

УДК 575

**ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОВ,
АССОЦИИРОВАННЫХ С АПОМИКСИСОМ, *CENH3* И *APOLLO*****Е.А. Бакин^{1,2}, Ф. Сезер³, М.П. Райко¹, К.М. Таскин³, В.Б. Брюхин^{1,4}**¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия² Институт биоинформатики, Санкт-Петербург, Россия³ Университет Чанаккале Онсекиз Март, Чанаккале, Турция⁴ Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, Россия

Половой процесс способствует возникновению большого разнообразия новых форм и признаков у живых организмов. В результате естественной и искусственной гибридизации близкородственных и отдаленных организмов в первом поколении гибридов часто возникает явление, называемое гетерозисом (увеличение жизнеспособности гибридов), выражающееся у растений в лучшем росте, увеличении урожайности, улучшении пищевых свойств семян и плодов, повышении технических характеристик растительного сырья. Однако, в результате мейоза и рекомбинации в последующих поколениях происходит расщепление выгодного сочетания аллелей, определяющего ценные признаки. Кроме того, гибридизация часто сопровождается возникновением полиплоидии, анеуплоидии и невозможностью воспроизведения образовавшихся гибридов половым путем. Одним из хорошо известных механизмов, который может предотвратить эти явления и продуцировать «клоны» материнских растений, является апомиксис, который часто описывают как способ бесполого размножения семенами, встречающийся в природе как минимум в 400 семействах растений (Carman 1997; Koltunow and Grossniklaus 2003; Brukhin 2017). При апомиксисе мейоз модифицируется, либо полностью отсутствует (апомейоз), а генетически идентичные материнскому растению зародыши развиваются без оплодотворения, путем партеногенеза. Благодаря способности апомиктов к быстрому фенотипическому ответу на требования отбора за короткое время апомиксис способствует моментальной репродуктивной изоляции полиплоидных линий, формируя фрагментированные генофонды в популяции, которые развиваются независимо, тем самым, он увеличивает диапазон распространения популяции и расширяет экологическую пластичность. Таким образом, апомиксис является очень важным экологическим и эволюционным феноменом в природе. Несмотря на прогресс в изучении апомиксиса, молекулярно-генетическая регуляция последнего остается слабо изученной (Koltunow and Grossniklaus 2003; Brukhin 2017). В нашей работе мы предприняли попытку филогенетической и функциональной характеристики двух генов, ассоциированных с апомиксисом, *CENH3* и *APOLLO* у апомиктических и половых растений из рода *Boechea* (Brassicaceae), которые являются очень удобной моделью для изучения апомиксиса (Brukhin et al. 2019). Особого внимания заслуживают апомиктический вид *Boechea divaricarpa*, который известен как межвидовой гибрид между половыми видами *B. stricta* и *B. retrofracta* или другими близкородственными видами *Boechea* (Koch 2003). Ген *Centromere Specific Histone 3* (*CENH3*) является одним из важнейших генов, необходимых для осуществления деления клеток и, как предполагают, он задействован в возникновение апомиксиса (Lermontova et al 2011; 2015). Этот ген кодирует специфичный для центромеры вариант гистона H3. Накопление белка *CENH3* определяет место формирования кинетохор, основная функция которых – связывать хромосомы с нитями веретена деления во время расхождения хромосом при мейозе и митозе (Talbert and Henikoff 2010). *CENH3* содержит два домена: ДНК-связывающий гистоновый складчатый домен (HFD) и N-концевой хвостовой домен. HFD структурно сходен и высоко консервативен у всех высших эукариот. Однако N-концевой регион белка *CENH3* сильно варьирует даже у близкородственных видов и выполняет специфическую для мейоза функцию (Maheshwari et al. 2015). Мутации в N-терминальном хвосте *CENH3* вызывают нарушение расхождения хромосом при мейозе и часто приводят к стерильности (Lermontova et al. 2011; Ravi et al. 2011). Нулевые мутации в *CENH3* также вызывают элиминацию хромосом; мутанты по данному гену были предложены в качестве инструмента для получения гаплоидных растений (Ravi and Chan 2010; Marimuthu et al. 2011; Karimi-Ashtiyani et al. 2015; Evtushenko et al. 2019).

Мы выявили различные уровни экспрессии гена *CENH3* в клетках меристем цветка при апомиктическом и половом развитии растений *Boechea*. Тогда как сразу после оплодотворения у апомиктов экспрессия *CENH3* понижалась, у половых растений она возрастала в первый день после оплодотворения. Эти результаты указывают на возможную роль, которую *CENH3* может играть в апомиктическом развитии у видов *Boechea*.

Также мы изучили филогению гена *APOLLO* (*APomixis-Linked LOcus*), который кодирует ген аспартат-глутамата аспартат-аспартат-гистидин экзонуклеазы NEN и, как было показано, имеет несколько полиморфных половых и апо-аллелей (Corral et al. 2013; Kliver et al. 2018). Экспрессия этого гена подавляется в клетках семязачатков половых растений на стадии мейоза и активируется в семязачатках апомиктических растений *Boechnera*. Геномы апомиктических растений всегда гетерозиготны по этому гену и содержат по крайней мере одну апо-аллель, в то время как половые генотипы всегда гомозиготны по половым аллелям (Corral et al. 2013; Kliver et al. 2018). *APOLLO* является одним из самых важных генов, связанных с апомиксисом у видов *Boechnera*. Эволюционный анализ генов *APOLLO*, представленный в нашем исследовании, показывает, что половые и апомиктические виды *Boechnera* сгруппированы в разные клады на филогенетическом дереве на основе выравнивания множественных нуклеотидных последовательностей. Это может быть связано с тем, что апо-аллели *APOLLO*, присутствующие в геномах апомиктических видов, могут приобретать новую функцию (Kliver et al. 2018).

Характеристика гена *CENH3* и изоформ белка *CENH3*

У семи исследованных видов *Boecheera* изоформы белка CENH3 показали высокое сходство друг с другом с индексом сходства не менее 97 % (как на уровне нуклеотидов, так и на уровне белка). Все последовательности белка CENH3, содержащие консервативный домен гистона H3/CENP-A (IPR000164), составляли 177 п.н. (пар нуклеотидов) и предположительно были локализованы в ядре. Результаты выравнивания белка CENH3 представлены на рис. 1. У семи исследованных видов *Boecheera* были обнаружены 10 полиморфных сайтов аминокислот в белке CENH3. *B. stricta* и *B. divaricarpa*, которые были подвергнуты дополнительному сравнительному анализу экспрессии гена *CENH3*, имели только две полиморфные аминокислоты в положениях 7 и 16 N – концевой хвоста, которые были расположены вне консервативного домена гистона H3. Вариабельность в районе N-концевого хвоста может быть причиной, влияющей на сегрегацию хромосом при мейозе (Lermontova et al. 2011; 2015) и приводящей к апомейозу.

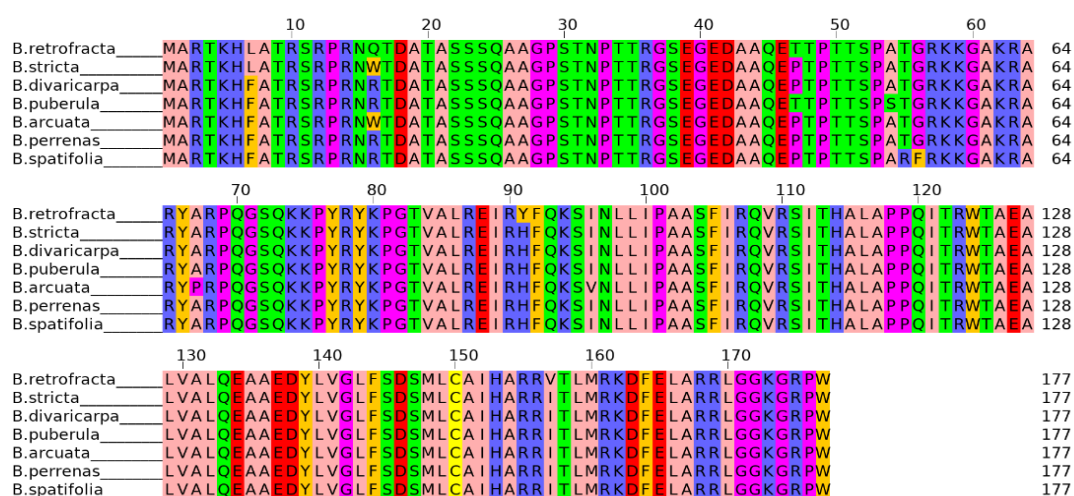


Рисунок 1. Множественное выравнивание белков CENH3 у семи видов *Boechera* sp., выполненное с использованием программного обеспечения MUSCLE и визуализированное в Jalview.

Матричная тепловая карта сходства гомологов *CENH3* и его реконструированное филогенетическое дерево изображены на рис. 2, (а) и (б) соответственно. Тепловая карта демонстрирует, что последовательности *CENH3* у всех видов *Boecheria* практически идентичны, что согласуется с анализом выравнивания белков (рис. 1), и очень похожи ($\geq 80\%$) на гомологичный белок у *Arabidopsis*, а также у других исследованных представителей Brassicaceae. Ген *CENH3* представлен только одной копией на геном у каждого исследованного вида. Эволюционная история оценивалась с помощью наивысшей логарифмической вероятности. Реконструированное филогенетическое дерево (рис. 2б) укоренялось с помощью *P. persica*, выбранной в качестве внешней группы. Все виды *Boecheria* сгруппировались в одну кладу, которая оказалась довольно близка к видам *Arabidopsis*, *Eutrema*, *Cardamine sp.* и немного удалена от видов *Capsella*. Из этого можно предположить, что ортологи *CENH3* очень похожи в геномах всех видов Brassicaceae, использованных в нашем исследовании.

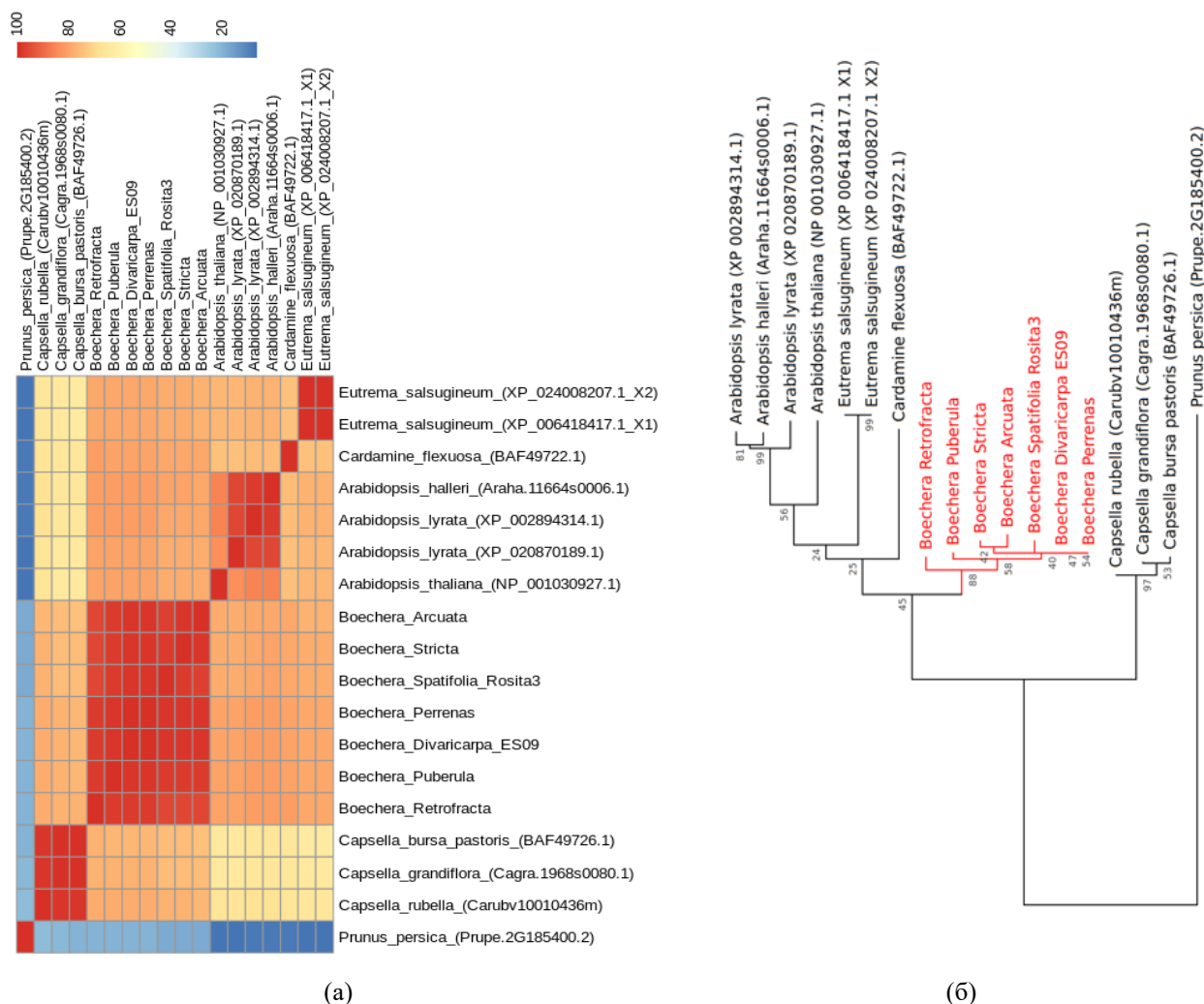


Рисунок 2. (а) Матрица сходства и (б) Филогенетическое древо CENH3 (гистон H3-подобный центромерный белок) у семи видов. Последовательности *Prunus persica* использовали в качестве внешней группы. Все виды *Boechea* сгруппировались в одну кладу. Числа рядом с узлами представляют соответствующую поддержку начальной загрузки (бутстрэп). Филогенетическое древо было реконструировано с использованием метода максимального правдоподобия.

Филогенетический анализ гена APOLLO

Комплексный анализ гена APOLLO и белковых ортологов проводился ранее (Corral et al. 2013; Kliver et al. 2018), поэтому целью данного исследования было изучение филогении гена APOLLO с использованием имеющихся в открытом доступе секвенированных геномов апомиктичных и половых видов *Boechea* путем трансляции нуклеотидных последовательностей APOLLO в белки и применения метода множественного выравнивания для получения аминокислотных последовательностей с использованием программного обеспечения MUSCLE и метода максимального правдоподобия для построения филогенетического дерева. Тепловая карта, изображенная на рис. 3а, демонстрирует, что все сравниваемые белки APOLLO у видов *Boechea* довольно похожи ($\geq 92,5\%$), несмотря на присутствие 5 апо- и 5 половых аллелей этого гена. Филогенетическое древо APOLLO (рис. 3б) указывает на то, что виды *Boechea* сгруппированы в два отдельных субклада в соответствии с типом размножения: первый субклад содержит гомозиготные образцы для половых аллелей, размножающихся половым путем, а второй содержит образцы с апо – аллелями, которые размножаются посредством апомиксиса. В то же время, все виды *Boechea*, представленные на филогенетическом древе, сгруппированы в общую кладу, слегка отделяющую их от других родов семейства Brassicaceae (сходство $\geq 82,5\%$).

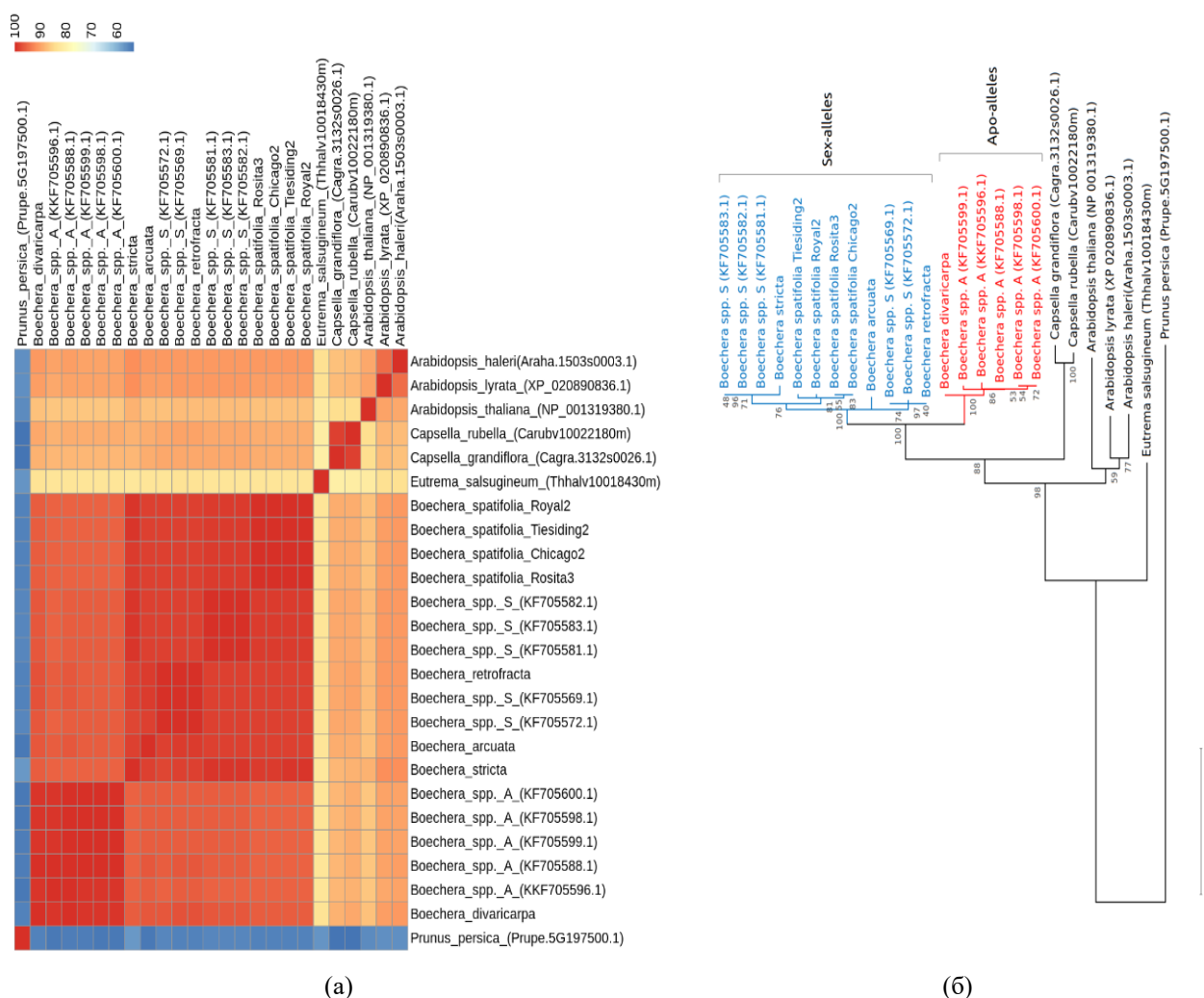


Рисунок 3. Матрица сходства (а) и Филогенетическое древо (б) *APOLLO* у интересующих видов. Последовательности *Prunus persica* использовали в качестве внешней группы. Числа рядом с узлами представляют соответствующую поддержку начальной загрузки (бутстрэп). Филогенетическое древо было реконструировано с использованием метода максимального правдоподобия. В зависимости от способа размножения виды *Boechera* группировались в два отдельных субклада: первый содержит гомозиготные образцы для половых аллелей, а второй содержит образцы с апо-аллелями

В заключении можно отметить, что подробное знание структуры и филогении аллелей генов, тесно связанных с апомиксисом и динамики их экспрессии, по-видимому, может быть использовано для идентификации половых и апомиктических растений в агамных комплексах, а также для изучения эволюционной, экологической и популяционной роли апомиксиса.

Работа выполнялась при поддержке гранта РФФИ № 20–54–46002, гранта Санкт-Петербургского государственного университета (СПбГУ № 51148284) В.Б. Брюхину, а также гранта TÜBİTAK № 119N384 и гранта университета Чанаккале Онсекиз Март ВАР № FHD-2016–1038 К.М. Таскину. Исследование осуществляется в рамках государственного задания № АААА-А18–118051590112–8 БИН РАН.

ЛИТЕРАТУРА

- Brukhin V. (2017) Molecular and Genetic Regulation of Apomixis. *Russ J Genetics* 53 (9), 1001–1024.
- Brukhin V., Osadtchiy J.V., Florez-Rueda A.M., Smetanin D., Nobre M.S., Bakin E., Grossniklaus U. (2019) The *Boecheira* Genus as a Resource for Apomixis Research. *Frontiers in Plant Science* – Special Issue Plant Breeding, March 2019, v. 10:392. doi: 10.3389/fpls.2019.00392.
- Carman J.G. (1997) Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. *Biological Journal of the Linnean Society*, 61, 51–94, doi: 10.1111/j. 1095–8312.1997.tb01778.x
- Corral, J.M.; Vogel, H.; Aliyu, O.M.; Hensel, G.; Thiel, T.; Kumlehn, J.; Sharbel, T.F. A Conserved Apomixis-Specific Polymorphism Is Correlated with Exclusive Exonuclease Expression in Premeiotic Ovules of Apomictic *Boecheira* Species. *PLANT PHYSIOLOGY* 2013, 163, 1660–1672.
- Evtushenko, E.V.; Lipikhina, Y.A.; Stepochkin, P.I.; Vershinin, A.V. Cytogenetic and molecular characteristics of rye genome in octoploid triticale ($\times$ Triticosecale Wittmack). *CCG* 2019, 13, 423–434.
- Karimi-Ashtiyani, R.; Ishii, T.; Niessen, M.; Stein, N.; Heckmann, S.; Gurushidze, M.; Banaei-Moghaddam, A.M.; Fuchs, J.; Schubert, V.; Koch, K.; et al. Point mutation impairs centromeric CENH3 loading and induces haploid plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015, 112, 11211–11216.
- Kliver, S.; Rayko, M.; Komissarov, A.; Bakin, E.; Zhernakova, D.; Prasad, K.; Rushworth, C.; Baskar, R.; Smetanin, D.; Schmutz, J.; et al. Assembly of the *Boecheira retrofracta* Genome and Evolutionary Analysis of Apomixis-Associated Genes. *Genes* 2018, 9(4), 185. doi: 10.3390/genes9040185.
- Koch, M.A. Multiple Hybrid Formation in Natural Populations: Concerted Evolution of the Internal Transcribed Spacer of Nuclear Ribosomal DNA (ITS) in North American *Arabis divaricarpa* (Brassicaceae). *Molecular Biology and Evolution* 2003, 20, 338–350.
- Koltunow, A.M., and Grossniklaus, U. (2003). Apomixis: a developmental perspective. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 547–574. doi: 10.1146/annurev.arplant.54.110901.16084
- Lermontova, I.; Koroleva, O.; Rutten, T.; Fuchs, J.; Schubert, V.; Moraes, I.; Koszegi, D.; Schubert, I. Knockdown of CENH3 in *Arabidopsis* reduces mitotic divisions and causes sterility by disturbed meiotic chromosome segregation: *Consequences of AtCENH3 depletion*. *The Plant Journal* 2011, 68, 40–50.
- Lermontova, I.; Sandmann, M.; Mascher, M.; Schmit, A. – C.; Chabouté, M. – E. Centromeric chromatin and its dynamics in plants. *Plant J* 2015, 83, 4–17.
- Maheshwari, S.; Tan, E.H.; West, A.; Franklin, F.C.H.; Comai, L.; Chan, S.W.L. Naturally Occurring Differences in CENH3 Affect Chromosome Segregation in Zygotic Mitosis of Hybrids. *PLoS Genet* 2015, 11, e1004970.
- Marimuthu, M.P.A.; Jolivet, S.; Ravi, M.; Pereira, L.; Davda, J.N.; Cromer, L.; Wang, L.; Nogue, F.; Chan, S.W.L.; Siddiqi, I.; et al. Synthetic Clonal Reproduction Through Seeds. *Science* 2011, 331, 876–876.
- Ravi, M.; Chan, S.W.L. Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. *Nature* 2010, 464, 615–618.
- Ravi, M.; Shibata, F.; Ramahi, J.S.; Nagaki, K.; Chen, C.; Murata, M.; Chan, S.W.L. Meiosis-Specific Loading of the Centromere-Specific Histone CENH3 in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* 2011, 7, e1002121.
- Talbert, P.B.; Henikoff, S. Histone variants – ancient wrap artists of the epigenome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010, 11, 264–275.