

## АНАЛИЗ РЕПИТОМА В СЕМЕЙСТВЕ CANNABACEAE – ПОИСК КЛЮЧА К ВОЗНИКНОВЕНИЮ ПОЛА

О.В. Разумова<sup>1</sup>, Ю.В. Бочаркина<sup>1,2</sup>, К.Д. Боне<sup>1,3</sup>, Д.В. Романов<sup>1</sup>, Г.И. Карлов<sup>1</sup>.

ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия

Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

Российский государственный аграрный университет МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, Россия

Проблема возникновения пола в целом, и половых хромосом в частности интересовала людей во все времена. Несмотря на то, что само наличие пола у растений явление довольно редкое, а наличие гетероморфных половых хромосом – исключительно редкое, растения как модель для изучения механизмов эволюции пола во многом предпочтительней животных. Это связано, в первую очередь с тем, что, в отличие от животных, растения обладают разными системами детерминации пола, их половые хромосомы возникли сравнительно недавно и находятся на разных этапах эволюционной зрелости, что позволяет проследить этапы их эволюционного пути. Однако, в связи с тем, что гетероморфные половые хромосомы встречаются лишь у немногих видов растений из филогенетически далёких семейств, построение стройной и логичной системы возникновения пола затруднено, и неизбежно связано со значительным количеством спекулятивных выводов, не подкреплённых наблюдениями. Семейство Cannabaceae может служить удобной моделью для понимания процессов, происходящих в половых хромосомах, поскольку включает в себя растения из двух родов с разными системами определения пола.

В семейство Cannabaceae sensu stricto включают растения рода Хмель (*Humulus*) с двумя общепризнанными видами – хмелем обыкновенным *Humulus lupulus* L. и хмелем японским *H. japonicus* Siebold & Zucc. и род Конопля (*Cannabis*) с единственным крайне полиморфным видом *Cannabis sativa* L. Все растения двудомные, однако различаются по своему хромосомному составу. Хмель обыкновенный в кариотипе имеет 20 хромосом ( $2n=18+XX\backslash XV$  у женских и мужских растений соответственно), у хмеля японского женские растения имеют 16 хромосом ( $2n=14+XX$ ), а мужские – 17 ( $2n=14+XY1Y2$ ). У конопли система хромосом схожа с хмелем обыкновенным, и у мужских и у женских растений по 18 аутосом и одна пара половых хромосом –  $XV\backslash XX$ . Однако, в отличие от хмеля обыкновенного, Y хромосома которого самая маленькая в кариотипе, Y хромосома конопли, напротив, имеет самый большой относительный размер. Данное различие имеет принципиальное значение, поскольку именно размер половой хромосомы в гетерогаметном поле принято считать маркером эволюционной древности системы половых хромосом.

Дело в том, что по наиболее разработанной и принятой на данный момент модели эволюции пола, образование половых хромосом начинается с возникновения на аутосомах нерекombинирующего участка, ответственного за определение пола (образования мужских и женских цветков), с последующим распространением нерекombинирующей области на хромосоме, исключенной из кроссинговера, и как следствие – дифференциацией на X и Y хромосомы (или Z и W, в случае женского гетерогаметного пола). Еще одним следствием исключения из процесса рекомбинации является накопление хромосомой участков хлоропластной и митохондриальной ДНК, мобильных генетических элементов и других повторяющихся последовательностей. На последней стадии дифференциации половых хромосом начинается обратный процесс, когда нерекombинирующие, увеличенные гетерохроматиновые области Y-хромосомы элиминируются, вплоть до полной дегенерации хромосомы с возникновением системы  $XX/XO$ , когда Y хромосома, даже если остается в кариотипе физически, полностью утрачивает роль пол-определяющего фактора. Таким образом, считается, что чем меньше по размеру Y-хромосома, тем более вырожденной, и, как следствие, более эволюционно древней, является хромосома. Однако в последние годы данная концепция подвергается сомнению. Ряд исследований, в первую очередь на хурме (*Diospyros*), показали, что после возникновения первичной мутации, ответственной за дифференциацию цветков на мужские и женские, дальнейшего подавления рекомбинации и увеличения размера Y-хромосомы может не происходить, и концепция «большая Y-хромосома – эволюционная молодость, маленькая – зрелость» утрачивает свое господство. Однако, почему именно в одних случаях нерекombинирующая хромосома начинает накапливать некодирующие участки ДНК и сначала разрастается, а затем частично элиминируется, а в других случаях этого не происходит, на данный момент не ясно. Наличие половых хромосом на разных этапах развития у близкородственных видов, как в семействе Cannabaceae, может дать ключ к разгадке этой тайны.

В своей работе мы провели секвенирование репитомов мужских и женских растений трех видов семейства Cannabaceae. Полученные сиквенсы проанализировали на наличие повторяющихся последовательностей ДНК в программном обеспечении RepeatExplorer2. Анализ геномов подтвердил большое количество повторяющихся последовательностей ДНК. Так на долю повторяющихся последовательностей в геноме изученных видов приходится порядка 61–65 % от всего генома. У хмелей большая часть выявленных последовательностей относятся к неклассифицированным семействам, среди известных около 8 % приходится на Ty3/Gypsy ретротранспозоны. В конопле 85 % обнаруженных кластеров повторяющихся последовательностей приходится на различные группы LTR, около 12 % – на сталлеитную ДНК и повторяющиеся последовательности органелл, только 2 % были отмечены как неизвестные. Возможно, это связано с большей изученностью *Cannabis sativa*, по сравнению с видами рода *Humulus*.

Мы сравнили репитомы мужских и женских растений хмелей между собой, по каждому виду отдельно, а также с использованием стратегии сравнительной кластеризации, выявили общие и видоспецифические повторы, сравнивая объединенные репитомы мужских и женских растений (мужские и женские последовательности *H.lupulus* с мужскими и женскими последовательностями *H.japonicus*). В настоящее время аналогичная работа ведется на третьем виде, *Cannabis sativa*.

В результате было выявлено 88 видоспецифичных кластеров для хмеля обыкновенного, и 10 видоспецифичных кластеров для хмеля японского.

На самые высококопийные кластеры были подобраны праймеры. Предварительные результаты ПЦР показали, что большая часть выявленных кластеров не является видоспецифичными и амплифицируется на всех геномах, однако ряд праймеров показывал специфичную амплификацию. На настоящий момент можно выделить три группы достоверно амплифицирующихся повторов – универсальные для семейства Cannabaceae (для обоих видов хмеля и для конопли); универсальные для рода *Humulus* и видоспецифичные для *Humulus lupulus* L. или *Humulus japonicus* L.

Работа продолжается, в настоящее время в сравнение добавлены сиквенсы репитома мужского и женского растения конопли. После проведенного сравнения трех видов планируется физическая локализация обнаруженных повторяющихся последовательностей на хромосомах, с последующим построением модели эволюции пола в данном семействе.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ договор № 20–316–70018\19*