01800.x>.
  34. Hewitt GM. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2004;359(1442):183-195. <https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1388>.
  35. Hampe A, Petit RJ. Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters. *Ecol Lett*. 2005;8(5):461-467. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00739.x>

36. Шиятов С.Г., Мазепа В.С., Моисеев П.А., Братухина М.Ю. Изменения климата и их влияние на горные экосистемы национального парка «Таганай» за последние столетия // Влияние изменений климата на экологию охраняемых природных территорий России. Анализ многолетних наблюдений / под ред. А. Кокорина, А. Кожаринова, А. Минина. — М., 2001. — С. 16–31. [Shiyatov SG, Mazepa VS, Moiseyev PA, Bratukhina MYu. Izmeneniya klimata i ikh vliyanie na gornye ekosistemy natsional'nogo parka "Taganai" za poslednie stoletiya. In: Vliyanie izmenenii klimata na ekologiyu okhranyaemykh prirodnnykh territorii Rossii. Analiz mnogoletnikh nablyudenii. Ed. by A. Kokorin, A. Kozharinov, A. Minin. Moscow; 2001. P. 16-31. (In Russ.)]
37. Падутов В.Е., Хотылева Л.В., Баранов О.Ю., Ивановская С.И. Генетические эффекты трансформации лесных экосистем // Экологическая генетика. — 2008. — Т. 6. — № 1. — С. 3–11. [Padutov VE, Khotyleva LV, Baranov OYu, Ivanovskaya SI. Genetic effects of transformation of forest ecosystems. *Ecological genetics*. 2008;6(1):3-11. (In Russ.)]
38. Houghton JT, Meira Filho LG, Callander BA, et al. Climate change 1995. The science of climate change. Contribution of Working Group 1 to the Second Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Xii. *Cambridge University Press (CUP)*. 1996;76(3):836-836. <https://doi.org/10.1017/s002531540003157x>.
39. Кондрашева Н.Ю., Кобак К.И., Турчинович И.Е. Возможные реакции наземной растительности на увеличение концентрации CO<sub>2</sub> в атмосфере и глобальное потепление // Лесоведение. — 1993. — № 4. — С. 71–76. [Kondrasheva NYu, Kobak KI, Turchinovich IE. Vozmozhnye reaktsii nazemnoi rastitel'nosti na uvelichenie kontsentratsii SO<sub>2</sub> v atmosfere i global'noe poteplenie. *Lesovedenie*. 1993;(4):71-76. (In Russ.)].
40. Гитарский М.Л., Карабань Р.Т. Реакция лесных экосистем Европейской части России на изменения климата (по данным многолетних наблюдений в заповедниках) // Влияние изменений климата на экологию охраняемых природных территорий России. Анализ многолетних наблюдений / под ред. А. Кокорина, А. Кожаринова, А. Минина. — М., 2001. — С. 24–27. [Gitarskii ML, Karaban' RT. Reaktsiya lesnykh ekosistem Evropeiskoi chasti Rossii na izmeneniya klimata (po dannym mnogoletnikh nablyudenii v zapovednikakh). In: Vliyanie izmenenii klimata na ekologiyu okhranyaemykh prirodnnykh territorii Rossii. Analiz mnogoletnikh nablyudenii. Ed. by A. Kokorin, A. Kozharinov, A. Minin. Moscow; 2001. P. 24-27. (In Russ.)]
41. Величко А.А. Зональные и макрорегиональные изменения ландшафтно-климатических условий, вызванных «парниковым эффектом» // Изв. РАН. Сер. геогр. — 1992. — № 2. — С. 89–102. [Velichko AA. Zonal'nye i makroregional'nye izmeneniya landshaftno-klimaticheskikh uslovii, vyzvannykh "parnikovym effektom". *Izv. RAN. Ser. geogr.* 1992;(2):89-102. (In Russ.)]
42. Шиятов С.Г. Климатогенная динамика лесотундровых редколесий и методические подходы к ее изучению // Мат. симпозиума «Северные леса: состояние, динамика, антропогенное воздействие», Архангельск, 16–26 июля 1990. — М., 1990. — С. 69–71. [Shiyatov SG. Klimatogennaya dinamika lesotundrovyykh redkolesii i metodicheskie podkhody k ee izucheniyu. (Conference proceedings) "Severnye lesa: sostoyanie, dinamika, antropogennoe vozdeistvie"; Arkhangelsk, July 16–26, 1990. Moscow; 1990. P. 69-71. (In Russ.)]
43. Гончаренко Г.Г., Падутов В.Е. Популяционная и эволюционная генетика елей Палеарктики. — Гомель: ИЛ НаНБ, 2001. — 206 с. [Goncharenko GG, Padutov VE. Populyatsionnaya i evolyutsionnaya genetika elei Palearktiki. Gomel': IL NaNB; 2001. 206 p. (In Russ.)]

## ✿ Информация об авторах

**Алексей Алексеевич Ильинов** — канд. с.-х. наук, старший научный сотрудник, отдел комплексных научных исследований. ИЛ КарНЦ РАН, Петрозаводск. SPIN: 2850-3404. E-mail: ialexa33@yandex.ru.

## ✿ Authors and affiliations

**Aleksey A. Ilinov** — PhD, Senior Researcher. Forest Research Institute of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia. SPIN: 2850-3404. E-mail: ialexa33@yandex.ru.

## ✿ Информация об авторах

**Борис Владимирович Раевский** — д-р с.-х. наук, старший научный сотрудник, отдел комплексных научных исследований. ФГБУН ФИЦ КарНЦ РАН, Петрозаводск. SPIN: 2136-7785. E-mail: borisraevsky@gmail.com.

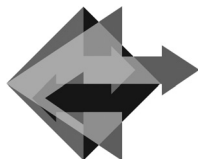
**Ольга Владимировна Чирва** — отдел комплексных научных исследований. ФГБУН ФИЦ КарНЦ РАН, Петрозаводск. SPIN: 4755-2713. E-mail: tchirva.olga@yandex.ru.

## ✿ Authors and affiliations

**Boris V. Raevsky** — Doctor of Science, Senior Researcher, Department of Multidisciplinary Scientific Research. Karelian Research Centre of the Russian Academy of Science, Petrozavodsk, Russia. SPIN: 2136-7785. E-mail: borisraevsky@gmail.com.

**Olga V. Chirva** — Junior Researcher, Department of Multidisciplinary Scientific Research. Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences. Petrozavodsk, Russia. SPIN: 4755-2713. E-mail: tchirva.olga@yandex.ru.





## ТЕХНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРОВЕДЕНИЯ ЭТАПА ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В МЕТОДЕ ДНК-КОМЕТ

© А.К. Жанатаев, Е.А. Анисина, К.Л. Плигина, А.А. Лисицын, А.Д. Дурнев

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова», Москва

Для цитирования: Жанатаев А.К., Анисина Е.А., Плигина К.Л., и др. Технические аспекты проведения этапа электрофореза в методе ДНК-комет // Экологическая генетика. — 2020. — Т. 18. — № 2. — С. 203–214. <https://doi.org/10.17816/ecogen16239>.

Поступила: 24.09.2019

Одобрена: 20.01.2020

Принята: 23.06.2020

❁ Причины меж- и внутрилабораторной вариабельности данных, полученных в исследованиях методом ДНК-комет, на сегодняшний день не до конца ясны. Гель-электрофорез является определяющим этапом при использовании метода анализа поврежденности ДНК единичных клеток. В настоящей работе проведена сравнительная оценка расчетной и фактической напряженности электрического поля в пяти различных электрофоретических камерах и вклада выявляемых различий в вариабельность оцениваемой поврежденности ДНК. Только для одной камеры измеренная напряженность совпала с расчетной — 1 В/см, тогда как для четырех варьировала от 0,6 до 2,0 В/см. Оцененные в одних и тех же образцах клеток почек мышей значения поврежденности ДНК различались между камерами до 4,7 крат для индуцированной и до 10 крат для спонтанной поврежденности ДНК. Выявлена высокая локальная вариация напряженности электрического поля и температуры раствора по площадке камер и вариабельность поврежденности ДНК в идентичных образцах клеток в условиях одного электрофореза. Таким образом, несоответствие при электрофорезе расчетной (теоретической) и фактической напряженности электрического поля может служить причиной межлабораторной вариабельности данных метода ДНК-комет. Рециркуляция раствора в ходе электрофореза позволяет значительно снизить внутриэкспериментальную и внутрилабораторную вариабельность результатов.

❁ **Ключевые слова:** метод ДНК-комет; повреждение ДНК; меж- и внутрилабораторная вариабельность; электрофоретическая камера; напряженность электрического поля; напряжение.

## TECHNICAL ASPECTS OF THE ELECTROPHORESIS STAGE IN THE COMET ASSAY

© A.K. Zhanataev, E.A. Anisina, K.L. Pligina, A.A. Lisitsyn, A.D. Durnev

Zakusov Research Institute of Pharmacology, Moscow, Russia

Cite this article as: Zhanataev AK, Anisina EA, Pligina KL, et al. Technical aspects of the electrophoresis stage in the comet assay. *Ecological genetics*. 2020;18(2):203-214. <https://doi.org/10.17816/ecogen16239>.

Received: 24.09.2019

Revised: 20.01.2020

Accepted: 23.06.2020

❁ Inter- and intralaboratory variability of results is still a serious issue in the comet assay. There are several technical conditions of procedure, which may critically affect the results and electrophoresis terms were identified as main. A comparative assessment of the expected and actual electric field strength in five electrophoretic tanks and the contribution of the revealed differences to the variability in DNA damage carried out. Only for one tank, the measured electric field strength coincided with the expected 1 V/cm, while for four it ranged from 0.6 to 2.0 V/cm. The values of DNA damage assessed in the same samples of mouse kidney cells differed between tanks up to 4.7-fold for induced and up to 10-fold for spontaneous DNA damage. High local variations in the electric field strength and solution temperature across the platform as well as in %DNA in the tail of identical cell samples within electrophoresis runs also revealed. These variations were reduced by recirculation of electrophoresis solution. The results show that discrepancy between the estimated and the actual electric field strength can be reason of inter-laboratory variation of the comet assay results. Recirculation of the solution during electrophoresis will be useful to control of intra-laboratory and intra-assay variations.

❁ **Keywords:** comet assay; inter- and intralaboratory variability; DNA damage; electric field strength; voltage; electrophoresis tank.

## ВВЕДЕНИЕ

Оценка уровней первичных повреждений ДНК в качестве биомаркера в медико-биологических и генотоксикологических исследованиях *in vitro*

и *in vivo* получила широкое распространение с внедрением в практику метода гель-электрофореза отдельных клеток (SCGE, метод ДНК-комет) [1, 2].

Важными характеристиками метода, в особенности при использовании в качестве экспертного теста в генотоксикологии, является его точность и воспроизводимость. Меж- и внутрилабораторная вариабельность данных, получаемых методом ДНК-комет, остается нерешенной проблемой, порождающей получение неопределенных или противоречивых данных [3, 4].

Европейской группой по валидации метода ДНК-комет (The European Comet Assay Validation Group, ECVAG) были проведены масштабные международные сличительные испытания, целью которых явилось определение меж- и внутрилабораторной сходимости и воспроизводимости данных метода ДНК-комет [5, 6]. Результаты исследований продемонстрировали высокую вариабельность данных между лабораториями, причиной которой, по заключению специалистов, явилось использование различных протоколов проведения метода. Было установлено, что критическими методическими факторами, определяющими результаты метода ДНК-комет, являются концентрация агарозного геля, длительность щелочной денатурации/электрофореза и напряженность электрического поля [3, 4, 7]. Температура раствора в ходе электрофореза также оказывает значительное влияние на оцениваемые показатели [8, 9]. Стандартизация экспериментальных процедур в последующих исследованиях ECVAG позволила снизить внутрилабораторную вариабельность результатов, однако межлабораторная осталась на высоком уровне [10–12].

Использование лабораториями различного оборудования *a priori* не позволяет полностью стандартизовать протокол исследования. Технические средства получения и анализа изображений ДНК-комет не оказывают существенного влияния на получаемые результаты, тогда как вклад в вариабельность данных особенностей используемого для этапа гель-электрофореза оборудования остается не до конца изученным [13–15].

Традиционно в методе ДНК-комет применяются электрофоретические камеры, предназначенные для агарозного гель-электрофореза нуклеиновых кислот или специально разработанные под метод камеры схожей конструкции. При этом напряженность электрического поля, как и для гель-электрофореза нуклеиновых кислот, определяется от-

ношением подаваемого напряжения к расстоянию между электродами [15, 16]. Неоднократно высказывалось мнение, что такой принцип расчета напряженности при щелочном электрофорезе ДНК-комет может быть ошибочным [4, 15, 17]. Вместе с тем, только в единственной работе на примере единичной электрофоретической камеры была проведена оценка соответствия между расчетной и фактической напряженностью электрического поля [3].

*Цель настоящего исследования* — сравнительная оценка расчетной и фактической напряженности электрического поля в пяти различных электрофоретических камерах и вклада выявляемых различий в вариабельность показателей спонтанной и индуцированной поврежденности ДНК.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Получение слайдов ДНК-комет.** Исследование выполнено на половозрелых самцах мышей-гибридов  $F_1$  (СВА  $\times$  С57Bl/6), массой 22–24 г, в возрасте 6–8 недель, полученных из питомника лабораторных животных «Столовая». Эксперименты проводили в соответствии с международными правилами (Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях) и с одобрения Комиссии по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» (протокол № 6 от 04.07.19). С целью соответствия принципам 3R использовали образцы тканей животных, задействованных в качестве позитивного и негативного контроля в доклинических исследованиях лекарственных средств.

Для индукции повреждений ДНК животным вводили внутривенно метилметансульфонат (ММС, Sigma-Aldrich) в дозе 30 мг/кг. Животным негативного контроля вводили тем же путем эквивалентные объемы физиологического раствора. Через 3 ч после введения физиологического раствора или ММС животных выводили из эксперимента путем декапитации. В первой серии экспериментов проводили оценку поврежденности ДНК в клетках почек, для второй серии экспериментов использовали клетки почек и костного мозга.

Выделяли бедренные кости, срезали эпифизы и вымывали клетки костного мозга 2 мл пред-

варительно охлажденного до 6 °С фосфатно-солевого буфера, содержащего 20 мМ EDTA-Na<sub>2</sub> и 10 % диметилсульфоксид (pH 7,4). Почки измельчали в стеклянной пробирке в 3 мл того же буфера, раздавливали стеклянной палочкой и выдерживали 5 мин при комнатной температуре для осаждения крупных фрагментов ткани.

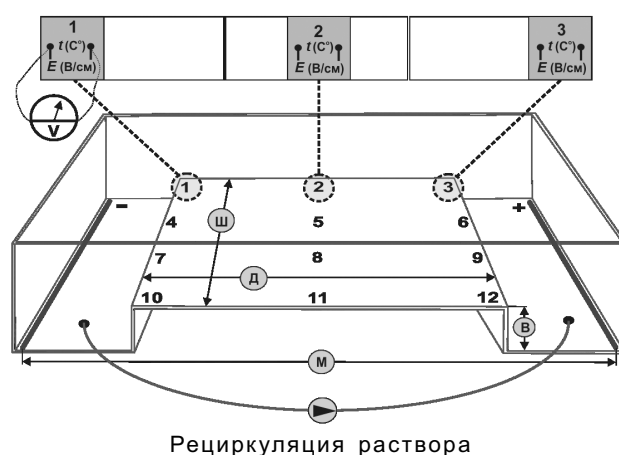
Для каждой серии экспериментов готовили идентичные слайды из одной суспензии клеток. Для этого суспензию клеток в объеме 60 мкл вносили в пробирки с 240 мкл 1 % раствора легкоплавкой агарозы в фосфатно-солевом буфере, подогретой до 42 °С (микротермостат «Термит», Россия) и ресуспендировали. Готовили несколько таких пробирок. По 35 мкл раствора агарозы с клетками наносили на предварительно покрытые 1 % универсальной агарозой предметные стекла, накрывали покровным стеклом (24 × 24 мм) и помещали на лед. Покровные стекла осторожно удаляли, микропрепараты помещали в стеклянную кювету (тип Шиффендекер) с охлажденным до 4 °С лизирующим буфером (10 мМ Tris-HCl [pH 10], 2,5 М NaCl, 100 мМ EDTA-Na<sub>2</sub>, 1 % Triton X-100, 10 % диметилсульфоксид) и инкубировали в течение 1 ч [22]. После окончания лизиса слайды помещали в кюветы с охлажденным до 6 °С раствором для электрофореза (300 мМ NaOH, 1 мМ EDTA-Na<sub>2</sub>, pH > 13) и инкубировали в течение 20 мин для денатурации ДНК и реализации щелочно-лабильных сайтов.

**Электрофорез.** Электрофорез проводили в электрофоретических камерах SE-2 (Хеликон), Sub-Cell 192 (BioRad), multiSUB Screen 32, CSL-COM40 и COMPAC-50 (Clever Scientific) в охлажденном до 6 °С растворе для электрофореза в течение 20 мин при начальной силе тока 300 мА (источник питания Power PRO 300, Cleaver Scientific). В камерах CSL-COM40, Sub-Cell 192 и multiSUB Screen 32 слайды с клетками располагали на 12 участках площадки камер, согласно схеме на рис. 1. Оставшееся пространство на площадке заполняли слайдами с агарозой без клеток таким образом, чтобы между слайдами не оставалось пробелов. В камеру SE-2 помещали 8 слайдов с клетками, которые полностью заполняли площадку камеры.

Подаваемое напряжение (В) равнялось расстоянию (см) между электродами камеры — расчет-

ная напряженность электрического поля 1 В/см. Определение фактической напряженности электрического поля проводили измерением разности потенциалов в электрофорезном растворе на высоте ~1 мм над слайдами (мультиметр Mastech MAS838 с позолоченными щупами) в начале электрофореза (0–1 минута) и в конце (19–20-я минута).

В первой серии экспериментов фактическую напряженность электрического поля определяли путем измерения разности потенциалов между двумя точками в срединной части площадки камеры, расположенными на расстоянии 10 см. Для камеры COMPAC-50 проводили измерение разности потенциалов между двумя точками на расстоянии 7,6 см (по ширине слайда) в левой и правой частях камеры погружением щупов в раствор для электрофореза на глубину 1 мм возле поверхности слайдов. Во второй серии экспериментов для оценки локальной напряженности электрического поля измеряли разность потенциалов на сантиметровом отрезке над слайдами с клетками (рис. 1). Измерение температуры электрофорезного раствора на этих же участках во второй серии экспериментов проводили с помощью цифрового пирометра DT-8860В (СЕМ). Во всех случаях определяли среднее значение для трех измерений. В экспериментах с рециркуляцией электрофорезного раствора использовали перистальтический насос ВЗ-V PER (Etatron D.S.) с устойчивым к щелочным



**Рис. 1.** Геометрические параметры камер, расположение слайдов с клетками на площадке и участки (обозначены цифрами 1–12) определения локальной напряженности электрического поля и температуры электрофорезного раствора в камерах CSL-COM40, Sub-Cell 192 и multiSUB Screen 32. М — межэлектродное расстояние; В — высота, Д — длина, Ш — ширина площадки камер

растворам шлангом из сантопрена (Santoprene®). В ходе электрофореза раствор из катодного резервуара камеры подавался в анодный со скоростью, обеспечивающей смену 1,5 объемов раствора в резервуарах (рис. 1).

**Анализ препаратов.** После электрофореза слайды отмывали в фосфатно-солевом буфере, фиксировали в 70 % растворе этилового спирта в течение 15 мин, высушивали и хранили до анализа при комнатной температуре. Слайды окрашивали флуоресцирующим красителем SYBR Green I (Invitrogen, 1 : 10000 в ТЕ-буфере с 50 % глицерином, pH 8,5) в течение 20 мин. Цифровые изображения со слайдов (по 10–15 на слайд) получали на эпифлуоресцентном микроскопе Микмед-2 12Т («Ломо», Россия) с помощью камеры высокого разрешения (VEC-335, «ЭВС», Россия) при общем увеличении  $\times 800$  (оптическое —  $\times 20$ , цифровое —  $\times 40$ ). На каждом слайде с использованием программного обеспечения CASP 1.2.2 анализировали по 100 ДНК-комет и вычисляли среднее значение процентного содержания ДНК в «хвосте» ДНК-комет (ДНК в «хвосте», %).

Проверку гипотезы о равенстве средних значений показателя поврежденности ДНК для электрофореза с и без рециркуляции проводили с исполь-

зованием *U*-критерия Манна — Уитни. Проверку равенства генеральных дисперсий выборок проводили с использованием *F*-критерия Фишера.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В табл. 1 представлены геометрические характеристики использованных камер и измеренные в ходе электрофореза реальные значения напряженности электрического поля (первая серия экспериментов). Только для CSL-COM40 измеренное значение совпало с расчетным. Для камеры SE-2 различие между расчетным и измеренным значениями оказалось наименьшим. Камера Sub-Cell 192 комплектуется устанавливаемой поверх площадки дополнительной платформой, позволяющей увеличить размер агарозного геля и, соответственно, количество слайдов при использовании камеры для метода ДНК-комет. При проведении электрофореза с дополнительной платформой измеренное значение напряженности составило 1,2 В/см, тогда как без нее напряженность возрастала до 2,0 В/см.

В камере multiSUB Screen 32 при подаваемом напряжении 46 В и высоте электрофорезного раствора над стеклами ~2 мм сила тока составила ~420 мА. Понижение силы тока до рекоменду-

Таблица 1

**Геометрические параметры электрофоретических камер и значения спонтанной и индуцированной поврежденности ДНК в клетках почек мышей при электрофорезе с расчетной и фактической напряженностью электрического поля 1 В/см**

| Наименование<br>камеры          | Параметры<br>камеры, см |                  |      |    | Объем<br>раство-<br>ра, мл* | При расчете подаваемого<br>напряжения по измерению М |                                        |                        | При $E = 1$ В/см      |                                     |                        |
|---------------------------------|-------------------------|------------------|------|----|-----------------------------|------------------------------------------------------|----------------------------------------|------------------------|-----------------------|-------------------------------------|------------------------|
|                                 | Ш                       | В                | Д    | М  |                             | $E$ , В/см**                                         | ДНК в «хвосте», %<br>( $m \pm SD$ )*** |                        | Напря-<br>жение,<br>В | ДНК в «хвосте», %<br>( $m \pm SD$ ) |                        |
|                                 |                         |                  |      |    |                             |                                                      | контроль                               | ММС в дозе<br>30 мг/кг |                       | контроль                            | ММС в дозе<br>30 мг/кг |
| SE-2                            | 13                      | 2,4              | 17,6 | 27 | 550                         | 1,1                                                  | $1,9 \pm 0,9$                          | $13,1 \pm 1,7$         | 26                    | $1,6 \pm 0,8$                       | $12,2 \pm 1,5$         |
| CSL–COM40                       | 35,5                    | 3,3              | 14,5 | 25 | 1900                        | 1,0                                                  | $3,4 \pm 2,8$                          | $13,3 \pm 3,7$         |                       |                                     |                        |
| Sub-Cell 192<br>(без платформы) | 26                      | 4,1              | 15,2 | 32 | 2080                        | 2,0                                                  | $9,0 \pm 1,7$                          | $20,7 \pm 1,9$         | 24                    | $1,7 \pm 0,7$                       | $9,9 \pm 0,9$          |
| Sub-Cell 192<br>(с платформой)  | 26                      | 4,6              | 25,7 | 32 | 2150                        | 1,2                                                  | $2,2 \pm 0,3$                          | $15,5 \pm 2,9$         | 30                    | $1,5 \pm 0,4$                       | $12,8 \pm 2,2$         |
| multiSUB Screen 32              | 27                      | 2,5              | 32   | 46 | 1280                        | 1,4                                                  | $4,9 \pm 1,9$                          | $16,7 \pm 3,2$         | 38                    | $1,8 \pm 0,5$                       | $11,8 \pm 1,6$         |
| COMPAC-50                       | 10,6                    | 3,2 <sup>#</sup> | 18   | 21 | 550                         | 0,6                                                  | $0,9 \pm 0,3$                          | $4,6 \pm 0,6$          | 28                    | $1,5 \pm 0,8^{##}$                  | $12,9 \pm 2,1^{##}$    |

*Примечание.* \* Высота электрофорезного раствора над стеклами ~2 мм. \*\* Измерения проведены в начале электрофореза при силе тока ~300 мА (кроме камер COMPAC-50 и multiSUB Screen 32; см. в тексте). \*\*\* Для 12 слайдов (камеры CSL-COM40, Sub-Cell 192 и multiSUB Screen 32) и для 8 слайдов (камеры COMPAC-50 и SE-2). # Высота столба электрофорезного раствора (рис. 2). ## Электрофорез 30 мин. Ш — ширина, В — высота, Д — длина площадки камер; М — межэлектродное расстояние (рис. 1). ММС — метилметансульфонат.

емых 300 мА удалением части раствора оказалось технически невозможным, поскольку в этом случае раствор не покрывал слайды. Измеренная напряженность при указанных параметрах оказалась значительно выше расчетной — 1,4 В/см.

Камера COMPAS-50 имеет уникальную запатентованную конструкцию с вертикальной ориентацией слайдов ДНК-комет (рис. 2), имеющую преимущества в виде компактности и большой вместимости (до 50 слайдов). Измерения показали, что при рекомендуемом производителем напряжении 21 В значение напряженности электрического поля возле поверхности слайдов составляет 0,6 В/см.

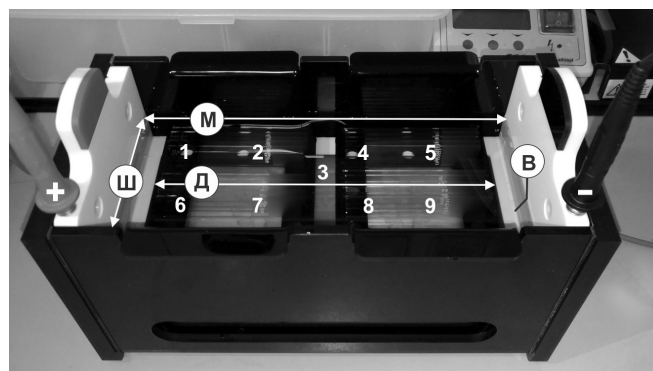
Анализ препаратов ДНК-комет выявил высокую вариабельность в уровнях спонтанных и индуцированных повреждений ДНК, оцененных для одного и того же образца клеток почек мышей при проведении электрофореза в различных камерах (табл. 1, рис. 3). Наибольшие значения уровней поврежденности ДНК были получены при использовании камеры Sub-Cell 192 без платформы ( $E = 2,0$  В/см), наименьшие — для камеры COMPAS-50 ( $E = 0,6$  В/см).

Эмпирически для камер было подобрано подаваемое напряжение, при котором напряженность электрического поля составляет 1 В/см (табл. 1) и эксперименты с препаратами клеток почек мышей были повторены. В результате унификации напряженности электрического поля в камерах были получены сходные уровни как спонтанных, так и индуцированных повреждений ДНК. Исключение составила камера COMPAS-50, для которой сходные результаты были получены при проведении электрофореза в течение 30 мин (1 В/см, 680 мА; см. ниже).

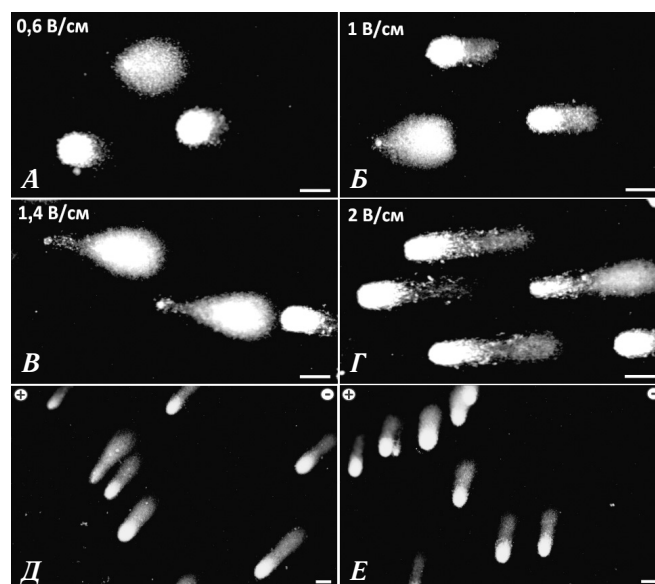
В ходе анализа данных был выявлен значительный разброс средних показателей поврежденности ДНК между идентичными слайдами, полученными в условиях одного электрофореза. Для камеры CSL-COM40 он оказался наибольшим, от 1,1 до 8,8 % ДНК в «хвосте» для спонтанной поврежденности ДНК и от 4,1 до 17,9 % ДНК в «хвосте» для индуцированной. Было выдвинуто предположение, что наблюдаемая вариабельность данных может быть обусловлена неоднородностью напряженности поля и/или температуры по площадке камер. В описанных выше

экспериментах напряженность поля определяли путем измерения разности потенциалов над слайдами на десятисантиметровом отрезке в срединной части площадки камер. Далее в камере CSL-COM40 провели определение напряженности на 12 участках площадки (рис. 1) измерением разности потенциалов на сантиметровом отрезке над слайдами в стандартных условиях и с рециркуляцией электрофорезного раствора. Одновременно на этих участках определяли температуру электрофорезного раствора.

Измерения выявили выраженные различия напряженности, варьирующей от 0,8 до 1,5 В/см в начале электрофореза и от 1,0 до 1,3 В/см



**Рис. 2.** Камера COMPAS-50 с вертикальной ориентацией слайдов. 1–9 — участки определения напряженности электрического поля. М — межэлектродное расстояние; В — высота раствора для электрофореза, Д — длина, Ш — ширина резервуара камеры



**Рис. 3.** Морфология ДНК-комет в зависимости от напряженности электрического поля (А, Б, В и Г; электрофорез 20 мин) и при увеличении скорости рециркуляции в 2 раза (Д и Е; камера multiSUB Screen 32). Шкала — 50 мкм

Таблица 2

Значения напряженности электрического поля и температуры электрофорезного раствора на 12 участках площадки камеры CSL-COM40

| Номер участка измерения в камере | Без рециркуляции раствора   |                        | С рециркуляцией раствора  |                        |
|----------------------------------|-----------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------|
|                                  | $t_s/t_f, ^\circ\text{C}^*$ | $E_s/E_f, \text{В/см}$ | $t_s/t_f, ^\circ\text{C}$ | $E_s/E_f, \text{В/см}$ |
| 1                                | 8,0/18,7                    | 1,4/1,3                | 9,4/9,4                   | 1,0/1,0                |
| 2                                | 9,4/18,2                    | 1,2/1,1                | 11,1/10,8                 | 1,0/1,0                |
| 3                                | 9,8/17,0                    | 0,9/1,1                | 14,1/10,3                 | 1,1/1,1                |
| 4                                | 10,0/19,1                   | 1,4/1,2                | 9,7/9,5                   | 1,0/1,0                |
| 5                                | 11,3/16,7                   | 1,1/1,1                | 12,2/9,9                  | 1,0/1,0                |
| 6                                | 11,7/17,5                   | 0,8/1,0                | 13,3/10,5                 | 1,1/1,0                |
| 7                                | 10,4/18,0                   | 1,5/1,3                | 10,5/10,0                 | 1,1/1,0                |
| 8                                | 10,1/18,3                   | 1,3/1,1                | 12,1/11,0                 | 1,0/1,1                |
| 9                                | 10,6/17,3                   | 0,8/1,0                | 14,1/11,7                 | 1,1/1,0                |
| 10                               | 12,6/17,6                   | 1,5/1,3                | 10,8/9,5                  | 0,9/1,0                |
| 11                               | 11,2/17,0                   | 1,2/1,1                | 11,1/10,2                 | 1,0/1,0                |
| 12                               | 10,0/17,6                   | 0,9/1,0                | 12,2/10,4                 | 1,0/1,0                |
| CV, %                            |                             | 22,6/10,2              | 6,1/3,8                   |                        |

Примечание. \* Здесь и в табл. 3, 4 указаны значения, полученные в начале  $t_s$ ,  $E_s$  (0–1-я минута), и в конце  $t_f$ ,  $E_f$  (19–20-я минута) электрофореза

в конце (табл. 2). При этом наибольшие значения были отмечены на участках, расположенных около катодного резервуара (участки 1, 4, 7 и 10), наименьшие — около анодного (участки 3, 6, 9 и 12). Температура электрофорезного раствора в начале электрофореза варьировала от 8,0 до 12,6 °С, а к концу значительно повысилась на всех участках до сходных значений.

Рециркуляция электрофорезного раствора привела к выравниванию напряженности электрического поля по площадке камеры 0,9–1,1 В/см. Температура электрофорезного раствора в условиях рециркуляции в начале электрофореза также различалась между участками, однако к концу не повышалась, а на некоторых участках снизилась.

Аналогичные измерения были проведены в камерах Sub-Cell 192 и multiSUB Screen 32 при проведении электрофореза препаратов ДНК-комет клеток костного мозга и почек интактных мышей и обработанных ММС в дозе 30 мг/кг (вторая серия экспериментов).

В камере Sub-Cell 192 значения напряженности без рециркуляции раствора варьировали в пределах 0,8–1,1 В/см (табл. 3). В условиях рециркуляции напряженность на всех участках, за исключением 11-го, в начале электрофореза составляла 1,0 В/см,

а к концу электрофореза повысилась до 1,2 В/см. Средние значения поврежденности ДНК не отличались статистически значимо для электрофореза с рециркуляцией и без нее. Также выявлен высокий уровень вариабельности показателя между идентичными слайдами интактных клеток костного мозга при проведении электрофореза без рециркуляции буфера — от 0,9 до 3,6 % ДНК в «хвосте» (CV 41,9 %). В условиях электрофореза с рециркуляцией раствора коэффициент вариации снизился до 14,3 %.

Меньший разброс значений выявлен при анализе слайдов ДНК-комет клеток костного мозга животного, обработанного ММС. Коэффициент вариации в случае электрофореза без рециркуляции раствора составил 8,6 %, в условиях рециркуляции — 4,6 %. Как и в случае с камерой CSL-COM40, без рециркуляции температура электрофорезного раствора к концу электрофореза значительно повысилась, тогда как с рециркуляцией не превысила 11,8 °С. При этом в обоих случаях разница температур раствора над слайдами и в резервуарах камер не превышала 3 °С.

В камере multiSUB Screen 32 напряженность электрического поля по площадке варьировала в пределах 0,8–1,2 В/см в начале электрофореза и 0,9–1,3 В/см — в конце (табл. 4).

Таблица 3

Значения напряженности электрического поля и температуры электрофорезного раствора на 12 участках площадки камеры Sub-Cell 192 (с дополнительной платформой) и соответствующие показатели спонтанной и индуцированной поврежденности ДНК в клетках костного мозга мышей

| Номер участка измерения в камере | Без рециркуляции раствора |                  |                   |                     | С рециркуляцией раствора |                  |                   |                             |
|----------------------------------|---------------------------|------------------|-------------------|---------------------|--------------------------|------------------|-------------------|-----------------------------|
|                                  | $t_s/t_f$ , °C            | $E_s/E_f$ , В/см | ДНК в «хвосте», % |                     | $t_s/t_f$ , °C           | $E_s/E_f$ , В/см | ДНК в «хвосте», % |                             |
|                                  |                           |                  | контроль          | ММС в дозе 30 мг/кг |                          |                  | контроль          | ММС в дозе 30 мг/кг         |
| 1                                | 8,6/17,0                  | 1,0/1,0          | 0,9               | 7,3                 | 6,5/10,1                 | 1,0/1,2          | 1,4               | 6,3                         |
| 2                                | 8,5/17,2                  | 1,0/0,9          | 1,4               | 6,2                 | 8,0/10,9                 | 1,0/1,2          | 1,3               | 6,0                         |
| 3                                | 8,5/17,2                  | 1,1/0,9          | 2,9               | 7,5                 | 8,6/11,3                 | 1,0/1,2          | 1,7               | 6,9                         |
| 4                                | 9,9/16,1                  | 1,0/1,0          | 1,3               | 6,8                 | 7,3/10,8                 | 1,0/1,2          | 1,5               | 6,6                         |
| 5                                | 8,8/19,5                  | 1,0/0,9          | 1,8               | 6,8                 | 9,5/11,5                 | 1,0/1,2          | 1,3               | 6,5                         |
| 6                                | 8,3/18,8                  | 1,0/0,9          | 2,0               | 6,8                 | 9,3/11,6                 | 1,0/1,2          | 1,2               | 6,5                         |
| 7                                | 9,2/18,5                  | 1,0/0,8          | 2,0               | 6,1                 | 9,2/10,4                 | 1,0/1,2          | 1,4               | 7,0                         |
| 8                                | 9,2/19,1                  | 0,9/0,8          | 1,7               | 6,6                 | 9,0/11,1                 | 1,0/1,2          | 1,4               | 6,1                         |
| 9                                | 6,6/18,5                  | 1,0/0,9          | 1,3               | 5,5                 | 9,4/11,4                 | 1,0/1,2          | 1,8               | 6,5                         |
| 10                               | 9,6/19,3                  | 0,9/0,8          | 3,6               | 6,0                 | 7,7/10,2                 | 1,0/1,2          | 1,2               | 6,3                         |
| 11                               | 8,7/19,4                  | 0,8/0,8          | 1,7               | 6,9                 | 8,3/11,2                 | 0,9/1,1          | 1,7               | 6,5                         |
| 12                               | 6,1/14,7                  | 0,8/0,8          | 1,2               | 6,5                 | 9,4/11,8                 | 1,0/1,2          | 1,7               | 6,2                         |
| $m \pm SD$                       |                           |                  | 1,8 $\pm$ 0,5     | 6,6 $\pm$ 0,4       |                          |                  |                   | 1,5 $\pm$ 0,2* <sup>‡</sup> |
| CV, %                            |                           |                  | 9,4/8,6           | 41,9                |                          |                  |                   | 6,5 $\pm$ 0,3* <sup>‡</sup> |
|                                  |                           |                  |                   | 8,6                 |                          |                  |                   | 14,3                        |
|                                  |                           |                  |                   |                     |                          |                  |                   | 4,6                         |

Примечание. \*  $p = 0,0002$ ; <sup>‡</sup>  $p = 0,04$  (F-критерий Фишера); <sup>‡</sup>  $p > 0,05$  (U-критерий Манна – Уитни) по сравнению с электрофорезом без рециркуляции.

Таблица 4

Значения напряженности электрического поля и температуры электрофорезного раствора на 12 участках площадки камеры multiSUB Screen 32 и соответствующие показатели спонтанной и индуцированной поврежденности ДНК в клетках почек мышей

| Номер участка измерения в камере | Без рециркуляции раствора |                  |                   |                     | С рециркуляцией раствора |                  |                   |                              |
|----------------------------------|---------------------------|------------------|-------------------|---------------------|--------------------------|------------------|-------------------|------------------------------|
|                                  | $t_s/t_f$ , °C            | $E_s/E_f$ , В/см | ДНК в «хвосте», % |                     | $t_s/t_f$ , °C           | $E_s/E_f$ , В/см | ДНК в «хвосте», % |                              |
|                                  |                           |                  | контроль          | ММС в дозе 30 мг/кг |                          |                  | контроль          | ММС в дозе 30 мг/кг          |
| 1                                | 8,9/20,6                  | 0,8/1,0          | 1,9               | 9,6                 | 8,3/13,7                 | 1,0/1,0          | 1,3               | 9,2                          |
| 2                                | 9,2/20,8                  | 0,8/0,9          | 1,2               | 10,4                | 8,7/13,5                 | 0,9/0,9          | 1,4               | 11,1                         |
| 3                                | 9,0/15,8                  | 1,2/1,2          | 2,3               | 9,9                 | 8,6/14,2                 | 1,2/1,0          | 1,7               | 13,5                         |
| 4                                | 7,9/18,8                  | 0,8/1,0          | 2,6               | 13,3                | 9,3/12,1                 | 1,0/1,0          | 1,8               | 12,2                         |
| 5                                | 9,3/20,5                  | 0,8/0,9          | 1,1               | 13,8                | 8,8/14,8                 | 0,9/0,9          | 0,9               | 10,3                         |
| 6                                | 8,8/10,6                  | 1,2/1,2          | 2,1               | 14,7                | 7,0/12,1                 | 1,2/0,9          | 2,3               | 12,0                         |
| 7                                | 9,1/18,7                  | 0,9/1,0          | 1,9               | 15,1                | 8,8/13,4                 | 1,0/1,0          | 1,6               | 13,1                         |
| 8                                | 8,7/20,4                  | 0,9/0,9          | 1,4               | 11,4                | 8,0/14,3                 | 0,9/1,0          | 1,1               | 8,8                          |
| 9                                | 8,1/15,2                  | 1,2/1,3          | 0,7               | 10,4                | 7,8/17,7                 | 1,1/0,8          | 2,1               | 10,4                         |
| 10                               | 8,9/21,7                  | 0,9/1,0          | 2,1               | 11,5                | 6,2/13,3                 | 1,0/1,0          | 2,1               | 10,8                         |
| 11                               | 9,0/21,5                  | 0,9/0,9          | 1,3               | 10,8                | 7,8/17,8                 | 0,9/0,9          | 1,7               | 8,7                          |
| 12                               | 8,5/15,0                  | 1,0/1,1          | 2,8               | 10,8                | 7,7/16,8                 | 1,0/0,8          | 1,8               | 12,1                         |
| $m \pm SD$                       |                           |                  | 1,8 $\pm$ 0,5     | 11,8 $\pm$ 1,6      |                          |                  |                   | 1,7 $\pm$ 0,4* <sup>‡</sup>  |
| CV, %                            |                           |                  | 17,1/13,3         | 36,1                |                          |                  |                   | 11,0 $\pm$ 1,3* <sup>‡</sup> |
|                                  |                           |                  |                   | 16,2                |                          |                  |                   | 25,4                         |
|                                  |                           |                  |                   |                     |                          |                  |                   | 14,6                         |

Примечание. \*  $p > 0,05$  (F-критерий Фишера); <sup>‡</sup>  $p > 0,05$  (U-критерий Манна – Уитни) по сравнению с электрофорезом без рециркуляции.

При этом наблюдалась обратная, по сравнению с камерой CSL-COM40, картина — высокие значения напряженности зарегистрированы на участках, расположенных около анодного резервуара, низкие — около катодного. Рециркуляция электрофорезного раствора несколько снизила неравномерность напряженности электрического поля по площадке.

В отличие от камер CSL-COM40 и Sub-Cell 192 рециркуляция раствора не предотвращала вариabельность температуры по площадке камеры и ее повышение к концу электрофореза. Двукратное увеличение скорости рециркуляции не оказывало влияния на вариabельность напряженности и температуры (данные не представлены), однако приводило к изменению направленности «хвостов» ДНК-комет на слайдах. Анализ таких изображений не проводили (рис. 3, Д и Е). Средние значения поврежденности ДНК не отличались статистически значимо для электрофореза с рециркуляцией и без нее. Показатель поврежденности ДНК для интактных клеток почек варьировал между слайдами в пределах 0,7–2,8 % ДНК в «хвосте» (CV 36,1 %). Коэффициент вариации для слайдов с индуцированной поврежденностью ДНК в клетках почек оказался выше по сравнению с камерой Sub-Cell — 16,2 %. Зарегистрировано снижение по сравнению с электрофорезом без рециркуляции коэффициентов вариации показателей спонтанной и индуцированной поврежденности ДНК, однако оно было не столь выраженным, как в случае с камерой Sub-Cell 192.

Стоит отметить особенности проведения электрофореза в камере СОМРАС-50. При рекомендуемом производителем напряжении 21 В сила тока составила 420 мА, напряженность поля — 0,6 В/см. Напряженности электрического поля в 1 В/см удалось достигнуть при подаваемом напряжении 28 В, однако сила тока возросла до 680 мА, что находится в районе предела для использованного источника питания. Эксперименты с измерением локальной напряженности на 9 участках (рис. 2) показали, что в начале электрофореза она составляла 1,0 В/см на всех участках (1,2 В/см на участке 3 между слайдами). К концу электрофореза возрастание силы тока до предельных 700 мА привело к падению напряжения на выходе источника питания до 25 В (переход от стабилизации по напря-

жению к стабилизации по току) и, соответственно, падению напряженности поля и ее вариации по участкам от 0,7 до 0,9 В/см.

## ОБСУЖДЕНИЕ

При горизонтальном агарозном гель-электрофорезе нуклеиновых кислот для расчета напряженности электрического поля независимо от геометрии камеры используется отношение подаваемого напряжения к расстоянию между электродами [15, 16]. Поскольку в методе ДНК-комет применяются такие же или схожей конструкции электрофоретические камеры, данный принцип был принят по умолчанию при расчете рекомендуемой напряженности в 1,0 В/см, когда подаваемое напряжение (В) равно межэлектродному расстоянию (см). Из использованных в нашем исследовании камер только для одной измеренная напряженность совпала с расчетной, тогда как для четырех варьировала от 0,6 до 2,0 В/см. В результате оцененные в одних и тех же образцах клеток почек мышей значения поврежденности ДНК различались между камерами до 4,7 крат при оценке ММС-индуцированной и до 10 крат при оценке спонтанной поврежденности ДНК. Несоответствие измеренных значений напряженности электрического поля расчетным было показано в исследовании A. Azqueta et al. [3]. Были зарегистрированы значения ниже расчетных, при этом разница была обратно пропорциональна подаваемому напряжению (модель электрофоретической камеры не указана). В нашем исследовании напряженность ниже расчетной выявлена для камеры СОМРАС-50, имеющей нестандартную конфигурацию с вертикальной ориентацией слайдов, в остальных случаях значения оказались выше.

P.L. Olive et al. [17] для получения оптимальных препаратов ДНК-комет было предложено проводить электрофорез в течение 20–25 мин при напряжении, равном произведению расстояния между электродами камеры на 0,6. Такой расчет применительно к использованным в настоящем исследовании камерам во всех случаях дает значения напряжения значительно ниже определенных экспериментально для получения напряженности 1 В/см (табл. 1). В ряде работ предлагают рассчитывать напряженность как отношение подаваемого напряжения к длине площадки камеры (рис. 1, Д) [3].



Ожидаемые и фактические значения напряженности при таком принципе расчета совпадают только для Sub-Cell 192 без дополнительной платформы и multiSUB Screen 32. Кроме того, при постоянных межэлектродном расстоянии и подаваемом напряжении напряженность электрического поля на площадке со слайдами зависит от ее размеров. Так, в камере Sub-Cell 192 напряженность 1 В/см достигалась при подаваемом напряжении 24 В, тогда как при установке дополнительной платформы для получения указанной напряженности требовалось напряжение 30 В. Полученные данные свидетельствуют, что невозможен общий принцип расчета напряженности электрического поля в случае щелочного электрофореза ДНК-комет и в каждом конкретном случае следует экспериментально определять напряжение, обеспечивающее требуемую напряженность. К аналогичному заключению пришли в недавней работе G. Brunborg et al. [15].

На сегодняшний день нет общепринятого правила при какой напряженности электрического поля проводить электрофорез в методе ДНК-комет. В руководстве OECD со ссылкой на результаты исследований японского центра по валидации альтернативных методов (JaCVAM) рекомендуется проводить электрофорез в течение 20 мин при напряженности 0,7 В/см [18]. По мнению ряда авторитетных специалистов оптимально проведение электрофореза при 1,15 В/см в течение 20 мин или при 0,7 В/см в течение 30 мин [3, 4, 15, 19]. Согласно данным литературы большинство исследователей использует напряженность 1 В/см, ориентируясь на рекомендации, выпущенные в 2000 г. R.R. Tice et al. [20]. Собственный многолетний опыт применения метода ДНК-комет показывает, что проведение электрофореза при напряженности 1,0–1,2 В/см в течение 20 мин является оптимальным. Использование меньших значений снижает чувствительность метода, тогда как более высокие значения могут приводить к искажению результатов анализа. Отрыв от «хвоста» ДНК-комет и/или диффузия в геле небольших фрагментов ДНК может приводить к недооценке показателя (рис. 3) [15].

Считается, что сила тока не оказывает влияние на миграцию ДНК в геле, но в то же время в отличие от напряженности электрического поля

для силы тока рекомендовано определенное значение — 300 мА в начале электрофореза. Доподлинно неизвестно, почему именно такая сила тока изначально была принята как оптимальная в методе ДНК-комет. Существует мнение, что на момент разработки метода источники питания электрофоретических камер с номинальным током нагрузки более 300 мА не были широко доступны из-за их дороговизны [21]. Сила тока напрямую зависит от высоты электрофорезного раствора над слайдами и регулируется удалением/добавлением последнего. G. Brunborg et al. [15] рекомендовано проведение электрофореза при высоте раствора над стеклами не менее 5 мм. По мнению авторов, это позволяет снизить неравномерность температуры и напряженности по площадке камеры и, соответственно, внутриэкспериментальную вариабельность данных. Незначительное снижение напряженности электрического поля с повышением силы тока при этом может быть скорректировано увеличением подаваемого на камеру напряжения.

Наряду с межлабораторной важной проблемой является внутрилабораторная вариабельность данных метода ДНК-комет [3, 4, 15]. В зависимости от использованной камеры коэффициент вариации показателя для идентичных образцов клеток в условиях одного электрофореза составил 8–16 % для индуцированных повреждений ДНК и 36–42 % для спонтанных. Сходные результаты были получены в двух исследованиях [22, 23]. Если для индуцированных повреждений ДНК коэффициент вариации не превышал 14 %, то для спонтанных он достигал 52 %. Данное наблюдение приобретает особое значение при применении метода ДНК-комет в исследованиях, направленных преимущественно на оценку низких уровней поврежденности ДНК, таких как генетический биомониторинг или клинические исследования.

В работе K.B. Gutzkow et al. [19] с использованием вместо стандартных слайдов минигелей GelBond® было показано, что рециркуляция электрофорезного раствора снижает коэффициент вариации показателя поврежденности ДНК в облученных клетках с 26 до 7 %. Авторы предположили, что выявленная внутриэкспериментальная вариабельность может быть связана с неоднородностью напряженности электрического поля по площадке камеры. В последующем исследовании ими было

показано, что напряженность поля варьирует по площадке камеры ( $CV$  10,5 %) и рециркуляция раствора, в зависимости от ее скорости, снижает коэффициент вариации до 0,5 % [15]. Для трех исследованных нами камер выявлена вариабельность напряженности поля —  $CV$  от 9,4 до 22,6 %. Для камер Sub-Cell 192 и CSL-COM40 рециркуляция раствора в ходе электрофореза значительно снижала неравномерность напряженности, тогда как в камере multiSUB Screen 32 это снижение было менее выраженным. Если в камере Sub-Cell 192 в условиях рециркуляции уменьшение неоднородности напряженности сопровождалось и снижением вариабельности показателей спонтанной и индуцированной поврежденности ДНК, то в камере multiSUB Screen 32 вариабельность показателей в обоих случаях оставалась на высоком уровне. Неоднородность напряженности поля связывают, предположительно, с локальными изменениями в ходе электрофореза удельной электропроводности раствора вследствие возникновения в камере градиентов температуры и/или концентрации ионов [15, 24]. Было показано, что возрастание в ходе электрофореза температуры раствора сопровождается ее гетерогенностью в камере, с более высокими значениями в срединной части площадки (камера SE-1) [9]. Для камеры multiSUB Screen 32 на участках около анодного резервуара (3, 6, 9, 12), в которых температура раствора была ниже чем в остальных, наблюдались более высокие значения напряженности. Эксперименты показали, что если температура раствора над слайдами к концу электрофореза возрастает значительно, то в резервуарах камеры она повышается не более чем на 5 °C, создавая таким образом температурные градиенты. Рециркуляция приводит к активной смене раствора над слайдами, способствуя выравниванию его температуры по камере (разница <3 °C). Вероятно, аналогичным образом рециркуляция позволяет предотвратить и возникновение градиентов концентрации ионов электролита [15, 24]. Значимое отличие камеры multiSUB Screen 32 от камеры Sub-Cell 192 — меньший объем используемого электрофорезного раствора (1280 против 2150 мл). Можно предположить, что чем меньше объем электрофорезного раствора при сходных размерах площадки камер, тем меньший стабилизирующий эффект имеет рециркуляция.

Возникающие вследствие электролиза воды изменения pH раствора возле электродов также могут оказывать влияние на локальную напряженность электрического поля [25]. Вместе с тем, учитывая высокую концентрацию электролита в используемом растворе, высокое значение ( $pH > 13,0$ ) и относительно короткое время электрофореза, вклад изменений pH рассматривается как незначительный [14, 15].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные в настоящем исследовании данные показывают, что несоответствие при электрофорезе расчетной напряженности электрического поля фактической может служить причиной межлабораторной вариабельности данных метода ДНК-комет. Перед проведением экспериментов для конкретной электрофоретической камеры следует эмпирически определить напряжение, обеспечивающее заданные значения напряженности электрического поля и силы тока. Для снижения внутрилабораторной вариабельности данных, в особенности при применении камер больших размеров, рекомендуется проведение в ходе электрофореза рециркуляции раствора, стабилизирующей его температуру, а также, вероятно, электрохимические процессы в камере. В совокупности с унификацией других экспериментальных условий (концентрация агарозного геля, длительность щелочной денатурации и электрофореза) указанное позволит обеспечить меж- и внутрилабораторную сходимость и воспроизводимость данных, полученных с использованием метода ДНК-комет.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов и коммерческой составляющей при планировании, выполнении и подготовке к печати настоящей работы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Koppen G, Azqueta A, Pourrut B, et al. The next three decades of the comet assay: a report of the 11<sup>th</sup> international comet assay workshop. *Mutagenesis*. 2017;32(3):397-408. <https://doi.org/10.1093/mutage/gex002>.
2. Møller P. The comet assay: ready for 30 more years. *Mutagenesis*. 2018;33(1):1-7. <https://doi.org/10.1093/mutage/gex046>.

3. Azqueta A, Gutzkow KB, Brunborg G, Collins AR. Towards a more reliable comet assay: optimizing agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions. *Mutation Research*. 2011;724(1-2):41-45. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.05.010>.
4. Azqueta A, Muruzabal D, Boutet-Robinet E, et al. Technical recommendations to perform the alkaline standard and enzyme-modified comet assay in human biomonitoring studies. *Mutat Res*. 2019;843:24-32. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.04.007>.
5. Forchhammer L, Johansson C, Loft S, et al. Variation in the measurement of DNA damage by comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial. *Mutagenesis*. 2010;25(2):113-123. <https://doi.org/10.1093/mutage/geb048>.
6. Johansson C, Möller P, Forchhammer L, et al. An ECVAG trial on assessment of oxidative damage to DNA measured by the comet assay. *Mutagenesis*. 2010;25(2):125-132. <https://doi.org/10.1093/mutage/geb055>.
7. Ersson C, Möller L. The effects on DNA migration of altering parameters in the comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments. *Mutagenesis*. 2011;26(6):689-695. <https://doi.org/10.1093/mutage/ger034>.
8. Speit G, Trenz K, Schütz P, et al. The influence of temperature during alkaline treatment and electrophoresis on results obtained with the comet assay. *Toxicol Lett*. 1999;110(1-2):73-78. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(99\)00137-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(99)00137-X).
9. Sirota NP, Zhanataev AK, Kuznetsova EA, et al. Some causes of inter-laboratory variation in the results of comet assay. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2014;770:16-22. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.05.003>.
10. Möller P, Möller L, Godschalk RW, Jones GD. Assessment and reduction of comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay validation group. *Mutagenesis*. 2010;25(2):109-111. <https://doi.org/10.1093/mutage/geb067>.
11. Godschalk RW, Ersson C, Riso P, et al. DNA-repair measurements by use of the modified comet assay: an inter-laboratory comparison within the European Comet Assay validation group (ECVAG). *Mutat Res*. 2013;757(1):60-67. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.06.020>.
12. Ersson C, Möller P, Forchhammer L, et al. An ECVAG inter-laboratory validation study of the comet assay: inter-laboratory and intra-laboratory variations of DNA strand breaks and FPG-sensitive sites in human mononuclear cells. *Mutagenesis*. 2013;28(3):279-286. <https://doi.org/10.1093/mutage/get001>.
13. Plappert-Helbig U, Guérard M. Inter-laboratory comparison of the *in vivo* comet assay including three image analysis systems. *Environ Mol Mutagen*. 2015;56(9):788-793. <https://doi.org/10.1002/em.21964>.
14. Olive PL, Wlodek D, Durand RE, Banáth JP. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Exp Cell Res*. 1992;198(2):259-267. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(92\)90378-1](https://doi.org/10.1016/0014-4827(92)90378-1).
15. Brunborg G, Rolstadaas L, Gutzkow KB. Electrophoresis in the comet assay. (September 12<sup>th</sup> 2018). In: Bolduna OM, Balta C, eds. *Electrophoresis – Life Sciences Practical Applications*. London: Intech Open; 2018. P. 63-80. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76880>.
16. Sambrook J, Russel DW. *Molecular cloning – a laboratory manual*. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
17. Olive PL, Banáth JP. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc*. 2006;1(1):23-29. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.5>.
18. OECD. Test No. 489: In vivo mammalian alkaline comet assay [Internet]. Paris: OECD Publishing; 2016. Available from: <https://www.oecd.org/env/test-no-489-in-vivo-mammalian-alkaline-comet-assay-9789264264885-en.htm>.
19. Gutzkow KB, Langleite TM, Meier S, et al. High-throughput comet assay using 96 minigels. *Mutagenesis*. 2013;28(3):333-340. <https://doi.org/10.1093/mutage/get012>.
20. Tice RR, Agurell E, Anderson D, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*. 2000;35(3):206-221. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3<206::CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::CO;2-J).

21. Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, et al. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*. 2008;23(3):143-151. <https://doi.org/10.1093/mutage/gem051>.
22. Collins AR, El Yamani N, Lorenzo Y, et al. Controlling variation in the comet assay. *Front Genet*. 2014;5:359. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00359>.
23. Roy M, Hamel A, Cardoso R. Effect of slide positioning in electrophoresis chamber over comet assay results [Internet]. Charles River Laboratories, Senneville, Quebec, Canada, H9X 3R3. Available from: <https://www.criver.com/sites/default/files/resources/EffectofSlidePositioninginElectrophoresisChamberOverCometAssayResults.pdf>.
24. Brody JR, Kern SE. Sodium boric acid: a tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *Biotechniques*. 2004;36(2):214-216. <https://doi.org/10.2144/04362BM02>.
25. O'Conner JL, Wade MF, Zhou Y. Control of buffer pH during agarose gel electrophoresis of glyoxylated RNA. *Biotechniques*. 1991;10(3):300-302.

#### ✿ Информация об авторах

**Алий Курманович Жанатаев** — канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник, лаборатория фармакологии мутагенеза. ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», Москва. SPIN: 7070-0510. E-mail: zhanataev@academpharm.ru.

**Елена Александровна Анисина** — научный сотрудник, лаборатория фармакологии мутагенеза. ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», Москва. E-mail: anisinalena@yandex.ru.

**Кира Львовна Плигина** — канд. биол. наук, научный сотрудник, лаборатория фармакологии мутагенеза. ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», Москва. SPIN: 7315-5417. E-mail: kira-pligina@rambler.ru.

**Артем Андреевич Лисицын** — лаборант-исследователь, лаборатория фармакологии мутагенеза. ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», Москва. E-mail: nordical@yandex.ru.

**Андрей Дмитриевич Дурнев** — д-р мед. наук, профессор, чл.-кор. РАН, директор. ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», Москва. SPIN: 8426-0380. E-mail: addurnev@mail.ru.

#### ✿ Authors and affiliations

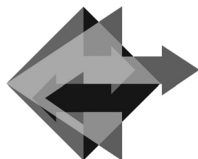
**Aliy K. Zhanataev** — PhD, Main Researcher, Laboratory of Pharmacology and Mutagenesis. Zakusov Research Institute of Pharmacology, Moscow, Russia. SPIN: 7070-0510. E-mail: zhanataev@academpharm.ru.

**Elena A. Anisina** — Researcher, Laboratory of Pharmacology and Mutagenesis. Zakusov Research Institute of Pharmacology, Moscow, Russia. E-mail: anisinalena@yandex.ru.

**Kira L. Pligina** — PhD, Researcher, Laboratory of pharmacology and mutagenesis. Zakusov Research Institute of Pharmacology, Moscow, Russia. SPIN: 7315-5417. E-mail: kira-pligina@rambler.ru.

**Artem A. Lisitsyn** — Researcher, Laboratory of pharmacology and mutagenesis. Zakusov Institute of Pharmacology, Moscow, Russia. E-mail: nordical@yandex.ru.

**Andrey D. Durnev** — Doctor of Science, Professor, Corresponding member of Russian Academy of Sciences, Head of Institute. Zakusov Institute of Pharmacology, Moscow, Russia. SPIN: 8426-0380. E-mail: addurnev@mail.ru.



## ГЕНЕТИКО-БИОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ГАММА-ГЛУТАМИЛЦИКЛОТРАНСФЕРАЗЫ В ФОРМИРОВАНИИ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К САХАРНОМУ ДИАБЕТУ 2-го ТИПА

© Ю.Э. Азарова, Е.Ю. Клёсова, М.И. Чурилин, Т.А. Самгина, А.И. Конопля, А.В. Полоников

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Курск

Для цитирования: Азарова Ю.Э., Клёсова Е.Ю., Чурилин М.И., и др. Генетико-биохимическое исследование роли гамма-глутамилциклотрансферазы в формировании предрасположенности к сахарному диабету 2-го типа // Экологическая генетика. — 2020. — Т. 18. — № 2. — С. 215–228. <https://doi.org/10.17816/ecogen16293>.

Поступила: 27.09.2019

Одобрена: 05.02.2020

Принята: 23.06.2020

✿ Дисбаланс в системе редокс-гомеостаза является важным звеном патогенеза сахарного диабета 2-го типа (СД2). Гамма-глутамилциклотрансфераза представляет собой фермент антиоксидантной защиты, непосредственно вовлеченный в метаболизм глутатиона, эндогенного антиоксиданта. Целью исследования стало изучение ассоциации однонуклеотидных замен (SNP) rs38420 (G > A), rs4270 (T > C), rs6462210 (C > T) и rs28679 (G > A) в гене *GGCT* с СД2. В исследование включено 1022 пациента с СД2 и 1064 условно здоровых добровольца. В результате нами впервые выявлена взаимосвязь SNP rs4270 гена *GGCT* с СД2 в русской популяции. Нами также установлены генно-средовые взаимодействия, ассоциированные с предрасположенностью к заболеванию: протективный эффект гена гамма-глутамилциклотрансферазы проявлялся только у некурящих лиц при условии ежедневного употребления ими свежих овощей и фруктов, тогда как у лиц с недостаточным потреблением растительной пищи, а также у всех курящих больных защитный эффект *GGCT* не наблюдался. У пациентов с СД2 содержание перекиси водорода и мономера глутатиона резко повышено по сравнению с контролем. Также было установлено, что SNP rs4270 связан с повышенным содержанием восстановленного глутатиона в плазме крови больных СД2. Таким образом, впервые установлено, что полиморфный локус rs4270 в гене *GGCT* ассоциирован с предрасположенностью к СД2, но его связь с заболеванием модулируется курением и употреблением свежей растительной пищи.

✿ **Ключевые слова:** сахарный диабет 2-го типа; гамма-глутамилциклотрансфераза; однонуклеотидный полиморфизм; курение.

## GENETIC AND BIOCHEMICAL INVESTIGATION OF THE GAMMA-GLUTAMYL CYCLOTRANSFERASE ROLE IN PREDISPOSITION TO TYPE 2 DIABETES MELLITUS

© Iu.E. Azarova, E.Yu. Klyosova, M.I. Churilin, T.A. Samgina, A.I. Konoplya, A.V. Polonikov

Kursk State Medical University, Kursk, Russia

Cite this article as: Azarova IuE, Klyosova EYu, Churilin MI, et al. Genetic and biochemical investigation of the gamma-glutamylcyclotransferase role in predisposition to type 2 diabetes mellitus. *Ecological genetics*. 2020;18(2):215-228. <https://doi.org/10.17816/ecogen16293>.

Received: 27.09.2019

Revised: 05.02.2020

Accepted: 23.06.2020

✿ **Background.** Imbalance in the system of redox homeostasis is an important link in the pathogenesis of type 2 diabetes (T2D). Gamma-glutamyl cyclotransferase is an antioxidant defense enzyme directly involved in the metabolism of glutathione, an endogenous antioxidant. **The aim** of the study was to examine the association of single nucleotide polymorphisms (SNP) rs38420 (G > A), rs4270 (T > C), rs6462210 (C > T) and rs28679 (G > A) in *GGCT* gene with the risk of developing T2D. **Materials and Methods.** The study included 1022 T2D patients and 1064 healthy volunteers. Genotyping of *GGCT* gene loci was performed using iPLEX technology on a MassARRAY Analyzer 4 genome time-of-flight mass spectrometer (Agena Bioscience). **Results.** As a result, we identified for the first time the association of SNP rs4270 in the *GGCT* gene with the risk of T2D in the Russian population. We have also established genetic and environmental interactions associated with predisposition to the disease: protective effect of gamma-glutamyl cyclotransferase gene was observed only in non-smokers under condition of daily consumption of fresh vegetables and fruits, whereas in persons with insufficient consumption of plant foods, as well as in all smoking patients protective effect of *GGCT* was not observed. In patients with T2D, the level of hydrogen peroxide and glutathione monomer was sharply increased compared to the controls. SNP rs4270 was also found to be associated with elevated levels of reduced glutathione in the plasma of type 2 diabetics.

**Conclusion.** Thus, for the first time it was established that polymorphic locus rs4270 in the *GGCT* gene is associated with a predisposition to T2D, but its relationship with the disease is modulated by smoking and fresh plant foods consumption.

✳ **Keywords:** diabetes mellitus, type 2; gamma-glutamylcyclotransferase; polymorphism, single nucleotide; smoking.

## ВВЕДЕНИЕ

По данным Международной диабетической федерации, в мире сахарным диабетом страдают 425 млн человек [1]. На конец 2018 г. в России насчитывалось 4,58 млн больных диабетом, более 90 % которых страдают сахарным диабетом 2-го типа (СД2) [2]. Заболевание представляет собой постоянно прогрессирующую хроническую патологию, в развитии которого принимают участие генетические и средовые факторы. Полногеномные ассоциативные исследования, проведенные с 2007 г. и включавшие более 1 млн больных и 3 млн здоровых лиц, выявили сотни однонуклеотидных вариантов (SNPs), связанных с риском развития СД2 [3]. Локусы, биологическую роль которых удалось установить, в большей степени влияют на бета-клетки поджелудочной железы, определяя их количество, массу, функциональную активность, чувствительность к уровню глюкозы в крови, а также выживаемость в условиях глюкозо- и липотоксичности. Гораздо меньшее количество вариантов ассоциировано с изменениями в сигнализации инсулина в периферических тканях, приводящих к инсулинорезистентности [4]. Помимо снижения чувствительности периферических тканей к инсулину и нарушения его продукции поджелудочной железой, существующая сегодня концепция патогенеза СД2 включает увеличение продукции глюкозы печенью, усиление секреции глюкагона островками Лангерганса, уменьшение синтеза гормонов желудочно-кишечного тракта инкретинов, повышение реабсорбции глюкозы почками, усиление всасывания глюкозы в кишечнике, а также повышение активности центров аппетита в гипоталамусе. Перечисленные восемь звеньев составляют так называемый «угрожающий октет» DeFronzo [5], любой компонент которого может способствовать развитию хронической гипергликемии и нарушению практически всех видов обмена.

Важным звеном в цепи событий, приводящих к развитию СД2, является нарушение редокс-го-

меостаза, которое характеризуется избыточной продукцией активных форм кислорода и азота, дефицитом антиоксидантов и рассматривается в качестве основного механизма повреждения внутриклеточных сигнальных молекул, результатом чего являются дисфункция островкового аппарата поджелудочной железы и прогрессирующая инсулинорезистентность [6]. В исследованиях последних лет убедительно показано, что курение, неправильное питание, в первую очередь, недостаток свежих овощей и фруктов, избыточная масса тела и ожирение снижают чувствительность клеток к инсулину и провоцируют манифестацию СД2 [7, 8]. Баланс в про- и антиоксидантной системе в значительной степени детерминирован способностью клеток синтезировать универсальный антиоксидант глутатион в ходе так называемого гамма-глутамильного цикла. Разрушаясь, глутатион превращается в цистеинилглицин и гамма-глутамиламинокислоту. Последний фрагмент транспортируется внутрь клетки с помощью специального мембранного переносчика. Гамма-глутамилциклотрансфераза (*GGCT*) является ключевым ферментом цикла и катализирует превращение гамма-глутамилсодержащего дипептида в аминокислоту и 5-оксопролин, используемый для регенерации глутаминовой кислоты к началу следующего витка синтеза глутатиона (GSH) [9]. Таким образом, *GGCT* играет значимую роль в поддержании внутри- и внеклеточного гомеостаза глутатиона. Тем не менее исследований, оценивающих вклад генетических вариантов *GGCT* в патогенез СД2, на сегодняшний день не проводилось. Вопросы взаимосвязи между потреблением овощей и фруктов, курением и полиморфными вариантами генов антиоксидантной системы, в частности гена гамма-глутамилциклотрансферазы, остаются нераскрытыми на сегодняшний день и требуют изучения для расшифровки фундаментальных основ болезни.

*Цель исследования* — изучить ассоциации однонуклеотидных замен rs38420, rs4270, rs6462210, rs28679 в гене *GGCT* с СД2 у больных и здоровых

лиц, а также оценить триггерную роль курения, потребления свежих овощей и фруктов в реализации наследственной предрасположенности к СД2 у носителей различных генотипов *GGCT*.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Протокол исследования одобрен Региональным этическим комитетом при Курском государственном медицинском университете (выписка из протокола № 10 от 12.12.2016). В исследование приглашали больных СД2, получавших стационарное лечение на базе эндокринологического отделения Курской городской клинической больницы скорой медицинской помощи. В группу здоровых индивидов вошли доноры областной станции переливания крови, а также материал наших предыдущих исследований [10, 11]. Всего за три года (2016–2018) в исследование включено 2086 неродственных индивидов славянского происхождения, в том числе 1022 пациента с подтвержденным диагнозом СД2 (358 мужчин и 664 женщины, средний возраст  $61,57 \pm 10,44$  года) и 1064 условно здоровых добровольца (392 мужчины и 672 женщины, средний возраст  $61,00 \pm 7,82$  года). Группы больных СД2 и контроля были сопоставимы по полу ( $p = 0,41$ ) и возрасту ( $p = 0,16$ ). Критериями включения в группу больных служили: наличие верифицированного врачом диагноза болезни, подтвержденного клинически и лабораторно-инструментально, возраст старше 35 лет, наличие письменного информированного согласия на участие в исследовании. Критериями включения лиц в группу контроля служили: возраст старше 35 лет, нормальный уровень гликемии согласно критериям Всемирной организации здравоохранения [12], отсутствие тяжелых хронических заболеваний, наличие письменного информированного согласия.

Участники исследования вошли в две основных группы: группу больных СД2 и группу здоровых. Пациенты с СД2 и контроль были стратифицированы по потреблению свежих овощей и фруктов и статусу курения на 4 подгруппы: в первую вошли некурящие больные СД2 и здоровые лица, ежедневно потребляющие свежие овощи и фрукты; во вторую — курящие больные СД2 и здоровые лица, ежедневно потребляющие растительную пищу; в третью — некурящие больные СД2 и здоровые лица, не потребляющие свежие овощи

и фрукты каждый день; в четвертую — курящие больные СД2 и здоровые лица, не потребляющие фрукты и овощи каждый день.

Как у больных, так и у здоровых лиц проводилось анкетирование по основным факторам риска. Индекс массы тела (ИМТ), статус курения, наследственной отягощенности по СД2, потребление свежих овощей и фруктов оценивали путем анкетирования. В отношении последнего параметра участникам предлагалось указать, как часто они употребляют в пищу свежие овощи и фрукты и в каких количествах. Ежедневное потребление не менее 6 порций овощей и фруктов (400 г) было классифицировано как достаточное, более редкое или меньшее потребление растительной пищи было оценено как недостаточное, в соответствии с критериями Всемирной организации здравоохранения [12]. О наличии нарушений углеводного обмена судили по результатам тестов уровня гликированного гемоглобина, концентрации глюкозы натощак и через 2 ч после нагрузки 75 г глюкозы. Концентрации глюкозы, гликированного гемоглобина, общего холестерина, липопротеинов низкой плотности (ЛНП), липопротеинов высокой плотности (ЛВП), триацилглицеролов (ТАГ) определяли на полуавтоматическом биохимическом анализаторе Clima MC-15 (RAL, Испания) стандартными наборами реагентов фирмы «Диакон-ДС» (Россия).

Для проведения генетических исследований у всех больных и здоровых пациентов проводили забор 5 мл венозной крови натощак в вакуумные пробирки Vacuette с EDTA. Геномную ДНК выделяли стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. Качество выделенной ДНК оценивали по степени чистоты и концентрации раствора на спектрофотометре NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, США). Для молекулярно-генетического анализа с помощью интернет-ресурса SNPinfo Web Server [13] было отобрано 4 однонуклеотидных полиморфизма гена *GGCT*, а именно: rs38420 (G > A), rs4270 (T > C), rs6462210 (C > T) и rs28679 (G > A). Выбор SNPs в гене *GGCT* основывался на оценке гаплотипической структуры гена (отбор tagSNPs,  $r^2 \geq 0,8$ ), частоты минорного аллеля (MAF > 5 %), а также регуляторного потенциала SNPs (способности полиморфного сайта влиять на трехмерную структуру хроматина,

связывание транскрипционных факторов и микроРНК, сплайсинг и активность белкового продукта гена [13, 14]. Генотипирование полиморфизмов гена *GGCT* проводили с использованием технологии iPLEX на геномном времяпролетном масс-спектрометре MassARRAY Analyzer 4 (Agena Bioscience, США). Праймеры синтезированы фирмой «Евроген» (Москва).

Для измерения содержания перекиси водорода и глутатиона, проводили забор 5 мл венозной крови в вакуумные пробирки с гепарином лития, центрифугировали их 15 мин при 3500 об./мин, для детекции  $H_2O_2$  плазму аликвотировали и замораживали при  $-80^\circ C$ . Образцы, предназначенные для измерения уровня глутатиона, предварительно подвергали депротеинизации 5%-раствором метафосфорной кислоты, центрифугировали 10 мин при 12000 об./мин, надосадочную жидкость аликвотировали и замораживали при  $-80^\circ C$ . Концентрации перекиси водорода и глутатиона определяли с помощью наборов OxiSelect ROS/RNS Assay Kit и GSH/GSSG Assay Kit (Cell Biolabs, США) флуориметрическим и колориметрическим методом соответственно на микропланшетном ридере Varioscan Flash (Thermo Fisher Scientific, США).

Размер выборки рассчитывали с помощью онлайн калькулятора Genetic Association Study Power Calculator [15] с учетом частоты минорных аллелей полиморфных локусов rs38420, rs4270, rs6462210, rs28679 в гене *GGCT* и заболеваемости СД2 в Курской области. Для достижения статистической мощности исследования 85 % при пороговом уровне значимости ассоциаций  $p = 0,05$ , минимальный размер выборки больных и здоровых должен составлять не менее 1000 человек.

Ассоциации генотипов с риском СД2 изучали методом логистической регрессии с поправкой на пол, возраст и ИМТ с помощью программы SNPStats [16]. Тестировалось пять генетических моделей: кодоминантная, доминантная, рецессивная, сверхдоминантная и log-аддитивная. В качестве лучшей выбирали модель с наименьшим численным значением критерия Акаике (AIC, Akaike information).

Количественные биохимические показатели проверяли на нормальность распределения по критерию Колмогорова – Смирнова. Показатели с нормальным распределением были описаны в формате: среднее значение  $\pm$  стандартное откло-

нение, в качестве теста для оценки статистической значимости различий между группами использовали тест Стьюдента. Показатели с ненормальным распределением описывали с использованием медианы, первого и третьего квартилей в формате  $Me [Q_1; Q_3]$ , в качестве теста для оценки статистической значимости различий между группами использовали критерий Манна – Уитни. Выявленные межгрупповые отличия считались значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Клинико-лабораторные характеристики участников исследования представлены в табл. 1. Стаж диабета у больных составил 10 лет. У 34,7 % пациентов имела место отягощенная наследственность по СД2. Доля курящих в группе контроля (28,9 %) превышала таковую в группе больных (22,5 %). Кроме того, пациенты с СД2 и здоровые отличались по своему отношению к растительной пище: только 48,9 % больных ежедневно потребляли достаточно свежих овощей и фруктов (в среднем 6 порций массой около 400 г, согласно критериям Всемирной организации здравоохранения), тогда как значение этого показателя в группе контроля составило 83,4 %. Показатели углеводного и липидного обмена были проанализированы у всех участников проекта, при этом концентрации глюкозы натощак, гликированного гемоглобина, общего холестерина, ЛНП и ТАГ были выше у больных СД2, концентрация ЛВП была выше в группе контроля ( $p < 0,0001$ ).

Частоты аллелей и генотипов полиморфных локусов *GGCT* представлены в табл. 2. Все исследованные SNPs находились в соответствии с равновесием Харди – Вайнберга ( $p > 0,05$ ). Частоты аллелей однонуклеотидных замен в гене *GGCT* были сопоставимы с европейскими популяциями, согласно данным проекта «1000 Genomes», депонированных в Ensembl [17]. Частота минорного аллеля С rs4270 была ниже в группе пациентов с СД2 по сравнению с группой контроля ( $p = 0,009$ ). Статистически значимых различий в частоте аллелей SNPs rs38420, rs6462210 и rs28679 установлено не было ( $p > 0,05$ ). Генотипы Т/С – С/С варианта rs4270 были значительно ассоциированы с пониженным риском развития СД2 (отношение шансов (odds ratio) OR 0,80; 95 % CI 0,67–0,96;  $p = 0,014$ , доминантная модель).



Таблица 1

Клинико-лабораторные характеристики участников исследования,  $Me [Q_1; Q_3]$ 

| Параметры сравнения                                        | Группа контроля<br>( $n = 1064$ ) | Группа пациентов с СД2<br>( $n = 1022$ ) | $p$     |
|------------------------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------|---------|
| Возраст, лет (ср. $\pm$ ст. откл.)                         | 61,00 $\pm$ 7,82                  | 61,57 $\pm$ 10,44                        | 0,16    |
| Мужчины, $n$ (%)                                           | 392 (36,8)                        | 358 (35,0)                               | 0,41    |
| Женщины, $n$ (%)                                           | 672 (63,2)                        | 664 (65,0)                               |         |
| Индекс массы тела, кг/м <sup>2</sup> (ср. $\pm$ ст. откл.) | 27,04 $\pm$ 3,55                  | 32,13 $\pm$ 6,60                         | 0,001   |
| Ежедневно потребляющие овощи и фрукты, $n$ (%)             | 887 (83,4)                        | 500 (48,9)                               | <0,0001 |
| Курящие, $n$ (%)                                           | 308 (28,9)                        | 230 (22,5)                               | 0,0009  |
| Стаж диабета, лет                                          | —                                 | 10,01 [4; 14]                            | —       |
| Наследственная отягощенность, $n$ (%)                      | —                                 | 355 (34,7)                               | —       |
| HbA <sub>1c</sub> , %                                      | 4,58 [4,11; 4,87]                 | 9,10 [7,90; 11,00]                       | <0,0001 |
| Глюкоза крови натощак, ммоль/л                             | 4,71 [4,39; 4,84]                 | 12,00 [9,49; 14,90]                      | <0,0001 |
| Общий холестерин, ммоль/л                                  | 3,06 [2,86; 3,12]                 | 4,93 [4,14; 5,90]                        | <0,0001 |
| ЛПН, ммоль/л                                               | 1,74 [1,60; 1,79]                 | 3,10 [2,50; 4,05]                        | <0,0001 |
| ЛВП, ммоль/л                                               | 1,47 [1,36; 1,62]                 | 0,84 [0,73; 1,00]                        | <0,0001 |
| ТАГ, ммоль/л                                               | 1,15 [0,98; 1,23]                 | 2,17 [1,55; 2,93]                        | <0,0001 |

Примечание. ЛНП — липопротеины низкой плотности; ЛВП — липопротеины высокой плотности; ТАГ — триацилглицеролы.

Таблица 2

Частоты аллелей и генотипов *GGCT* у больных СД2 и здоровых лиц

| SNP       | Аллель/<br>генотип | Группа контроля,<br><i>n</i> (%) | Группа больных<br>СД2, <i>n</i> (%) | OR<br>(95 % CI)  | <i>p</i>           | OR<br>(95 % CI)* | <i>p</i> *         |
|-----------|--------------------|----------------------------------|-------------------------------------|------------------|--------------------|------------------|--------------------|
| rs38420   | G/G                | 671 (63,5)                       | 657 (64,3)                          | 1,00             | 0,41 <sup>R</sup>  | 1,00             | 0,31 <sup>R</sup>  |
|           | G/A                | 337 (31,9)                       | 325 (31,8)                          |                  |                    | 0,78 (0,48–1,27) |                    |
|           | A/A                | 48 (4,5)                         | 39 (3,8)                            | 0,83 (0,54–1,28) | 0,538              | –                | –                  |
|           | A                  | 20,5                             | 19,7                                | 0,95 (0,82–1,11) |                    | –                | –                  |
| rs4270    | T/T                | 604 (57,5)                       | 639 (62,8)                          | 1,00             | 0,014 <sup>D</sup> | 1,00             | 0,013 <sup>D</sup> |
|           | T/C                | 381 (36,2)                       | 330 (32,4)                          | 0,80 (0,67–0,96) |                    | 0,80 (0,67–0,95) |                    |
|           | C/C                | 66 (6,3)                         | 49 (4,8)                            | 0,82 (0,71–0,95) | 0,009              | –                | –                  |
|           | C                  | 24,4                             | 21,0                                |                  |                    | –                | –                  |
| rs6462210 | C/C                | 782 (74,3)                       | 755 (73,9)                          | 1,00             | 0,39 <sup>R</sup>  | 1,00             | 0,29 <sup>R</sup>  |
|           | C/T                | 250 (23,8)                       | 242 (23,7)                          |                  |                    | 1,41 (0,74–2,70) |                    |
|           | T/T                | 20 (1,9)                         | 25 (2,5)                            | 1,29 (0,71–2,34) | 0,641              | –                | –                  |
|           | T                  | 13,8                             | 14,3                                | 1,04 (0,87–1,24) |                    | –                | –                  |
| rs28679   | G/G                | 533 (51)                         | 531 (52,2)                          | 1,00             | 0,12 <sup>R</sup>  | 1,00 R           | 0,053 <sup>R</sup> |
|           | G/A                | 414 (39,6)                       | 410 (40,3)                          |                  |                    | 0,71 (0,49–1,01) |                    |
|           | A/A                | 98 (9,4)                         | 76 (7,5)                            | 0,78 (0,57–1,07) | 0,268              | –                | –                  |
|           | A                  | 29,2                             | 27,6                                | 0,93 (0,81–1,06) |                    | –                | –                  |

Примечание. \* Расчеты выполнены с поправкой на пол, возраст и индекс массы тела, R — рецессивная модель, D — log-аддитивная модель, OR — отношение шансов,  $p$  — уровень значимости ассоциаций.

Ассоциация оставалась значимой и после введения поправок на пол, возраст и ИМТ (OR 0,80; 95 % CI 0,67–0,95;  $p = 0,013$ ). Статистически значимых различий по частотам генотипов локусов rs38420, rs6462210, rs28679 между группами больных СД2 и здоровых лиц не выявлено ( $p > 0,05$ ).

Анализ гаметического неравновесия по сцеплению показал, что rs38420 сцеплен с rs6462210 ( $D' = 0,960$ ,  $p < 0,0001$ ) и rs28679 ( $D' = 0,961$ ,  $p < 0,0001$ ), и последние 2 SNPs сцеплены между собой ( $D' = 0,951$ ,  $p < 0,0001$ ). При анализе частот гаплотипов у больных и здоровых лиц (табл. 3) обнаружено, что гаплотип G–C–C–G, включающий минорные аллели rs38420–rs4270–rs6462210–rs28679, ассоциирован с пониженным риском заболевания (OR 0,72; 95 % CI 0,58–0,90;  $p = 0,0032$ ).

Принимая во внимание тот факт, что растительная пища служит источником экзогенных антиоксидантов, а изучаемый ген *GGCT* непосредственно вовлечен в метаболизм антиоксиданта глутатиона, нам представлялось важным провести оценку влияния потребления свежих овощей и фруктов на ассоциации полиморфных локусов *GGCT* с риском развития СД2. Поскольку курение является мощным фактором риска СД2 [12], анализ в подгруппах участников исследования с различным отношением к овощам и фруктам проводили с учетом статуса курения. Подгруппы некурящих и курящих больных СД2 с достаточным потреблением овощей и фруктов отличались по возрасту, соотношению мужчин и женщин, ИМТ и длительности заболе-

вания, с преобладанием более молодых мужчин с меньшим стажем заболевания и более низким значением ИМТ среди курящих пациентов; подгруппы пациентов с недостаточным потреблением свежих овощей и фруктов отличались по тем же параметрам, с преобладанием более пожилых женщин с большим стажем заболевания и более высоким ИМТ среди некурящих больных с СД2 (данные не представлены). Генотипы T/C–C/C rs4270 ассоциировались с пониженным риском развития СД2 только в подгруппе некурящих пациентов, ежедневно потребляющих достаточное количество овощей и фруктов (OR 0,71; 95 % CI 0,54–0,93;  $p = 0,011$ ; табл. 4). Примечательно, что у некурящих больных, не потребляющих ежедневно достаточно овощей и фруктов, ассоциация полиморфных локусов гена *GGCT* с риском СД2 отсутствовала. Ассоциация полиморфизма *GGCT* с СД2 также отсутствовала у всех курящих пациентов, независимо от их отношения к свежим овощам и фруктам ( $p > 0,05$ ). Анализ частот гаплотипов в тех же четырех подгруппах (табл. 5) показал тот же тренд: ассоциация гаплотипа G–C–C–G, состоящего из альтернативных аллелей rs38420–rs4270–rs6462210–rs28679, была отмечена только в подгруппе некурящих и ежедневно потребляющих достаточное количество свежей растительной пищи (OR 0,62; 95 % CI 0,45–0,86;  $p = 0,0039$ ).

Оценка редокс-статуса 588 участников исследования показала, что уровень перекиси водорода  $H_2O_2$  в плазме 419 больных (3,82 [2,95; 4,94] мкмоль/л) был значительно выше такового в плазме

Таблица 3

Частоты гаплотипов *GGCT* у больных СД2 и здоровых лиц

| rs38420 | rs4270 | rs6462210 | rs28679 | Частота гаплотипов |                       | OR<br>(95 % CI)* | $p^*$  |
|---------|--------|-----------|---------|--------------------|-----------------------|------------------|--------|
|         |        |           |         | группа<br>контроля | группа<br>больных СД2 |                  |        |
| G       | T      | C         | G       | 0,4114             | 0,4553                | 1,00             | —      |
| A       | T      | C         | A       | 0,1824             | 0,1803                | 0,89 (0,75–1,07) | 0,21   |
| G       | C      | C         | G       | 0,1556             | 0,1233                | 0,72 (0,58–0,90) | 0,0032 |
| G       | T      | T         | G       | 0,0751             | 0,0824                | 0,99 (0,76–1,28) | 0,94   |
| G       | T      | C         | A       | 0,0785             | 0,0699                | 0,80 (0,61–1,04) | 0,098  |
| G       | C      | T         | G       | 0,0583             | 0,0592                | 0,92 (0,68–1,24) | 0,57   |
| A       | C      | C         | A       | 0,0151             | 0,0131                | 0,80 (0,38–1,66) | 0,54   |
| G       | C      | C         | A       | 0,0125             | 0,0127                | 0,91 (0,43–1,92) | 0,81   |

Примечания. \* Расчеты выполнены с поправкой на пол, возраст и индекс массы тела, OR — отношение шансов.

Таблица 4

Частоты генотипов GGCT у больных СД2 и здоровых лиц, стратифицированных по потреблению овощей и фруктов и курению

| SNP<br>гена <i>GGCT</i>                    | Генотип | Некурящие       |                 |                     |                    | Курящие         |                |                     |                   |
|--------------------------------------------|---------|-----------------|-----------------|---------------------|--------------------|-----------------|----------------|---------------------|-------------------|
|                                            |         | контроль        | больные<br>СД2  | OR<br>(95 % CI)*    | <i>p</i> *         | контроль        | больные<br>СД2 | OR<br>(95 % CI)*    | <i>p</i> *        |
| Потребляющие достаточно овощей и фруктов   |         |                 |                 |                     |                    |                 |                |                     |                   |
| rs38420                                    | G/G     | 384<br>(63,6 %) | 252<br>(64 %)   | 1,00                | 0,25 <sup>R</sup>  | 180<br>(65,2 %) | 71<br>(67 %)   | 1,00                | 0,31 <sup>R</sup> |
|                                            | G/A     | 191<br>(31,6 %) | 128<br>(32,5 %) |                     |                    | 84<br>(30,4 %)  | 32<br>(30,2 %) |                     |                   |
|                                            | A/A     | 29<br>(4,8 %)   | 14<br>(3,5 %)   | 0,64<br>(0,30–1,39) |                    | 12<br>(4,3 %)   | 3<br>(2,8 %)   | 0,44<br>(0,08–2,34) |                   |
| rs4270                                     | T/T     | 342<br>(56,6 %) | 256<br>(65,1 %) | 1,00                | 0,011 <sup>D</sup> | 164<br>(60,7 %) | 74<br>(69,8 %) | 1,00                | 0,25 <sup>D</sup> |
|                                            | T/C     | 216<br>(35,8 %) | 119<br>(30,3 %) | 0,71<br>(0,54–0,93) |                    | 95<br>(35,2 %)  | 30<br>(28,3 %) | 0,72<br>(0,41–1,27) |                   |
|                                            | C/C     | 46<br>(7,6 %)   | 18<br>(4,6 %)   |                     |                    | 11<br>(4,1 %)   | 2<br>(1,9 %)   |                     |                   |
| rs6462210                                  | C/C     | 442<br>(73,5 %) | 296<br>(75,1 %) | 1,00                | 0,16 <sup>R</sup>  | 207<br>(75,3 %) | 83<br>(78,3 %) | 1,00                | 0,17 <sup>R</sup> |
|                                            | C/T     | 150<br>(25 %)   | 87<br>(22,1 %)  |                     |                    | 61<br>(22,2 %)  | 22<br>(20,8 %) |                     |                   |
|                                            | T/T     | 9<br>(1,5 %)    | 11<br>(2,8 %)   | 2,08<br>(0,75–5,71) |                    | 7<br>(2,5 %)    | 1<br>(0,9 %)   | 0,23<br>(0,02–2,37) |                   |
| rs28679                                    | G/G     | 306<br>(51,3 %) | 202<br>(51,4 %) | 1,00                | 0,054 <sup>R</sup> | 140<br>(51,5 %) | 48<br>(47,1 %) | 1,00                | 0,27 <sup>R</sup> |
|                                            | G/A     | 230<br>(38,5 %) | 161<br>(41 %)   |                     |                    | 109<br>(40,1 %) | 46<br>(45,1 %) |                     |                   |
|                                            | A/A     | 61<br>(10,2 %)  | 30<br>(7,6 %)   | 0,59<br>(0,35–1,02) |                    | 23<br>(8,5 %)   | 8<br>(7,8 %)   | 0,54<br>(0,17–1,68) |                   |
| Потребляющие недостаточно овощей и фруктов |         |                 |                 |                     |                    |                 |                |                     |                   |
| rs38420                                    | G/G     | 89<br>(61,4 %)  | 259<br>(65,2 %) | 1,00                | 0,96 <sup>R</sup>  | 18<br>(58,1 %)  | 75<br>(60,5 %) | 1,00                | 0,73 <sup>R</sup> |
|                                            | G/A     | 51<br>(35,2 %)  | 124<br>(31,2 %) |                     |                    | 11<br>(35,5 %)  | 41<br>(33,1 %) |                     |                   |
|                                            | A/A     | 5<br>(3,5 %)    | 14<br>(3,5 %)   | 0,97<br>(0,32–2,98) |                    | 2<br>(6,5 %)    | 8<br>(6,5 %)   | 1,36<br>(0,24–7,84) |                   |
| rs4270                                     | T/T     | 74<br>(50,7 %)  | 234<br>(59,2 %) | 1,00                | 0,30 <sup>D</sup>  | 24<br>(77,4 %)  | 75<br>(60,5 %) | 1,00                | 0,13 <sup>D</sup> |
|                                            | T/C     | 63<br>(43,1 %)  | 139<br>(35,2 %) | 0,80(0,53–1,21)     |                    | 7<br>(22,6 %)   | 42<br>(33,9 %) | 2,06<br>(0,78–5,39) |                   |
|                                            | C/C     | 9<br>(6,2 %)    | 22<br>(5,6 %)   |                     |                    | 0<br>(5,7 %)    | 7<br>(5,7 %)   |                     |                   |
| rs6462210                                  | C/C     | 109<br>(74,7 %) | 281<br>(70,6 %) | 1,00                | 0,40 <sup>D</sup>  | 24<br>(80 %)    | 95<br>(76,6 %) | 1,00                | 0,79 <sup>D</sup> |
|                                            | C/T     | 33<br>(22,6 %)  | 108<br>(27,1 %) | 1,22<br>(0,77–1,93) |                    | 6<br>(20 %)     | 25<br>(20,2 %) | 1,15<br>(0,41–3,22) |                   |
|                                            | T/T     | 4<br>(2,7 %)    | 9<br>(2,3 %)    |                     |                    | 0<br>(3,2 %)    | 4<br>(3,2 %)   |                     |                   |
| rs28679                                    | G/G     | 72<br>(49,3 %)  | 223<br>(56 %)   | 1,00                | 0,91 <sup>R</sup>  | 15<br>(50 %)    | 58<br>(46,8 %) | 1,00                | 0,63 <sup>R</sup> |
|                                            | G/A     | 64<br>(43,8 %)  | 148<br>(37,2 %) |                     |                    | 11<br>(36,7 %)  | 55<br>(44,4 %) |                     |                   |
|                                            | A/A     | 10<br>(6,8 %)   | 27<br>(6,8 %)   | 1,04<br>(0,47–2,33) |                    | 4<br>(13,3 %)   | 11<br>(8,9 %)  | 0,72<br>(0,19–2,69) |                   |

Примечания. \* Расчеты выполнены с поправкой на пол, возраст и индекс массы тела. D — доминантная модель, R — рецессивная модель, AD — log-аддитивная модель. Полужирным выделены значимые OR и *p*. OR — отношение шансов, *p* — уровень значимости ассоциаций.

163 здоровых (3,05 [2,49; 3,64] мкмоль/л,  $p < 0,0001$ ). Содержание восстановленного GSH было также выше в группе пациентов с СД2 (0,79 [0,48; 1,05] мкмоль/л) по сравнению с контролем (0,37 [0,31; 0,50] мкмоль/л,  $p < 0,0001$ ). При анализе взаимосвязей между генотипами *GGCT* и биохимическими показателями редокс-статуса больных СД2 было обнаружено, что генотипы Т/С–С/С *rs4270* ассоциированы с повышением уровня GSH в плазме на 0,18 мкмоль/л (95 % CI 0,04–0,32,  $p = 0,016$ ), тогда как гаплотип G–C–C–G, состоящий из минорных аллелей *rs38420*–*rs4270*–*rs6462210*–*rs28679*, повышает уровень восстановленного глутатиона на 0,17 мкмоль/л (95 % CI 0,02–0,34,  $p = 0,03$ ).

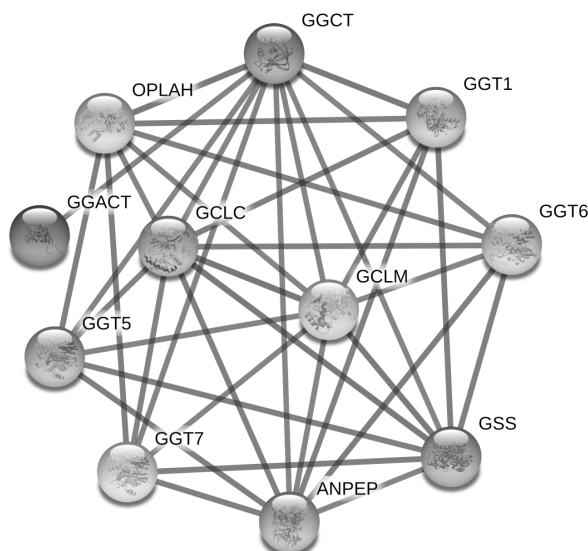
## ОБСУЖДЕНИЕ

В рамках настоящего исследования впервые выявлена ассоциация полиморфного локуса *rs4270* гена *GGCT* с пониженным риском развития СД2 в русской популяции. Нами также установлены генно-средовые взаимодействия, ассоциированные с предрасположенностью к заболеванию: протективный эффект гена гамма-глутамилциклотрансферазы проявлялся только у некурящих лиц при условии ежедневного употребления ими свежих овощей и фруктов, тогда как у лиц с недостаточным потреблением растительной пищи, а также у всех курящих больных защитный эффект *GGCT* не наблюдался. У больных СД2 содержание перекиси водорода и мономера глутатиона резко повышено по сравнению с контролем. Также было установлено, что SNP *rs4270* связан с повышением содержания восстановленного глутатиона в плазме крови больных СД2.

Гамма-глутамилциклотрансфераза (*GGCT*, 188 аминокислот, 21 кДа) — это регуляторный фермент антиоксидантной системы, главная функция которого заключается в поддержании внутриклеточного гомеостаза GSH, антиоксиданта, нейтрализующего все виды перекисных соединений и свободнорадикальных частиц. Фермент входит в гамма-глутамильный цикл, начинающийся с синтеза GSH из глутамата, цистеина и глицина под действием глутаматцистеинлигазы (*GCL*) и глутатионсинтетазы (*GSS*) с затратой двух молекул аденозинтрифосфата. Глутатион далее может быть экспортирован из клетки с помощью специально-

го трансмембранного переносчика. Внеклеточные гамма-глутамилтрансфераза (*GGT*) и дипептидаза (*DP*) разрушают GSH до аминокислот цистеина, глицина и гамма-глутамил содержащего дипептида, транспортируемых внутрь клетки. *GGCT* катализирует превращение гамма-глутамиламинокислоты в соответствующую аминокислоту и 5-оксопролин. Последний претерпевает гидролиз под действием оксопролиназы (*OPLAH*) с затратой одной молекулы аденозинтрифосфата и превращается в глутамат, вступающий вместе с цистеином и глицином в следующий виток синтеза GSH [18]. Дополнительное значение *GGCT* еще заключается в том, что этот фермент может осуществлять регуляцию *de novo* синтеза глутатиона благодаря своей активности в отношении гамма-глутамилцистеина, являющегося также субстратом *GSS*. Аффинность *GSS* к  $\gamma$ -глутамилцистеину выше таковой *GGCT*, и в нормальных условиях образуемый *GCL* продукт направляется на синтез GSH, однако при избытке глутамата и цистеина  $\gamma$ -Glu-Cys превращается в цистеин и 5-оксопролин под действием *GGCT*. Наконец, в условиях недостатка цистеина, *GCL* может катализировать конденсацию глутамата с отличной от цистеина аминокислотой, образуя гамма-глутамиламинокислоту, — потенциальный субстрат *GGCT*, превращаемый в аминокислоту и 5-оксопролин [19]. Функции *GGCT* не ограничены участием в реутилизации фрагментов GSH. Y. Ohno et al. [20] показали, что фермент также участвует в регуляции клеточного цикла, старения и необходим для пролиферации и дифференцировки клеток.

Анализ взаимодействий *GGCT* с другими генами на уровне белковых продуктов, выполненный с помощью инструмента STRING [21], показал, что *GGCT* образует сеть из 10 белков (см. рисунок). Анализ обогащения терминами генных онтологий Gene Ontology [22] обнаружил, что 8 ферментов: 5-оксопролиназа (*OPLAH*), каталитическая субъединица глутаматцистеинлигазы (*GCLC*), модифицирующая субъединица глутаматцистеинлигазы (*GCLM*), глутатионсинтетаза (*GSS*), гамма-глутамилтрансфераза 1 (*GGT1*), гамма-глутамилтрансфераза 5 (*GGT5*), гамма-глутамилтрансфераза 6 (*GGT6*), гамма-глутамилтрансфераза 7 (*GGT7*), совместно с *GGCT*, ответственны за биосинтез глутатиона (уровень значимости этой ассоциации с учетом поправки на множественное тестирование



Сеть белков, образуемая гамма-глутамилциклотрансферазой. GGCT — гамма-глутамилциклотрансфераза; OPLAH — 5-оксо-пролиназа; GGACT — гамма-глутамиламинциклотрансфераза; GCLC — глутаматцистеинлигаза, каталитическая субъединица; GCLM — глутаматцистеинлигаза, модифицирующая субъединица; GSS — глутатионсинтаза; ANPEP — аминопептидаза N; GGT1 — гамма-глутамилтрансфераза 1; GGT5 — гамма-глутамилтрансфераза 5; GGT6 — гамма-глутамилтрансфераза 6; GGT7 — гамма-глутамилтрансфераза 7

(false discovery rate),  $FDR = 1,47 \cdot 10^{-23}$ , тогда как GCLC, GCLM и GGCT участвуют в апоптотических изменениях митохондрий ( $FDR = 4,67 \cdot 10^{-5}$ ).

Выполненное нами исследование в русской популяции выявило ассоциацию однонуклеотидной замены rs4270 (T > C) в 3'-нетранслируемой области гена *GGCT* с пониженным риском развития СД2, тем самым впервые демонстрируя потенциальную вовлеченность гена гамма-глутамилциклотрансферазы в патогенез этой болезни. В литературе есть единичные исследования, посвященные изучению роли *GGCT* в развитии опухолей различной локализации [23–26]. Данные о связи *GGCT* и СД2 отсутствуют. Проведенный нами биоинформатический анализ установил, что минорные аллели всех изучаемых SNPs (rs38420 (G > A), rs4270 (T > C), rs6462210 (C > T) и rs28679 (G > A)) связаны с увеличением экспрессии гена *GGCT* в поджелудочной железе, нервной системе мышечной и висцеральной жировой ткани [27]. Согласно экспериментальным данным по оценке эффектов однонуклеотидных вариантов ДНК на статус метилирования генов *mQTL* [28], аллель C rs4270 связан с гипометилированием *GGCT* у взрослых, а следовательно, и с увеличением экспрессии этого гена. Биоинформатический инструмент atSNP [29] позволил определить, что аллель C создает участки связывания для 5 транскрипционных факторов:

SPDEF ( $p = 7,57 \cdot 10^{-5}$ ), MYB ( $p = 7,74 \cdot 10^{-4}$ ), MYBL1 ( $p = 9,90 \cdot 10^{-4}$ ), EP300 ( $p = 4,38 \cdot 10^{-4}$ ) и NRF1 ( $p = 1,67 \cdot 10^{-4}$ ), последний из которых представляет особый интерес, поскольку именно NRF1 запускает экспрессию ключевых антиоксидантных генов в условиях оксидантного стресса. В островках Лангерганса эти эффекты особенно важны ввиду низкой обеспеченности бета-клеток антиоксидантами и, как следствие, их большей уязвимостью, по сравнению с другими тканями [30]. Концентрация перекиси водорода у больных СД2 в нашем исследовании значимо превышала соответствующие показатели контрольной группы, что было описано и в других работах. Так, T. Inoguchi et al. [31] в эксперименте на клеточных линиях доказали увеличение продукции активных форм кислорода при СД2 в эндотелии, гладкомышечных клетках сосудов и почках, используя метод спектроскопии на основе электронного парамагнитного резонанса для детекции образуемых НАДФН-оксидазой супероксид-анионов. Гиперпродукция активных форм кислорода при СД2 также была показана в бета-клетках поджелудочной железы и инсулинзависимых тканях (жировой и мышечной), с чем связывают становление инсулинорезистентности и дисфункции бета-клеток [6, 32], особенно усугубляющимися на фоне снижения антиоксидантной защиты. Так, M. Lagman et al. [33]

Таблица 5

Частоты гаплотипов *GGCT* у больных СД2 и здоровых лиц, стратифицированных по потреблению овощей и фруктов и курению

| Гаплотипы изучаемых SNPs                   |        |           |         | Некурящие |             |                             |               | Курящие                                    |             |                      |            |
|--------------------------------------------|--------|-----------|---------|-----------|-------------|-----------------------------|---------------|--------------------------------------------|-------------|----------------------|------------|
| rs38420                                    | rs4270 | rs6462210 | rs28679 | контроль  | больные СД2 | OR (95 % CI)*               | <i>p</i> *    | контроль                                   | больные СД2 | OR (95 % CI)*        | <i>p</i> * |
| Потребляющие достаточно овощей и фруктов   |        |           |         |           |             |                             |               |                                            |             |                      |            |
| G                                          | T      | C         | G       | 0,3973    | 0,461       | 1,00                        | —             | 0,4352                                     | 0,4782      | 1,00                 | —          |
| A                                          | T      | C         | A       | 0,183     | 0,1838      | 0,86<br>(0,66—1,11)         | 0,25          | 0,1731                                     | 0,1729      | 0,91<br>(0,57—1,45)  | 0,69       |
| G                                          | C      | C         | G       | 0,1632    | 0,1165      | <b>0,62<br/>(0,45—0,86)</b> | <b>0,0039</b> | 0,1425                                     | 0,1106      | 0,70<br>(0,39—1,25)  | 0,22       |
| G                                          | T      | T         | G       | 0,0722    | 0,0871      | 1,02<br>(0,69—1,49)         | 0,93          | 0,0865                                     | 0,0751      | 0,82<br>(0,43—1,58)  | 0,56       |
| G                                          | T      | C         | A       | 0,0819    | 0,0709      | 0,73<br>(0,49—1,08)         | 0,11          | 0,0851                                     | 0,1135      | 1,26<br>(0,69—2,27)  | 0,45       |
| G                                          | C      | T         | G       | 0,0617    | 0,0505      | 0,72<br>(0,46—1,12)         | 0,15          | 0,0463                                     | 0,0326      | 0,67<br>(0,23—1,95)  | 0,46       |
| G                                          | C      | C         | A       | 0,0122    | 0,0161      | 1,18<br>(0,44—3,19)         | 0,74          | 0,0074                                     | 0,0053      | 0,60<br>(0,08—4,55)  | 0,62       |
| A                                          | C      | C         | A       | 0,0142    | 0,0099      | 0,66<br>(0,20—2,19)         | 0,5           | 0,0158                                     | 0,0064      | 0,37<br>(0,04—3,16)  | 0,36       |
| Общий <i>p</i> ассоциаций гаплотипов:      |        |           |         |           |             |                             | <b>0,041</b>  | Общий <i>p</i> ассоциаций гаплотипов: 0,61 |             |                      |            |
| Потребляющие недостаточно овощей и фруктов |        |           |         |           |             |                             |               |                                            |             |                      |            |
| G                                          | T      | C         | G       | 0,4034    | 0,4536      | 1,00                        | —             | 0,5458                                     | 0,419       | 1,00                 | —          |
| A                                          | T      | C         | A       | 0,1851    | 0,1694      | 0,81<br>(0,53—1,22)         | 0,31          | 0,1933                                     | 0,2067      | 1,49<br>(0,67—3,32)  | 0,34       |
| G                                          | C      | C         | G       | 0,1647    | 0,1327      | 0,71<br>(0,44—1,15)         | 0,17          | 0,0537                                     | 0,1331      | 3,26<br>(0,63—16,92) | 0,16       |
| G                                          | T      | T         | G       | 0,0713    | 0,0867      | 1,08<br>(0,58—2,00)         | 0,81          | 0,0914                                     | 0,0635      | 0,78<br>(0,25—2,46)  | 0,68       |
| G                                          | C      | T         | G       | 0,0691    | 0,0706      | 0,91<br>(0,48—1,74)         | 0,78          | NA                                         | 0,065       | NA                   | NA         |
| G                                          | T      | C         | A       | 0,059     | 0,0564      | 0,90<br>(0,46—1,77)         | 0,76          | 0,0566                                     | 0,0804      | 1,82<br>(0,46—7,14)  | 0,39       |
| A                                          | C      | C         | A       | 0,02      | 0,0189      | 0,93<br>(0,19—4,51)         | 0,93          | 0,0391                                     | 0,0142      | 0,58<br>(0,06—5,52)  | 0,64       |
| G                                          | C      | C         | A       | 0,0236    | 0,0091      | 0,31<br>(0,07—1,32)         | 0,11          | 0,0106                                     | 0,009       | 1,30<br>(0,02—9,65)  | 0,91       |
| Общий <i>p</i> ассоциаций гаплотипов:      |        |           |         |           |             |                             | 0,63          | Общий <i>p</i> ассоциаций гаплотипов: 0,67 |             |                      |            |

Примечания. \* Расчеты выполнены с поправкой на пол, возраст и индекс массы тела. NA — not applicable (не применимо). Полу жирным выделены значимые OR и *p*. OR — отношение шансов, *p* — уровень значимости ассоциаций.

показали, что концентрация восстановленного глутатиона в плазме и эритроцитах больных СД2 была в 2 раза ниже, а уровень окисленного глутатиона в 2 раза выше, чем у здоровых лиц.

Содержание восстановленного глутатиона в плазме пациентов с СД2 в нашем исследовании значимо превышало таковое у лиц контрольной группы, что, вероятно, связано с компенсаторной трансактива-

цией генов ферментов антиоксидантной системы (в частности, *GCL* и *GSS*), в избытке образующимися активными формами кислорода [34]. Положительный эффект *GGCT* на редокс-баланс был показан только в нашей работе: SNP rs4270 ассоциирован с повышением уровня GSH у больных СД2.

По всей видимости, ассоциация полиморфизма гена *GGCT* с СД2 модулируется внешними факто-

рами: в нашем исследовании протективный эффект минорных аллелей изучаемых локусов *GGCT* был отмечен только у некурящих пациентов, ежедневно потребляющих не менее 6 порций свежих овощей и фруктов. Именно растительная пища служит природным источником витаминов и антиоксидантов, способными восполнить их эндогенный дефицит. Оценка связи потребления свежих овощей и фруктов с СД2 по данным литературы неоднозначна. Так, P. Carter et al. [35] установили, что ежедневное потребление свежих овощей и фруктов снижает риск заболевания на 14 %, тогда как H. Boeing et al. [36] исключили наличие прямой связи между количеством потребляемой растительной пищи и риском СД2. A.J. Cooper et al. [37] рассчитали, что потребление свежих овощей, фруктов и их сочетаний снижает риск СД2 на 25, 28 и 32 % соответственно. Обратная связь между количеством растительной пищи и риском заболевания была показана в исследовании I. Muraki [38], включавшем 150 000 женщин и 35 000 мужчин, а также в метаанализе M. Li [39]. Антидиабетический эффект свежих овощей и фруктов может быть связан с тем, что, во-первых, флавоноид кверцетин, компонент растительной пищи, повышает экспрессию ферментов антиоксидантного профиля, а также стимулирует транслокацию транспортеров глюкозы-4 (GLUT4) к мембранам миоцитов и ингибирует глюкозо-6-фосфатазу в печени, способствуя нормализации гликемического профиля [40]. Во-вторых, показано, что кверцетин и полиоксифенолы растительной пищи активируют экспрессию Nrf2, запускающего транскрипцию ключевых антиоксидантных ферментов в ответ на активные формы кислорода и подавляющего провоспалительные эффекты ядерного транскрипционного фактора  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) [41].

Протективный эффект *GGCT* также отсутствовал у всех курящих участников исследования. Токсины табачного дыма оказывают прямое токсическое действие на ткань поджелудочной железы даже при пассивном курении [42, 43], подавляя секрецию инсулина [44]. Кроме того, никотин индуцирует липолиз, воспаление и оксидантный стресс в жировой ткани с последующим развитием дислипидемии, инсулинорезистентности и нарушением сигнализации инсулина [44, 45]. В то же время курение увеличивает риск абдоминаль-

ного ожирения за счет усиления инактивирующего гидроксирования эстрадиола (антиэстрогенный эффект) [44]. Таким образом, комбинация курения, усиливающего прооксидантный статус клеток, и недостаточного потребления свежей растительной пищи, естественного источника антиоксидантов, создает тот самый отрицательный метаболический фундамент, на котором происходит манифестация СД2 или декомпенсация уже имеющегося заболевания.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В проведенном исследовании впервые установлена ассоциация SNP rs4270 гена *GGCT* с пониженным риском развития СД2. Механизм взаимосвязи данного варианта с заболеванием объясняется увеличением экспрессии гена *GGCT* у носителей минорного аллеля С, что проявляется повышением концентрации восстановленного глутатиона в плазме крови. Данная ассоциация модулируется антиоксидантными эффектами внешней среды: потребление свежих овощей и фруктов и отказ от курения способствуют проявлению защитных эффектов *GGCT* в отношении риска развития заболевания. Полученные данные открывают перспективы для дальнейшего изучения генетико-биохимических особенностей метаболизма глутатиона при СД2 и поиска новых молекулярных мишеней для терапии и профилактики болезней.

*Источник финансирования.* Исследование выполнено при финансовой поддержке ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России.

*Конфликт интересов.* Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

*Благодарности.* Авторы выражают благодарность главному врачу Курской городской клинической больницы скорой медицинской помощи В.Е. Ивакину, а также главному врачу Курской областной станции переливания крови А.П. Ковалеву за оказанную помощь в организации сбора клинического материала.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, et al. IDF IDF Diabetes atlas: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabe-*

- tes Res Clin Pract.* 2018;138:271-281. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.02.023>.
2. Дедов И.И., Шестакова М.В., Викулова О.К. и др. Сахарный диабет в Российской Федерации: распространенность, заболеваемость, смертность, параметры углеводного обмена и структура сахароснижающей терапии по данным федерального регистра сахарного диабета, статус 2017 г. // Сахарный диабет. — 2018. — Т. 21. — № 3. — С. 144-159. [Dedov II, Shestakova MV, Vikulova OK, et al. Diabetes mellitus in Russian Federation: prevalence, morbidity, mortality, parameters of glycaemic control and structure of glucose lowering therapy according to the Federal Diabetes Register, status 2017. *Diabetes mellitus.* 2018;21(3):144-159. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.14341/dm9686>.
  3. Buniello A, MacArthur JAL, Cerezo M, et al. The NHGRI-EBI GWAS Catalog of published genome-wide association studies, targeted arrays and summary statistics 2019. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D1005-D1012. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1120>.
  4. Shah M, Vella A. What is type 2 diabetes? *Medicine.* 2014;42(12):687-691. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2014.09.013>.
  5. DeFronzo RA. Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes.* 2009;58(4):773-795. <https://doi.org/10.2337/db09-9028>.
  6. Newsholme P, Cruzat VF, Keane KN, et al. Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. *Biochem J.* 2016;473(24):4527-4550. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160503C>.
  7. Malik VS, Popkin BM, Bray GA, et al. Sugar-sweetened beverages, obesity, type 2 diabetes mellitus, and cardiovascular disease risk. *Circulation.* 2010;121(11):1356-1364. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.876185>.
  8. Cederberg H, Stančáková A, Kuusisto J, et al. Family history of type 2 diabetes increases the risk of both obesity and its complications: is type 2 diabetes a disease of inappropriate lipid storage? *J Intern Med.* 2015;277(5):540-551. <https://doi.org/10.1111/joim.12289>.
  9. Orłowski M, Meister A. The gamma-glutamyl cycle: a possible transport system for amino acids. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1970;67(3):1248-1255. <https://doi.org/10.1073/pnas.67.3.1248>.
  10. Azarova I, Bushueva O, Konoplya A, Polonikov A. Glutathione S-transferase genes and the risk of type 2 diabetes mellitus: role of sexual dimorphism, gene-gene and gene-smoking interactions in disease susceptibility. *J Diabetes.* 2018;10(5):398-407. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.12623>.
  11. Азарова Ю.Э., Клесова Е.Ю., Конопля А.И. Роль полиморфизмов генов глутаматцистеинлигазы в развитии сахарного диабета 2 типа у жителей Курской области // Научный результат. Медицина и фармация. — 2018. — Т. 4. — № 1. — С. 39-52. [Azarova YuE, Klyosova EYu, Konoplya AI. The role of polymorphisms of glutamate-cysteine ligase in type 2 diabetes mellitus susceptibility in Kursk population. *Research result. Medicine and pharmacy.* 2018;4(1):39-52. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.18413/2313-8955-2018-4-1-39-52>.
  12. Organization WT. Global report on diabetes: executive summary (No. WHO/NMH/NVI/16.3). World Health Organization; 2016. <https://doi.org/10.30875/3fa8639a-en>.
  13. Xu Z, Taylor JA. SNPinfo: integrating GWAS and candidate gene information into functional SNP selection for genetic association studies. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(Web Server Issue):W600-605. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp290>.
  14. Пономаренко И.В. Отбор полиморфных локусов для анализа ассоциаций при генетико-эпидемиологических исследованиях // Научный результат. Медицина и фармация. — 2018. — Т. 4. — № 2. — С. 40-54. [Ponomarenko IV. Selection of polymorphic loci for association analysis in genetic-epidemiological studies. *Research result. Medicine and pharmacy.* 2018;4(2):40-54. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-5>.
  15. Skol AD, Scott LJ, Abecasis GR, Boehnke M. Joint analysis is more efficient than replication-based analysis for two-stage genome-wide association studies. *Nat Genet.* 2006;38(2):209-213. <https://doi.org/10.1038/ng1706>.



16. Solé X, Guinó E, Valls J, et al. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006;22(15):1928-1929. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl268>.
17. Hunt SE, McLaren W, Gil L, et al. Ensembl variation resources. *Database (Oxford)*. 2018;2018. <https://doi.org/10.1093/database/bay119>.
18. Liu Y, Hyde AS, Simpson MA, Barycki JJ. Emerging regulatory paradigms in glutathione metabolism. *Adv Cancer Res*. 2014;122:69-101. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420117-0.00002-5>.
19. Bachhawat AK, Yadav S. The glutathione cycle: glutathione metabolism beyond the  $\gamma$ -glutamyl cycle. *IUBMB Life*. 2018;70(7):585-592. <https://doi.org/10.1002/iub.1756>.
20. Kageyama S, Ii H, Taniguchi K, et al. Mechanisms of tumor growth inhibition by depletion of  $\gamma$ -glutamylcyclotransferase (GGCT): a novel molecular target for anticancer therapy. *Int J Mol Sci*. 2018;19(7). pii: E2054. <https://doi.org/10.3390/ijms19072054>.
21. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D607-D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>.
22. The Gene Ontology Consortium. The gene ontology resource: 20 years and still going strong. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D330-D338. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1055>.
23. Lin Z, Xiong L, Zhou J, et al.  $\gamma$ -Glutamylcyclotransferase knockdown inhibits growth of lung cancer cells through g0/g1 phase arrest. *Cancer Biother Radiopharm*. 2015;30(5): 211-216. <https://doi.org/10.1089/cbr.2014.1807>.
24. Zhang W, Chen L, Xiang H, et al. Knockdown of GGCT inhibits cell proliferation and induces late apoptosis in human gastric cancer. *BMC Biochem*. 2016;17(1):19. <https://doi.org/10.1186/s12858-016-0075-8>.
25. Dong J, Zhou Y, Liao Z, et al. Role of  $\gamma$ -glutamyl cyclotransferase as a therapeutic target for colorectal cancer based on the lentivirus-mediated system. *Anticancer Drugs*. 2016;27(10):1011-1020. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000407>.
26. Matsumura K, Nakata S, Taniguchi K, et al. Depletion of  $\gamma$ -glutamylcyclotransferase inhibits breast cancer cell growth via cellular senescence induction mediated by CDK inhibitor upregulation. *BMC Cancer*. 2016;16(1):748. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2779-y>.
27. GTex Portal. Current Release (V8) [cited 2019 August 25]. Available from: <https://www.gtexportal.org>.
28. Gaunt TR, Shihab HA, Hemani G, et al. Systematic identification of genetic influences on methylation across the human life course. *Genome Biol*. 2016;17:61. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0926-z>.
29. Zuo C, Shin S, Keleş S. atSNP: transcription factor binding affinity testing for regulatory SNP detection. *Bioinformatics*. 2015;31(20):3353-3355. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv328>.
30. Gerber PA, Rutter GA. The role of oxidative stress and hypoxia in pancreatic beta-cell dysfunction in diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal*. 2017;26(10):501-518. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6755>.
31. Inoguchi T, Li P, Umeda F, et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C – dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*. 2000;49(11):1939-1945. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.11.1939>.
32. Brownlee M. A radical explanation for glucose-induced beta cell dysfunction. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1788-1790. <https://doi.org/10.1172/jci200320501>.
33. Lagman M, Ly J, Saing T, et al. Investigating the causes for decreased levels of glutathione in individuals with type II diabetes. *PLoS One*. 2015;10(3):e0118436. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118436>.
34. Halliwell B, Gutteridge J. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press Oxford; 1999.
35. Carter P, Gray LJ, Troughton J, et al. Fruit and vegetable intake and incidence of type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2010;341:c4229. <https://doi.org/10.1136/bmj.c4229>.

36. Boeing H, Bechthold A, Bub A, et al. Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. *Eur J Nutr.* 2012;51(6):637-663. <https://doi.org/10.1007/s00394-012-0380-y>.
37. Cooper AJ, Sharp SJ, Lentjes MA, et al. A prospective study of the association between quantity and variety of fruit and vegetable intake and incident type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2012;35(6):1293-1300. <https://doi.org/10.2337/dc11-2388>.
38. Muraki I, Imamura F, Manson JE, et al. Fruit consumption and risk of type 2 diabetes: results from three prospective longitudinal cohort studies. *BMJ.* 2013;347:f5001. <https://doi.org/10.1136/bmj.f5001>.
39. Li M, Fan Y, Zhang X, et al. Fruit and vegetable intake and risk of type 2 diabetes mellitus: meta-analysis of prospective cohort studies. *BMJ Open.* 2014;4(11):e005497. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2014-005497>.
40. Xu L, Li Y, Dai Y, Peng J. Natural products for the treatment of type 2 diabetes mellitus: pharmacology and mechanisms. *Pharmacol Res.* 2018;130:451-65. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.01.015>.
41. Cardozo LF, Pedruzzi LM, Stenvinkel P, et al. Nutritional strategies to modulate inflammation and oxidative stress pathways via activation of the master antioxidant switch Nrf2. *Biochimie.* 2013;95(8):1525-1533. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.04.012>.
42. Rimm EB, Chan J, Stampfer MJ, et al. Prospective study of cigarette smoking, alcohol use, and the risk of diabetes in men. *BMJ.* 1995;310(6979):555-559. <https://doi.org/10.1136/bmj.310.6979.555>.
43. Zhang L, Curhan GC, Hu FB, et al. Association between passive and active smoking and incident type 2 diabetes in women. *Diabetes Care.* 2011;34(4):892-897. <https://doi.org/10.2337/dc10-2087>.
44. Zhu P, Pan XF, Sheng L, et al. Cigarette smoking, diabetes, and diabetes complications: call for urgent action. *Curr Diab Rep.* 2017;17(9):78. <https://doi.org/10.1007/s11892-017-0903-2>.
45. Rajagopalan S, Brook RD. Air pollution and type 2 diabetes: mechanistic insights. *Diabetes.* 2012;61(12):3037-3045. <https://doi.org/10.2337/db12-0190>.

#### ✿ Информация об авторах

**Юлия Эдуардовна Азарова** — канд. мед. наук, доцент кафедры биологической химии, зав. лабораторией биохимической генетики и метаболомики НИИ генетической и молекулярной эпидемиологии. ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России, Курск. E-mail: azzzzar@yandex.ru.

**Елена Юрьевна Клёсова** — инженер-биотехнолог, лаборатория биохимической генетики и метаболомики НИИ генетической и молекулярной эпидемиологии. ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России, Курск. E-mail: ecless@yandex.ru.

**Михаил Иванович Чурилин** — ассистент, кафедра инфекционных болезней и эпидемиологии. ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России, Курск. E-mail: mpmi2@yandex.ru.

**Татьяна Александровна Самгина** — канд. мед. наук, доцент, доцент кафедры хирургических болезней № 2. ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России, Курск. E-mail: tass@list.ru.

**Александр Иванович Конопля** — д-р мед. наук, профессор, профессор кафедры биологической химии. ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России, Курск. E-mail: konoplya51@mail.ru.

**Алексей Валерьевич Полоников** — д-р мед. наук, профессор, профессор кафедры биологии, медицинской генетики и экологии, зав. лабораторией статистической генетики и биоинформатики, НИИ генетической и молекулярной эпидемиологии. ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России, Курск. E-mail: polonikov@rambler.ru.

#### ✿ Authors and affiliations

**Iuliia E. Azarova** — MD, PhD, Associate Professor of Department of Biological Chemistry of KSMU, Head of Laboratory of Biochemical Genetics and Metabolomics of Research Institute for Genetic and Molecular Epidemiology. Kursk State Medical University, Kursk, Russia. E-mail: azzzzar@yandex.ru.

**Elena Yu. Klyosova** — biotechnologist of Laboratory of Biochemical Genetics and Metabolomics of Research Institute for Genetic and Molecular Epidemiology. Kursk State Medical University, Kursk, Russia. E-mail: ecless@yandex.ru.

**Mikhail I. Churilin** — Assistant Lecturer of Department of Infectious Diseases. Kursk State Medical University, Kursk, Russia. E-mail: mpmi2@yandex.ru.

**Tatiana A. Samgina** — MD, PhD, Associate Professor, Associate Professor of Department of Surgical Diseases No. 2. Kursk State Medical University, Kursk, Russia. E-mail: tass@list.ru.

**Alexander I. Konoplya** — MD, PhD, Professor, Professor of Department of Biological Chemistry. Kursk State Medical University, Kursk, Russia. E-mail: konoplya51@mail.ru.

**Alexey V. Polonikov** — MD, PhD, Professor, Professor of Department of Biology, Medical Genetics and Ecology, Head of Laboratory of Statistical Genetics and Bioinformatics of Research Institute for Genetic and Molecular Epidemiology. Kursk State Medical University, Kursk, Russia. E-mail: polonikov@rambler.ru.

## ЗАБОЛЕВАНИЯ ЧЕЛОВЕКА, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ГЕНОМ *NTE*

© П.А. Мелентьев<sup>1</sup>, О.Е. Агранович<sup>2</sup>, С.В. Саранцева<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Гатчина;

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр детской травматологии и ортопедии им. Г.И. Турнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Пушкин, Санкт-Петербург

Для цитирования: Мелентьев П.А., Агранович О.Е., Саранцева С.В. Заболевания человека, ассоциированные с геном *NTE* // Экологическая генетика. — 2020. — Т. 18. — № 2. — С. 229–242. <https://doi.org/10.17816/ecogen16327>.

Поступила: 04.10.2019

Одобрена: 06.03.2020

Принята: 23.06.2020

✿ Эволюционно консервативный ген *NTE* играет важную роль в поддержании жизнеспособности и функционирования клеток нервной системы, а нарушение его работы приводит к различным патологиям. В работе рассмотрены характерные черты различных болезней, как вызванных ингибированием активности белка *NTE* (OPIDN), так и обусловленных мутациями в гене *NTE*: наследственная спастическая параплегия (форма SPG39), синдромы Boucher – Neuhauser, Gordon Holmes, Laurence – Moon, Oliver – McFarlane, врожденный амавроз Лебера, чистая мозжечковая атаксия. Обзор обобщает накопленные данные о клинической картине заболеваний человека, ассоциированных с геном *NTE*, представляя их в историческом аспекте медико-биологических исследований, и рассматривает молекулярно-генетические закономерности этиологии этих болезней.

✿ **Ключевые слова:** *NTE*; PNPLA6; hSWS; нейродегенерация; болезни нервной системы; наследственные заболевания; спастическая параплегия; атаксия; органофосфаты.

## HUMAN DISEASES ASSOCIATED WITH *NTE* GENE

© P.A. Melentev<sup>1</sup>, O.E. Agranovich<sup>2</sup>, S.V. Sarantseva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of NRC “Kurchatov Institute”, Gatchina, Russia;

<sup>2</sup> Turner Scientific Research Institute for Children’s Orthopedics, Pushkin, Saint Petersburg, Russia

Cite this article as: Melentev PA, Agranovich OE, Sarantseva SV. Human diseases associated with *NTE* gene. *Ecological genetics*. 2020;18(2):229–242. <https://doi.org/10.17816/ecogen16327>.

Received: 04.10.2019

Revised: 06.03.2020

Accepted: 23.06.2020

✿ Evolutionary conserved *NTE* gene is important for survival and functioning of nervous system cells, its dysfunction leads to various pathologies. Here we describe characteristics of different disorders induced by *NTE* protein activity inhibition (OPIDN) or by *NTE* gene mutations: hereditary spastic paraplegia (SPG39), Boucher – Neuhauser, Gordon Holmes, Laurence – Moon, Oliver – McFarlane syndromes, Leber congenital amaurosis, pure cerebellar ataxia. Current review summarises accumulated data about clinical features of *NTE* associated diseases, presenting them in a historical way of biomedical studies, and observes molecular and genetic causes of these disorders.

✿ **Keywords:** *NTE*; PNPLA6; hSWS; neurodegeneration; nervous system disorders; hereditary diseases; spastic paraplegia; ataxia; organophosphates.

## ВВЕДЕНИЕ

Ген *NTE* человека в настоящее время все чаще именуется как *PNPLA6* вследствие наличия паттин-подобного лизофосфолипазного (эстеразного) домена, обнаруженного у соответствующего белка. Существует целое семейство белков *PNPLA*, содержащих такой домен, и у человека обнаружено не менее 8 представителей этого семейства [1]. Весьма редко употребляют другие названия, являющиеся синонимами *PNPLA6*: *hSWS*, *BNHS*, *LNMS*, *OMCS*, *SPG39*, *NTEMND*,

*iPLA2delta*. Однако исторически, с момента своего открытия, в течение нескольких десятилетий белок (и соответствующий ген) имел название *NTE* (Neuropathy Target Esterase), которое и будет использовано далее. Белок *NTE* является эволюционно консервативным, его ортологи найдены у широкого круга организмов — от бактерий до млекопитающих. Трансмембранный участок, расположенный на N-конце, удерживает белок на мембране эндоплазматического ретикулума, а его длинный C-концевой фрагмент, обращенный в цитоплазму, наряду

с лизофосфолипазной функцией, выполняет функции неканонической регуляторной субъединицы протеинкиназы А. У человека длина канонической изоформы-4 белка составляет 1375 аминокислот, однако подавляющее большинство исследований посвящено более короткой изоформе-2, длина которой 1327 аминокислот. Последняя имеет 3 домена связывания циклических нуклеотидмонофосфатов, которые занимают положения 163-262, 480-573, 597-689, а эстеразный домен имеет положение 933-1099, где нуклеофильный активный сайт представлен Ser<sub>966</sub>, в то время как протоноакцепторные сайты представлены Asp<sub>960</sub> и Asp<sub>1086</sub>. Ген *NTE* широко экспрессируется в развивающейся и взрослой нервной системе, но с возрастом его экспрессия ограничена крупными нейронами, например пирамидными клетками гиппокампа и клетками Пуркинье мозжечка [2, 3]. Нокаут одноименного ортолога *NTE* у мышей приводит к гибели эмбрионов на 9-й день из-за дефектов развития плаценты. Особи, несущие лишь одну нормальную аллель *NTE*, жизнеспособны и развиваются нормально, хотя и имеют сниженную на 50 % активность *NTE* [4]. Инактивация экспрессии *NTE* в нейронах мыши ведет к нейродегенерации — гибнут клетки гиппокампа, таламуса, клетки Пуркинье мозжечка [5]. Нарушение функции *NTE* у человека вызывает целый ряд тяжелых ауто-сомно-рецессивных заболеваний с различными клиническими симптомами, такими как гипогонадизм, хориоретинальная дистрофия, пигментный ретинит, атаксия, спастичность.

### ОТСРОЧЕННАЯ НЕЙРОПАТИЯ, ВЫЗВАННАЯ ОРГАНИЧЕСКИМИ ФОСФАТАМИ

Первым описанным синдромом, связанным с дисфункцией *NTE*, была отсроченная нейропатия, вызванная органическими фосфатами (OPIDN, organophosphorus compound-induced delayed neuropathy). Специфическая форма паралича поразила десятки тысяч людей, употреблявших во времена сухого закона в США фальсифицированный алкогольный напиток Jamaica Ginger (Jake). Первый признак заболевания в виде боли в мышцах ног, иногда сопровождающейся онемением пальцев, наблюдали через 10–20 дней после употребления напитка. Еще через 7–10 дней подобные проявления наблюдали и в верхних конечностях, но они были менее выраженными. В слу-

чае умеренного течения болезни пациенты могли передвигаться при помощи костылей, в тяжелых случаях больные были прикованы к постели и не были самостоятельными [6]. Слабость в конечностях развивалась в течение периода, продолжающегося до 2 месяцев, в единственном известном самом тяжелом случае все закончилось бульбарным синдромом и смертью. Состояние пациентов со временем улучшалось, мышечная сила в верхних конечностях восстанавливалась быстрее, чем в нижних, но полного выздоровления пациенты не достигали. Гистологический анализ постмортального материала выявил деструкцию мышц конечностей, их замещение соединительной тканью, уменьшение просвета подходящих к ним мелких артерий, ангиогенез. В периферических нервах уменьшалось число аксонов, происходила демиелинизация нервного волокна. В спинном мозге были поражены нижние отделы нисходящего латерального пирамидного тракта, здесь же наблюдался глиоз (разрастание астроцитарной глии) и демиелинизация. Умеренные повреждения были зафиксированы в верхних отделах тонкого пучка Голля (афферентные волокна, идущие от нижних конечностей), но никогда в клиновидном пучке Бурдаха (афферентные волокна, идущие от верхних конечностей). Дегенерация белого вещества (миелинизированных пучков аксонов) наблюдалась только в спинном мозге. Дегенерация серого вещества (тел нервных клеток) обнаруживалась преимущественно в передних рогах спинного мозга, где располагаются мотонейроны, и, в меньшей степени, в боковых рогах, содержащих висцеральные мотонейроны. Течение болезни не зависело от возраста пациентов [7].

Химический анализ фальсификата Jamaica Ginger (Jake) и тестирование смесей на кроликах, собаках, обезьянах, курицах и телятах выявили, что токсическим агентом были фенольные эфиры фосфорной кислоты, а именно триортокрезилфосфат (ТОСР, triorthocresil phosphate), добавляемый бутлегерами в напиток вместо горького имбирного экстракта. Трипаракрезилфосфат не приводил к подобным эффектам, но оказывал токсическое действие, подобное действию фенолов (в частности, крезолов), не влияющее на моторные функции, возникающее, вероятно, вследствие его расщепления в организме до паракрезола.

После перорального или внутримышечного введения сублетальных доз ТОСР кроликам, равно как и при введении фальсифицированного напитка, первые симптомы проявлялись только через несколько дней. Так, наблюдалась гипертоническая рефлексия, спастическая походка, развивающийся тремор и эмпростотонус (положение тела с согнутым вперед туловищем за счет сокращения мышц), которые прогрессировали и приводили к вялому параличу с нарушенным сердцебиением и ослабленным медленным дыханием, а затем к смерти животного. Малые дозы вызывали эффекты подобного характера, но менее выраженные, и животные через некоторое время восстанавливались.

Впоследствии было установлено, что различные фосфорорганические соединения (ОР, *organophosphates*, органические фосфаты) обладают токсичным действием. Органические эфиры фосфорной кислоты являются компонентами некоторых нервнопаралитических ядов, промышленных химикатов и лекарственных препаратов. С 1970-х гг. органические фосфаты стали широко использовать в составе инсектицидов [8, 9]. При попадании в организм человека эти вещества вызывают тяжелую нейропатию, симптомы которой могут быть разделены на три стадии: острый холинэргический синдром, умеренный промежуточный синдром и OPIDN [10, 11].

Мишенями фосфорорганических эфиров являются сериновые гидролазы (имеют остаток Ser в активном центре): ацетилхолинэстераза (AChE), бутирилхолинэстераза (BchE, псевдохлинэстераза) и выявленная при помощи радиоактивно-меченого необратимого ингибитора диизопропилфторфосфата (DFP) нейротоксичная эстераза (NTE, *neurotoxic esterase*, *neuropathy target esterase*) — главный участник патогенеза OPIDN [12, 13].

Фосфорорганические эфиры, такие как мипафокс, диизопропилфторфосфат, хлорофос, дихлофос, ингибируют как NTE, так и AChE, BchE [14, 15]. Нейропатические органические фосфаты, фосфорамидаты, фосфонаты взаимодействуют с активным центром NTE (с гидроксильной группой серина), образуя промежуточный продукт — сложный эфир фосфорной кислоты. Вторая стадия реакции называется «старением NTE», так как этот процесс прогрессирующий и необратимый, — после него нуклеофильные агенты не способны активи-

ровать NTE вновь. В ходе этой реакции отщепляется один из боковых радикалов у атома фосфора. Сульфонилфториды, фосфинаты, карбаматы, тиокарбаматы не являются нейротоксичными; они способны взаимодействовать с NTE и фосфорилировать его, однако не вызывают «старения» последнего, то есть не ведут к ингибированию NTE и развитию OPIDN [2].

Свойство NTE связывать ОР используют для определения ферментативной (эстеразной) активности белка. Активность NTE в белковом лизате может быть определена в ходе реакции гидролиза фенилвалерата (фенилового эфира пентановой кислоты) в присутствии параоксона (не нейротоксичного ОР, который не ингибирует активность NTE, но ингибирует AChE), но в отсутствие мипафокса (нейротоксичного ОР, который ингибирует активность NTE и AChE) [16]. При тестировании различных ОР на нейротоксичность основным модельным объектом долгое время оставалась курица, у которой фенотипические проявления OPIDN весьма сходны с таковыми у человека. После латентной фазы, продолжающейся 8–14 дней после введения раствора ОР в пищевод, развивается быстрая утомляемость, нежелание двигаться, походка становится неуклюжей, в течение следующих 4–5 дней прогрессирует слабость в конечностях, и птицы теряют способность стоять, ахиллов рефлекс ослабляется, развивается гипотония в ногах. В крыльях также постепенно развивается слабость, выраженная в гораздо меньшей степени, чем в ногах. Часто через 3–4 недели после сильного отравления птицы погибают, но летального исхода удается избежать при сокращении дозы ОР.

Гистологические исследования отравленных птиц выявили дезорганизацию миелинового слоя периферических нервов, образование миелиновых глобул, фрагментацию и узловатость аксонов, напоминающих дегенерацию валлерова типа (*Wallerian degeneration*), направленную от первичного места повреждения к дистальным частям аксона. Такие патологические изменения наблюдались не ранее чем через неделю после отравления. В спинном мозге поражался ответственный за моторную функцию вентральный спинальный путь в нижних отделах (крестцовом, поясничном и грудном) и дорсолатеральный спинальный путь в шейном отделе. Преимущественная дегенерация

нервных волокон большого диаметра и наибольшей длины, которые состоят из отростков мотонейронов, и патологические изменения, происходящие по большей части в дистальных отделах нейронов, согласовывались с клиническим фенотипом — первоочередным поражением двигательной активности дистальных отделов нижних конечностей. Дегенерация аксонов происходила независимо от демиелинизации, что указывало на токсический эффект ОР как на нейроны, так и на глиальные клетки. Кроме того, в шванновских клетках иногда выявляли липидные капли [17].

Позднее, активность NTE была обнаружена в лимфоцитах курицы [18], человека [19], мыши [20], что значительно упрощает скрининг ОР на токсичность.

Действие нейротоксичных органических фосфатов, помимо необратимого ингибирования NTE, ведет к нарушениям кальциевого гомеостаза, что, в свою очередь, приводит к активации протеазы CANP (calcium-induced neutral protease), расщепляющей белки в синаптических окончаниях аксонов [21, 22]. Исследование тканей куриц, подвергнутых воздействию органических фосфатов, выявило увеличенное содержание мРНК кальций/кальмодулин-зависимой киназы II ( $\text{Ca}^{2+}$ /CaMKII) в мозжечке и спинном мозге. В этих же тканях наблюдалось атипичное фосфорилирование белков цитоскелета. Так, была предложена гипотеза об участии  $\text{Ca}^{2+}$ /CaMKII в патогенезе OPIDN [23]. Однако стоит заметить, что исследования в другой лаборатории не подтвердили это предположение [15].

Таким образом, благодаря исследованиям OPIDN, была выявлена роль NTE в развитии нейропатии у млекопитающих и птиц, подробно описаны патологические последствия интоксикации, найден широкий спектр нейротоксичных ОР — ингибиторов NTE, предложен метод измерения активности NTE, обнаружена активность NTE в нервной и лимфоидной ткани у млекопитающих и птиц.

## НАСЛЕДСТВЕННАЯ СПАСТИЧЕСКАЯ ПАРАПЛЕГИЯ

Дисфункция NTE может быть вызвана не только ингибированием токсичными органическими фосфатами, но и мутациями в соответствующем гене, как это происходит при одной из форм наследственной спастической параплегии (НСП, hereditary spastic paraplegia, HSP).

Наследственная спастическая параплегия — синдром, объединяющий группу заболеваний человека, характеризующихся прогрессирующим спастическим (спазматическим) парепарезом (параличом пары конечностей). Основной особенностью параплегии является именно преимущественное поражение нижних конечностей, что отличает это заболевание от атаксии, при которой нарушается координация в обеих парах конечностей [24]. Частота заболевания оценивается как 1,8–9,8 случаев на 100 000 человек [25].

Первые случаи подобного заболевания были описаны в 1876 г., а термин «спастическая параплегия» впервые в 1880 г. применил немецкий врач Адольф Штрюмпель (Adolf Strümpell), описав несколько случаев «чистого» спастического паралича [26, 27]. Заболевание прогрессирует с возрастом, начинается со слабости нижних конечностей. Пациенты жалуются на «одеревенелость», ощущение неустойчивости и «зыбкости» в ногах, особенно при подъеме по лестнице, а также на онемение пальцев ног. Важной отличительной чертой патогенеза является спастическая походка, вызванная повышением тонуса мышц. Больной передвигается мелкими шагами, с трудом отрывает ноги от пола, при совершении шага описывает полукруг ногой [28–30].

При исследовании материала после аутопсии выявляли дегенерацию дистальной части аксонов длинных миелинизированных волокон в латеральных кортикоспинальных (пирамидных) трактах, причем эта дегенерация расширялась от шейного отдела спинного мозга к поясничному отделу. Кроме того, наблюдали патологические изменения в переднем кортикоспинальном тракте, пучке Голля. В головном мозге изменений не наблюдалось [31]. Восходящие чувствительные волокна могут быть поражены в верхних отделах спинного мозга [32]. Любопытно, что в некоторых случаях пациенты-родственники с различными клиническими проявлениями имели сходный профиль нейродегенерации, отличалась лишь интенсивность патологических изменений в разных участках центральной нервной системы [33]. По многим наблюдениям, спастическая параплегия не влияет на продолжительность жизни. Умирают такие больные по разным другим причинам, и поэтому гистологические исследования мозга у таких паци-

ентов не проводят или результаты не публикуют. Почти за 100 лет изучения заболевания, к 1974 г., было описано всего 11 случаев, у которых была исследована патоморфология нервной системы. Накопленные данные из разных публикаций свидетельствовали о поражении нейронов с длинными отростками в первую очередь в кортикоспинальном (пирамидном) тракте [34].

Предположение о механизме возникновения патологии впервые выдвинул Гринфилд в 1954 г. Он заключил, что нейродегенерация может быть вызвана недостаточностью некоего фермента — вероятно, эстеразы [34, 35]. К этому моменту хорошо были известны случаи нейропатии OPIDN, клинические проявления которой очень похожи на патогенез наследственной спастической параплегии.

На сегодняшний день известно более 55 генов, ассоциированных с наследственной спастической параплегией, что обуславливает гетерогенность случаев, описываемую с ранних этапов исследования этого заболевания. Классификация форм спастической параплегии была разделена на 74 основных (SPG1-74, от: spastic paraplegia gene) и 23 «неклассифицированных» НСП-ассоциированных типа; большинство форм являются моногенными заболеваниями, но в некоторых локусах, сцепленных с НСП, гены пока не были обнаружены. Мутации в генах приводят к нарушению различных клеточных процессов: аксонального транспорта, миелинизации, роста отростков нервных клеток, везикулярного транспорта, внутриклеточной сигнализации, работы митохондрий, метаболизма липидов, репарации ДНК [25].

Таким образом, первичные нарушения различных процессов поддержания жизнедеятельности и функционирования клеток нервной системы, вызванные мутациями в разных генах, приводят к сходному клиническому фенотипу, проявляющемуся в виде НСП. К подобным последствиям приводят и мутации в гене *NTE*, способствуя развитию одной из форм НСП — SPG39.

Так, в 2008 г. были изучены две семьи, представители которых страдали заболеванием моторных нейронов, имели симптоматику как в случае OPIDN или синдрома Троера (форма НСП SPG20, вызванная мутациями в гене спартина), прогрессирующую спастическую слабость нижних конечностей. Однако при синдроме Троера кро-

ме прогрессирующей спастической параплегии и атрофии дистальных мышц наблюдается задержка развития, нарушение когнитивных функций, эмоциональная лабильность, отклонения в строении скелета, атаксия, дизартрия, дисфагия, что не было отмечено у описываемых пациентов.

Электрофизиологические исследования подтвердили моторную нейропатию нижних и верхних конечностей. Магнитно-резонансная томография (МРТ) выявила атрофию спинного мозга в грудном отделе. Заболевание наследовалось как аутосомно-рецессивный признак. Одна из изученных семей была представителем евреев-ашкенази, то есть изученные больные характеризовались высоким коэффициентом инбридинга. Пациенты из этой семьи были гомозиготными по миссенс-мутации *c./3034G/A/* гена *NTE* (приводящей к замене Met1012Val). Больные из другой исследованной европейской семьи являлись гетерозиготными компаундами, несущими две мутации в гене *NTE*: *c./2669G/A/* (приводящей к замене Arg890His) и *c./2946\_2947insCAGC/* (приводящей к сдвигу рамки считывания и образованию укороченного белка с измененной последовательностью после аминокислоты в позиции 1019). Все обнаруженные мутации затрагивают эстеразный домен, который лежит в пределах участка белка *NTE* с 727-й до 1216-й аминокислоты. 105 исследованных здоровых человек контрольной группы не имели ни одной из выявленных мутаций [36].

Первые признаки заболевания появлялись в детском возрасте до 7 лет в виде слабых, медленно прогрессирующих нарушений походки. Усиливающаяся слабость и атрофия рук развивались в возрасте от 12 до 21 года. У пациентов не было замечено нарушений когнитивных функций. Значительная слабость была обусловлена мышечной атрофией, которая наблюдалась в дистальных отделах как верхних, так и нижних конечностей. Один пациент в возрасте 82 лет был неспособен к ходьбе из-за слабости и сильной мышечной спастичности верхних и нижних конечностей. Второй пациент (38 лет) имел спастическую походку. Третий пациент (38 лет), как и четвертый (48 лет), могли самостоятельно передвигаться с тростью, хотя имели выраженный спастический паразет [37].

Таким образом, мутации в гене *NTE*, наряду с мутациями в некоторых других генах, ведут к на-

рушению различных клеточных функций, угнетая жизнедеятельность сходных клеток нервной системы, что, в результате, проявляется в виде НСП. Сходной чертой патогенеза различных форм НСП является моторная нейропатия пирамидных трактов. Таким образом, различные иницирующие механизмы ведут к общему фенотипу НСП, который может быть дополнен некоторыми другими специфическими для каждой формы признаками. Молекулярные механизмы, вызывающие дефектную работу NTE (в случае мутации или инактивации органическими фосфатами), ведут к отмиранию центральных или периферических моторных нейронов или их аксонов, то есть к нейродегенерации.

### СИНДРОМЫ BOUCHER — NEUHAÜSER И GORDON HOLMES

Здесь и далее синдромы будут названы принятыми англоязычными именами вследствие отсутствия их перевода в русскоязычной литературе.

В 2014 г. было обнаружено, что с мутациями в гене *NTE* связаны еще два заболевания: синдромы Boucher — Neuhaüser и Gordon Holmes. Были изучены результаты экзомного секвенирования у двух больных синдромом Boucher — Neuhaüser и одного пациента с синдромом Gordon Holmes и выявлены мутации в гене *NTE*. Анализ родословных показал аутосомно-рецессивный тип наследования. Один пациент был носителем гомозиготной миссенс-мутации *c.[3173C>T]*, что приводило к замене Thr1058Ile. Второй пациент являлся носителем гетерозиготного компаунда, имея мутацию *c.[2212-1G>C]*, приводящую к пропуску 20-го экзона, сдвигу рамки считывания и изменению последовательности белка p.[Val738Glnfs\*98], а также миссенс-мутацию *c.[3328G>A]*, приводящую к замене p.[Val1110Met]. Третий пациент, страдающий синдромом Gordon Holmes, был носителем гетерозиготного компаунда *c.[3084\_3085insGCCA]/[4084C>G]*, что вело к синтезу дефектных белков p.[Arg1031Glufs\*38]/[Arg1362Gly]. Также с помощью метода секвенирования по Сэнгеру была изучена последовательность гена *NTE* у 4 пациентов из других семей с синдромом Boucher — Neuhaüser, и выявлены другие мутации: *c.[3134C>T]/[3365C>T]*, p.[Ser1045Leu]/[Pro1122Leu] и *c.[1732G>T]/[3197T>C]*,

p.[Gly578Trp];[Phe1066Ser]. Добавим, что позднее были описаны новые случаи синдрома, которые также характеризовались мутациями в гене *NTE*: *c.[2944\_2947dub]/[3932G>A]*, p.[Leu983fs\*86]/[Arg1311Gln]. Кроме того, были изучены экзомы 538 пациентов с различными нейродегенеративными заболеваниями, но не с вышеописанными синдромами: 67 человек с ранней атаксией, начинающейся в возрасте ранее 30 лет, 144 — со «сложными» формами наследственной спастической параплегии и 192 — с «чистыми» формами НСП, 135 человек с рецессивной формой болезни Шарко — Мари — Тута (Charcot — Marie — Tooth disease type 2). Такой анализ данных экзомного секвенирования выявил, что один пациент со спастической атаксией несет гетерозиготный компаунд по мутациям в гене *NTE* *c.[3084\_3085insGCCA]/[3299T>G]*, приводящим к синтезу дефектных белков p.[Arg1031Glufs\*38]/[Val1100Gly]. Еще один пациент с НСП также имел гетерозиготный компаунд, но по мутациям *c.[787G>A]/[2519G>A]* в гене *NTE*, что вело к заменам p.[Val263Ile]/[Gly840Glu]. Мутировавшие локусы оказались высоко консервативными у разных видов (от дрожжей до млекопитающих) и затрагивали либо эстеразный домен NTE, либо домены взаимодействия с циклическими нуклеотиднофосфатами, либо прилежащие к ним участки. Обнаруженные мутантные аллели отсутствовали или имели очень низкую частоту в базах данных GEM.app (2175 экзотов), dbSNP137 и NHLBI ESP (6500 экзотов). В контрольной группе из 1637 пациентов с нейродегенеративными заболеваниями при исключении всех вышеперечисленных заболеваний не было выявлено гомозигот или гетерозиготных компаундов по мутациям в гене *NTE* (по результатам анализа экзомного секвенирования ДНК). Таким образом, выяснилось, что мутации в гене *NTE* могут приводить к различным наследственным заболеваниям [38].

Синдром Boucher — Neuhaüser, по-видимому, может быть вызван исключительно мутациями в гене *NTE* [39, 40]. Это моногенное заболевание, наследуемое по аутосомно-рецессивному типу, сочетает в себе триаду симптомов: спинномозжечковую атаксию (расстройство координации движений), гипогонадотропный гипогонадизм (снижение уровня гормонов гипоталамо-гипофизарной си-



стемы — лютеинизирующего и фолликулостимулирующего, что ведет к падению уровня половых гормонов, снижению гаметогенеза, проявляется в подростковом возрасте в виде задержки полового развития) и хориоретинальную дистрофию (необратимые дегенеративные изменения в хориокапиллярном слое сосудистой оболочки глаза, затрагивающие пигментный слой сетчатки и мембрану Бруха, что ведет к ухудшению зрения) [41–43].

К настоящему времени в литературе описано 40 случаев синдрома Boucher—Neuhaüser. Манифестируют симптомы в разном возрасте: от первого года жизни до 40 лет, при этом первым проявляющимся симптомом может быть один из вышеописанной триады: либо атаксия, либо ухудшение зрения, либо задержка полового развития. Как правило, один из них обязательно проявляется до 15-го года жизни. У пациентов атаксия проявляется в виде нарушений координации движений как верхних, так и нижних конечностей; развивается дизартрия (нарушение речи). У значительной доли пациентов клинический фенотип свидетельствовал о вовлеченности пирамидного пути в патогенез заболевания. У некоторых пациентов могут быть обнаружены небольшие нарушения когнитивных функций (снижение внимания, ухудшение оперативной и краткосрочной памяти). Исследование пациентов с помощью МРТ, проведенное в некоторых случаях, выявляет атрофию в мозжечке (как в полушариях, так и в черве), усиленный сигнал в области ствола мозга на T2-взвешенных изображениях. Зрительные дефекты, встречающиеся у всех пациентов, выражаются в следующих признаках: парацентральная скотома (слепой участок в поле зрения рядом с точкой фиксации взгляда), снижение остроты зрения. У всех пациентов описаны моторные нарушения глаза: нистагм (частое колебательное движение глаз), нарушение вестибулоокулярного рефлекса (фиксация взгляда на предмете при повороте головы). Анализ крови выявляет значительное снижение уровня тестостерона, лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормонов. Половые органы пациентов недоразвиты. Больные оказываются бесплодны, но своевременная гормональная терапия восстанавливает фертильность [39, 44].

Синдром Gordon Holmes сходен с синдромом Boucher—Neuhaüser, так как классическими кли-

ническими признаками этого заболевания являются спинномозжечковая атаксия и гипогонадотропный гипогонадизм, но при этом синдром не сопровождается хориоретинальной дистрофией. Впервые синдром был описан английским неврологом Гордоном Холмсом [45] в 1908 г. как прогрессирующая спинномозжечковая атаксия, начинающаяся после 35 лет, сопровождающаяся гипогонадизмом и нистагмом. Исследование мозжечка одного из пациентов на постмортальном материале выявило трехкратное уменьшение его массы по сравнению с весом нормального мозжечка; наибольшие изменения были замечены в черве (*vermis*) и клочке (*flocculus*). Найдены сопровождающиеся глиозом заметные дегенеративные изменения в оливах, участвующих в контроле моторных функций. В мозжечке обнаружена дегенерация молекулярного и зернистого слоев, клеток Пуркинье и миелинизированных волокон. В спинном мозге замечено небольшое просветление пирамидного тракта в грудном и поясничном отделах, согласующееся с легким увеличением возбудимости коленного рефлекса [46].

Синдром Gordon Holmes может быть вызван мутациями в разных генах: *NTE*, *RNF216* (кодирует убиквитинлигазу E3), *OTUD4* (кодирует OTU деубиквитиназу 4) и *STUB1* (кодирует белок, имеющий активность убиквитинлигазы E3, способный также ингибировать АТФазную активность шаперонов семейства HSP70).

В 2014 г. появились сразу 2 работы, где в ходе экзомного секвенирования выявили связь развития синдрома Gordon Holmes с мутациями в гене *NTE*. Первое такое исследование, в котором была обнаружена мутация *c.[3084\_3085insGCCA]/[4084C>G]*, мы уже упомянули выше [38]. В другой работе были найдены новые мутации у 6 больных из трех семей, генотипы (и получившиеся замены в белковом продукте) у которых оказались следующими: гомозигота *c.[C3380G]* (p.[Ser1127Cys]); компаунд *c.[C3931T]/[ins2494TGTGGGCCTGGGG]* (p.[Arg1311Trp]/[Gly832fs\*13]); компаунд *c.[1127insG]/[C3295T]* (p.Asp376Glyfs\*18/Arg1099Cys). У пациентов из первых двух семей был установлен синдром Gordon Holmes, у пациентов из третьей семьи — синдром Boucher—Neuhaüser [47].

По-видимому, гипогонадотропный гипогонадизм, сопровождающий указанные синдромы,

вызван дисфункцией нейроэндокринных клеток гипофиза. Эксперимент с использованием иммортализованной культуры клеток гипофиза мыши (LβT2) показал уменьшение секреции лютеинизирующего гормона в ответ на обработку культуры гонадотропин-рилизинг гормоном в присутствии ингибитора NTE — органического фосфата хлорпирифосоксона, — который на 70 % снижал эстеразную активность NTE. При этом не уменьшался уровень мРНК лютеинизирующего гормона, а резко падала интенсивность экзоцитоза. Любопытно, что попытка повлиять на гипогонадотропный гипогонадизм с помощью терапии гонадотропин-рилизинг-фактором не увенчалась успехом — уровень лютеинизирующего гормона в крови пациентов не возрастал. Предполагаемая причина дефекта везикулярного транспорта — нарушение метаболизма фосфатидилхолина вследствие снижения активности NTE [47].

Таким образом, анализ распределения локусов патогенных мутаций гена *NTE* показывает, что они могут находиться не только в функциональных доменах (нуклеотид-связывающих и эстеразном), но и в других частях гена [38, 39]. Это означает, что функциональная структура белка до сих пор не известна полностью. Аминокислотные замены, возникающие вследствие мутаций, могут приводить к изменению фолдинга белка или изменению функций известных доменов. Не исключают описанные факты и гипотезу наличия в структуре белка иных функциональных доменов, роль которых не известна на сегодняшний день. Клиническая значимость указанного феномена выражается в необходимости секвенирования всего гена для подтверждения носительства патогенной аллели при генетическом описании *NTE*-ассоциированных болезней.

#### СИНДРОМЫ OLIVER — MCFARLANE, LAURENCE — MOON И ВРОЖДЕННЫЙ АМАВРОЗ ЛЕБЕРА

В 2015 г. список болезней, связанных с мутациями в гене *NTE*, расширился, вновь благодаря современным омиксным технологиям, а именно — секвенированию экзонов. У 8 пациентов с синдромом Oliver — McFarlane в пяти семьях были обнаружены новые мутации в гене *NTE* (указаны генотипы и соответствующие изменения в белке):

- *c.[1571T>C]/[3373G>A]*, p.[Leu524Pro]/[Asp1125Asn];

- *c.[2116C>T]/[3385G>C]*, p.[Gln706\*]/[Gly1129Arg];
- *c.[343-2A>T]/[3373G>A]*, p.[ivs4-2A>T]/[Asp1125Asn];
- *c.[3322C>T]/[3385G>C]*, p.[Arg1108Trp]/[Gly1129Arg];
- *c.[1238\_1239insC]/[3385G>C]*, p.[Pro413fs\*28]/[Gly1129Arg];
- гомозигота *c.[2763G>A]*, p.[Trp921\*].

У другой группы, состоящей из 10 пациентов из шести семей с синдромами Oliver — McFarlane и Laurence — Moon, также были обнаружены новые патогенные мутации в гене *NTE*, приводящие к следующим изменениям в первичной структуре гена и соответствующего белка у гетерозиготных компаундов:

- *c.[3296G>A]/[3526G>A]*, p.[Arg1099Gln]/[Gly1176Ser];
- *c.[3091\_3092insAGCC]/[3385G>A]*, p.[Arg1031fs\*38]/[Gly1129Arg];
- *c.[2176G>C]/[3091\_3092insAGCC]*, p.[Gly726Arg]/[Arg1031fs\*38].

Также описаны следующие компаунды: мутация, приводящая к нарушению сплайсинга *c.[1973+2T>G]*, и миссенс-мутация *c.[3644T>G]*, приводящая к замене p.[Val1215Ala]; и другой вариант, где произошла дупликация фрагмента, содержащего экзона 14–20, и миссенс-мутация *c.[3644T>G]*, приводящая к замене p.[Val1215Ala]. Заметим, что только одна из описанных мутаций была ранее известна и ассоциирована с синдромом Boucher — Neuhauser (*c.[3091\_3092insAGCC]*, приводящая к сдвигу рамки считывания и синтезу укороченного белка p.[Arg1031fs\*38]) [38]. Большинство из этих мутаций приводит к изменениям в известных функциональных доменах белка *NTE* (эстеразном и нуклеотид-связывающем); показана эволюционная консервативность всех изменяемых остатков (иногда нарушающаяся у некоторых видов) [48, 49]. Эксперименты по восстановлению эмбриогенеза у *Danio rerio* с нокдауном ортолога *NTE* — гена *pnpla6*, — индуцированным с помощью введения морфолиновых олигонуклеотидов, показали, что человеческая мРНК *NTE* дикого типа почти полностью восстанавливает морфологию личинок, в отличие от мутантных мРНК, содержащих вышеперечисленные замены. Наблюдаемые явления подтверждают негативное влияние указанных

мутаций на функциональную состоятельность белка NTE [48]. Синдром Oliver — McFarlane получил имя авторов, впервые описавших в 1965 г. случай врожденной трихомегалии — увеличения длины ресниц и бровей (до 4 сантиметров), — проявившейся у ребенка при его рождении. Наблюдение за индивидом в течение двух лет показало, что он развивается гораздо медленнее нормальных детей, как умственно, так и физически. Отмечался гипотиреоз, дегенерация ретины и неравномерное распределение пигмента в глазном дне [50]. Позднее были описаны другие подобные случаи, сопровождающиеся аллопецией (частичным или полным облысением), врожденным гипогонадотропным гипогонадизмом, дефицитом гормона роста, прогрессирующей атаксией, нистагмом, периферической полинейропатией и атрофией мозжечка, выявляемой на компьютерной томограмме [51]. На сегодняшний день охарактеризовано 22 случая заболевания [48, 49], для всех был показан ауто-сомно-рецессивный тип наследования. Общими чертами синдрома стали: врожденная трихомегалия и гипогонадизм, задержка в умственном и физическом развитии, дефицит гормонов гипофиза, детская хориоретинальная дистрофия или пигментный ретинит (дегенерация светочувствительных клеток с замещающим их фиброзом и глиозом, отложение пигмента в глазном дне), нейропатия (периферическая сенсорная полинейропатия, атаксия или спастическая параплегия) [48].

Синдром Laurence — Moon также назван в честь авторов, впервые описавших в 1866 г. четырех детей из одной семьи с ранней хориоретинальной дистрофией и пигментным ретинитом, сильно сниженной остротой зрения и гемералопией (куриной слепотой — плохим зрением в сумерках и темноте), при этом поле зрения оставалось нормальным. Кроме того, авторы обратили внимание на задержку в развитии больных, низкий рост, недоразвитие половых органов, трудности при двигательной активности, колебание глаз (повидимому, соответствующее нистагму) [52, 53]. Различные фенотипические проявления в течение последующих полутора веков ассоциировали с синдромом, включая сюда случаи с полидактилией, Кляйнфельтера, умственной отсталостью. Объединяющими признаками синдрома стали: ауто-сомно-рецессивный тип наследования, хори-

оретинальная дистрофия в совокупности с пигментным ретинитом, развивающиеся вплоть до полной слепоты, дефекты функционирования гипофиза (дефицит гормонов гипофиза, отставание в умственном развитии, замедление роста, гипогонадотропный гипогонадизм, недоразвитие половых органов и вторичных половых признаков) [54]. В некоторых случаях проявляется нейропатия (периферическая сенсорная полинейропатия, атаксия или спастическая параплегия). Таким образом, синдром Laurence — Moon весьма сходен с патогенезом синдрома Oliver — McFarlane, отличаясь, в первую очередь, отсутствием трихомегалии, и похож на развитие болезни Boucher — Neuhauser, будучи дополненным еще и некоторыми другими признаками при отсутствии сенсомоторной нейропатии [48]. На сегодняшний день не известно других генов, кроме NTE, мутации в которых ведут к этим трем синдромам.

Также оказалось, что с мутациями в гене NTE может быть связан врожденный амавроз Лебера (Leber Congenital Amaurosis). При анализе 200 больных с этой патологией был найден один пациент со следующим генотипом (и соответствующими изменениями в первичной структуре белка NTE): *c.[3084\_3085insGCCA]//1076C>T*, p.[Ser1028fs\*40]/[Thr359Ile]. Пациент родился слепым из-за деструкции ретины, кроме того, страдал выраженным аутизмом [49]. Этот единственный описанный в литературе случай требует внимательной проверки и дополнительного подтверждения связи NTE и амавроза Лебера. Обращает на себя внимание осложнение синдрома аутизмом, ранее не ассоциированным с мутациями в гене NTE. Известно, что сама патология является гетерогенной с генетической и симптоматической точки зрения. Описано как минимум 25 генов, мутации в которых вызывают врожденный амавроз Лебера [55]. Тем не менее не вызывает сомнений роль дефекта NTE в зрительной дисфункции.

Обнаружение связи мутаций NTE со зрительной дисфункцией подтолкнуло к изучению экспрессии ортологов NTE у модельных животных. Так, удалось идентифицировать экспрессию *sws*, ортолога NTE у *Drosophila melanogaster*, в фоторецепторных клетках мух, а также выявить влияние дисфункции *sws* на прогрессирующую с возрастом дегенерацию фасеток. Такие эксперименты подтвердили эволюци-

онно-консервативную роль *sws/NTE* в поддержании жизнеспособности фоторецепторных клеток [49].

### ЧИСТАЯ МОЗЖЕЧКОВАЯ АТАКСИЯ

Описанные выше синдромы не ограничивают возможную клиническую картину при нарушении функций гена *NTE* вследствие мутаций. Так, в 2017 г. впервые было показано, что мутации в этом гене приводят к чистой мозжечковой аутосомно-рецессивной атаксии (*pure cerebellar ataxia*), не отягощенной каким-либо другим симптомом. В индийской популяции зороастрийцев-парсов у двоих родственников — потомков детей, рожденных от близкородственных браков, — были обнаружены сразу две новые мутации в гене *NTE*, по обеим из которых больные были гомозиготны. Мутация *c.[3847G>A]* приводила к замене р.[V1283M], а мутация *c.[3929A>T]* имела миссенс-эффект р.[D1310V]. Первые симптомы появились у пациентов в возрасте около 12 лет в виде пошатывающейся походки и трудностей при письме. С возрастом болезнь прогрессировала, появлялся нистагм, оживлялись сухожильные рефлексy, развивалась дизартрия. В результате атаксия приковала пациентов к коляске, однако прожили они как минимум до 70 лет. Никаких других нарушений, характерных для приведенных в настоящем разделе синдромов, выявлено не было [56].

Обнаружение случаев чистой атаксии, связанной с мутациями в гене *NTE*, является несомненным аргументом в пользу пересмотра существующей феноменологии при классификации моторных болезней. Классический алгоритм клинической диагностики наследственных моторных заболеваний долгое время строился на взаимоисключении атаксии/спастичности. Однако в последнее десятилетие, в связи с внедрением омиксных технологий в клинические исследования, был найден целый ряд примеров влияния мутаций одного и того же гена на развитие целого спектра болезней. Эти наблюдения позволяют сделать вывод, что атаксия и спастическая параплегия представляют собой непрерывный континуум. Как минимум для 69 генов уже обнаружена такая плейотропия. Интересно, что их функциональный анализ выявляет 3 основных биологических процесса, которые контролируют эти гены: метаболизм липидов, метаболизм карбоновых кислот, организация цито-

скелета. Такой пересмотр классификации может быть весьма продуктивным, во-первых, для идентификации механизмов патогенеза и, во-вторых, для поиска оптимальных персонализированных методов терапии, основывающихся на компенсации дефектной функции, а не на симптоматическом подходе [57].

Приведенные рассуждения справедливы и для всего спектра заболеваний, вызванных мутациями в гене *NTE*. Если OPIDN и НСП являются крайними проявлениями спастичности в континууме дегенеративных фенотипов, то чистая атаксия занимает полностью противоположное место. В таком случае, синдромы Boucher—Neuhaüser, Gordon Holmes, Laurence—Moon и Oliver—McFarlane становятся промежуточными вариантами, смещенными в ту или иную сторону. Исключением является единственный описанный случай врожденного амавроза Лебера, не проявляющий моторной нейропатии. Особенно важна такая «объединяющая» классификация для четырех промежуточных синдромов, весьма сходных друг с другом по клинической картине, и, как мы замечаем, диагностируемых иногда с некоторой условностью.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Открытие целого спектра болезней, вызванных мутациями в гене *NTE*, позволяет сделать ряд важных выводов о его роли в различных клетках и в целом на общем физиологическом уровне. Во-первых, при развитии спастичности страдают, в первую очередь, длинные и крупные нейроны кортиспинальных (пирамидных) трактов, что сопровождается классическими «пирамидными знаками»: оживлением сухожильных рефлексов и появлением рефлекса Бабинского. Атаксия прежде всего связана с поражением мозжечка, которое было обнаружено при синдромах Boucher—Neuhaüser, Gordon Holmes, Oliver—McFarlane и чистой мозжечковой атаксии [39, 43, 46–48, 56]. При синдроме Laurence—Moon может развиваться как спастичность, так и атаксия, но работ, визуально подтверждающих тип моторной дегенерации при данном синдроме, на сегодняшний день нет. Единственный известный нам случай, у которого была изучена структура головного мозга с помощью МРТ, страдал именно спастичностью, и поэтому заметных изменений в мозжечке не наблюда-

лось [48]. Однако мы ожидаем, что исследования соответствующих пациентов с помощью МРТ или при аутопсии выявят дегенерацию либо пирамидных трактов, либо мозжечка, в зависимости от клинического фенотипа (спастичности или атаксии).

Во-вторых, синдромы Boucher — Neuhaüser, Gordon Holmes, Laurence — Moon и Oliver — McFarlane связаны с дисфункцией гипофиза, приводящей к снижению уровня одного или нескольких гормонов в крови пациентов: тиреотропного, соматотропного и гонадотропных. Это ведет к задержке роста, умственного развития, полового созревания, нарушению развития гонад и стерильности, а также, например, к трихомегалии и алопеции. Исследование мозга пациентов с помощью МРТ выявило в ряде случаев уменьшение объема гипофиза.

В-третьих, мутации в гене *NTE* могут приводить к дегенерации сосудистого слоя глаза, лежащего под ретиной, и/или к дегенерации слоя пигментных клеток ретины (палочек и колбочек). Хориоретинальная атрофия наблюдается при синдромах Boucher — Neuhaüser, Laurence — Moon и Oliver — McFarlane. Пигментный ретинит является характерной чертой последних двух синдромов, течение которых проходит заметно тяжелее, нежели других рассматриваемых в этом разделе болезней. Поражение ретины проявляется в первые годы жизни, прогрессирует и ведет к полной слепоте. Это же справедливо и для амавроза Лебера.

Рассматриваемые наследственные заболевания (к которым не относится OPIDN), являются крайне редкими. Сегодня известно лишь несколько десятков случаев таких болезней. И, как показали геномные исследования, подавляющее большинство пациентов являются гетерозиготными компаундами, несущими 2 разные мутации *NTE* в гомологичных хромосомах. Это означает, что мутации в *NTE* возникают *de novo* случайно и редко у разных предков по отцовской и материнской линиям, являющихся здоровыми гетерозиготными носителями. Наиболее тяжелыми болезнями являются врожденные синдромы Laurence — Moon и Oliver — McFarlane, а также рассмотренный случай врожденного амавроза Лебера. Предполагают, что пациенты с этими заболеваниями несут мутации, нарушающие активность двух разных функ-

циональных доменов — эстеразного и нуклеотид-связывающего. В случаях других синдромов дисфункция затрагивает только один домен, и поэтому они протекают более мягко и проявляются после первого десятилетия, а некоторые симптомы иногда даже на четвертом десятке жизни [49]. Анализ эстеразной активности *NTE* в фибробластах пациентов с разными мутациями и разными болезнями показал наличие четырех групп уровней активности, что свидетельствует об отличиях во влиянии тех или иных мутаций на функцию белка [48]. Симптоматика практически никогда не имеет летальных последствий, за исключением единственного случая тяжелейшего отравления триортокрезилфосфатом, но приводит к недееспособности больных.

Таким образом, несмотря на то что показана связь мутаций в гене *NTE* с развитием различных заболеваний, конкретные механизмы патогенеза остаются во многом нерасшифрованными. Поэтому остаются актуальными дополнительные исследования связи конкретных мутаций, функций гена *NTE* и клинической картины ассоциированных с ним заболеваний.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Kienesberger P, Oberer M, Lass A, Zechner R. Mammalian patatin domain containing proteins: a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions. *J Lipid Res.* 2008;50(Suppl):S63-S68. <https://doi.org/10.1194/jlr.r800082-jlr200>.
2. Glynn P. Neural development and neurodegeneration: two faces of Neuropathy Target Esterase. *Prog Neurobiol.* 2000;61(1):61-74. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(99\)00043-x](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(99)00043-x).
3. Moser M, Stempf T, Li Y, et al. Cloning and expression of the murine *sws/NTE* gene. *Mech Dev.* 2000;90(2):279-282. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(99\)00239-7](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(99)00239-7).
4. Moser M, Li Y, Vaupel K, et al. Placental failure and impaired vasculogenesis result in embryonic lethality for neuropathy target esterase-deficient mice. *Mol Cell Biol.* 2004;24(4):1667-1679. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.4.1667-1679.2004>.
5. Akassoglou K, Malester B, Xu J, et al. Brain-specific deletion of neuropathy target esterase/

- swiss cheese results in neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(14):5075-5080. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401030101>.
6. Smith M, Elvove E. Pharmacological and chemical studies of the cause of so-called ginger paralysis: a preliminary report. *Public Health Reports (1896-1970)*. 1930;45(30):1703. <https://doi.org/10.2307/4579730>.
  7. Aring C. The systemic nervous affinity of triortho-cresyl phosphate (Jamaica ginger palsy). *Brain*. 1942;65(1):34-47. <https://doi.org/10.1093/brain/65.1.34>.
  8. Johnson M. Organophosphates and delayed neuropathy — is NTE alive and well? *Toxicol Appl Pharmacol*. 1990;102(3):385-399. [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(90\)90036-t](https://doi.org/10.1016/0041-008x(90)90036-t).
  9. Hou W, Long D, Wang H, et al. The homeostasis of phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine was not disrupted during tri-o-cresyl phosphate-induced delayed neurotoxicity in hens. *Toxicology*. 2008;252(1-3):56-63. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.07.061>.
  10. Johnson M, Jacobsen D, Meredith T, et al. Evaluation of antidotes for poisoning by organophosphorus pesticides. *Emerg Med Australas*. 2000;12(1):22-37. <https://doi.org/10.1046/j.1442-2026.2000.00087.x>.
  11. Salvi R. Neuropsychiatric Evaluation in subjects chronically exposed to organophosphate pesticides. *Toxicol Sci*. 2003;72(2):267-271. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg034>.
  12. Johnson M. The delayed neurotoxic effect of some organophosphorus compounds. Identification of the phosphorylation site as an esterase. *Biochem J*. 1969;114(4):711-717. <https://doi.org/10.1042/bj1140711>.
  13. Johnson M. A phosphorylation site in brain and the delayed neurotoxic effect of some organophosphorus compounds. *Biochem J*. 1969;111(4):487-495. <https://doi.org/10.1042/bj1110487>.
  14. Craig P, Barth M. Evaluation of the hazards of industrial exposure to tricresyl phosphate: a review and interpretation of the literature. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 1999;2(4):281-300. <https://doi.org/10.1080/109374099281142>.
  15. Emerick GL, Deoliveira GH, Santos ACD, Ehrich M. Mechanisms for consideration for intervention in the development of organophosphorus-induced delayed neuropathy. *Chem Biol Interact*. 2012;199(3):177-184. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.07.002>.
  16. Johnson MK. Improved assay of neurotoxic esterase for screening organophosphates for delayed neurotoxicity potential. *Arch Toxicol*. 1977;37(2):113-115. <https://doi.org/10.1007/bf00293860>.
  17. Cavanagh JB. The toxic effects of tri-ortho-cresyl phosphate on the nervous system: an experimental study in hens. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1954;17(3):163-172. <https://doi.org/10.1136/jnnp.17.3.163>.
  18. Dudek BR, Richardson RJ. Evidence for the existence of neurotoxic esterase in neural and lymphatic tissue of the adult hen. *Biochem Pharmacol*. 1982;31(6):1117-1121. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(82\)90351-3](https://doi.org/10.1016/0006-2952(82)90351-3).
  19. Bertoncin D, Russolo A, Caroli S, Lotti M. Neuropathy target esterase in human lymphocytes. *Archives of Environmental Health: An International Journal*. 1985;40(3):139-144. <https://doi.org/10.1080/00039896.1985.10545905>.
  20. Makhaeva GF, Rudakova EV, Sigolaeva LV, et al. Neuropathy target esterase in mouse whole blood as a biomarker of exposure to neuropathic organophosphorus compounds. *J Appl Toxicol*. 2016;36(11):1468-1475. <https://doi.org/10.1002/jat.3305>.
  21. Emerick GL, Peccinini RG, Oliveira GHD. Organophosphorus-induced delayed neuropathy: A simple and efficient therapeutic strategy. *Toxicol Lett*. 2010;192(2):238-244. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.10.032>.
  22. Jortner BS. Preparation and analysis of the peripheral nervous system. *Toxicol Pathol*. 2010;39(1):66-72. <https://doi.org/10.1177/0192623310387618>.
  23. Gupta RP, Abou-Donia MB. Tau proteins-enhanced  $\text{Ca}_2^+$ /calmodulin (CaM)-dependent phosphorylation by the brain supernatant of diisopropyl phosphorofluoridate (DFP)-treated hen: tau mutants indicate phosphorylation of more amino acids in tau by CaM kinase II. *Brain Res*. 1998;813(1):32-43. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(98\)00988-3](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(98)00988-3).
  24. Faber I, Pereira ER, Martinez AR, et al. Hereditary spastic paraplegia from 1880 to 2017: an historical review. *Arq Neuropsiquiatr*. 2017;75(11):813-818. <https://doi.org/10.1590/0004-282X20170160>.

25. de Souza PV, de Rezende Pinto WB, de Rezende Batistella GN, et al. Hereditary spastic paraplegia: clinical and genetic hallmarks. *The Cerebellum*. 2017;16(2):525-551. <https://doi.org/10.1007/s12311-016-0803-z>.
26. Seeligmüller A. Sklerose der seitenstränge des rückenmarks bei vier kindern derselben familie. *Dtsch Med Wochenshr*. 1876;2:185-186.
27. Strümpell A. Beiträge zur Pathologie des Rückenmarks. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 1880;10(3):676-717. <https://doi.org/10.1007/bf02054821>.
28. Rhein JH. Family spastic paralysis. *The Journal of Nervous and Mental Disease*. 1916;44(2):115-144. <https://doi.org/10.1097/00005053-191609000-00004>.
29. Garland HG, Astley CE. Hereditary spastic paraplegia with amyotrophy and pes cavus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry Res*. 1950;13(2):130-133. <https://doi.org/10.1136/jnnp.13.2.130>.
30. Bickerstaff ER. Hereditary spastic paraplegia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry Res*. 1950;13(2):134-145. <https://doi.org/10.1136/jnnp.13.2.134>.
31. Strümpell A. Die primäre Seitenstrangsklerose (spastische Spinalparalyse). *Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde*. 1904;27(3-4):291-339. <https://doi.org/10.1007/bf01667115>.
32. Deluca GC, Ebers GC, Esiri MM. The extent of axonal loss in the long tracts in hereditary spastic paraplegia. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2004;30(6):576-584. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2004.00587.x>.
33. Schut JW, Haymaker W. Hereditary ataxia: a pathologic study of five cases of common ancestry. *J Neuropathol Clin Neurol*. 1951;1(3):183-213.
34. Behan WM, Maia M. Strumpells familial spastic paraplegia: genetics and neuropathology. *J Neurol Neurosurg Psychiatry Res*. 1974;37(1):8-20. <https://doi.org/10.1136/jnnp.37.1.8>.
35. Greenfield JG, Aring CD. The spino-cerebellar degenerations. Edited by Charles D. Aring. Blackwell Scientific Publications; 1954.
36. Rainier S, Bui M, Mark E, et al. Neuropathy target esterase gene mutations cause motor neuron disease. *Am J Hum Genet*. 2008;82(3):780-785. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.12.018>.
37. Rainier S, Albers JW, Dyck PJ, et al. Motor neuron disease due to neuropathy target esterase gene mutation: clinical features of the index families. *Muscle Nerve*. 2010;43(1):19-25. <https://doi.org/10.1002/mus.21777>.
38. Synofzik M, Gonzalez MA, Lourenco CM, et al. PNPLA6 mutations cause Boucher–Neuhäuser and Gordon Holmes syndromes as part of a broad neurodegenerative spectrum. *Brain*. 2013;137(1):69-77. <https://doi.org/10.1093/brain/awt326>.
39. Tarnutzer AA, Gerth-Kahlert C, Timmann D, et al. Boucher–Neuhäuser syndrome: cerebellar degeneration, chorioretinal dystrophy and hypogonadotropic hypogonadism: two novel cases and a review of 40 cases from the literature. *J Neurol*. 2014;262(1):194-202. <https://doi.org/10.1007/s00415-014-7555-9>.
40. Teive HA, Camargo CH, Sato MT, et al. Different cerebellar ataxia phenotypes associated with mutations of the PNPLA6 gene in Brazilian patients with recessive ataxias. *The Cerebellum*. 2017;17(3):380-385. <https://doi.org/10.1007/s12311-017-0909-y>.
41. Boucher RJ, Gibberd FB. Familial ataxia, hypogonadism and retinal degeneration. *Acta Neurol Scand*. 2009;45(4):507-510. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1969.tb01261.x>.
42. Neuhäuser G, Opitz JM. Autosomal recessive syndrome of cerebellar ataxia and hypogonadotropic hypogonadism. *Clin Genet*. 2008;7(5):426-434. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.1975.tb00353.x>.
43. Limber ER, Bresnick GH, Lebovitz RM, et al. Spinocerebellar ataxia, hypogonadotropic hypogonadism, and choroidal dystrophy (Boucher–Neuhäuser syndrome). *Am J Med Genet*. 1989;33(3):409-414. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320330325>.
44. Rump R, Hamel BC, Pinckers AJ, Dop PAV. Two sibs with chorioretinal dystrophy, hypogonadotropic hypogonadism, and cerebellar ataxia: Boucher–Neuhäuser syndrome. *J Med Genet*. 1997;34(9):767-771. <https://doi.org/10.1136/jmg.34.9.767>.
45. Sak JJ, Grzybowski A, Baj J. Sir Gordon Morgan Holmes (1876–1965): one of the founders of modern neurology. *Neurol Sci*. 2017;39(1):169-171. <https://doi.org/10.1007/s10072-017-3180-6>.

46. Holmes G. A form of familial degeneration of the cerebellum. *Brain*. 1908;30(4):466-489. <https://doi.org/10.1093/brain/30.4.466>.
47. Topaloglu AK, Lomniczi A, Kretschmar D, et al. Loss-of-function mutations in *PNPLA6* encoding neuropathy target esterase underlie pubertal failure and neurological deficits in Gordon Holmes syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(10). <https://doi.org/10.1210/jc.2014-1836>.
48. Hufnagel RB, Arno G, Hein ND, et al. Neuropathy target esterase impairments cause Oliver – McFarlane and Laurence – Moon syndromes. *J Med Genet*. 2015;52(2):85-94. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2014-102856>.
49. Kmoch S, Majewski J, Ramamurthy V, et al. Mutations in *PNPLA6* are linked to photoreceptor degeneration and various forms of childhood blindness. *Nat Commun*. 2015;6(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms6614>.
50. Oliver GL, McFarlane DC. Congenital trichomegaly: with associated pigmentary degeneration of the retina, dwarfism, and mental retardation. *Arch Ophthalmol*. 1965;74(2):169-171. <https://doi.org/10.1001/archophth.1965.00970040171008>.
51. Patton M, Harding A, Baraitser M. Congenital trichomegaly, pigmentary retinal degeneration, and short stature. *Am J Ophthalmol*. 1986;101(4):490-491. [https://doi.org/10.1016/0002-9394\(86\)90656-2](https://doi.org/10.1016/0002-9394(86)90656-2).
52. Laurence JZ. Four cases of retinitis pigmentosa occurring in the same family, and accompanied by general imperfections of development. *Ophthalmol Rev*. 1866;2:32-41.
53. Laurence JZ, Moon RC. Four cases of «retinitis pigmentosa» occurring in the same family, and accompanied by general imperfections of development. *Obes Res*. 1995;3(4):400-403. <https://doi.org/10.1002/j.1550-8528.1995.tb00166.x>.
54. Bowen P. The Laurence-Moon syndrome. Association with hypogonadotrophic hypogonadism and sex-chromosome aneuploidy. *Arch Intern Med*. 1965;116(4):598-604. <https://doi.org/10.1001/archinte.116.4.598>.
55. Kumaran N, Moore AT, Weleber RG, Michaelides M. Leber congenital amaurosis/early-onset severe retinal dystrophy: clinical features, molecular genetics and therapeutic interventions. *Br J Ophthalmol*. 2017;101(9):1147-1154. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2016-309975>.
56. Wiethoff S, Bettencourt C, Paudel R, et al. Pure Cerebellar Ataxia with Homozygous Mutations in the *PNPLA6* Gene. *The Cerebellum*. 2016;16(1):262-267. <https://doi.org/10.1007/s12311-016-0769-x>.
57. Synofzik M, Schüle R. Overcoming the divide between ataxias and spastic paraplegias: Shared phenotypes, genes, and pathways. *Mov Disord*. 2017;32(3):332-345. <https://doi.org/10.1002/mds.26944>.

## ✿ Информация об авторах

**Павел Алексеевич Мелентьев** — аспирант, лаборатория экспериментальной и прикладной генетики. ФГБУ ПИЯФ, НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина. E-mail: melentev\_pa@pnpi.nrcki.ru.

**Ольга Евгеньевна Агранович** — д-р мед. наук, руководитель отделения артрогрипоза, врач травматолог-ортопед. ФГБУ «НМИЦ детской травматологии и ортопедии им. Г.И. Турнера» Минздрава России, Пушкин, Санкт-Петербург. E-mail: olga\_agranovich@yahoo.com

**Светлана Владимировна Саранцева** — д-р биол. наук, заведующая лабораторией экспериментальной и прикладной генетики, заместитель директора по научной работе. ФГБУ ПИЯФ, НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина. E-mail: sarantseva\_sv@pnpi.nrcki.ru.

## ✿ Authors and affiliations

**Pavel A. Melentev** — PhD student. Laboratory of Experimental and Applied Genetics. Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of NRC “Kurchatov Institute”, Gatchina, Russia. E-mail: melentev\_pa@pnpi.nrcki.ru.

**Olga E. Agranovich** — Doctor of Medicine, Head of Arthrogriposis Department, Orthopedic Trauma Surgeon. Turner Scientific Research Institute for Children's Orthopedics, Pushkin, Saint Petersburg, Russia. E-mail: olga\_agranovich@yahoo.com.

**Svetlana V. Sarantseva** — Doctor of Science, Head of Laboratory of Experimental and Applied Genetics, Deputy Director for Science. Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of NRC “Kurchatov Institute”, Gatchina, Russia. E-mail: sarantseva\_sv@pnpi.nrcki.ru.



## ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА *GC*, КОДИРУЮЩЕГО ВИТАМИН D-СВЯЗЫВАЮЩИЙ БЕЛОК, У КОРЕННОГО НАСЕЛЕНИЯ СИБИРИ

© Б.А. Малярчук

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биологических проблем Севера»  
Дальневосточного отделения Российской академии наук, Магадан

Для цитирования: Малярчук Б.А. Полиморфизм гена *GC*, кодирующего витамин D-связывающий белок, у коренного населения Сибири // Экологическая генетика. — 2020. — Т. 18. — № 2. — С. 243–250. <https://doi.org/10.17816/ecogen18634>.

Поступила: 12.12.2019

Одобрена: 13.04.2020

Принята: 23.06.2020

✿ Проведен анализ нуклеотидных последовательностей экзонов и прилегающих к ним некодирующих участков гена *GC* у 108 представителей различных этнических групп коренного населения Сибири. Полиморфизм обнаружен в четырех нуклеотидных позициях: несинонимичные замены в локусах rs4588 и rs7041, синонимичная замена в локусе rs4752 и замена в некодирующей области в локусе rs3733359. Выявлено семь гаплотипов гена *GC*. Из них 4 гаплотипа кодируют изоформу Gc1F, 2 гаплотипа — изоформу Gc1S и 1 гаплотип — изоформу Gc2. Обнаружены межрегиональные различия по распределению вариантов гена *GC*: на северо-востоке и в центральной части Сибири наблюдается самая высокая распространенность вариантов Gc1F и Gc1F/Gc1F, а на юге и западе Сибири чаще всего распространены варианты Gc2, Gc1S/Gc2 и Gc2/Gc2. По всей видимости, в случае гена *GC* ген-средовые взаимодействия направлены на формирование баланса между активностью витамин D-связывающего белка и уровнем 25-гидроксивитамина D в сыворотке крови.

✿ **Ключевые слова:** генетический полиморфизм; витамин D-связывающий белок; ген *GC*; популяции человека; Сибирь.

## POLYMORPHISM OF *GC* GENE, ENCODING VITAMIN D BINDING PROTEIN, IN ABORIGINAL POPULATIONS OF SIBERIA

© B.A. Malyarchuk

Institute of Biological Problems of the North, Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences, Magadan, Russia

Cite this article as: Malyarchuk B.A. Polymorphism of *GC* gene, encoding vitamin D binding protein, in aboriginal populations of Siberia. *Ecological genetics*. 2020;18(2):243-250. <https://doi.org/10.17816/ecogen18634>.

Received: 12.12.2019

Revised: 13.04.2020

Accepted: 23.06.2020

✿ The analysis of the nucleotide sequences of exons and adjacent non-coding regions of the *GC* gene in 108 representatives of various ethnic groups of aboriginal population of Siberia was carried out. Polymorphism was found in four nucleotide positions: non-synonymous substitutions at the rs4588 and rs7041 loci, a synonymous substitution at the rs4752 locus, and a replacement in the non-coding region at the rs3733359 locus. Seven haplotypes of the *GC* gene were identified. Of these, 4 haplotypes encode the Gc1F isoform, 2 haplotypes encode the Gc1S isoform, and 1 haplotype encodes the Gc2 isoform. Between-regional differences were found in the distribution of variants of the *GC* gene: in the northeast and in the central part of Siberia, the highest prevalence of the Gc1F and Gc1F/Gc1F variants is observed, and in the south and west of Siberia, the Gc2, Gc1S/Gc2 and Gc2/Gc2 variants are most common. In the case of the *GC* gene, gene-environment interactions are apparently aimed at creating a balance between the activity of vitamin D-binding protein and the level of 25-hydroxyvitamin D in the blood serum.

✿ **Keywords:** genetic polymorphism; vitamin D binding protein; gene *GC*; human populations; Siberia.

### ВВЕДЕНИЕ

Витамин D имеет важнейшее значение в функционировании организма, поскольку участвует в процессах обмена кальция и фосфора, транспорта кальция в костную ткань, иммуномодуляции и регуляции энергетического метаболизма клетки. По-

ступление витамина D в организм осуществляется двумя путями: холекальциферол  $D_3$  синтезируется в коже под воздействием ультрафиолетового излучения, а эргокальциферол  $D_2$  поступает в организм только с пищей. Поскольку на территории Северной Евразии (севернее  $35^\circ$  с. ш.) уровень

ультрафиолетового излучения недостаточен для круглогодичного синтеза холекальциферола  $D_3$  в коже, то большое значение приобретает экзогенное потребление человеком витамина D [1]. Транспортная форма витамина D ( $25(OH)D$ , кальцитриол) синтезируется в печени, а затем в почках превращается в активную гормональную форму витамина D ( $1,25(OH)_2D$ , кальцитриол). Кальцитриол далее участвует в активации рецепторов витамина D (VDR), которые, в свою очередь, задействованы в процессах регуляции транскрипции различных генов [2].

Основным переносчиком витамина  $D_3$  и его производных является витамин D-связывающий белок (DBP), относящийся к Gc-глобулинам крови (Group-specific component) [3]. Этот полифункциональный гликопротеин состоит из трех структурных доменов, отвечающих за связывание с витамином D и жирными кислотами, актином, а также с клеточной мембраной нейтрофилов [4]. Белок DBP кодируется расположенным на хромосоме 4 геном *GC*, представленном 13 экзонами [5]. Установлено, что гликопротеин DBP представляет собой смесь модифицированных полипептидов, степень гликозилирования которых определяется генотипом [5]. Описаны три основных изоформы DBP: Gc1F, Gc1S и Gc2. Белковые варианты Gc1F и Gc1S, характеризующиеся аминокислотной заменой D432E, могут быть превращены в активный белок GcMAF — макрофаг-активирующий фактор, который играет большую роль в развитии антиракового ответа, при некоторых вирусных и нейродегенеративных заболеваниях [6, 7]. Между тем, вариант Gc2 не может быть превращен в GcMAF, поскольку в нем отсутствует основной сайт O-связанного гликозилирования сахаридов из-за аминокислотной замены T436K. В связи с этим генотипы Gc2/Gc2 ассоциируются с повышенным риском развития некоторых заболеваний [6, 7].

Исследования показали, что в распределении Gc-вариантов в популяциях человека имеются региональные особенности, которые, по всей видимости, обусловлены различиями Gc-вариантов по способности связывать  $25(OH)D$ . В ряде исследований было показано, что содержание Gc в плазме крови определяется генотипически: самые высокие концентрации Gc наблюдаются у носителей

аллеля Gc1F, самые низкие — у носителей аллеля Gc2 [8, 9]. Соответственно, самым высоким сродством к  $25(OH)D$  характеризуются носители вариантов Gc1F и Gc1S, а самым низким — варианты Gc2. Распределение частот вариантов Gc коррелирует с экологическими и климатогеографическими факторами (интенсивность солнечной радиации, высота над уровнем моря, тип питания и др.) [10–12]. Самые высокие частоты варианта Gc1F выявлены в наиболее темнопигментированных группах населения, а самые высокие частоты Gc2 — у населения регионов с относительно низкой солнечной освещенностью [10, 13, 14]. В.А. Спицыным установлена также положительная корреляция частоты аллеля Gc2 с географической широтой, и отрицательная — с уровнем среднегодовой температуры [11].

Следует отметить, что за годы исследований иммунобиохимического полиморфизма (с использованием методов электрофореза и изоэлектрофокусирования белков) накоплены большие массивы данных о частотах вариантов Gc1 и Gc2 в популяциях Северной Евразии, включая популяции бывшего Советского Союза [15]. В последние годы базы данных генетического полиморфизма пополнились результатами полногеномных и полноэкзомных исследований, в связи с чем у исследователей имеется возможность оценить распространенность генетических вариантов локусов *rs4588* и *rs7041*, определяющих основные Gc-варианты, в популяциях человека. Между тем, в международных базах данных сведений об аллельном и гаплотипическом разнообразии гена *GC* в популяциях России пока очень мало. В настоящей работе представлены результаты анализа полиморфизма гена *GC* у коренного населения Сибири, основываясь на данных о полноэкзомном полиморфизме [16–18].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проанализированы опубликованные ранее с участием автора настоящей работы данные о полноэкзомном полиморфизме в популяциях коренного населения Северо-Восточной Сибири (эскимосы, чукчи, коряки;  $n = 28$ ), Центральной Сибири (эвены, эвенки, якуты;  $n = 32$ ), Южной Сибири (тувинцы, шорцы, алтайцы, буряты;  $n = 28$ ) и Западной Сибири (кеты, ханты, манси,

селькупы, ненцы, нганасаны;  $n = 20$ ) [16–18]. Выполнен анализ полиморфизма всех экзонов и прилегающих к ним участков интронов гена *GC*, расположенного на хромосоме 4 между позициями 72607410 и 72669758. Нумерация нуклеотидов приводится согласно референтной последовательности генома человека GRCh37.p13 (hg19).

Для выявления гаплотипов из генотипов гена *GC* с неизвестной гаметной фазой применяли алгоритм ELB пакета программ Arlequin 3.01 [19]. Статистическую значимость различий частот аллелей и генотипов анализируемых локусов гена *GC* в сравниваемых группах определяли с помощью точного критерия Фишера. Степень межпопуляционной дифференциации по частотам вариантов гена *GC* оценивали с помощью значений  $F_{ST}$  (Arlequin 3.01).

Для сравнительного анализа использовали информацию о частотах вариантов популяционного полиморфизма гена *GC*, находящуюся в базах данных dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>), 1000 Genomes (<https://www.internationalgenome.org/>), gnomAD и ExAC (<https://gnomad.broadinstitute.org/>), ALFRED (<https://alfred.med.yale.edu/>).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ нуклеотидных последовательностей экзонов и прилегающих к ним некодирующих участков гена *GC* у 108 представителей различных этнических групп коренного населения Сибири показал наличие полиморфизма в 4 нуклеотидных позициях (табл. 1). В экзонах обнаружено три замены (несинонимичные замены в локусах rs4588 и rs7041 и синонимичная замена в локусе rs4752) и одна замена выявлена в некодирующей области

(rs3733359). Как видно из распределения частот аллелей гена *GC* в региональных выборках Сибири (табл. 2), вариант rs4588-Т значительно реже встречается на северо-востоке и в центральной части Сибири, чем на юге и западе Сибири ( $p < 0,003$ , точный тест Фишера) и в других восточноазиатских популяциях, и также редок, как и в африканских популяциях. Аллель rs4752-G с самой высокой частотой обнаружен в центрально-сибирской выборке (у эвенов, эвенков и якутов), а на юге и западе Сибири его частота значительно ниже ( $p < 0,0004$ ). По сведениям базы данных ALFRED, в Восточной Азии наиболее высокие частоты аллеля rs4752-G характерны для якутов (32 и 47,6 % в разных выборках). Аллель rs3733359-A чаще всего наблюдался на северо-востоке Сибири (32,1 %) и реже всего в западносибирской выборке (7,5 %) (табл. 2). По данным базы ALFRED, частота этого варианта у тувинцев и якутов составила 17 и 19,5 % соответственно, что находится в диапазоне частот, зарегистрированных в сибирских выборках по результатам настоящей работы.

Анализ нуклеотидных последовательностей гена *GC* позволил выявить 7 гаплотипов, характеризующихся различными сочетаниями аллелей в локусах rs4588, rs7041, rs4752 и rs3733359 (табл. 3). Как известно, комбинации вариантов полиморфизма в локусах rs4588 и rs7041 определяют основные варианты изоформ DBP: диплотипу rs4588-G/rs7041-A соответствует вариант Gc1F, rs4588-G/rs7041-C — вариант Gc1S и rs4588-T/rs7041-A — вариант Gc2. Поэтому на основании генотипических данных распределение Gc-аллелей и генотипов в исследованных

Таблица 1

### Полиморфизм гена *GC* у коренного населения Сибири

| № позиции | Нуклеотидная позиция хромосомы 4 | Идентификатор полиморфизма | Локализация замены | Тип нуклеотидной и аминокислотной замен |
|-----------|----------------------------------|----------------------------|--------------------|-----------------------------------------|
| 1         | 72618323                         | rs4588                     | Экзон              | G → T, Thr436Lys                        |
| 2         | 72618334                         | rs7041                     | Экзон              | A → C, Asp432Glu                        |
| 3         | 72622566                         | rs4752                     | Экзон              | A → G, Cys318Cys                        |
| 4         | 72649774                         | rs3733359                  | 5'-utr             | G → A                                   |

Примечание. Тип замены показан в направлении от предкового к производному варианту. 5'-utr — 5'-нетранслируемый участок.

Таблица 2

Распространенность аллелей гена *GC* в популяциях

| Аллель      | Частота аллелей, %                          |                                        |                                  |                                     |                                       |                               |
|-------------|---------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|
|             | Северо-Восточная Сибирь<br>( <i>n</i> = 28) | Центральная Сибирь<br>( <i>n</i> = 32) | Южная Сибирь<br>( <i>n</i> = 28) | Западная Сибирь<br>( <i>n</i> = 20) | Восточная Азия<br>( <i>n</i> = 1008)* | Африка<br>( <i>n</i> = 1322)* |
| rs4588-T    | 5,4                                         | 3,1                                    | 28,6                             | 27,5                                | 26,1                                  | 6,7                           |
| rs7041-C    | 28,6                                        | 39,1                                   | 30,4                             | 52,5                                | 30,0                                  | 9,4                           |
| rs4752-G    | 32,1                                        | 46,9                                   | 16,1                             | 12,5                                | 7,9                                   | 29,7                          |
| rs3733359-A | 32,1                                        | 17,2                                   | 25,0                             | 7,5                                 | 40,0                                  | 27,4                          |

Примечание. *n* — размер выборки. Приводятся частоты производных аллелей согласно данным табл. 1. \*База данных dbSNP ([www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP)).

сибирских выборках реконструируется таким образом, как это показано в табл. 4. Как видно, выборки существенно различаются по частотам *Gc2*, *Gc1S/Gc2* и *Gc2/Gc2*: самые высокие частоты этих вариантов обнаружены на юге и западе Сибири. И, наоборот, самая высокая распространенность вариантов *Gc1F* и *Gc1F/Gc1F* наблюдается на северо-востоке и в центральной части Сибири. Эти результаты, в целом, соответствуют полученным ранее данным, что минимальные частоты *Gc2* характерны для населения северо-восточной части Сибири [12].

Анализ генетической дифференциации исследованных выборок населения Сибири по частотам указанных в табл. 3 гаплотипов гена *GC* показал, что выборки дифференцируются в две группы (табл. 5). Северо-восточная и центральносибирская выборки по значениям  $F_{ST}$  значительно отличаются от выборок из Южной и Западной Сибири ( $p < 0,05$ ). Вклад в дифференциацию вносят не только локусы rs4588 и rs7041, но и два других локуса (rs4752 и rs3733359), указанных в табл. 3. Так, изоформа *Gc1F* кодируется четырьмя гаплотипами, но самыми частыми из них являются два гаплотипа, характеризующиеся производными аллелями в локусах rs4752 и rs3733359 (гаплотипы 1 и 4). Примечательно, что комбинация производных аллелей rs4752-G и rs3733359-A наблюдалась лишь однократно в гаплотипе 6. Для изоформы *Gc1S* в сибирских выборках наблюдаются два гаплотипа, различающиеся заменами в локусе rs3733359 (гаплотипы 2 и 7),

а *Gc2* кодируется единственным гаплотипом 5 (табл. 3).

Полиморфизм локусов rs4588 и rs7041 имеет функциональное значение, поскольку определяемые ими изоформы *Gc* характеризуются различным сродством к 25(OH)D. Между тем, в отношении локусов rs4752 и rs3733359 информации довольно мало, но известно, что оба локуса содержат замены, повышающие риск развития артрита периферических суставов и увеита у корейских пациентов с анкилозирующим спондилитом — группы заболеваний суставов и позвоночника [20]. Так, для носителей варианта rs3733359-A показано уменьшение риска периферического артрита, а у носителей варианта rs4752-G выявлен увеличенный риск увеита. Эти данные могут иметь отношение к сибирским популяциям, поскольку среди коренного населения Северо-Востока Сибири (у эскимосов, чукчей и коряков) обнаружена достаточно высокая распространенность спондилоартропатий [21].

Таким образом, проведенное исследование показало, что распределение аллелей и генотипов гена *GC* у коренного населения Сибири имеет региональный характер, что, по всей видимости, связано с особенностями метаболизма витамина D и его производных в тех или иных группах населения. Размеры исследованных выборок невелики, в связи с чем продолжение исследований полиморфизма гена *GC* на популяционном уровне имеет большие перспективы

Таблица 3

Частота гаплотипов гена *GC* у коренного населения Сибири

| № га-<br>плотипа* | Гаплотип | Кодируемая<br>изоформа белка Gc | Частота гаплотипа в популяции, %                 |                                           |                                     |                                        |
|-------------------|----------|---------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------|
|                   |          |                                 | Северо-Вос-<br>точная Сибирь<br>( <i>n</i> = 28) | Центральная<br>Сибирь<br>( <i>n</i> = 32) | Южная<br>Сибирь<br>( <i>n</i> = 28) | Западная<br>Сибирь<br>( <i>n</i> = 20) |
| 1                 | GAGG     | Gc1F                            | 32,0                                             | 45,4                                      | 16,0                                | 12,5                                   |
| 2                 | GCAG     | Gc1S                            | 28,6                                             | 35,9                                      | 28,6                                | 52,5                                   |
| 3                 | GAAG     | Gc1F                            | 3,6                                              | 0                                         | 1,8                                 | 2,5                                    |
| 4                 | GAAA     | Gc1F                            | 30,4                                             | 10,9                                      | 23,2                                | 5,0                                    |
| 5                 | TAAG     | Gc2                             | 5,4                                              | 3,1                                       | 28,6                                | 25,0                                   |
| 6                 | GAGA     | Gc1F                            | 0                                                | 1,6                                       | 0                                   | 0                                      |
| 7                 | GCAA     | Gc1S                            | 0                                                | 3,1                                       | 1,8                                 | 2,5                                    |

Примечание. *n* — размер выборки. \* Номера гаплотипов, сформированных аллельными вариантами локусов, указанных в том же порядке, как в табл. 1.

Таблица 4

Частота изоформ и генотипов белка *Gc* у коренного населения Сибири

| Изоформы<br>и генотипы Gc | Частота в популяции, %                      |                                        |                                  |                                     |
|---------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
|                           | Северо-Восточная<br>Сибирь ( <i>n</i> = 28) | Центральная Сибирь<br>( <i>n</i> = 32) | Южная Сибирь<br>( <i>n</i> = 28) | Западная Сибирь<br>( <i>n</i> = 20) |
| Gc1F                      | 66,0                                        | 57,8                                   | 41,0                             | 20,0                                |
| Gc1S                      | 28,6                                        | 39,1                                   | 30,4                             | 55,0                                |
| Gc2                       | 5,4                                         | 3,1                                    | 28,6                             | 25,0                                |
| Gc1F/Gc1F                 | 42,9                                        | 28,1                                   | 10,7                             | 0                                   |
| Gc1F/Gc1S                 | 35,7                                        | 53,1                                   | 21,4                             | 30,0                                |
| Gc1S/Gc1S                 | 10,7                                        | 12,5                                   | 14,3                             | 25,0                                |
| Gc1F/Gc2                  | 10,7                                        | 6,3                                    | 39,3                             | 10,0                                |
| Gc1S/Gc2                  | 0                                           | 0                                      | 10,7                             | 25,0                                |
| Gc2/Gc2                   | 0                                           | 0                                      | 3,6                              | 10,0                                |

Таблица 5

Попарные различия  $F_{ST}$  по распределению гаплотипов гена *GC* в популяциях Сибири

| Популяция                  | 1       | 2       | 3     | 4 |
|----------------------------|---------|---------|-------|---|
| 1. Северо-Восточная Сибирь | 0       | —       | —     | — |
| 2. Центральная Сибирь      | 0,023   | 0       | —     | — |
| 3. Южная Сибирь            | 0,038*  | 0,098** | 0     | — |
| 4. Западная Сибирь         | 0,111** | 0,119** | 0,035 | 0 |

Примечание. Уровни значимости: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

в плане изучения ген-средовых взаимодействий с учетом D-витаминного статуса коренного населения, этнической принадлежности, влияния экологических условий (уровня естественного освещения и сезонности), специфики питания [22]. О влиянии такого рода факторов на распределение вариантов полиморфизма гена *GC* свидетельствуют полученные в настоящей работе данные о высокой распространенности гаплотипов, кодирующих Gc1F-изоформу, на Северо-Востоке Азии в условиях низкой интенсивности солнечной радиации. Кроме этого, важным фактором, способствующим дефициту витамина D, может быть сравнительно высокое содержание меланина в коже представителей арктических народов, который препятствует проникновению в кожу ультрафиолетовых лучей и затрудняет тем самым синтез витамина D<sub>3</sub> [23]. В какой-то мере дефицит витамина D у аборигенов Севера мог быть компенсирован особенностями традиционной диеты, включающей богатые витамином D продукты морского зверобойного промысла, рыбы и оленины, однако вклад пищевого фактора в формирование D-витаминного статуса коренных народов Сибири пока изучен мало. Представляется очень важным также расширить исследования гаплотипического разнообразия гена *GC*, основываясь на результатах секвенирования как кодирующих, так и некодирующих участков гена. Это обусловлено тем, что отбор наиболее оптимальных вариантов гена *GC* (не только для основных локусов rs4588 и rs7041, но и для дополнительных локусов, расположенных в интронах и регуляторных участках) в различных региональных группах человека является результатом балансирования между активностью витамин D-связывающего белка и уровнем 25(OH)D в крови [24]. Полученные в настоящей работе данные также свидетельствуют, что особенности распределения гаплотипов по четырем локусам гена *GC* в сибирских популяциях могут иметь функциональный смысл.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Козлов А.И., Атеева Ю.А. Витамин D и особенности питания различных групп коми // Вестник Московского университета. Серия XXIII. Антропология. — 2011. — № 4. — С. 25–34. [Kozlov AI, Ateeva JuA. Vitamin D i osobennosti pitaniya razlichnykh grupp komi. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 23. Antropologiya*. 2011;(4):25-34. (In Russ.)]
2. Zenata O, Vrzal R. Fine tuning of vitamin D receptor (VDR) activity by post-transcriptional and post-translational modifications. *Oncotarget*. 2017;8(21):35390-35402. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15697>.
3. Daiger SP, Schanfield MS, Cavalli-Sforza LL. Group-specific component (Gc) proteins bind vitamin D and 25-hydroxyvitamin D. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1975;72(6):2076-2080. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.6.2076>.
4. Verboven C, Rabijns A, De Maeyer M, et al. A structural basis for the unique binding features of the human vitamin D-binding protein. *Nat Struct Biol*. 2002;9(2):131-136. <https://doi.org/10.1038/nsb754>.
5. Malik S, Fu L, Juras DJ, et al. Common variants of the vitamin D binding protein gene and adverse health outcomes. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2013;50(1):1-22. <https://doi.org/10.3109/10408363.2012.750262>.
6. Останин А.А., Кирикович С.С., Долгова Е.В., и др. Тернистый путь макрофаг-активирующего фактора (GcMAF): от открытия к клинической практике // Вавиловский журнал генетики и селекции. — 2019. — Т. 23. — № 5. — С. 624–631. [Ostanin AA, Kirikovich SS, Dolgova EV, et al. A thorny pathway of macrophage activating factor (GcMAF): from bench to bedside. *Vavilov journal of genetics and breeding*. 2019;23(5):624-631. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.18699/VJ19.535>.
7. Morales EM. GcMAF: a polemic or a highly promising molecule? *World Scientific News*. 2017;65:20-36.
8. Kueppers F, Harpel B. Group-specific component (Gc)'subtypes' of Gc1 by isoelectric focusing in US blacks and whites. *Hum Hered*. 1979;29(4):242-249. <https://doi.org/10.1159/000153052>.
9. Coppenhaver D, Kueppers F, Schidlow D, et al. Serum concentrations of vitamin D-binding protein (group-specific component) in cystic fibrosis. *Hum Genet*. 1981;57(4):399-403. <https://doi.org/10.1007/bf00281693>.

10. Constans J, Lefevre-Witier P, Richard P, Jaeger G. Gc (vitamin D binding protein) subtype polymorphism and variants distribution among Saharan, Middle East, and African populations. *Am J Phys Anthropol.* 1980;52(3):435-441. <https://doi.org/10.1002/ajpa.1330520315>.
11. Спицын В.А. Биохимический полиморфизм человека. — М.: Изд-во МГУ, 1985. — 216 с. [Spitsyn VA. Biokhimicheskiy polimorfizm cheloveka. Moscow: Publishing house Moscow State University; 1985. 216 p. (In Russ.)]
12. Спицын В.А., Лебедева И.А., Шнейдер Ю.В., и др. Полиморфизм белков и ферментов сыворотки крови // Генофонд и геногеография народонаселения / под ред. Ю.Г. Рычкова. Т. 1. Генофонд и геногеография населения России и сопредельных стран. — СПб.: Наука, 2000. — С. 146–181. [Spitsyn VA, Lebedeva IA, Shneider YuV, et al. Polymorphism of blood serum proteins and enzymes. In: Yu.G. Rychkov, editor. Gene Pool and Genegeography of population. Vol. 1. Gene pool of population of Russia and contiguous countries. Saint Petersburg: Nauka; 2000. P. 146-181. (In Russ.)]
13. Спицын В.А., Ирисова О.В. Этнографический аспект в изучении группоспецифического компонента (Gc) // Вопросы антропологии. — 1973. — № 45. — С. 85–93. [Spitsyn VA, Irisova OV. Etnograficheskiy aspekt v izuchenii gruppopspezificheskogo komponenta (Gc). *Voprosy antropologii.* 1973;(45): 85-93. (In Russ.)]
14. Mourant AE, Tills D, Domaniewska-Sobczak K. Sunshine and the geographical distribution of the alleles of the Gc system of plasma proteins. *Hum Genet.* 1976;33(3):307–314. <https://doi.org/10.1007/bf00286857>.
15. Шнейдер Ю.В., Лебедева И.А., Петрищев В.Н., Раутиан Г.С. Системы белков и ферментов сыворотки крови // Генофонд и геногеография народонаселения / под ред. Ю.Г. Рычкова. Т. 1. Генофонд и геногеография населения России и сопредельных стран. — СПб.: Наука, 2000. — С. 512-539. [Shneider YuV, Lebedeva IA, Petrishchev VN, Rautian GS. Systems of blood proteins and enzymes. In: Rychkov YuG, editor. Gene Pool and Genegeography of population. Vol. 1. Gene pool of population of Russia and contiguous countries. Saint Petersburg: Nauka; 2000. P. 512-539. (In Russ.)]
16. Clemente FJ, Cardona A, Inchley CE, et al. A selective sweep on a deleterious mutation in the *CPT1A* gene in Arctic populations. *Am J Hum Genet.* 2014;95(5):584-589. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.09.016>.
17. Мальярчук Б.А., Деренко М.В., Денисова Г.А., Литвинов А.Н. Распространенность арктического варианта гена *CPT1A* в популяциях коренного населения Сибири // Вавиловский журнал генетики и селекции. — 2016. — Т. 20. — № 5. — С. 571–575. [Malyarchuk BA, Derenko MV, Denisova GA, Litvinov AN. Distribution of the arctic variant of the *CPT1A* gene in indigenous populations of Siberia. *Vavilov journal of genetics and breeding.* 2016;20(5): 571-575.(In Russ.)]. <https://doi.org/10.18699/VJ16.130>.
18. Pagani L, Lawson DJ, Jagoda E, et al. Genomic analyses inform on migration events during the peopling of Eurasia. *Nature.* 2016;538(7624): 238-242. <https://doi.org/10.1038/nature19792>.
19. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online.* 2005;(1):47-50. <https://doi.org/10.1177/117693430500100003>.
20. Jung KH, Kim TH, Sheen DH, et al. Associations of vitamin d binding protein gene polymorphisms with the development of peripheral arthritis and uveitis in ankylosing spondylitis. *J Rheumatol.* 2011;38(10):2224-2229. <https://doi.org/10.3899/jrheum.101244>.
21. Фефелова В.В., Хамнагадаев И.И., Поликарпов Л.С. Антиген HLA-B27 и спондилоартропатии у арктических монголоидов // Бюллетень СО РАМН. — 2010. — Т. 30. — № 6. — С. 136–139. [Fefelova VV, Khamnagadaev II, Polikarpov LS. HLA-B27 antigen and spondylarthropathies in arctic mongoloids. *Byulleten' SO RAMN.* 2010;30(6): 136-139. (In Russ.)]
22. Козлов А.И., Вершубская Г.Г. 25-гидроксивитамин Д в различных группах населения Севера России // Физиология человека. — 2019. — Т. 45. — № 5. — С. 125–136. [Kozlov AI, Vershubsky GG. Systematic review on

- 25-hydroxyvitamin D levels in various populations of the Russian North. *Human Physiology*. 2019;45(5):125-136. (In Russ.)). <https://doi.org/10.1134/S0131164619050060>.
23. Clemens TL, Adams JS, Henderson SL, Holick MF. Increased skin pigment reduces the capacity of skin to synthesise vitamin D3. *Lancet*. 1982;319(8263):74-76. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(82\)90214-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(82)90214-8).
24. Mozzi A, Forni D, Cagliani R, et al. Albuminoid genes: evolving at the interface of dispensability and selection. *Genome Biol Evol*. 2014;6(11):2983-2997. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu235>.

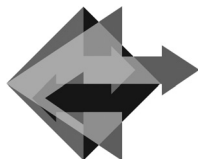
## ✿ Информация об авторе

**Борис Аркадьевич Малярчук** — д-р биол. наук, заведующий лабораторией генетики. ИБПС ДО РАН, Магадан. E-mail: malyarchuk@ibpn.ru.

## ✿ Author and affiliations

**Boris A. Malyarchuk** — Dr. Biol. Sci., Head of Genetics Laboratory. Institute of Biological Problems of the North, Magadan, Russia. E-mail: malyarchuk@ibpn.ru.





## СЕЛЕКТИВНАЯ СИСТЕМА НА ОСНОВЕ ФРАГМЕНТОВ ВИРУСА M1 ДЛЯ ОТБОРА ТРАНСФОРМАНТОВ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

© Д.М. Музаев<sup>1</sup>, А.М. Румянцев<sup>1</sup>, У.Р. Аль Шанаа<sup>1,2</sup>, Е.В. Самбук<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования  
«Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup>Комиссия по атомной энергии Сирии, Дамаск, Сирия

Для цитирования: Музаев Д.М., Румянцев А.М., Аль Шанаа У.Р., Самбук Е.В. Селективная система на основе фрагментов вируса M1 для отбора трансформантов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Экологическая генетика. — 2020. — Т. 18. — № 2. — С. 251–263. <https://doi.org/10.17816/ecogen17719>.

Поступила: 12.11.2019

Одобрена: 25.02.2020

Принята: 23.06.2020

✿ **Цель.** Задачей настоящей работы было получение селективной системы на основе вируса M1 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. **Методы.** Для создания штамма-реципиента фрагмент ДНК, кодирующий киллер-токсин вируса M1 под контролем регулируемого промотора гена *GAL1*, был встроен в геном штаммов Y-1236 и Y-2177 *S. cerevisiae*, чувствительных к токсинам. **Результаты.** Интеграция такой экспрессионной кассеты приводит к появлению условной летальности, а именно, данные штаммы гибнут на среде с галактозой, когда происходит синтез киллер-токсина. Для трансформации полученных штаммов используется линейный фрагмент ДНК, содержащий ген интереса, фланкированный последовательностями, гомологичными промотору гена *GAL1* и терминаторной области гена *CYC1*. При трансформации за счет гомологичной рекомбинации происходит выщепление последовательности, кодирующей киллер-токсин, и трансформанты растут на среде с галактозой. **Выводы.** Предложенная селективная система сочетает в себе основные преимущества других систем: возможность применения простых сред без необходимости добавления дорогостоящих антибиотиков и наличие упрощенных методик конструирования экспрессионных кассет и отбора трансформантов.

✿ **Ключевые слова:** дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*; киллер-токсины; вирусы M1 и M28; селективные маркеры.

## SELECTIVE SYSTEM BASED ON FRAGMENTS OF THE M1 VIRUS FOR THE YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* TRANSFORMATION

© D.M. Muzaev<sup>1</sup>, A.M. Rumyantsev<sup>1</sup>, O.R. Al Shanaa<sup>1,2</sup>, E.V. Sambuk<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia;

<sup>2</sup> Atomic Energy Commission of Syria, Damascus, Syria

Cite this article as: Muzaev DM, Rumyantsev AM, Al Shanaa OR, Sambuk EV. Selective system based on fragments of the M1 virus for the yeast *Saccharomyces cerevisiae* transformation. *Ecological genetics*. 2020;18(2):251–263. <https://doi.org/10.17816/ecogen17719>.

Received: 12.11.2019

Revised: 25.02.2020

Accepted: 23.06.2020

✿ **Background.** A selective system based on the M1 virus of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* was proposed. **Methods.** To create a recipient strain, a DNA fragment encoding the killer toxin of the M1 virus under the control of the regulated promoter of the *GAL1* gene was inserted into the genome of *S. cerevisiae* strains Y-1236 and Y-2177. **Results.** Integration of such expression cassette leads to the conditional lethality — resulting strains die on a medium with galactose when killer toxin synthesis occurs. A linear DNA fragment containing the gene of interest flanked by sequences homologous to the promoter of the *GAL1* gene and the termination region of the *CYC1* gene is used to transform the obtained strains. During transformation due to homologous recombination, the sequence encoding the killer toxin is cleaved and the transformants grow on a medium with galactose. **Conclusion.** The proposed selective system combines the main advantages of other systems: the use of simple media, without the need to add expensive antibiotics, and a simplified technique for constructing expression cassettes and selecting transformants.

✿ **Keywords:** yeast *Saccharomyces cerevisiae*; killer-toxins; M1 and M28 viruses; selective markers.

## ВВЕДЕНИЕ

Дрожжи — гетерогенная группа микроорганизмов, которые в настоящее время привлекают внимание биотехнологов [1, 2]. Они находят применение в биотехнологии, в пищевой [3] и фармацевтической промышленности [4], а также в производстве биотоплива [5].

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* являются идеальной генетической моделью. Для них разработаны методы генной инженерии, молекулярной биологии, биохимии, выделения и очистки белков [6]. Наличие селективных маркеров и соответствующих штаммов-реципиентов позволяет вводить в геном *S. cerevisiae* необходимые последовательности [7]. Использованию *S. cerevisiae* в биотехнологии способствует их статус GRAS (Generally Recognized As Safe) и устойчивость к низким pH [8]. Генетически модифицированные дрожжевые клетки служат биофабриками для производства целевых продуктов [9]. Одним из недостатков дрожжевых штаммов-продуцентов, используемых в промышленной биотехнологии, является наличие в составе плазмид генов устойчивости к антибиотикам, что может приводить к появлению устойчивых к антибиотикам природных микроорганизмов [10]. Поиск новых селективных маркеров дрожжей, не связанных с антибиотиками, является одной из актуальных задач. В этом отношении перспективным является использование в качестве селективного маркера киллер-токсина (микотоксина) дрожжей.

Впервые микоцины (киллер-факторы) были обнаружены у дрожжей *S. cerevisiae* [11]. Киллер-факторами называют белки, подавляющие рост чувствительных штаммов. Они имеют разнообразное строение и являются либо простыми белками, либо гликопротеинами. Киллер-факторы связываются с рецепторами, расположенными в клеточной стенке чувствительных дрожжей, и приводят к их гибели. Сами дрожжи-киллеры не чувствительны к собственному токсину. Киллерная активность может быть направлена не только против представителей своего вида, но и против широкого спектра эукариотических и прокариотических организмов [12].

Киллер-токсины обнаружены более чем в двадцати родах дрожжей, в частности у таких родов, как *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Ustilago*, *Williopsis* и др. [13].

Лучше всего механизмы синтеза киллер-токсинов, способы их действия на чувствительные клетки и иммунность клеток-киллеров изучены у дрожжей *S. cerevisiae*. Было показано, что у дрожжей *S. cerevisiae* киллер-токсины синтезируются в клетках при наличии в цитоплазме днРНК-вирусов. Вирусы, обеспечивающие фенотип «киллер», принадлежат семейству *Totiviridae*, классу микровирусов. Один из них, вирус-помощник L-A, обеспечивает синтез оболочки вирусов. Другой, так называемый вирус-сателлит, один из днРНК-вирусов M (M1, M2, M28 или Mlus), кодирует токсин (K1, K2, K28 или Klus) [11]. Для синтеза эффективного киллер-токсина и формирования иммунитета клетки-хозяина необходимы оба вируса.

Синтез и созревание киллер-токсинов K1 и K28 изучены и подробно рассмотрены в статьях и обзорах [14–16]. Токсины синтезируются в виде препептидов в цитоплазме, после чего транспортируются в эндоплазматический ретикулум, где происходит отщепление сигнальной последовательности (пре-), образование дисульфидных связей и гликозилирование. Формирующиеся препептиды попадают в аппарат Гольджи, где происходит отщепление сигнальной последовательности (про-) и удаление  $\gamma$ -субъединицы.

Зрелые киллер-токсины секретируются в среду [17]. Способы их действия на чувствительные клетки различны. Токсин K1 в низких концентрациях запускает механизмы запрограммированной клеточной гибели. Он действует через белок-рецептор киллер-токсина Kge1p, белок кальциевых каналов Tok1p и митохондриальный белок Dnm1p. Это приводит к увеличению уровня активных форм кислорода (ROS) в клетке и инициирует апоптоз. При высоких концентрациях токсин K1 формирует в мембране каналы, что приводит к некрозу клеток [18]. Токсин K28 попадает в клетку за счет эндоцитоза и, двигаясь ретроградно по секреторному пути, направляется в цитоплазму. Здесь происходит его расщепление на  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы. Субъединица  $\alpha$  направляется в ядро, где ее активность блокирует синтез ДНК и деление клеток [19].

В данной работе разработана селективная система для трансформации дрожжей *S. cerevisiae*, где в качестве селективного маркера используется последовательность ДНК киллер-токсина. Применение киллер-токсина в качестве селективного

маркера может способствовать расширению спектра биотехнологически интересных видов дрожжей и позволит получать штаммы-продуценты без применения плазмид, содержащих гены устойчивости к антибиотикам.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Праймеры

Все праймеры, использованные в работе, представлены в табл. 1.

### Плазмиды

Последовательности вирусов M1 и M28 (Приложение 1), фланкированные сайтами рестрикции BamHI/EcoRI и HindIII/EcoRI, были синтезированы (Eurofins Genomics, Германия) и клонированы в область полилинкера (MCS, multicloning site) вектора pEX-A128 (Eurofins Genomics, Германия). Таким образом, были получены плазмиды pEX-A128-M1, pEX-A128-M28. Последовательности вирусов M1, M28 проверены с помощью секвенирования по методу Сэнгера.

**Конструирование плазмид pAL2T-delleu2 и pAL2T-delura3.** Используя геномную ДНК штамма Y-1236 *S. cerevisiae* и пары праймеров

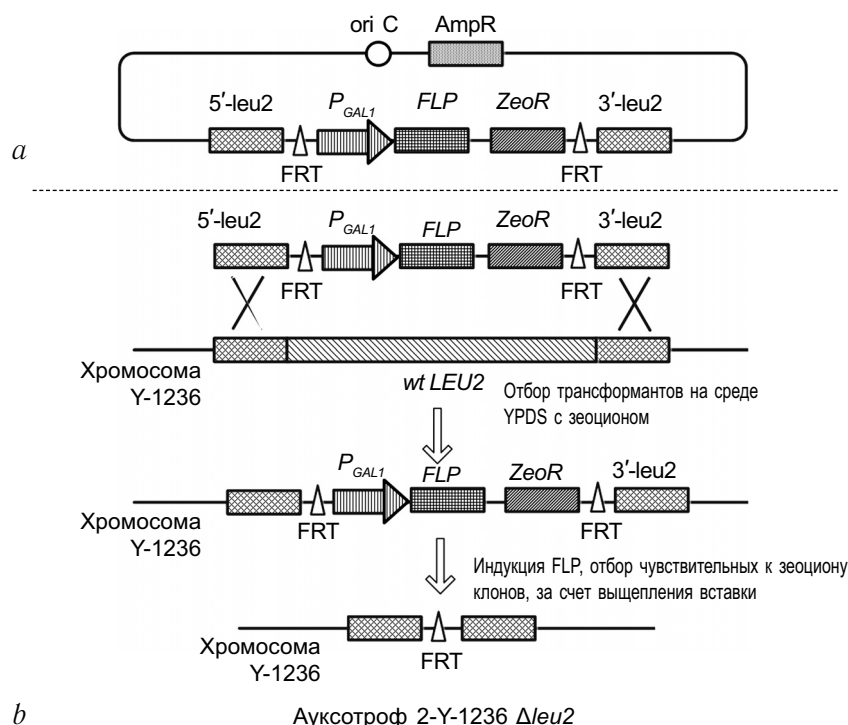
ScLEU2-5'-AvrII-F/ScLEU2-5'-AflIII-R и ScLEU2-3'-AflIII-F/ScLEU2-3'-AvrII-R, амплифицировали последовательности, фланкирующие ген *LEU2*. Полученные фрагменты использовали для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами ScLEU2-5'-AvrII-F и ScLEU2-3'-AvrII-R. Фрагмент 5'-3'-*leu2*, содержащий 5'- и 3'-области гена *LEU2*, встраивали в вектор pAL2-T (Евроген) с помощью ТА-клонирования. Полученную плазмиду pAL2-T-5'-3'-*leu2* обрабатывали рестриктазой AflIII и дефосфорилировали.

Ранее нами была получена плаزمида pPICZ-FLP (Приложение 2), содержащая ген флипазы под контролем промотора гена *AOX1*, ген устойчивости к антибиотику зеоцину, а также две последовательности сайтов FRT, разделенных сайтом рестрикции AflIII. Используя праймеры PGAL-SacI-F и PGAL-SalI-R и плазмиду pYES2 (Thermo Fisher Scientific), амплифицировали последовательность промотора гена *GAL1*. Фрагмент обрабатывали рестриктазами SacI и SalI и встраивали в плазмиду pPICZ-FLP вместо промотора гена *AOX1*. Полученную плазмиду pPICZ-P<sub>GAL1</sub>-FLP обрабатывали рестриктазой AflIII и лигировали с линейаризованной плазмидой

Таблица 1

### Последовательности праймеров, использованных в работе

| Название           | Последовательность (от 5' к 3')                        |
|--------------------|--------------------------------------------------------|
| ScLEU2-5'-AvrII-F  | CCTAGGAGTTCGAATCTCTTAGCAACC                            |
| ScLEU2-5'-AflIII-R | TCTTAAGACACCTGTAGCATCGATAGC                            |
| ScLEU2-3'-AvrII-R  | CCTAGGCCAGATCATCGTTATCCAG                              |
| ScLEU2-3'-AflIII-F | GTGTCTTAAGAAGTTAAGAAAATCCTTGC                          |
| ScURA3-5'-AvrII-F  | CCTAGGACATGAACAAACACCAGAGTC                            |
| ScURA3-5'-AflIII-R | CCTTAAGAATCAGTCAAGATATCCACATG                          |
| ScURA3-3'-AvrII-R  | CCTAGGTGGATTGTGGTTAGATTAGATATGG                        |
| ScURA3-3'-AflIII-F | GATTCTTAAGGGATGCTAAGGTAGAGG                            |
| PGAL-SacI-F        | AAATGAGCTCGATCCACTAGTACGGATTAGAAG                      |
| PGAL-SalI-R        | AAATGTCGACTTAATATTCCTATAGTGAGTCG                       |
| αTOX-F             | AAATAAAGCTTATGGAAGCGCCGTGGTATGACAAGATCTG               |
| αTOX-R             | AAATTGAATTCTTAAGCAACGGTAGCGCCATTAGGATCTG               |
| LEU2-dR            | ACCTTTGGATCCTCCTTTTCTCCTTCTT                           |
| LEU2-dF            | GAGGATCCAAAGGAATACAGGTAAGCAAAT                         |
| expαTOX-BHI-F      | AATAGGATCCGGCGTAACCAACACACC                            |
| expαTOX-BHI-R      | AATAGGATCCCGCAAATTAAGCCCTTCG                           |
| GFP-F              | GGACTACTAGCAGCTGTAATACGACTCACTATAGGGAATATGGTGAGCAAGGGC |
| GFP-R              | TCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTACTTGTACAGCTCGTCC |



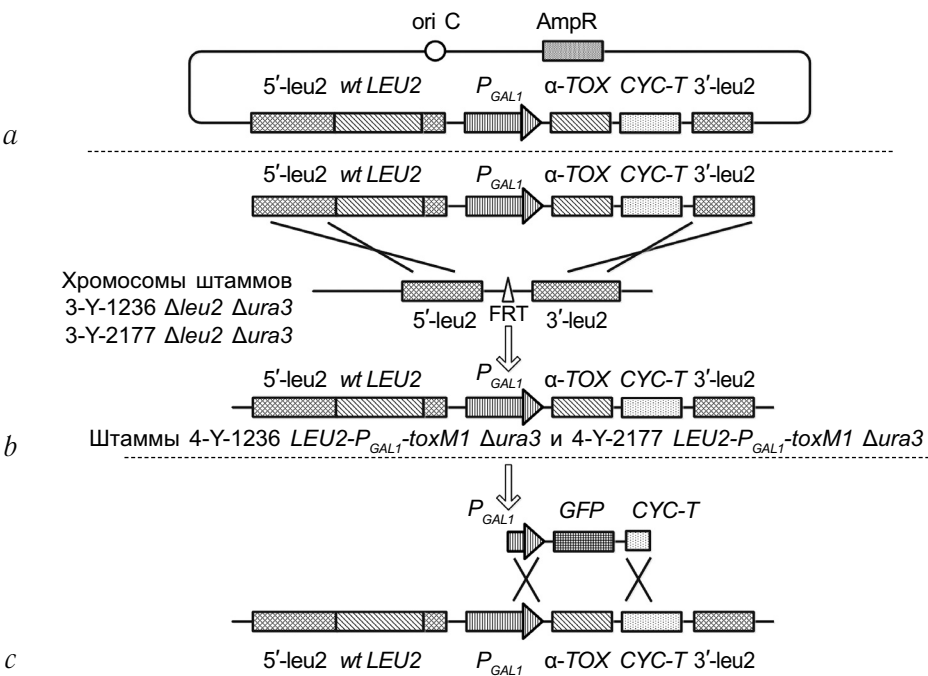
**Рис. 1.** Схема получения штаммов дрожжей *S. cerevisiae* с делециями в генах *LEU2* и *URA3*: *a* — структура плазмиды pAL2-T-delleu2; *b* — схема получения ауксотрофного штамма 1-Y-1236 ( $\Delta leu2$ ) при помощи системы FLP-FRT рекомбинации (штаммы 2-Y-1236 ( $\Delta ura3$ ), 1-Y-2177 ( $\Delta leu2$ ) и 2-Y-2177 ( $\Delta ura3$ ) получали аналогично). Штаммы с двумя ауксотрофностями по лейцину и урацилу 3-Y-1236 ( $\Delta leu2 \Delta ura3$ ) и 3-Y-2177 ( $\Delta leu2 \Delta ura3$ ) получали путем использования штаммов с одиночной ауксотрофностью в качестве исходных

pAL2-T-5'-3'-*leu2*. Структура итоговой плазмиды pAL2-T-delleu2 представлена на рис. 1, *a*. Аналогичным образом была получена плазмида pAL2-T-delura3. Для этого использовали пары праймеров ScURA3-5'-AvrII-F/ScURA3-5'-AflIII-R и ScURA3-3'-AflIII-F/ScURA3-3'-AvrII-R. Структуру плазмид проверяли с помощью ПЦР и рестрикционного анализа.

**Конструирование плазмид pYES2-M1 и pYES2-M28.** В составе плазмиды pEX-A128-M1 фрагмент ДНК-вируса M1 фланкирован сайтами рестрикции BamHI и EcoRI, фрагмент ДНК вируса M28 в плазмиде pEX-A128-M28 — сайтами HindIII и EcoRI. Эти фрагменты были вырезаны и встроены в экспрессирующий вектор pYES2 с использованием соответствующих сайтов рестрикции. В плазмидах pYES2-M1 и pYES2-M28 полноразмерные последовательности ДНК-вирусов оказались под контролем промотора гена *GAL1*, индуцируемого добавлением галактозы в среду.

**Конструирование плазмиды pAL2-T-P<sub>GAL1</sub>- $\alpha$ TOX.** Амплифицировали последовательности ДНК гена *LEU2*, используя пары праймеров ScLEU2-5'-AvrII-F/LEU2-dR и LEU2-dF/ScLEU2-3'-AvrII-R

и хромосомную ДНК штамма Y-1236 *S. cerevisiae* в качестве матрицы. Полученные фрагменты очищали и их смесь использовали для проведения ПЦР с праймерами ScLEU2-5'-AvrII-F и ScLEU2-3'-AvrII-R. Итоговый фрагмент встраивали в вектор pAL2-T (Евроген) с помощью ТА-клонирования. В результате была получена плазмида pAL2-T-LEU2, содержащая полноразмерный ген *LEU2*, в 3'-область которого был внесен сайт рестрикции BamHI. Плазмиду pEX-A128-M1 использовали в качестве матрицы для амплификации последовательности ДНК гена токсина M1 с праймерами  $\alpha$ TOX-F и  $\alpha$ TOX-R. Фрагмент был обработан рестриктазами HindIII и EcoRI и встроен в вектор pYES2. Плазмида pYES2- $\alpha$ TOX была использована в качестве матрицы для проведения ПЦР с праймерами exr $\alpha$ TOX-BHI-F и exr $\alpha$ TOX-BHI-R. Полученный фрагмент обрабатывали рестриктазой BamHI и встраивали в плазмиду pAL2-T-LEU2. Итоговая плазмида pAL2-T-P<sub>GAL1</sub>- $\alpha$ TOX содержала последовательность ДНК токсина вируса M1 под контролем промотора гена *GAL1*, встроенную в 3'-область гена *LEU2* (рис. 2, *b*).



**Рис. 2.** Схема интеграции последовательности токсина вируса M1 в геном штаммов дрожжей *S. cerevisiae* и ее применения в качестве селективного маркера: *a* — структура плазмиды pAL2-T-P<sub>GAL1</sub>-αTOX; *b* — схема получения штаммов 4-Y-1236 (*LEU2-P<sub>GAL1</sub>-toxM1 Δura3*) и 4-Y-2177 (*LEU2-P<sub>GAL1</sub>-toxM1 Δura3*), в геном которых была интегрирована последовательность ДНК-токсина вируса M1 под контролем регулируемого промотора гена *GAL1*; *c* — схема интеграции гена *GFP*, фланкированного последовательностями, гомологичными промотору гена *GAL1* и терминаторной области гена *CYC1*

**Штаммы**

Штаммы дрожжей *S. cerevisiae*, использованные в данной работе, представлены в табл. 2. Также был использован штамм бактерий *Escherichia coli* DH5α (*fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80Δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*).

**Среды и условия культивирования.** Для культивирования штаммов дрожжей использовали сле-

дующие среды. YEPD: 2 % глюкоза, 2 % пептон, 1 % дрожжевой экстракт, 2,4 % агар. YEPDS: 2 % глюкоза, 2 % пептон, 1 % дрожжевой экстракт, 2,4 % агар, 1M сорбитол, зеоцин 200 мкг/мл. MD и MGal (минимальные среды): 7,34 мМ КН<sub>2</sub>Р<sub>4</sub>, 0,95 мМ К<sub>2</sub>НР<sub>4</sub> · 2Н<sub>2</sub>О, 4 мМ MgSO<sub>4</sub> · 7Н<sub>2</sub>О, 0,9 мМ СаСl<sub>2</sub>, 1,7 мМ NaCl, 37,85 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; витамины, микроэлементы; 2 % — глюкоза (MD) или галактоза (MGal), 2,4 % агар, аминокислоты

Таблица 2

**Штаммы дрожжей *S. cerevisiae*, использованные в работе**

| Название | Генотип                                       | Источник      |
|----------|-----------------------------------------------|---------------|
| Y-1236   | <i>MATa wt</i>                                | ВКПМ          |
| 1-Y-1236 | <i>MATa Δleu2</i>                             | Данная работа |
| 2-Y-1236 | <i>MATa Δura3</i>                             | Данная работа |
| 3-Y-1236 | <i>MATa Δleu2 Δura3</i>                       | Данная работа |
| Y-2177   | <i>MATa wt</i>                                | ВКПМ          |
| 1-Y-2177 | <i>MATa Δleu2</i>                             | Данная работа |
| 2-Y-2177 | <i>MATa Δura3</i>                             | Данная работа |
| 3-Y-2177 | <i>MATa Δleu2 Δura3</i>                       | Данная работа |
| 4-Y-1236 | <i>MATa LEU2-P<sub>GAL1</sub>-toxM1 Δura3</i> | Данная работа |
| 4-Y-2177 | <i>MATa LEU2-P<sub>GAL1</sub>-toxM1 Δura3</i> | Данная работа |

и азотистые основания (если необходимо): лейцин, урацил — 40 мг/л. Для культивирования бактерий использовали среду LB: 1 % триптон, 0,5 % дрожжевой экстракт, 170 mM NaCl, бензилпенициллин —  $5 \cdot 10^5$  е.а./л. Штаммы *S. cerevisiae* выращивали при температуре 30 °С, *E. coli* — при 37 °С.

### Методы молекулярной генетики

В работе использовали эндонуклеазы рестрикции и фосфатазу FastAP (Thermo Fisher scientific Inc., США), T 4-лигазу (Евроген, Россия), согласно рекомендациям производителей. Очистку ДНК из агарозных гелей и реакционных смесей проводили с помощью наборов Cleanup Standard (Евроген, Россия). Выделение плазмидной ДНК проводили с помощью наборов Plasmid Miniprep (Евроген, Россия). Для проведения ПЦР использовали наборы реактивов Encyclo Plus PCR (Евроген, Россия). Электрофорез фрагментов ДНК проводили в 0,7 % агарозном геле в буфере TAE [20]. Трансформацию бактерий *E. coli* и дрожжей — согласно [21, 22]. Выделение хромосомной ДНК из дрожжей *S. cerevisiae* — по методике [23]. Секвенирование ДНК — с использованием BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США).

### РЕЗУЛЬТАТЫ

#### Получение штаммов 3-Y-1236 и 3-Y-2177 с делециями кодирующих последовательностей генов *LEU2* и *URA3*

В качестве исходных были использованы прототрофные штаммы *S. cerevisiae* Y-2177 и Y-1236 из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ), сверхчувствительные к киллер-токсинам. На первом этапе у штаммов Y-2177 и Y-1236 получали одиночные делеции в генах *URA3* и *LEU2* соответственно. Для этого использовали плазмиды pAL2T-delura3 и pAL2T-delleu2.

Фрагмент 5'-LEU2-FRT-P<sub>GAL1</sub>-FLP-ZeoR-FRT-3'-LEU2 амплифицировали с помощью праймеров ScLEU2-5'-AvrII-F и ScLEU2-3'-AvrII-R, используя плазмиду pAL2T-delleu2 в качестве матрицы. Фрагмент очищали и трансформировали штаммы Y-1236 и Y-2177. Селекцию трансформантов проводили на среде YEPDS с антибиотиком зеоцином. В ходе трансформации за счет гомологичной рекомби-

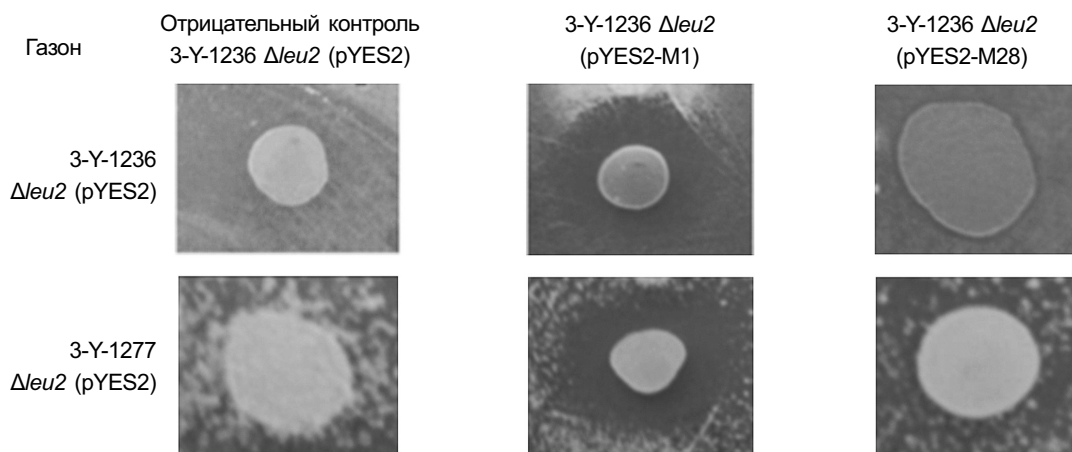
нации происходила замена кодирующей последовательности гена *LEU2* на кассету FRT-P<sub>GAL1</sub>-FLP-ZeoR-FRT. На следующем этапе культуры полученных трансформантов инкубировали в течение 24 ч в жидкой среде с галактозой (MGal). В клетках происходил синтез флиппазы, которая вносит двунитевые разрывы в последовательности FRT. В результате происходило удаление кассеты FRT-P<sub>GAL1</sub>-FLP-ZeoR-FRT из генома трансформантов. Клетки были высеяны на среду YEPD, после чего с помощью метода отпечатков среди полученных колоний были отобраны те, которые из-за удаления кассеты не росли на среде YEPDS с зеоцином. Полученные штаммы 1-Y-1236 ( $\Delta leu2$ ) и 1-Y-2177 ( $\Delta leu2$ ) не росли на среде MD без добавления лейцина, что свидетельствует об их ауксотрофности. Схема экспериментов приведена на рис. 1, b.

Аналогичным образом с использованием плазмиды pAL2T-delura3 были получены штаммы 2-Y-1236 ( $\Delta ura3$ ) и 2-Y-2177 ( $\Delta ura3$ ) ауксотрофные по урацилу. Далее были получены штаммы 3-Y-1236 ( $\Delta leu2 \Delta ura3$ ) и 3-Y-2177 ( $\Delta leu2 \Delta ura3$ ) с двумя ауксотрофностями. Наличие делеций подтверждали с помощью метода ПЦР, используя в качестве матрицы хромосомную ДНК штаммов 3-Y-1236, 3-Y-2177 и исходных штаммов Y-1236, Y-2177 в качестве контроля, и пары праймеров ScLEU2-5'-AvrII-F/ScLEU2-3'-AvrII-R и ScURA3-5'-AvrII-F/ScURA3-3'-AvrII-R.

#### Экспрессия полноразмерных вирусных геномов M1 и M28 в штаммах 3-Y-1236 и 3-Y-2177

Векторы pYES2-M1 и pYES2-M28 использовали для трансформации штаммов 3-Y-1236 ( $\Delta leu2 \Delta ura3$ ) и 3-Y-2177 ( $\Delta leu2 \Delta ura3$ ). Трансформанты отбирали по прототрофности по урацилу и анализировали появление киллерного эффекта. Для этого трансформанты этих штаммов 3-Y-1236 ( $\Delta leu2$  pYES2-M1), 3-Y-1236 ( $\Delta leu2$  pYES2-M28), 3-Y-2177 ( $\Delta leu2$  pYES2-M1) и 3-Y-2177 ( $\Delta leu2$  pYES2-M28) высевали на среды MGal, содержащие галактозу в качестве единственного источника углерода, на газоны контрольных штаммов, содержащих исходную плазмиду pYES2: 3-Y-1236 ( $\Delta leu2$  pYES2) и 3-Y-2177 ( $\Delta leu2$  pYES2).

На среде с галактозой происходит синтез киллерного белка, что приводит к подавлению роста



**Рис. 3.** Фенотипы штаммов 3-Y-1236 ( $\Delta leu2$  pYES2-M1) и 3-Y-1236 ( $\Delta leu2$  pYES2-M28) на среде с газонами контрольных штаммов 3-Y-1236 ( $\Delta leu2$  pYES2) и 3-Y-2177 ( $\Delta leu2$  pYES2). Зона подавления возникает в результате действия киллер-токсинов

чувствительных штаммов и формированию зоны лизиса. Результаты приведены на рис. 3. Экспрессия полноразмерных вирусных геномов не влияла на рост самих штаммов 3-Y-1236 ( $\Delta leu2$  pYES2-M1), 3-Y-1236 ( $\Delta leu2$  pYES2-M28), 3-Y-2177 ( $\Delta leu2$  pYES2-M1) и 3-Y-2177 ( $\Delta leu2$  pYES2-M28), так как они обеспечивают устойчивость к собственному токсину [11].

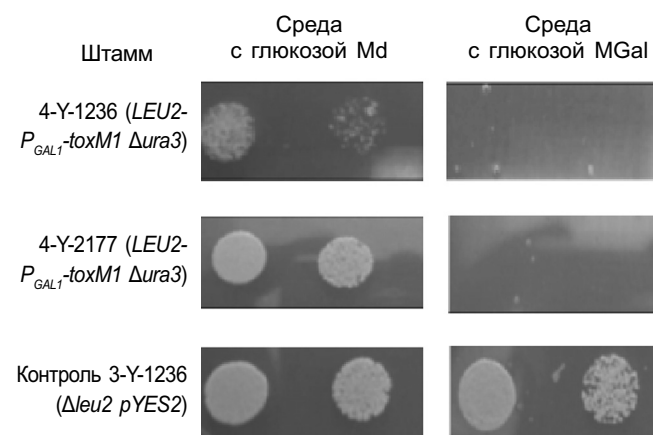
Наиболее выраженный киллерный эффект проявился у штамма 3-Y-1236 ( $\Delta leu2$  pYES2-M1), синтезирующего вирус M1. Поэтому далее для создания селективной системы был выбран именно токсин M1.

#### Использование последовательности токсина вируса M1 в качестве селективного маркера

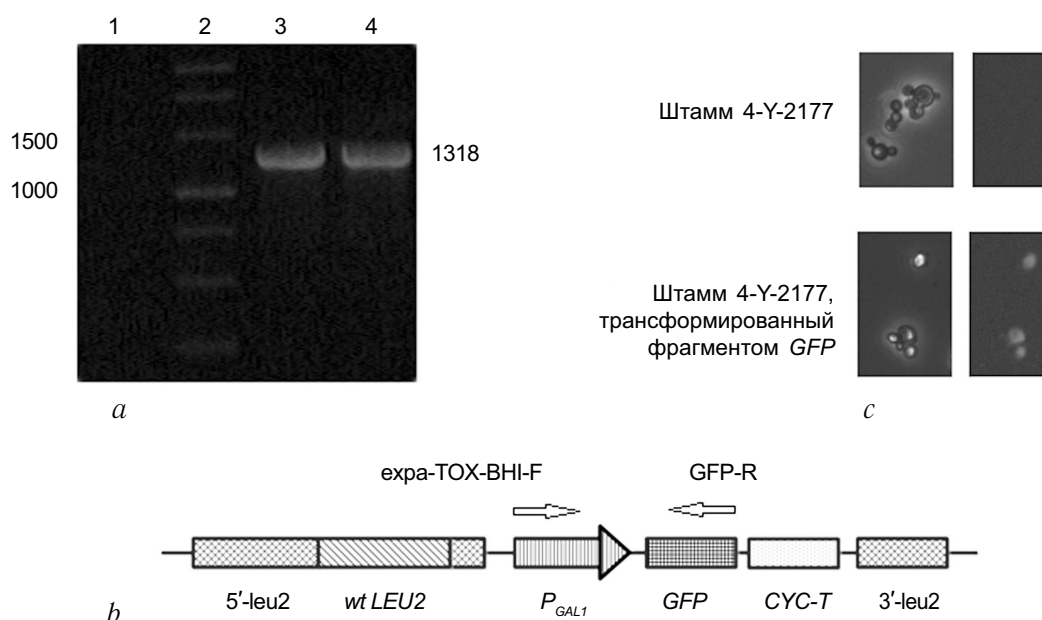
Использованный ранее фрагмент ДНК ( $\alpha TOX$  315 п. н.) киллер-вируса M1, который отвечает за синтез токсина [24], амплифицировали с помощью праймеров  $\alpha TOX$ -F и  $\alpha TOX$ -R. Получили плазмиду pAL2-T- $P_{GAL1}$ - $\alpha TOX$ , содержащую один из фрагментов вируса M1 ( $\alpha TOX$ ) под контролем промотора гена  $GAL1$ . Используя эту плазмиду в качестве матрицы, с помощью праймеров ScLEU2-5'-AvrII-F и ScLEU2-3'-AvrII-R амплифицировали фрагмент 5'LEU2- $P_{GAL1}$ - $\alpha TOX$ -3'LEU2. Данным фрагментом трансформировали штаммы 3-Y-1236 и 3-Y-2177. Трансформантов отбирали по восстановлению прототрофности по лейцину. Схема эксперимента представлена на рис. 2, b. Полученные таким образом штаммы 4-Y-1236 ( $LEU2$ - $P_{GAL1}$ - $toxM1$   $\Delta ura3$ ) и 4-Y-2177 ( $LEU2$ - $P_{GAL1}$ - $toxM1$   $\Delta ura3$ ) характеризуются условной

летальностью — они не растут на средах с галактозой, поскольку в этих условиях в их клетках происходит синтез токсина (рис. 4). Наличие интеграций проверяли с помощью метода ПЦР, используя пару праймеров  $\alpha TOX$ -F/ $\alpha TOX$ -R и геномную ДНК трансформантов 4-Y-1236 и 4-Y-2177 в качестве матрицы. В случае штамма 4-Y-1236 на среде с глюкозой наблюдали незначительное подавление роста, что может быть связано с особенностями регуляции глюкозной репрессии у данного штамма. Для дальнейшей работы использовали штамм 4-Y-2177.

Так как на среде с галактозой в результате синтеза токсина происходит подавление роста штамма



**Рис. 4.** Рост штаммов 4-Y-1236 ( $LEU2$ - $P_{GAL1}$ - $toxM1$   $\Delta ura3$ ) и 4-Y-2177 ( $LEU2$ - $P_{GAL1}$ - $toxM1$   $\Delta ura3$ ), в геномы которых была интегрирована последовательность ДНК токсина вируса M1 под контролем регулируемого промотора гена  $GAL1$ , на средах с глюкозой и галактозой. Штаммы характеризуются условной летальностью — они не растут на средах с галактозой, поскольку в этих условиях в их клетках происходит синтез токсина. Высевали по 10 мкл суспензии  $10^4$  и  $10^3$  кл/мл



**Рис. 5.** Проверка наличия интеграции гена *GFP* в геном трансформантов: *a* — результаты ПЦП с праймерами *exрa*TOX-BHI-F и *GFP*-R и геномной ДНК штаммов: 1) 4-Y-2177; 3) 4-Y-2177 с интеграцией гена *GFP*, клон 1; 4) 4-Y-2177 с интеграцией гена *GFP*, клон 2. Размеры фрагментов соответствуют теоретически ожидаемому — 1343 п. о.; 2) маркер длин ДНК 1 kb (Евроген). *b* — схема расположения праймеров *exрa*TOX-BHI-F и *GFP*-R; *c* — флуоресценция клеток исходного штамма 4-Y-2177 и штамма, трансформированного фрагментом *GFP* (клон 2)

4-Y-2177, следовательно ген токсина может быть использован в качестве селективного маркера. Для оценки возможности использования этого подхода при отборе трансформантов амплифицировали последовательность гена флуоресцентного белка *GFP*. Для этого использовали праймеры *GFP*-F и *GFP*-R, которые содержали на 5'-концах последовательно, гомологичные промотору гена *GAL1* и терминаторной области гена *CYC1*. Полученный фрагмент очищали и использовали для трансформации штамма 4-Y-2177. Селекцию трансформантов проводили на среде MGal с галактозой. В ходе трансформации за счет гомологичной рекомбинации происходила замена последовательности, кодирующей киллер-токсин, на последовательность гена *GFP* (рис. 2, *c*). Полученные трансформанты способны расти на среде MGal с галактозой, что свидетельствует о замене последовательности токсина на последовательность гена *GFP*. Наличие интеграции гена *GFP* в геном трансформантов подтвердили с помощью ПЦП с праймерами *exрa*TOX-BHI-F и *GFP*-R, а также с помощью метода флуоресцентной микроскопии (рис. 5).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Дрожжи *S. cerevisiae* широко используются в биотехнологических процессах. Созданию штам-

мов-производителей, используемых в промышленном производстве, способствуют разнообразие методик трансформации дрожжей и доступность удобных систем селекции.

При конструировании плазмид для работы с *S. cerevisiae* используются гены *URA3*, *LEU2*, *HIS3*, *TRP1* и другие гены, кодирующие различные ферменты метаболических путей дрожжей. Мутации в этих генах приводят к ауксотрофности по соответствующим аминокислотам или азотистым основаниям [25]. Плазмиды, используемые для получения штаммов-производителей, как правило, содержат бактериальные гены устойчивости к антибиотикам. Это позволяет успешно амплифицировать плазмиды в штаммах *E. coli* [26]. Также гены устойчивости к антибиотикам, например зеоцину, используются непосредственно для селекции дрожжевых трансформантов [27].

Однако в процессе создания штаммов-производителей наличие генов устойчивости к антибиотикам в плаزمиде является проблемой. Использование антибиотиков для поддержания плазмид не рекомендуется при синтезе рекомбинантных белков для фармацевтического производства. Это связано с риском загрязнения антибиотиками конечных продуктов и попаданием ДНК, кодирую-



щей устойчивость к антибиотикам, в окружающую среду [28, 29].

В связи с этим у бактерий, например, предпринимаются попытки замены генов устойчивости к антибиотикам в плазидах на ген *lgt*, кодирующий (про)липопротеин глицерилтрансферазу. Этот фермент у бактерий участвует в биосинтезе бактериального липопротеина, и делеция этого гена летальна. Разработана система для получения продуцентов рекомбинантных белков, в которой ген *lgt* в хромосоме бактерий делетирован и интегрирован в плазмиду вместе с целевым геном. Потеря плазмиды приводит к гибели клеток [30].

В настоящей работе в качестве селективного маркера впервые использован киллер-токсин дрожжей M1. Это позволяет при создании штаммов-продуцентов обойтись без последовательностей, приводящих к устойчивости к антибиотикам.

Данная система селекции предполагает, что в качестве штамма-реципиента должен быть использован штамм, чувствительный к киллер-токсину.

На первом этапе в случае прототрофности штаммов в их геном вводятся делеции генов *URA3* и *LEU2*. Затем в геном штаммов интегрируется конструкция, содержащая последовательность ДНК токсина вируса M1 под контролем регулируемого промотора гена *GAL1*. Для получения штамма-продуцента необходимо трансформировать штамм-реципиент амплифицированной кодирующей последовательностью гена интереса, которая фланкирована промотором гена *GAL1* и терминатором гена *CYC1*. За счет гомологичной рекомбинации на среде с галактозой происходит замещение гена, кодирующего токсин, и производится отбор целевых трансформантов. При этом ген интереса окажется в составе генома трансформированного штамма под контролем промотора гена *GAL1*, что обеспечит его регулируемую экспрессию. Такой подход может быть использован для экспрессии рекомбинантных белков. Он способствует уменьшению распространения генов, кодирующих устойчивость к антибиотикам, уменьшая выброс антибиотиков в окружающую среду и освобождая конечные продукты (часто используемые в фармацевтике) от загрязнения потенциально вредными остатками антибиотиков. Кроме того, предложенная селективная система

может быть использована как один из подходов к решению проблемы нехватки удобных селективных маркеров, возникающей при работе с новыми штаммами дрожжей.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (проект № 18-04-01057).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Varela C. The impact of non-Saccharomyces yeasts in the production of alcoholic beverages. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016;100(23):9861-9874. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7941-6>.
2. Tofalo R, Fusco V, Böhnlein C, et al. The life and times of yeasts in traditional food fermentations. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2019;26:1-30. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1677553>.
3. Thim L, Hansen MT, Norris K, et al. Secretion and processing of insulin precursors in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(18):6766-6770. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.18.6766>.
4. Nielsen J. Production of biopharmaceutical proteins by yeast: advances through metabolic engineering. *Bioengineered.* 2013;4(4):207-211. <https://doi.org/10.4161/bioe.22856>.
5. Jin YS, Cate JH. Metabolic engineering of yeast for lignocellulosic biofuel production. *Curr Opin Chem Biol.* 2017;41:99-106. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.10.025>.
6. Duina AA, Miller ME, Keeney JB. Budding yeast for budding geneticists: a primer on the *Saccharomyces Cerevisiae* model system. *Genetics.* 2014;197(1):33-48. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.163188>.
7. Sikorski RS, Hieter P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 1989;122(1):19-27.
8. Berlec A, Strukelj B. Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2013;40(3-4):257-274. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1235-0>.
9. Падкина М.В., Самбук Е.В. Генетически модифицированные микроорганизмы-продуценты биологически активных соединений // Экологическая генетика. — 2015. — Т. 13. —

- № 2. — С. 36–57. [Padkina MV, Sambuk EV. Genetically modified microorganisms as producers of biologically active compounds. *Ecological genetics*. 2015;13(2):36-57. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17816/ecogen13236-57>.
10. Землянюк О.М., Рогоза Т.М., Журавлева Г.А. Механизмы множественной устойчивости бактерий к антибиотикам // Экологическая генетика. — 2018. — Т. 16. — № 3. — С. 4–17. [Zemlyanko OM, Rogoza TM, Zhouravleva GA. Mechanisms of bacterial multiresistance to antibiotics. *Ecological genetics*. 2018;16(3):4-17. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17816/ecogen1634-17>.
  11. Magliani W, Conti S, Gerloni M, et al. Yeast killer systems. *Clin Microbiol Rev*. 1997;10(3):369-400. <https://doi.org/10.1128/cmr.10.3.369>.
  12. Hatoum R, Labrie S, Fliss I. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Front Microbiol*. 2012;3:421. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00421>.
  13. Belda I, Ruiz J, Alonso A, et al. The biology of pichia membranifaciens killer toxins. *Toxins (Basel)*. 2017;9(4). pii: E112. <https://doi.org/10.3390/toxins9040112>.
  14. Zhu H, Bussey H. Mutational analysis of the functional domains of yeast K1 killer toxin. *Mol Cell Biol*. 1991;11(1):175-181. <https://doi.org/10.1128/mcb.11.1.175>.
  15. Schmitt MJ, Tipper DJ. Sequence of the M28 dsRNA: preprotoxin is processed to an alpha/beta heterodimeric protein toxin. *Virology*. 1995;213(2):341-351. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.0007>.
  16. Самбук Е.В., Музаев Д.М., Румянцев А.М., Падкина М.В. Киллер-токсины дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: синтез, механизмы действия и практическое использование // Экологическая генетика. — 2019. — Т. 17. — № 3. — С. 59–73. [Sambuk EV, Muzaev DM, Rumjanzev AM, Padkina MV. *Saccharomyces cerevisiae* killer toxins: synthesis, mechanisms of action and practical use. *Ecological genetics*. 2019;17(3):59-73. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17816/ecogen17359-73>.
  17. Bussey H, Saville D, Greene D, et al. Secretion of *Saccharomyces cerevisiae* killer toxin: processing of the glycosylated precursor. *Mol Cell Biol*. 1983;3(8):1362-1370. <https://doi.org/10.1128/mcb.3.8.1362>.
  18. Bussey H, Sherman D. Yeast killer factor: ATP leakage and coordinate inhibition of macromolecular synthesis in sensitive cells. *Biochim Biophys Acta*. 1973;298(4):868-875. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(73\)90391-X](https://doi.org/10.1016/0005-2736(73)90391-X).
  19. Eisefeld K, Riffer F, Mentges J, Schmitt MJ. Endocytotic uptake and retrograde transport of a virally encoded killer toxin in yeast. *Mol Microbiol*. 2000;37(4):926-940. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02063.x>.
  20. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). — М.: Наука, 1981. — 288 с. [Osterman LA. Methods of protein and nucleic acid research. Springer; 1984. 288 p. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-87485-7>.
  21. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. 1983;166(4):557-580. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8).
  22. Wu S, Letchworth GJ. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *Biotechniques*. 2004;36(1):152-154. <https://doi.org/10.2144/04361dd02>.
  23. Guthrie C, Fink GR. Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods Enzymol*. 1991;194:1-863. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(00\)x0276-5](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(00)x0276-5).
  24. Gier S, Schmitt MJ, Breinig F. Expression of K1 toxin derivatives in *Saccharomyces cerevisiae* mimics treatment with exogenous toxin and provides a useful tool for elucidating K1 mechanisms of action and immunity. *Toxins (Basel)*. 2017;9(11). pii: E345. <https://doi.org/10.3390/toxins9110345>.
  25. Botstein D, Fink GR. Yeast: an experimental organism for modern biology. *Science*. 1988;240(4858):1439-1443. <https://doi.org/10.1126/science.3287619>.
  26. Duina AA, Miller ME, Keeney JB. Budding yeast for budding geneticists: a primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Genetics*. 2014;197(1):33-48. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.163188>.
  27. Tian Z, Liu R, Zhang H, et al. Developmental dynamics of antibiotic resistance in aerobic biofilm microbiota treating wastewater under

- stepwise increasing tigecycline concentrations. *Environ Int.* 2019;131:105008. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105008>.
28. Baquero F, Martínez JL, Cantón R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr Opin Biotechnol.* 2008;19(3):260-265. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.05.006>.
29. Tuller T, Girshovich Y, Sella Y, et al. Association between translation efficiency and horizontal gene transfer within microbial communities. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(11):4743-4755. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr054>.
30. Terrinoni M, Nordqvist SL, Källgård S, et al. A novel nonantibiotic, lgt-based selection system for stable maintenance of expression vectors in *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. *Appl Environ Microbiol.* 2018;84(4). pii: e02143-2117. <https://doi.org/10.1128/AEM.02143-17>.

## Приложение 1

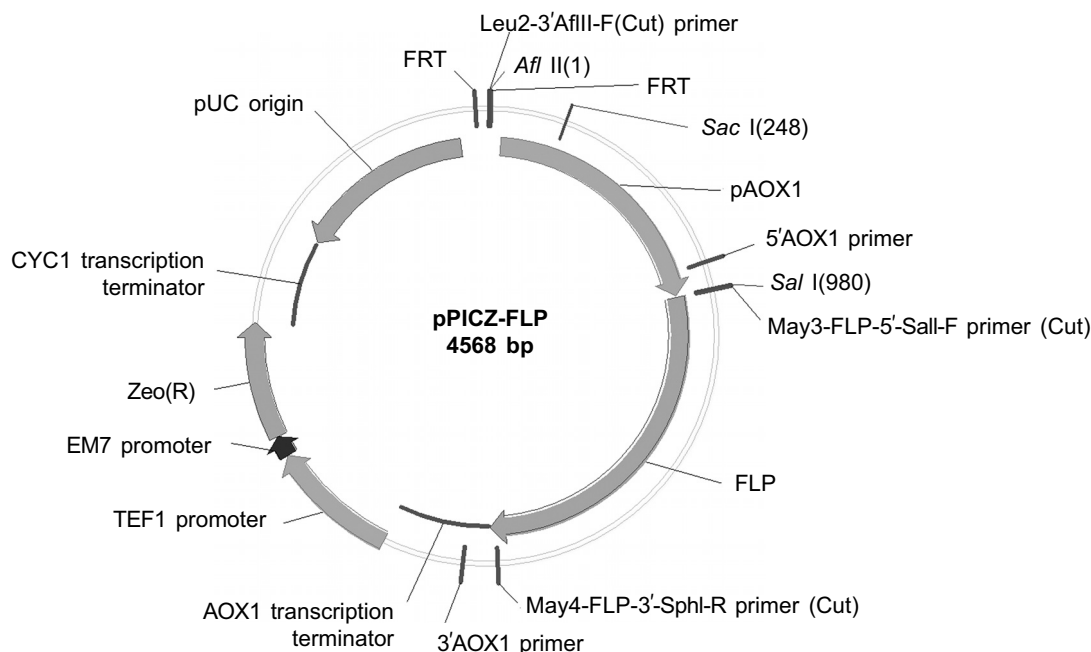
## Нуклеотидная последовательность M1:

GA AAAAATAAAGAAATGACGAAGCCAACCAAGTATTAGTTAGATCCGTCAGTATATTATTTTCATCACATTACTAC  
ACCTAGTCGTAGCGCTGAACGATGTGGCCGGTCTGCAGAAACAGCACCAGTGTCACTTACTACCTCGTGAAGCGCC  
GTGGTATGACAAGATCTGGGAAGTAAAGATTGGCTATTACAGCGTGCCACAGATGGCAATTGGGGCAAGTCGATC  
ACCTGGGGTTTCATTCGTAGCGAGCGATGCAGGTGTAGTAATCTTTGGTATCAATGTGTGTAAGAACTGCGTGGGTG  
AGCGTAAGGATGATATCAGTACGGACTGCGGCAAGCAAACACTTGCTTTACTAGTCAGCATTTTGTAGCAGTTAC  
ATCCGGCCATCATCTTATATGGGGTGGTAATAGGCCGGTGTGCGAGTCAGATCCTAATGGCGCTACCGTTGCTCGTC  
GTGACATTTCTACTGTGCGAGACGGGGATATTCCACTGGACTTTAGTGCGTTGAACGACATATTAAATGAACATGGT  
ATTAGTATACTCCCAGCTAACGCATCACAATATGTCAAAAGATCAGACACAGCCGAACACACGACAAGTTTTGTAGT  
GACCAACAACACTACACTTCTTTGCATACCGACCTGATTCATCATGGTAATGGAACATATACCACGTTTACCACACCTC  
ACATTCCAGCAGTGGCCAAGCGTTATGTTTATCCTATGTGCGAGCATGGTATCAAGGCCTCATACTGTATGGCCCTT  
AATGATGCCATGGTGTGCGCTAATGGTAACCTGTATGGACTAGCAGAAAAGCTGTTTAGTGAGGATGAGGGACAAT  
GGGAGACGAATTACTATAAATTGTATTGGAGTACTGGCCAGTGGATAATGTCGATGAAGTTTATTGAGGAAAGTATT  
GATAACGCCAATAATGACTTTGAAGGCTGTGACACAGGCCACTAGGGCATCGTGTCTGACCTCTGATGCGATAACT  
CGACCCTACAGAGCACC GGCTATATATAATATAGTAGGCACAAAATAAAAATAAAAAATTA AAAAAAAAAAAAAAAAAA  
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAGAGAGAGAAGAAGAAGAAGAAAAGAAAAACAAAAGAAACAGAAAAA  
GAGAGAACAGGACAACAACGCAACAACACACAAGCACACTCACCTTGAGTCTAACTGGTGGCAGCAG  
CATATCTCACCTGAGACTAACTGGCGGCAGGCGACCGTGAGCATACAGCATGCCCCACTCGATTGAGACGCGAT  
TCGCGCTCGTAGGTATCGAGCGGCTACGTTGAGCTATTATGGCAGTGACATGCGATTGCGCGACTGCCAAGATCAG  
CTCAGCAAAGTTAAGACCAGTATCGGATATGGTAGACTACTACAATTCGCACAGGTATGAGATTCTCAGTCTAGTGT  
ATGGATGAGTAGTTGAGCCAATGAATCTAGGGTTTAAATTACTATGCATTGACATATAGCAGGTACAAGCGTAGATA  
ATACTTACTAGGCCCCAGCCGGTACACCCTGTATTGAATAAATACGACTATTTGGCCAGGTCTGGACGGGGCAGTC  
GAATTACTAGTTGAGCACACACAGTGAATCACACAACATAACAGTGTAGGAACATAATGTGCCATTTCGTAGTCTG  
AGACGCCGCTAGCCTGGTTTAAATGCAACAGCATAGAAGAAACACACATCA

## Нуклеотидная последовательность M28:

GA AAAAATTTGAATGGAGAGCGTTTCCTCATTATTTAACATTTTTCACAACATCATGGTTAACTATAAATCGTT  
AGTTCTAGCACTATTAAGTGTTCAAATCTCAAATATGCACGGGGTATGCCGACATCTGAGAGACAGCAGGGCT  
TAGAAGAACGTGACTTCAGTGCTGCTACTTGCGTACTGATGGGCGCAGAAGTAGGCTCATGGGGAATGGTTTATA  
GTGGTCAGAAGGTCGAGAGTTGGATCCTCTACGTTCTGACTGGCATTACTACGATGAGCGCAATCGTTGACGAA  
ATTGACTATTATGCGTCACATATGCCACTGAGTGTTGTGGGTGAGAACTCAGGGCTACAAATCGTTCTGTGATACC  
ATAGTAACCTTGGTTATGGCTGGCCTGACAGCATCAGCTAACAAGGTAATCAGTAAGACTGAAAACGCAGAGAAT  
ATACAATCGCGTAGTCTTATACCGGGTCTGCTTAGTATGGATTATAACAGTACTCATACTATGGCGATTAAATTTGG  
AAGACGTATTCTCGGAGCTCGGCTGGGACATCGATACTAGTGATAGCTCTGGTTTATACAAACGTGACGATAATT  
CTGTCACTCTGCACCTAGGGGACGTACCTGCTCTAGGCACCAAGTAACACTATCATACCTAACGCTGTATGCAAAT  
ATATAATAACGCATCATTTGCTTTTCGGTTTTTGACCTCATAGCAACGGTAATTCTACAGGCTTGACAGAAACGAGCT-  
AGTATTGATGATGCGGTGTGGTTACAATCTGCATACGGAATAGCTTATAGTGCCTGGATAGGCTCTGAGAATGTGG  
GTTTCCTATGATCAGCATCTAGCTGAAGCTAACGGTATGGCTAACTACTGGACGTCCGAGTGTTCTAAGTACAATGG  
TGTCATCTGGGGTGACGAATCAGACGCCTGCGGTAACCTGGCTAGCATCACAGCGTTTAGACATAGTGAGTCACT  
CAACAGGCAATTACTACAGAGACGTTAACCTCTGTGGTGACGACGAGGCAAGGTGCCACGATGAGCTACGCTAA  
TAGTCCAGACCGACGCTTCTTAGTTATGATCAGGCTGTGA

## Карта плазмиды pPICZ-FLP:



## Нуклеотидная последовательность плазмиды pPICZ-FLP:

TTAAGGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACCTTCGGATCTAACATCCAAAGACGAAAGGTTGAATGAAACCTT  
 TTTGCCATCCGACATCCACAGGTCCATTCTCACACATAAGTGCCAAACGCAACAGGAGGGGATACACTAGCAGCAG  
 ACCGTTGCAAACGCAGGACCTCCACTCCTCTTCTCCTCAACACCCACTTTTGGCATCGAAAAACCAGCCCAGTTATT  
 GGGCTTGATTGGAGCTCGCTCATTCCAATTCCTTCTATTAGGCTACTAACACCATGACTTTATTAGCCTGTCTATCCT  
 GGCCCCCTGGCGAGGTTTCATGTTTGTTTATTTCGAATGCAACAAGCTCCGCATTACACCCGAACATCACTCCAG  
 ATGAGGGCTTTCTGAGTGTGGGGTCAAATAGTTTCATGTTCCCCAAATGGCCCCAAACTGACAGTTTAAACGCTGT  
 CTTGGAACCTAATATGACAAAAGCGTGATCTCATCCAAGATGAACTAAGTTTGGTTCGTTGAAATGCTAACGGCCAG  
 TTGGTCAAAAAGAACTTCCAAAAGTCGGCATAACGTTTGTCTTGTGTTGGTATTGATTGACGAATGCTCAAAAATAAT  
 CTCATTAATGCTTAGCGCAGTCTCTCTATCGCTTCTGAACCCCGGTGCACCTGTGCCGAAACGCAAATGGGGAAC  
 ACCCGCTTTTGGATGATTATGCATTGTCTCCACATTGATGCTTCCAAGATTCTGGTGGGAATACTGCTGATAGCCT  
 AACGTTTCATGATCAAAATTTAACTGTTCTAACCCCTACTTGACAGCAATATATAACAGAAGGAAGCTGCCCTGTCTTA  
 AACCTTTTTTTTTATCATCATTATTAGCTTACTTTTATAATTGCGACTGGTTCCAATTGACAAGCTTTTGATTTTAACGAC  
 TTTTAACGACAACCTTGAGAAGATCAAAAACAATAATTATTCGAAACGTCGACATGCCACAATTTGATATATTATGTAA  
 AACACCACCTAAGGTCCTGGTTCGTCAGTTTGTGGAAGGTTTGAAGACCTTCAGGGGAAAAAATAGCATCATGT  
 GCTGCTGAACTAACCTATTATGTTGGATGATTACTCATAACGGAACAGCAATCAAGAGAGCCACATTCATGAGCTATA  
 ATACTATCATAAGCAATTCGCTGAGTTTCGATATTGTCAACAATCACTCCAGTTTAAATACAAGACGCAAAAAGCAAC  
 AATTCTGGA AGCCTCATTAAGAAATTAATTCCTGCTTGGGAATTTACAATTATTCCTTACAATGGACAAAAACATCAA  
 TCTGATATCACTGATATTGTAAGTAGTTTGCAATTACAGTTTGAATCATCGGAAGAAGCAGATAAGGGAAATAGCCACA  
 GTAAAAAATGCTTAAAGCACTTCTAAGTGAGGGTGAAGCATCTGGGAGATCACTGAGAAAATACTAAATTCGTTTG  
 AGTATACCTCGAGATTTACAAAAACAAAACTTTATACCAATTCCTCTCCTAGCTACTTTTCATCAATTGTGGAAGATTC  
 AGCGATATTAAGAACGTTGATCCGAAATCATTTAAATTAGTCCAAAATAAGTATCTGGGAGTAATAATCCAGTGTTTAGT  
 GACAGAGACAAAGACAAGCGTTAGTAGGCACATATACTTCTTTAGCGCAAGGGGTAGGATCGATCCACTTGTATATTT  
 GGATGAATTTTTGAGGAATTCTGAACCAGTCCTAAAACGAGTAAATAGGACCGGCAATTCTTCAAGCAACAAACAGG  
 AATACCAATTATTAAGATACTTAGTCAGATCGTACAACAAGGCTTTGAAGAAAAATGCGCCTTATCCAATCTTTGC  
 TATAAAGAATGGCCCCAAATCTCACATTGGAAGACATTTGATGACCTCATTTCTGTCAATGAAGGGCCTAACGGAGT  
 TGACTAATGTTGTGGGAAATTGGAGCGATAAGCGTGCTTCTGCCGTGGCCAGGACAACGTATACTCATCAGATAAC  
 AGCAATACCTGATCACTACTTCGCACTAGTTTCTCGGTACTATGCATATGATCCAATATCAAAGGAAATGATAGCATTG  
 AAGGATGAGACTAATCCAATTGAGGAGTGGCAGCATATAGAACAGCTAAAGGGTAGTGCTGAAGGAAGCATACGATA  
 CCCCAGCATGGAATGGGATAATATCACAGGAGGTACTAGACTACCTTTCATCCTACATAAATAGACGCATTCTAGAACTA  
 TAGTGAGCATGCGTTTGTAGCCTTAGACATGACTGTTCTCAGTTCAAGTTGGGCACTTACGAGAAGACCGGTCTTG  
 CTAGATTCTAATCAAGAGGATGTCAGAATGCCATTTGCCTGAGAGATGCAGGCTTCATTTTTGATACTTTTTTATTTGT  
 AACCTATATAGTATAGGATTTTTTTTGTCAATTTGTTTCTTCTCGTACGAGCTTGCTCCTGATCAGCCTATCTCGCAGC

TGATGAATATCTTGTGGTAGGGGTTTGGGAAAATCATTCGAGTTTGATGTTTTCTTGGTATTTCCCACTCCTCTTCA  
GAGTACAGAAGATTAAGTGAGACCTTCGTTTGTGCGGATCCCCACACACCATAGCTTCAAAATGTTTCTACTCCTTT  
TTTACTCTTCCAGATTTTCTCGGACTCCGCGCATCGCCGTACCACTTCAAAACACCCAAGCACAGCATACTAAATTTT  
CCCTCTTTCTTCTCTAGGGTGTCTGTTAATTACCCGTACTAAAGGTTTGGAAAAAGAAAAAGAGACCGCCTCGTTTC  
TTTTTCTTCTGTCGAAAAAGGCAATAAAAAATTTTATCA CGTTTCTTTTCTTGAAATTTTTTTTTTTAGTTTTTTTCTCT  
TTCAGTGACCTCCATTGATATTTAAGTTAATAAACGGTCTTCAATTTCTCAAGTTTCAGTTTCATTTTTCTTGTTCTATTA  
CAACTTTTTTTTACTTCTTGTTTCATTAGAAAAGAAAGCATAGCAATCTAATCTAAGGGGCGGTGTTGACAATTAATCATCG  
GCATAGTATATCGGCATAGTATAATACGACAAGGTGAGGAATAAACCATGGCCAAGTTGACCAGTGCCGTTCCGGT  
GCTCACCGCGCGCGACGTGCGCGGAGCGGTGCGAGTTCTGGACCGACCGGCTCGGGTTCTCCCGGGACTTCGT  
GGAGGACGACTTCGCCGGTGTGGTCCGGGACGACGTGACCCTGTTTCATCAGCGCGGTCCAGGACCAGGTGGTG  
CCGGACAACACCTGGCCTGGGTGTGGGTGCGCGGCCTGGACGAGCTGTACGCCGAGTGTTGCGGAGGTCTGTG  
TCCACGAATTCGCGGACGCTCCGGGGCCGGCCATGACCGAGATCGGCGAGCAGCCGTGGGGGCGGGAGTTC  
GCCCTGCGCGACCCGGCCGGCAACTGCGTGCACTTCGTGGCCGAGGAGCAGGACTGACACGTCCGACGGCGG  
CCCACGGGTCCCAGGCCTCGGAGATCCGTCCCCCTTTCTTTTGTGCGATATCATGTAATTAGTTATGTCACGCTTAC  
ATTCACGCCCTCCCCCACATCCG CTCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCCTATTTAT  
TTTTTTATAGTTATGTTAGTATTAAGAAGCTTATTATATTTCAAATTTTTCTTTTTTTCTGTACAGACGCGTGACGCAT  
GTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTTAATTTGCAAGCTGGAGACCAAC  
ATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCG  
CCCCCTGACGAGCATCAGAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAG  
GCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTT  
TCTCCCTTCGGGAAGCGTGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTC  
CAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTC  
CAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGC  
GGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCT  
GAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTT  
TTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTG  
ACGCTCAGTGGAACGAAAACCTACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATCAGATCCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAG  
TATAGGAACCTCC

✿ Информация об авторах

**Дмитрий Михайлович Музаев** — инженер. ФГБОУ ВО СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: dmmuzaev@yandex.ru.

**Андрей Михайлович Румянцев** — канд. биол. наук, младший научный сотрудник. ФГБОУ ВО СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия. SPIN: 9335-1184. E-mail: a.m.rumyantsev@spbu.ru.

**Усама Раек Аль Шанаа** — аспирант, ФГБОУ ВО СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия; аспирант, Комиссия по атомной энергии Сирий, Дамаск, Сирия. E-mail: st072427@student.spbu.ru.

**Елена Викторовна Самбук** — д-р биол. наук, доцент. ФГБОУ ВО СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия. SPIN: 8281-8020. E-mail: e.sambuk@spbu.ru.

✿ Authors and affiliations

**Dmitri M. Muzaev** — Engineer. Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia. E-mail: dmmuzaev@yandex.ru.

**Andrey M. Rumyantsev** — PhD, Researcher. Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia. SPIN: 9335-1184. E-mail: a.m.rumyantsev@spbu.ru.

**Ousama R. Al Shanaa** — PhD Student, Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia; PhD Student, Atomic Energy Commission of Syria, Damascus, Syria. E-mail: st072427@student.spbu.ru.

**Elena V. Sambuk** — Doctor of Science, Docent. Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia. SPIN: 8281-8020. E-mail: e.sambuk@spbu.ru.



## ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

### НАСТОЯЩИЕ ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ ЯВЛЯЮТСЯ ИЗДАТЕЛЬСКИМ ДОГОВОРОМ

Условия настоящего Договора (далее — «**Договор**») являются публичной офертой в соответствии с п. 2 ст. 437 Гражданского кодекса Российской Федерации. Данный **Договор** определяет взаимоотношения между редакцией журнала «Ecological genetics/Экологическая генетика», зарегистрированной Государственным комитетом Российской Федерации по печати (свидетельство о регистрации № 77-65617 от 04 мая 2016 года), именуемой в дальнейшем «**Редакция**» и являющейся структурным подразделением ООО «Эко-Вектор», и **Автором** и/или Авторским коллективом (или иным правообладателем), именуемым в дальнейшем «**Автор**», принявшим публичное предложение (оферту) о заключении **Договора**.

#### I. ПОЛИТИКА ЖУРНАЛА

При рассмотрении полученных авторских материалов **Редакция** руководствуется:

рекомендациями Международного комитета редакторов медицинских журналов (ICMJE.org);  
правилами для авторов журнала «Экологическая генетика»;

этическими принципами проведения научных медицинских исследований при использовании животных или с участием человека, соответствующими требованиям Регионального этического комитета.

#### II. АВТОРСКИЕ ПРАВА

**Редакция** отбирает, готовит к публикации и публикует переданные **Авторами** материалы. Авторское право на конкретную статью принадлежит авторам статьи.

Авторский гонорар за публикации статей в Журнале не выплачивается. **Автор** передает, а **Редакция** принимает авторские материалы на следующих условиях:

1) **Редакции** передается право на оформление, издание, передачу Журнала с опубликованным материалом **Автора** для целей реферирования статей из него в Реферативном журнале ВИНИТИ, РИНЦ и базах данных, распространение Журнала/авторских материалов в печатных и электронных изданиях, включая размещение на выбранных либо созданных **Редакцией** сайтах в сети Интернет в целях доступа к публикации в интерактивном режиме любого заинтересованного лица из любого места и в любое время, а также на распространение Журнала с опубликованным материалом **Автора** по подписке;

2) территория, на которой разрешается использовать авторский материал, — Российская Федерация и сеть Интернет;

3) срок действия **Договора** — 5 лет. По истечении указанного срока **Редакция** оставляет за собой, а **Автор** подтверждает бессрочное право **Редакции** на продолжение размещения авторского материала в сети Интернет;

4) **Редакция** вправе по своему усмотрению без каких-либо согласований с **Автором** заключать договоры и соглашения с третьими лицами, направленные на дополнительные меры по защите авторских и издательских прав;

5) **Автор** гарантирует, что использование **Редакцией** предоставленного им по настоящему **Договору** авторского материала не нарушит прав третьих лиц;

6) **Автор** оставляет за собой право использовать предоставленный по настоящему **Договору** авторский материал самостоятельно, передавать права на него по договору третьим лицам, если это не противоречит настоящему **Договору**;

7) **Редакция** предоставляет **Автору** возможность безвозмездного получения одного авторского экземпляра из вышедшего тиража печатного издания с публикацией материалов **Автора** или получения справки с электронными адресами его официальной публикации в сети Интернет;

8) при перепечатке статьи или ее части ссылка на первую публикацию в Журнале обязательна;

9) **Редакция** вправе издавать Журнал любым тиражом.

#### III. ПОРЯДОК ЗАКЛЮЧЕНИЯ ДОГОВОРА И ИЗМЕНЕНИЯ ЕГО УСЛОВИЙ

Заключением **Договора** со стороны **Редакции** является опубликование рукописи данного **Автора** в журнале «Экологическая генетика» и размещение его текста в сети Интернет. Заключением **Договора** со стороны **Автора**, то есть полным и безоговорочным принятием **Автором** условий **Договора**, является передача **Автором** рукописи и сопроводительных документов.

#### Конфиденциальность

Имена и контактные данные, указанные Вами при регистрации на официальном сайте журнала, будут использованы исключительно для технических целей: контакта с Вами или с редакторами в процессе подготовки Вашей статьи к публикации. До публикации они не будут предоставлены другим лицам и организациям.

## ПОРЯДОК ПРЕДОСТАВЛЕНИЯ РУКОПИСИ

Журнал «Экологическая генетика» работает на платформе Open Journal System и принимает рукописи исключительно в электронной форме.

### НА САЙТ НЕОБХОДИМО ЗАГРУЗИТЬ:

#### Основной файл

- ✓ файл с текстом рукописи с нумерацией строк (формат Microsoft Word или совместимый с ним), содержащий все рисунки и таблицы и не содержащий сведений об авторах;
- ✓ **сопровождающие файлы:**
- ✓ файлы микрофотографий — формат tiff, для графиков — формат pdf или eps. Файлы должны быть сохранены в этих форматах из тех программ, в которых они созданы (сохранить, как...);
- ✓ файл, содержащий:
  - название статьи и порядок авторов. Если в написании рукописи принимали участие авторы из разных учреждений, необходимо соотнести названия учреждений и Ф. И. О. авторов путем добавления цифровых индексов в верхнем регистре перед названиями учреждений и фамилиями соответствующих авторов. Фамилию, имя, отчество следует писать полностью;
  - необходимо привести официальное ПОЛНОЕ название учреждения (без сокращений). После названия учреждения через запятую необходимо написать название города, страны и адрес местонахождения организации;  
*В англоязычной части файла*
  - Ф. И. О. необходимо писать в соответствии с заграничным паспортом или так же, как в ранее опубликованных в зарубежных журналах статьях. Авторам, публикующимся впервые и не имеющим заграничного паспорта, следует воспользоваться стандартом транслитерации bgp/rsgp (см. ниже);
  - необходимо указывать ОФИЦИАЛЬНОЕ АНГЛОЯЗЫЧНОЕ НАЗВАНИЕ УЧРЕЖДЕНИЯ. Наиболее полный список названий учреждений и их официальных англоязычных версий можно найти на сайте РИНЦ;
- ✓ файл сопроводительного письма (формат pdf), составленного по образцу;

✓ при загрузке файлов должно быть заполнено поле «комментарий к файлу»;

✓ комментарий должен содержать информацию о содержании файла. Например, «рисунок 1» (fig. 1).

Датой поступления Рукописи в Журнал считается дата получения полного комплекта файлов, оформленных в полном соответствии с данными правилами. Предварительное рассмотрение рукописи, не заказанной Редакцией, не является фактом заключения издательского Договора между сторонами.

#### Сопроводительные документы

Сопроводительное письмо должно быть подписано руководителем организации, в которой выполнена работа. Оно может быть выполнено на официальном бланке учреждения.

#### *Письмо должно содержать:*

- ✓ название организации;
- ✓ фразу о том, что рукопись направлена в журнал «Экологическая генетика»;
- ✓ Ф. И. О. авторов;
- ✓ название рукописи;
- ✓ название предполагаемой рубрики;
- ✓ данные автора, ответственного за переписку:
  - служебный и/или домашний адрес;
  - телефон/факс (моб. телефон);
  - адрес электронной почты (обязателен);
- ✓ **Ф. И. О. и «живые» подписи авторов.**

#### *В письме должно содержаться заверение, что:*

- ✓ препятствий для опубликования и распространения представленных материалов в открытой печати не имеется;
- ✓ статья прочитана и одобрена всеми авторами;
- ✓ все авторы уверены, что рукопись отражает действительно проделанную работу;
- ✓ данная рукопись ранее нигде не была опубликована;
- ✓ в случае принятия рукописи к публикации авторы обязуются при размещении статьи на ресурсах открытого доступа всегда указывать DOI.

Обращаем ваше внимание на то, что подписи авторов в сопроводительном письме означают, что все авторы действительно внимательно прочитали рукопись и несут ответственность за ее содержание.

## ПОДГОТОВКА РУКОПИСИ

Структура обзорно-теоретической статьи обычно включает следующие разделы:

- ✓ введение;
- ✓ изложение основного материала;
- ✓ заключение;
- ✓ литература.

Статья экспериментального характера должна содержать разделы:

- ✓ введение;
- ✓ материал и методы;
- ✓ результаты;
- ✓ обсуждение;
- ✓ литература.

**Объем рукописи** обзорно-теоретической статьи не должен превышать 60 000 знаков, включая пробелы (40 000 для экспериментальной работы), машинописного текста через два интервала, 12 кеглем (включая таблицы, список литературы, подписи к рисункам и резюме на английском языке), поля не менее 25 мм.

**Колонтитул** (верхний) должен содержать сокращенный заголовок статьи, содержащий не более 40 знаков (включая пробелы) и нумерацию страниц.

**Заглавие** должно быть кратким (не более 150 знаков, включая пробелы), точно отражающим содержание статьи.

**Резюме** (до 1500 знаков, включая пробелы) на русском языке.

Резюме не требуется при публикации персоналий, рецензий, отчетов о конференциях, информационных писем. При превышении предельного размера резюме рукопись будет отклонена.

**Заглавие на английском языке.**

**Резюме на английском языке** помещают после заглавия рукописи на английском языке. **Резюме экспериментальной статьи** на английском языке обязательно должно включать следующие разделы: Background, Materials and methods, Results, Conclusion. Объем резюме должен быть в пределах 200 слов (2000 знаков).

**Ключевые слова** помещаются под каждым резюме на соответствующем языке с подзаголовками «ключевые слова»/«keywords».

Необходимо указать от 3 до 10 ключевых слов или коротких фраз, которые будут способствовать корректному перекрестному индексированию статьи. Для выбора ключевых

слов используйте термины из *списка медицинских предметных заголовков* (MESH). Если в этом списке отсутствуют подходящие обозначения для недавно введенных терминов, подберите наиболее близкие из имеющихся.

**Требования к разделу «Материал и методы».**

Описывайте методы и процедуры достаточно детально для того, чтобы другие исследователи могли воспроизвести ваши результаты.

При описании использованных приборов и реактивов указывайте производителя.

При первом упоминании бинарного видового названия приводите его полностью с указанием автора. При последующих упоминаниях родовое название сокращайте до одной буквы.

Статистические методы описывайте с достаточным количеством деталей, чтобы грамотный читатель, имеющий доступ к исходным данным, смог бы воспроизвести публикуемые результаты. Недопустимы фразы вроде «материал обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики».

Сопровождайте описание статистических методов ссылками на стандартные общеизвестные издания с обязательным указанием страницы либо ссылками на общедоступные сайты, на которых используемые формулы представлены в явном виде.

Количественную оценку результатов наблюдений всегда сопровождайте показателями точности оценки (стандартной ошибкой или доверительным интервалом). Пример:  $27,9 \pm 0,47$ ;  $27,9^{27,46}_{28,40}$ ;  $0 + 0,78$ ,  $100 - 0,53$ . Значение  $p$ -value необходимо указывать точно, кроме случаев, когда  $p < 0,0001$ .

Старайтесь не полагаться только на оценку гипотезы, такую как значение  $p$  ( $p$ -value), которая не передает важную информацию о размере эффекта (effect size), вероятности воспроизведения (Prep), вероятности статистически значимого воспроизведения (Psrep), соотношении правдоподобий (Likelihood Ratio), вероятности справедливости нулевой гипотезы.

Дайте определения всем применяемым терминам, сокращениям и символам. Укажите использованное программное обеспечение. Единицы измерения приводите в соответствии с Международной системой единиц — СИ.



### Иллюстрации и таблицы

Все графы в таблицах должны иметь заголовки. Не следует повторять одни и те же данные в тексте, на рисунках и в таблицах.

Фотографии (черно-белые) должны быть представлены в графическом формате tiff (разрешение не менее 300 dpi (точек на дюйм)), а графики, схемы, диаграммы — в векторных форматах: pdf (предпочтительно), либо ai, eps, cdr. Обратите внимание на то, что в некоторых версиях Microsoft Office есть возможность сохранять созданные рисунки в формате pdf. Размер иллюстраций не должен превышать 170 × 230 мм.

Иллюстрации и таблицы должны быть представлены в вариантах рассчитанных на восприятие русскоязычными и англоязычными читателями.

**Англоязычные варианты рисунков (и таблиц) будут использованы при публикации англоязычной версии статьи.**

Число рисунков не должно превышать пяти. В подписях под рисунками должны быть сделаны объяснения значений всех кривых, букв, цифр и прочих условных обозначений на том языке, на котором написана статья.

### Библиография

#### Основные правила

1. В списке литературы все работы перечисляются в порядке цитирования, а НЕ в алфавитном порядке.
2. В тексте статьи библиографические ссылки даются в квадратных скобках арабскими цифрами.
3. Авторы цитируемых источников в списке литературы должны быть указаны в том же порядке, что и в первоисточнике (в случае, если у публикации более четырех авторов, то после третьего автора необходимо поставить сокращение «... , и др.» или “... , et al.”).
4. Недопустимо сокращать название статьи и название отечественного журнала. Название англоязычных журналов следует приводить в сокращении в соответствии с каталогом названий базы данных MedLine (NLM Catalog). Если журнал не индексируется в MedLine, необходимо указывать его полное название.
5. Для описания даты выхода, тома, номера журнала и страниц, на которых опубликована статья, следует использовать сокращенный формат записи — для иностранных источников и полный формат записи — для русскоязычной части описания русскоязычных источников.

6. Библиографические описания ссылок на иностранные источники следует составлять в формате Vancouver в версии AMA (AMA style, <http://www.amamanualofstyle.com>).
7. Библиографические описания ссылок на русскоязычные источники должны состоять из двух частей: русскоязычной и латиноязычной (подряд). При этом сначала следует приводить русскоязычную часть описания, затем — латиноязычную [в квадратных скобках].
  - Русскоязычную часть библиографического описания русскоязычного источника в списке литературы следует оформлять в соответствии с требованиями РИНЦ (см. «Примеры оформления»).
8. Во всех случаях, когда у цитируемого материала есть *цифровой идентификатор* (Digital Object Identifier — **DOI**), его необходимо указывать в самом конце библиографической ссылки. Формат представления: <https://doi.org/10.9734/BMRJ/2014/5635>.
9. Проверять наличие DOI у статьи следует на сайте <http://search.crossref.org/> или <https://www.citethisforme.com>. Для получения DOI нужно ввести в поисковую строку название статьи на английском языке. Последний сайт, помимо DOI, автоматически генерирует правильно оформленное библиографическое описание статьи на английском языке в стиле цитирования AMA. Подавляющее большинство зарубежных журнальных статей с 2000 г. и многие русскоязычные статьи (опубликованные после 2013 г.) зарегистрированы в системе CrossRef и имеют уникальный DOI.

#### Правила подготовки библиографических описаний.

Если статья написана **на латинице** (на английском, немецком, финском, датском, итальянском и т. д.), она должна быть процитирована **в оригинальном виде**.

Если статья написана **НЕ на латинице** — на кириллице (в том числе на русском), иероглифами и т. д. и если у статьи есть **ОФИЦИАЛЬНЫЙ ПЕРЕВОД НАЗВАНИЯ**, его нужно вставить в квадратных скобках после оригинального написания библиографической ссылки на источник. Проще всего проверить наличие официального перевода названия статьи, отыскав статью в РИНЦ.

Если у статьи нет **ОФИЦИАЛЬНОГО ПЕРЕВОДА**, то нужно **ПРИВЕСТИ ТРАНСЛИТЕРАЦИЮ** всей ссылки в квадратных скобках сразу после правильно оформленной ссылки в оригинальном написании. Англоязычная часть библиографическо-

го описания ссылки на русскоязычный источник должна находиться непосредственно после русскоязычной части в квадратных скобках [...]. Фамилии и инициалы всех авторов на латинице и название статьи на английском языке следует приводить так, как они даны в оригинальной публикации. Транслитерацию следует проводить в стандарте bsi (автоматически транслитерация в стандарте bsi производится на странице <http://ru.translit.net/?account=bsi>) с сохранением стилового оформления русскоязычного источника. Далее следует транслитерированное название русскоязычного журнала в стандарте bsi, затем — выходные данные: год;том(номер);страницы. В самом конце англоязычной части библиографического описания в круглые скобки помещают указание на исходный язык публикации, например: (In Russ.). В конце библиографического описания (за квадратной скобкой) помещают DOI статьи, если таковой имеется.

### Примеры оформления

- Обычная журнальная статья на русском языке, есть официальный перевод на английский язык.

Сендек Д.С., Новоселов А.П., Бознак Э.И. Генетическая дифференциация сиговых рыб в реке Печоре // Сибирский экологический журнал. — 2016. — Т. 23. — № 2. — С. 194–201. [Sendek DS, Novoselov AP, Boznak EI. Genetic differentiation of coregonid fishes in Pechora River. *Contemporary Problems of Ecology*. 2016;9(2):166–171. (In Russ.)]. doi: 10.15372/SEJ20160203.

- Обычная журнальная статья на русском языке, нет официального перевода на английский язык, транслитерация.

Боровикова Е.А., Махров А.А. Систематическое положение и происхождение сигов (*Coregonus*, *Coregonidae*, *Osteichthyes*) Европы. Генетический подход // Успехи современной биологии. — 2009. — Т. 129. — № 1. — С. 58–66. [Borovikova EA, Makhrov AA. Sistematischeskoe polozhenie i proiskhozhdenie sigov (*Coregonus*, *Coregonidae*, *Osteichthyes*) Evropy. *Uspekhi sovremennoi biologii*. 2009;129(1):58–66. (In Russ.)]

- Обычная журнальная статья на иностранном языке, преимущественно на английском.

Liviac D, Creus A, Marcos R. Genotoxic evaluation of the non-halogenated disinfection by-products nitrosodimethylamine and nitrosodiethylamine. *Journal*

*of Hazardous Materials*. 2011;185(2-3):613–618. doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.09.062.

- Книга на русском языке.

Стегний В.Н. Архитектоника генома, системные мутации и эволюция. — Новосибирск: Изд-во Новосибирского ун-та, 1993. — 143 с. [Stegnii VN. Arkhitektonika genoma, sistemnye mutatsii i evolyutsiya. Novosibirsk: Izdatel'stvo Novosibirskogo universiteta; 1993. 143 p. (In Russ.)]

- Книга на иностранном языке, преимущественно на английском.

Sutton P, Perron J, Giudice LC, Woodruff TJ. Pesticides matter: a primer for reproductive health physicians. San Francisco (CA): University of California, San Francisco; 2011. 25 p.

- Диссертация.

Коломиец Т.М. Отбор исходного материала риса для селекции на иммунитет к пирикулярриозу: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Голицино, 1990. — 21 с. [Kolomiec TM. Otbor iskhodnogo materiala risa dlya selekcii na immunitet k pirikulyarriozu. [dissertation] Golitsino; 1990. 21 p. (In Russ.)]

- Материалы конференции.

Костылев П.И., Краснова Е.В., Редькин А.А., и др. Объединение в одном генотипе риса пяти генов устойчивости к пирикулярриозу с помощью ДНК-маркеров // 8-я Междунар. научно-практ. конф. «Биологическая защита растений — основа стабилизации агроэкосистем». — Краснодар, 2014. — С. 25–28. [Kostylev PI, Krasnova EV, Redkin AA, et al. Combined in one rice genotype five blast resistance genes with DNA markers. 8 Mezhdunar. nauchno-prakt. konf. “Biologicheskaya zashhita rastenij — osnova stabilizacii agroekosistem”. (Conference proceedings) Krasnodar; 2014. P. 25–28. (In Russ.)]

- Ссылка на интернет-ресурс — русскоязычный источник.

Манн — Уитни, автоматический расчет. Доступно по: <http://www.psychol-ok.ru/statistics/mann-whitney/>. Ссылка активна на 27.09.2016.

- Ссылка на интернет-ресурс — зарубежный источник.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000;155:945–959. Available at: [http://web.stanford.edu/group/pritchardlab/structure\\_software/release\\_versions/v2.3.4/html/structure.html](http://web.stanford.edu/group/pritchardlab/structure_software/release_versions/v2.3.4/html/structure.html). Accessed September 1, 2016.

**Ответственность за корректность библиографических ссылок несут авторы.**