

УДК 575.857:575.826

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ АДАПТАЦИИ ПОПУЛЯЦИЙ

Л. В. Топчиева, О. М. Федоренко

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Обзор посвящен современным подходам и методам, используемым для изучения молекулярных основ адаптации популяций. Рассмотрены современные понятия адаптации популяций и основные подходы для отбора генов-кандидатов, участвующих в этом процессе. Приведены молекулярно-генетические методы, используемые для изучения роли мутаций и эпигенетических механизмов в адаптации организмов и популяций.

К л ю ч е в ы е с л о в а: адаптация, популяции, генотип, фенотип, экспрессия генов, эпигенетические механизмы, метилирование ДНК.

L. V. Topchieva, O. M. Fedorenko. METHODOLOGICAL APPROACHES TO STUDYING THE MOLECULAR MECHANISMS OF ADAPTATION IN POPULATIONS

The review is devoted to the modern approaches and methods used to study the molecular basis of adaptation in populations. The modern concepts of population adaptation and basic approaches to the selection of candidate genes involved in this process are discussed. Molecular genetic methods used to study the role of mutations and epigenetic mechanisms in adaptations of organisms and populations are considered.

К e y w o r d s: adaptation, populations, genotype, phenotype, gene expression, epigenetic mechanisms, DNA methylation.

Введение

В последние годы стремительно возросло количество работ, посвященных методическим подходам для исследования адаптации популяций растений и животных [Geffenew et al., 2005; Whitehead, Crawford, 2006; Ellegren, Sheldon, 2008; Feldman et al., 2009]. При этом особенное внимание в них уделяется изучению генетических и эпигенетических механизмов приспособления. Повышение интереса к проблеме адаптации популяций очевидно связано с разработкой и широким внедрением в эти

исследования новых подходов и методов, в том числе успешно развиваемых в молекулярной биологии. Однако особенности организации и функционирования отдельных организмов и популяций могут обуславливать применение разных подходов и методов для оценки уровня и механизмов их приспособленности.

Кратко остановимся на понятии «адаптация популяций». Популяциям растений и животных, как и любым живым системам, присущи саморегуляция, самоорганизация и адаптация (приспособление). Существуют различные определения и классификации адаптации, обобщен-

ные в работе [Шкорбатов, 1982]. Г. Л. Шкорбатов, согласно принципам системного исследования, ввел понятие адаптации как совокупности реакций живой системы, поддерживающих ее функциональную устойчивость при изменении условий окружающей среды, подчеркивая динамические качества этой устойчивости. Им же разработана классификация адаптаций в соответствии с основными типами существующих в природе биологических систем. Приспособление на популяционно-видовом уровне он относит к адаптации филогенетических систем, считая, что ее отличительными особенностями являются групповой характер, низкая скорость возникновения и относительно высокая стабильность. Возникновение и угасание этих адаптаций происходят в генофонде всей адаптирующейся группы. Причем изменения в генетическом аппарате могут иметь значение для адаптации в том случае, если возникший в данной популяции новый генотип распространяется, будучи подхваченным естественным отбором [Тимофеев-Ресовский и др., 1969]. Понятие приспособления, или адаптации, также подразумевает «запас прочности» биологических систем, а в нашем случае популяций, который многократно ими используется при повторных однотипных изменениях окружающих условий [Шкорбатов, 1982]. По мнению Ю. П. Алтухова, запас генетической прочности популяций представляет собой адаптацию к конкретной среде, с которой они сталкивались в прошлом и которая оказалась «записанной» в их генотипической структуре [Алтухов, 2003].

Факторы адаптивных изменений генетической структуры популяций

Принято считать, что в адаптивных изменениях генетической структуры популяций основную роль играют мутационный процесс и естественный отбор, а также такие факторы, как поток генов, генетический дрейф [Хедрик, 2003; Hereford, 2009]. Согласно Р. Фишеру, приспособленность популяций монотонно возрастает под давлением естественного отбора [Алтухов, 2003]. Однако это положение имеет ряд ограничений, например, для популяций с инбридингом и частотно-зависимым отбором [Животовский, 1981]. По Ю. П. Алтухову, современные нативные популяции достигли максимума адаптации и поддерживают экологическое равновесие с окружающей средой [Алтухов, 2003]. Но существует и другая точка зрения. Несмотря на действие стабилизирующего отбора, популяции не находятся в адаптивном оптимуме [Orzack, Sober, 1994]. Об этом свидетельствуют некото-

рые факты. Как правило, генотипы аборигенных представителей лучше адаптированы к условиям среды обитания [Schluter, 2000], тем не менее в популяции можно обнаружить индивидуумы, имеющие более низкую приспособленность к конкретным условиям среды, чем помещенные в эти условия особи из других популяций [Hereford, Winn, 2008].

На ход процессов адаптации популяций может оказывать влияние уровень их генетического разнообразия. В малочисленных популяциях из-за дрейфа генов, когда «успешные» аллели достигают высокой частоты, а «вредные» аллели фиксируются вследствие наличия генетического груза, уровень генного разнообразия может оказаться низким и ограничить адаптацию [Lynch, 2007].

В основе адаптаций лежит мутационный процесс, приводящий к появлению новых аллелей. Вновь возникающие мутации, как правило, вредны для организма [Алтухов, 2003]. Поэтому обнаруживаемое разнообразие генных локусов в популяции поддерживается за счет доли селективно-нейтральных аллелей. Подавляющее большинство мутаций рецессивно, и при высокой численности популяций они оказываются в гетерозиготном состоянии. Как полагал С. С. Четвериков, вновь возникающие аллели, не проявляя вредного эффекта в гетерозиготах, могут постепенно включаться в генофонд вида [Алтухов, 2003], являясь «сырьем» для естественного отбора. И, как было уже отмечено, значение этих аллелей в адаптации будет проявляться в том случае, если их частота в популяции станет ощутимой и они будут подхвачены естественным отбором.

При рассмотрении молекулярных механизмов адаптации возникает еще несколько вопросов. Например, эволюционирует отдельный ген или локусы, среди которых могут быть и полиаллельные генетические системы? В последнее время принято считать, что природная популяция бисексуальных видов эволюционирует одновременно по множеству локусов [Алтухов, 2003]. Соответствующие генотипы могут взаимодействовать между собой, гены могут быть сцепленными или их комбинации оказываются неслучайными под действием отбора [Алтухов, 2003]. Другой вопрос касается важности для приспособления так называемой морфологической эволюции и эволюции регуляторных систем. Одни авторы придерживаются точки зрения, что основным молекулярным механизмом приспособления являются изменения в транскрибируемых нуклеотидных последовательностях, приводящие к замене аминокислот и изменению структуры белка

[Hoekstra, Coyne, 2007]. Другие авторы полагают, что в основе формирования новых адаптированных фенотипов лежат изменения в регуляции экспрессии генов, обусловленные мутациями в регуляторных или, иначе, в *cis*-областях гена [Carroll, 2005]. Еще более 30 лет назад Кинг и Уилсон [King, Wilson, 1975], исследуя схожесть белков человека и шимпанзе, пришли к заключению, что наблюдаемые фенотипические различия между этими видами могут быть обусловлены различиями скорее в регуляции экспрессии генов, нежели в структуре кодируемых ими белков. На модельных объектах *Drosophila* и дрожжах рода *Saccharomyces* было показано, что ключевым механизмом фиксации некоторых фенотипических различий у этих объектов является возникновение мутаций в регуляторных частях генов [Borneman et al., 2007; McGregor et al., 2007]. В литературе также имеются сведения и в пользу важности для формирования новых адаптаций изменений в структурных областях генов [French-Constant et al., 1993]. Очевидно, что в естественных популяциях эволюция локусов, связанных с приспособлением, может осуществляться за счет возникновения мутаций как в регуляторных, так и в структурных областях генома [Ellegren, Sheldon, 2008]. Из этого следует, что методы и подходы для исследования молекулярных основ адаптации могут быть весьма разнообразными.

Методы выявления адаптивной генетической изменчивости

Поиску генов, которые позволяют популяциям адаптироваться к конкретным условиям среды обитания, в настоящее время посвящено много работ [Powers, Schulte, 1998; Geffenev et al., 2005; Whitehead, Crawford, 2006; Feldman et al., 2009]. Все они основаны на использовании разных подходов для изучения связи между фенотипом и генотипом. Эллегрен и Шелдон [Ellegren, Sheldon, 2008], обобщая накопившийся к настоящему моменту материал о методах исследования этой взаимосвязи, предложили схему отбора кандидатных генов, участвующих в приспособлении (рис.).

Анализ сцепления является традиционным способом идентификации участка хромосом, содержащего локусы, ответственные за те или иные количественные признаки. Этот подход называется «анализ локусов количественных признаков» (QTL, Quantative Trait Locus) и позволяет эффективно картировать и идентифицировать гены, определяющие сложные (полигенные) признаки. Метод устанавливает точ-

ную локализацию, количество, эффект взаимодействия QTLs. Для картирования QTL нужна сегрегированная популяция, полученная путем скрещивания двух родительских форм, которые различались бы по признаку, интересующему исследователя. Для признаков, контролируемых десятками или сотнями генов, родительские линии могут не различаться по ним фенотипически, но должны содержать различные аллели, которые в результате рекомбинационных событий мейоза дадут в поколении потомков целый спектр фенотипических проявлений выбранного признака [Сергеева, 2011]. Следует подчеркнуть, что QTL – это не ген, а только участок хромосомы, где расположен ген или группа генов, обнаруживающих значительное влияние на признак. Для идентификации этих генов необходимо использовать другие методы.

Для проведения QTL-анализа исследователю необходимо две или более линии организмов одного вида, которые различаются генетически по отношению к интересующему признаку. Также требуются генетические маркеры, которые бы позволили отличить родительские линии между собой. В последнее время для этих целей все чаще используют микросателлитные последовательности ДНК, которые могут быть расположены близко к генам, контролирующим признак. Необходимым условием проведения QTL-анализа является конструирование карт сцепления, которые указывают позицию маркеров и относительные генетические расстояния между маркерами вдоль хромосом. С помощью карт сцепления устанавливают местоположение генов и QTLs, связанных с интересующим признаком. QTL-картирование основано на принципе разделения генов и маркеров при рекомбинации хромосом. Это позволяет анализировать их в потомстве F₂ и сравнивать с родительскими формами. Частота рекомбинантных генотипов может быть использована для расчета генетического расстояния между маркерами. Чем ниже частота рекомбинации между двумя маркерами, тем ближе они расположены на хромосоме, и наоборот. Карты сцепления строятся на основе анализа множества сегрегирующих маркеров.

Приведем некоторые примеры использования QTL-анализа для поиска генетических локусов, ответственных за формирование определенного фенотипа. QTL-картирование было использовано для идентификации QTLs локусов, ответственных за вариативность такого признака, как «время начала цветения», у 17 F₂ популяций *Arabidopsis thaliana* [Salome et al.,

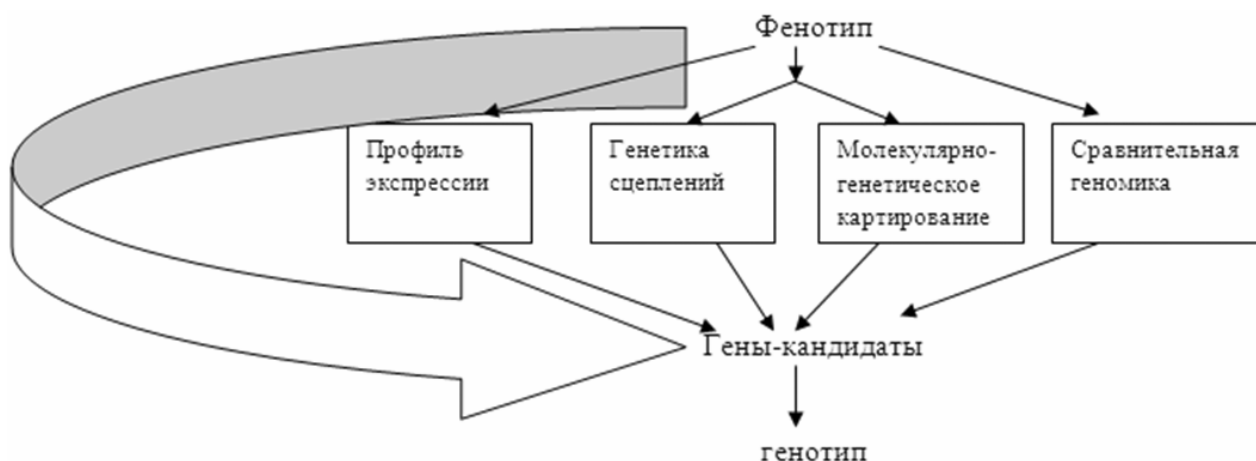


Схема изучения связи между фенотипом и вариациями генотипов [Ellegren, Sheldon, 2008]

2011]. Высоковариабельный признак «время начала цветения» *Arabidopsis thaliana* (L.) Neuh. является одной из важнейших физиологических характеристик растений и четко связан с приспособленностью [Pigliucci, 1998]. В последнее время среди исследователей сложилось представление, что этот признак является определяющим в адаптации арабидопсиса к условиям окружающей среды [Koornneef et al., 1991, 1998; Coupland, 1995; Kuittinen et al., 1997], к тому же он проявляет широтную клинальную изменчивость [Stinchcombe et al., 2004]. Вместе с прорастанием семян эта характеристика синхронизирует рост и репродукцию растений с наиболее благоприятным периодом вегетации [Symonides, 1987] и таким образом обеспечивает сохранение вида в череде поколений. Наличие клинальной изменчивости часто служит прямым доказательством действия естественного отбора [Левонтин, 1978] и участия в адаптации генов, контролирующих эту изменчивость.

С помощью данного метода был обнаружен основной QTL-кластер, связанный с контролем времени зацветания и включающий пять геномных областей [Salome et al., 2011]. Оказалось, что эти области содержат гены транскрипционных факторов FLC/MAF (FLOWERING LOCUS C/MADS AFFECTING FLOWERING). Для QTL-картирования в качестве ДНК-маркеров авторы использовали однонуклеотидные замены.

Методику QTL-анализа и ассоциативного картирования использовали для исследования хромосомных локусов, ассоциированных со временем перехода к цветению в двуродительской расщепляющейся популяции линий двойных гаплоидов и в стержневой колллекции местных и селекционных сортов-популяций *Brassica rapa* [Артемьева и др., 2012]. Авторы

нашли и картировали хромосомные локусы, расположенные во 2, 3, 5, 6, 7 и 10-й группах сцепления, и установили AFLP-, SSR- и S-SAP-маркеры, сцепленные со временем цветения.

Для поиска генов, участвующих в адаптации популяций, также используется подход, основанный на получении информации о нуклеотидных последовательностях организмов. Суть этого подхода состоит в установлении и сравнении нуклеотидных последовательностей особей из разных популяций, двух и более видов. Таким образом, можно определить области, включающиеся в негативную или положительную селекцию. Следует отметить, что данный подход, несмотря на сложность и высокую стоимость такого рода исследований, в последнее время используется довольно часто, особенно для изучения приспособления экологически важных или редких видов растений и животных [Ellegren, Sheldon, 2008].

Отбор генов-кандидатов может осуществляться и на основе знаний биохимии и экологических характеристик того или иного вида в комплексе с методами прямой генетики. К примерам использования такого подхода можно отнести исследования роли полиморфизма гена фосфоглюкозоизомеразы в термоадаптации у бабочки рода *Colias* [Watt et al., 2003], гена лактатдегидрогеназы в адаптации к холодным условиям среды у костной рыбы *Fundulus heteroclitus* [Place, Powers, 1984], роли генов синтеза пигментов в адаптивном цветовом паттерне прибрежных мышей [Hoekstra et al., 2006] и др.

Остановимся более подробно на одном из примеров. *Fundulus heteroclitus* – маленькая костная рыба, обитающая в болотах и эстуариях вдоль побережья Северной Америки. Температура воды для южных и северных популяций

в один и тот же сезон отличается примерно на 13 °С. Пауэрс и Плейс [Powers, Place, 1978] исследовали аллозимный спектр этих популяций, включая лактатдегидрогеназу (LDH-B), фермент, катализирующий превращение пирувата в лактат. Проверив кинетику очищенных LDH-B-ферментов *in vitro*, они обнаружили, что фермент, выделенный из особей, принадлежащих северным популяциям, имеет большую каталитическую способность при низких температурах [Place, Powers, 1984]. Анализ нуклеотидных последовательностей аллелей гена *ldh-b* показал, что функциональные отличия этих изоферментов обусловлены, вероятнее всего, заменой аминокислот в сайте 311 (Ala-Asp) (аллель *ldh-bnn*). Кроме этого авторы обнаружили корреляцию *ldh-b* генотипа с концентрацией АТФ в эритроцитах крови. Поскольку АТФ снижает способность связывания гемоглобином кислорода, было высказано предположение [DiMichele, Powers, 1982], что рыбы из северных популяций, имеющие *ldh-bnn* аллель, обладают более эффективной загрузкой кислорода работающими мышцами и лучшими плавательными характеристиками. Как и ожидалось, *ldh-bnn* рыбы имели более высокую концентрацию АТФ, более низкую гемоглобин-кислородную аффинность и лучшие плавательные характеристики при температуре воды 10 °С. Однако в теплой воде эти различия не были выявлены [DiMichele, Powers, 1982]. Более того, дальнейшие исследования показали, что *ldh-bnn* эмбрионы характеризовались более низкой скоростью метаболизма, в том числе лактатного, замедленным развитием, более поздним вылуплением. Поскольку самки *Fundulus heteroclitus* откладывают яйца в середине весны и их яйца вынуждены развиваться на воздухе, это позволяет получить им некоторые преимущества для выживания, а именно способность вылупляться на две недели позже в более теплой водной среде.

Другим примером, подтверждающим эффективность данного подхода для изучения молекулярных основ устойчивости и приспособления, являются исследования роли вольторотных натриевых каналов (Nav 1.4) в устойчивости популяций подвзвочной змеи *Tamnophis sirtalis* к тетродотоксину [Brodie et al., 2002]. *Tamnophis sirtalis* питается оригонским тритоном (*Taricha granulose*) и обитает в восточной части Северной Америки. Для защиты от хищника тритоны на своей коже содержат тетродотоксин (ТТХ). ТТХ – нейротоксин, который обладает способностью блокировать натриевые каналы (Nav) в цитоплазматической мембране нервных клеток и мускулов, что в

свою очередь ингибирует инициацию потенциала действия. При попадании внутрь даже минимального количества яда мускулы змей парализуются, приводя к смерти этих животных от удушья. Оказалось, что змеи из популяций, питающихся оригонскими тритонами, более устойчивы к ТТХ, чем змеи из популяций, в рацион которых не входит это животное [Brodie et al., 2002]. Более того, содержание ТТХ на коже у тритонов географически коррелирует с уровнем устойчивости змей в популяциях [Brodie, Brodie, 1991; Hanifin et al., 1999]. В дальнейшем на основании лабораторных экспериментов установили, что способность к движению у животных после всprysкивания ТТХ строго коррелировала со способностью клеток генерировать потенциал действия [Geffeney et al., 2002]. Была предложена гипотеза о генетической природе этой устойчивости. Основываясь на знаниях о механизмах действия тетродотоксина (а именно – его способности связываться с натриевыми каналами), авторы высказали предположение, что невосприимчивость к яду может быть обусловлена наличием устойчивых к нему натриевых каналов. Исследование различий в нуклеотидных последовательностях гена, кодирующего белок натриевого канала, показало, что во всех устойчивых популяциях обнаруживается одна несинонимичная мутация, способствующая уменьшению связывания ТТХ с натриевым каналом и повышающая устойчивость к этому нейротоксину [Geffeney et al., 2005]. Кроме этой мутации в большинстве популяций были обнаружены еще 1–3 дополнительные мутации, снижающие токсический эффект ТТХ. Недавно было показано, что два родственных подвзвочной змее вида, *Tamnophis atratus* и *Th. couchii*, также имеют ТТХ-устойчивые популяции [Feldman et al., 2009]. Причем однонуклеотидные замены в гене, кодирующем белок внешней поры Nav 1.4 канала, коррелируют с ТТХ-устойчивостью у этих видов. Данный факт может быть примером конвергентной эволюции на уровне нуклеотидов с параллельной эволюцией на более высоком уровне организации. Полиморфизм генов, кодирующих белки натриевых каналов, лежит в основе устойчивости к структурно или функционально подобным ТТХ нейротоксинам, сакситоксинам у двухстворчатых моллюсков [Bricelj et al., 2005; Soong, Venkatesh, 2006].

В последнее время особенное внимание при отборе кандидатных генов, участвующих в адаптации популяций различных видов растений и животных, уделяется транскрипционной активности генома [Whitehead, Crawford, 2006].

Как уже отмечалось, изменения в регуляторных областях генов, а также в генах, кодирующих транскрипционные факторы, могут привести к существенным различиям в экспрессии генов у особей из разных популяций одного и того же вида и формированию новых фенотипов. Яркий тому пример – разнообразие популяций *Arabidopsis thaliana* по признаку «время начала цветения», которое обусловлено вариативностью генов транскрипционных факторов, содержащих MADS-домен [Koornneef et al., 1998]. Мутации в так называемых *cis*-элементах генов могут обуславливать различный уровень экспрессии этих генов. У упомянутой выше рыбы *Fundulus heteroclitus* между северными и южными популяциями были обнаружены различия в содержании лактатдегидрогеназы, которые, по всей вероятности, зависят от уровня транскриптов гена, кодирующего этот фермент [Schulte et al., 1997]. Сравнение нуклеотидных последовательностей аллелей гена лактатдегидрогеназы у *Fundulus heteroclitus* показало, что различия в его транскрипционной активности обусловлены наличием полиморфных сайтов в промоторе [Schulte et al., 1997, 2000].

Для исследования транскриптома используются различные методы. Например, метод дифференциального дисплея [Liang, Pardee, 1992], кДНК-AFLP [Bachem et al., 1996], серийный анализ геной экспрессии (SAGE) [Velculescu et al., 1995], масс-спектрометрия, белковые и ДНК-микроматрицы.

Одним из наиболее распространенных современных методов, позволяющих сравнивать транскриптомные профили, является метод ДНК Microarray (ДНК-микроматрицы), заключающийся в использовании фиксированных на твердом носителе (чипе) в определенном порядке большого числа строго определенных олигонуклеотидов, с которыми осуществляется взаимодействие (гибридизация) анализируемого пула кДНК. Поскольку на одном чипе можно поместить более тысячи различных олигонуклеотидных зондов (даже более 50 000), это дает возможность анализировать одновременно уровень и паттерн большого количества кДНК. Далее профиль транскриптов анализируется с помощью кластерного анализа. Описываемый подход был использован для анализа транскриптомов различных популяций некоторых видов рыб семейства *Fundulus* [Oleksiak et al., 2002]. Авторы наблюдали индивидуальную изменчивость в экспрессии ряда генов внутри популяций и значительные различия в уровне их транскрипционной активности между популяциями.

Другой современный подход, применяющийся для анализа уровня транскриптов большого количества генов, – серийный анализ геной экспрессии (SAGE) [Velculescu et al., 1995]. Его основные этапы – выделение тагов, соединение их в протяженные ряды и их массовое секвенирование. Полученные тексты обрабатывают компьютерными методами и с помощью подсчета коротких одинаковых последовательностей получают количественные данные о распределении транскриптов многих тысяч генов для разных образцов. Появление новых технологий секвенирования (NGS), основанных на детекции продуктов с помощью лигазной реакции (платформа Solid), при освобождении пирофосфата в ходе роста цепочки нуклеотидов (Roshe), флуоресценции меченого нуклеотида в результате синтеза нуклеотидной последовательности (платформа Illumina) позволили значительно упростить применение данного метода для исследования транскриптомов различных организмов.

Так, модификация данного метода SuperSAGE [Matsumura et al., 2005] была использована для сравнения транскриптомов озерной и речной популяции трехиглой корюшки (*Gasterosteus aculeatus*) после однократного или двукратного заражения тремя видами паразитов: двумя видами нематод (*Anguillicoloides crassus*, *Camallanus lacustris*) и диплостомиды (*Diplostomum pseudospathaceum*) [Lenz et al., 2013]. Показано, что однократное и двукратное заражение рыб паразитами вызывало в их клетках изменения в уровне экспрессии ряда генов. Причем между популяциями наблюдались различия как в наборе дифференциально экспрессирующихся генов, так и в уровне их транскрипционной активности. Интересно, что различия в экспрессии генов так называемого «иммунного ответа» между популяциями можно было обнаружить только после двукратного заражения их паразитами.

Другой современный метод оценки транскриптома различных организмов – анализ прочитанных фрагментов экспрессированных последовательностей (EST). Основные этапы метода заключаются в синтезе кДНК, одностороннем клонировании, создании библиотеки кДНК-клонов, частичном секвенировании каждого клона с двух сторон – получении EST, кластеризации и выравнивании EST, генерировании консенсусов, реконструирующих структуру транскриптов. Применению этого метода в экологических исследованиях посвящен обзор [Bouck, Vision, 2007]. В нем отмечается, что чаще всего этот подход используется для создания ДНК-зондов, которые в дальнейшем ис-

пользуются для анализа уровня транскриптов генов методом Microarray. Метод EST был применен для сравнительного анализа транскриптов у эндемичного (*Amphilophus astorquii*) и симпатрического (*Amphilophus zaliosus*) видов цихлиды [Elmer et al., 2010].

Следует отметить, что с ростом интереса к исследованию транскриптома в генетике популяций возникают вопросы и дискуссии относительно происхождения варибельности уровня экспрессии генов между популяциями: являются ли эти различия результатом нейтральных процессов или же селекции, действия направленного или стабилизирующего отбора [Gilad et al., 2006; Ellegren, Sheldon, 2008].

Эпигенетическая изменчивость как потенциальный источник адаптивной генетической изменчивости

Большую роль в адаптации филогенетических систем в последнее время отводят эпигенетическим механизмам. Более того, разработанная М. А. Шишкиным [1984] и основанная на представлениях К. Х. Уоддингтона и И. И. Шмальгаузена эпигенетическая теория эволюции находит все больше сторонников среди специалистов, занимающихся популяционными исследованиями. Как отмечает Д. Л. Гродницкий [2004], «эволюционное изменение начинается, когда популяция попадает в непривычные условия существования. Новые внешние факторы воздействуют непосредственно на онтогенез особей и вызывают появление значительного числа необычных фенотипов – морфозов. Морфозы наследуются неустойчиво и представляют новый материал для естественного отбора. Если какой-либо из вновь появившихся морфозов оказывается способным существовать в изменившихся условиях, то естественный отбор приводит к генетической ассимиляции этого морфоза [Waddington, 1975] и к реорганизации популяционного генома, так что морфоз приобретает наследственную обусловленность и далее реализуется онтогенезом вне зависимости от внешних условий».

Действительно, в результате антропогенной нагрузки на экосистемы, а также применения искусственного отбора в популяциях некоторых животных за довольно непродолжительный период можно наблюдать быстрые направленные перестройки фенотипа [Шапошников, 1961, 1965; Васильева и др., 2003; Баранов, 2007; Ansorge et al., 2009]. О таких быстрых адаптивных изменениях могут свидетельствовать результаты экспериментов Г. Х. Шапошникова [1965]. Он менял места обитания партеногенетического потомства самок разных

рас тлей, пересаживая их с одного растения-хозяина на другое. Оказалось, что к концу эксперимента (конец сезона) тли-переселенцы полностью адаптировались к новым условиям и изменили фенотип, а именно – они приобрели морфологический облик аборигенных рас тлей, исходно обитавших на данном растении-хозяине. Как полагает А. Г. Васильев [2009], в основе таких адаптивных перестроек лежат эпигенетические механизмы.

Удобным подходом для оценки быстрых эпигенетических процессов в популяциях животных является разработанная А. Г. Васильевым [1988] методика, основанная на подсчете частот проявления дискретных вариаций неметрических признаков – фенов. В каждой выборке производится кодирование проявления фенов разных признаков единицами, а их отсутствия – нулями. За единицу наблюдения принимается сторона тела, а не целая особь. После выбраковки признаков, связанных с возрастом, полом, друг с другом и общими размерами, проводится многомерная ординация внутри индивидуальных фенетических композиций с использованием метода главных компонент. Затем по полученным значениям главных компонент между выборками проводится дискриминантный анализ. Использование этого подхода позволило оценить эпигенетическую изменчивость у ряда представителей семейства псовых при доместификации, интродукции и акклиматизации [Трут и др., 2004; Ansorge et al., 2009]. Техногенные факторы также могут способствовать быстрым изменениям фенотипов в популяциях животных. Например, отчетливые признаки быстрых эпигенетических перестроек по комплексу фенов неметрических признаков скелета речного окуня (*Perca fluviatilis*) при хроническом радиоактивном облучении популяционных группировок, обитающих в Теченском каскаде водохранилищ НПО «Маяк» на Южном Урале в течение последних 50 лет, выявил В. Ю. Баранов [2007].

В молекулярной биологии под эпигенетической регуляцией понимают механизмы изменения экспрессии генов, не затрагивающие последовательность нуклеотидов в ДНК. В основе эпигенетической наследственности могут находиться различные механизмы, включая транспозицию мобильных элементов, эффекты метилирования ДНК, реструктуризацию хроматина за счет метилирования или ацетилирования гистоновых белков, наличие разных сплайсосомных вариантов мРНК и др. Один из примеров эпигенетического подавления экспрессии генов – инактивация одной из X-хромосом в клетках женского организма. В начале эм-

брионального развития женщин одна из двух X-хромосом случайным образом и постоянно неактивна в подавляющем числе соматических клеток [Heard, Distechе, 2006]. Примером эпигенетической регуляции индивидуального развития растений является репрессия гена *FLC* у *Arabidopsis thaliana* [Bastow et al., 2004; Dennis, Peacock, 2007], которая происходит в процессе яровизации, необходимой многим растениям умеренных широт для индукции цветения.

Как отмечалось, одним из молекулярных механизмов эпигенетической наследственности может быть метилирование ДНК. Роль метилирования ДНК в регуляции генетических процессов и формировании новых фенотипов достаточно полно обсуждена в ряде обзоров [Madlung, Comai, 2004; Ванюшин, 2006; Angers et al., 2010; Law, Jacobsen, 2010; He et al., 2011]. В клетках эукариот ядерная ДНК подвержена энзиматическому метилированию с образованием остатков 5-метилцитозина в основном в CG и CNG последовательностях. При репликации ДНК на вновь синтезированной цепи с помощью ДНК-метилтрансфераз происходит заполнение отсутствующих метиловых групп. Метилирование ДНК у растений и животных видо-, ткане- и органоспецифично, оно изменяется с возрастом и регулируется гормонами. С другой стороны, метилирование генома может определять уровень ряда гормонов. Метилирование ДНК контролирует все генетические процессы в клетке (репликация, транскрипция, репарация ДНК, рекомбинация, транспозиция генов) и является механизмом клеточной дифференцировки, дискриминации и репрессии генов. О важности процессов метилирования для жизнедеятельности клеток и организмов в целом свидетельствует тот факт, что нокаутные мутации хотя бы одного из трех генов, кодирующих метилтрансферазы (*Dnmt1*, *Dnmt3a* и *Dnmt3b*), являются летальными [Goll, Bestor, 2005]. Изменение метилирования ДНК, а именно островков CpG в промоторных частях гена, может вызвать развитие различных патологий, например, изменение нормального фенотипа животных клеток на опухолевый [Mompalmer, Vovenzi, 2000]. Ингибирование метилирования ДНК у растений сопровождается, в частности, индукцией генов запасных белков и изменением времени цветения [Soppe et al., 2000]. Однако, несмотря на все возрастающее внимание к проблеме роли метилирования ДНК в процессе жизнедеятельности клеток и организмов, основная часть паттерна метилирования ДНК еще не исследована. Так, к 2006 году было проанализировано менее 0,1 % профиля метилирования генома человека [Schumacher et al., 2006].

Для изучения роли метилирования ДНК в процессах развития особей, в формировании различных патологий, а также эпигенетических адаптивных перестройках популяций растений и животных можно использовать методы, позволяющие оценить статус метилирования ДНК. Эти методы довольно разнообразны и включают использование бисульфитной конверсии, метилчувствительных эндонуклеаз рестрикции, метилсвязывающих белков и антиметилцитозиновых антител. Использование этих методов совместно с технологиями ДНК-микрочипов и высокопроизводительным секвенированием позволяет оценить статус метилирования не только единичного гена, но и генома в целом.

Следует заметить, что многие методы оценки статуса метилирования ДНК были разработаны лишь в последние годы [Bibikova et al., 2006; Schumacher et al., 2006; Zilbermann et al., 2007; Su et al., 2013]. Основаны они на трех подходах: бисульфитной конверсии, рестрикции метилчувствительными рестриктазами и аффинной очистке метилированной ДНК. Кратко рассмотрим все три подхода.

Бисульфитная конверсия. Метилированный цитозин имеет характеристики, очень схожие с неметилированным основанием, и поэтому их сложно различить с помощью стандартных методов секвенирования. Для того чтобы обойти это препятствие, геномная ДНК должна сначала обработаться бисульфитом натрия [Clark et al., 2006], что приводит к деминированию неметилированного цитозина и превращению его в урацил. Метилированный цитозин сохраняется без изменений. При последующей ПЦР конвертированной ДНК происходит замена урацила на тимин. Далее ПЦР-продукты анализируются либо с помощью секвенирования по Сэнгеру, либо с помощью пиросеквенирования, либо с использованием масс-спектрометрии. Дополнительно проводят сравнение нуклеотидной последовательности ДНК после конверсии с последовательностью известной неметилированной ДНК, для того чтобы убедиться в полной конверсии исследуемого участка генома.

Ферменты рестрикции, чувствительные к метилированию. Для анализа метилирования ДНК часто используют метилчувствительные эндонуклеазы рестрикции [Bird et al., 1985; Lindsay, Bird, 1987]. Активность этих ферментов ингибируется или, напротив, проявляется в зависимости от метилирования сайта узнавания ДНК. В настоящее время имеется несколько методов, основанных на использовании метилчувствительных рестриктаз [Lippman et al., 2005; Khulan et al., 2006], однако в целом их

можно разделить на два основных подхода. Первый из них основан на применении метилчувствительных эндонуклеаз рестрикции для исследования метилированной ДНК, второй – неметилированной ДНК. Для анализа статуса метилирования образцы, как правило, сравнивают между собой. Например, образцы, обработанные ферментами рестрикции, и необработанные (контрольные) образцы. В другом случае сопоставляют молекулы ДНК, обработанные метилчувствительными эндонуклеазами рестрикции и их метилнечувствительными изошизомерами. В третьем варианте могут сравниваться обработанные одинаковым набором ферментов разные образцы, например, ДНК, выделенная из разных тканей организма. Выбор стратегии определяется прежде всего степенью метилирования генома. Так, известно, что в геноме человека более 60 % GC-сайтов метилировано [Goll, Bestor, 2005]. В связи с этим более удобным и экономичным подходом будет обогащение неметилированной ДНК. Например, оба сравниваемых образца подвергаются расщеплению метилчувствительными изошизомерами, узнающими последовательность CCGG: HpaII, которая не активна при метилировании GC-пары, и MspI, активность которой не ингибируется метилированием. При обработке ДНК MspI образуется большое количество более коротких по длине фрагментов ДНК, которые затем элиминируются. Таким образом, сравниваться и анализироваться будет только неметилированная часть исследуемой ДНК. Другая полезная для изучения плотно метилированной ДНК эндонуклеаза рестрикции – MsrBC [Lippman et al., 2004].

После фракционирования ДНК-фрагментов по размеру они могут быть проанализированы разными методами, например, клонированы и секвенированы, проанализированы на ДНК-микрочипах.

Метилчувствительные ферменты могут использоваться и для анализа метилирования небольших участков гена. В этом случае анализу подвергаются продукты полимеразной цепной реакции. Следует отметить, что использование метилчувствительных рестриктаз для анализа метилированной ДНК ограничено, поскольку в этом случае можно анализировать GC-пары только в сайтах узнавания этих ферментов.

Аффинная очистка. Метод аффинной очистки основан на фракционировании молекул по биологическому средству. Одну молекулу из взаимодействующей пары, например антитело, химически закрепляют на матрице сорбента, а сорбцией и элюцией второй молекулы, например антигена, управляют путем измене-

ния условий биологического взаимодействия в результате введения в элюент солей, мочевины, детергентов, конкурирующих молекул или изменения его pH. Перед аффинной очисткой исследуемая ДНК подвергается денатурации и помещается на специальные колонки. В качестве аффинного агента часто используют белок, содержащий метилсвязывающий домен, который связывает метилированные GC-сайты [Zhang et al., 2006]. Также имеются коммерчески доступные моноклональные антитела, специфически узнающие метилированный цитозин. Они могут использоваться для иммунопреципитации метилированной ДНК [Zhang et al., 2006; Weber et al., 2007]. Использование метода иммунопреципитации бывает предпочтительнее, поскольку в этом случае можно изучать метилирование не только GC-пар, но и других сайтов ДНК.

Существует ряд методов, с помощью которых можно осуществлять полномасштабный анализ метилированной ДНК. В проекте «Эпигеном человека» (www.epigenome.org) используется стандартный подход секвенирования большого количества конвертированной бисульфитом натрия ДНК из тканей и стволовых клеток человека. Таким способом было идентифицировано существенное количество тканеспецифических дифференциально метилированных областей [Eckhardt et al., 2006]. В других исследованиях используются рестрицирующие ферменты, стандартное клонирование и секвенирование. Например, Роллинз с соавторами [Rollins et al., 2006] таким способом проанализировали почти 14 Mb (мегаоснований) неметилированной и свыше 8 Mb метилированной ДНК человека. Следует отметить, что использование этих подходов позволяет получить огромное количество информации, но они связаны с большим объемом работ и требуют значительных финансовых затрат.

В настоящее время все чаще для исследования статуса метилирования ДНК используют ДНК-микрочиповые технологии и высокопроизводительное секвенирование.

Ранее для микрочиповых исследований метилированной ДНК использовали чипы в виде нанесенных на твердую подложку пятен олигонуклеотидных зондов. Как правило, их изготавливали индивидуально в лабораториях [Lippman et al., 2004]. На данный момент имеются качественные коммерческие олигонуклеотидные чипы: чипы на четках (фирма Illumina), литографические чипы с короткими олигонуклеотидами (фирма Affymetrix), микрочипы с длинными олигонуклеотидами (фирмы NimbleGen, Agilent). Одни микрочиповые технологии предназначены

для анализа метилирования конвертированной бисульфитом натрия ДНК (Illumina), другие подходы для исследования ДНК с использованием рестрицирующих ферментов (Affymetrix) и аффинной очистки (Affymetrix).

Вместо использования микрочиповых технологий для оценки статуса метилирования ДНК можно использовать методы, основанные на высокопроизводительном секвенировании (платформа на основе пиросеквенирования (Roshe) и платформа на основе флуоресценции нуклеотидов в процессе синтеза цепи (Illumina)). Прямое секвенирование позволяет оценить не только профиль, но и уровень метилирования ДНК.

Несмотря на большое количество доступных методов исследования метилированной ДНК, их использование для широкомасштабного анализа ограничено как размером изучаемого генома, так степенью его метилирования. Например, для слабо или умеренно метилированных геномов (арабидопсис, рис, некоторые виды насекомых) рекомендуется применять методы с обогащением метилированной ДНК и последующим ее анализом с помощью микрочипов. Также в этом случае можно использовать высокопроизводительное секвенирование ДНК после бисульфитной конверсии или обогащении метилированной фракции с помощью аффинных колонок.

Как отмечалось выше, метилирование или ацетилирование гистонов может привести к изменению конформации хроматина и активности генов. Участки ДНК, не входящие в нуклеосомы (открытая конформация), отвечают за активацию генов и являются сверхчувствительными к ДНКазе I. На селективном разрезании ДНКазой I этих важных для регуляции биологических процессов участков основаны методы, позволяющие оценить изменения в структуре хроматина. Вначале для исследования доступности хроматина для ДНКазы I использовали довольно трудоемкий и малочувствительный метод разделения ДНК по Саузерну [Mather, Perry, 1983; Bender et al., 2000; Wang, Simpson, 2001]. В дальнейшем были разработаны методы, основанные на полимеразной цепной реакции [Pfeifer, Riggs, 1991; Feng, Villeponteau, 1992; McArthur et al., 2001; Dorschner et al., 2004]. В последние годы для полногеномного анализа конформации хроматина все чаще стали применять чиповые технологии и новые методы секвенирования ДНК [Weil et al., 2004; Crawford et al., 2006; Sabo et al., 2006]. Схема анализа конформации хроматина по его доступности для ДНКазы I выглядит следующим образом [Shu

et al., 2013]. На первом этапе выделяют ядра клеток. На втором этапе выделенные ядра ресуспендируют в буфере для рестрикции и делят на равные аликвоты. К ним добавляют раствор фермента разной концентрации. После инкубации и дополнительной очистки ДНК в случае анализа конформации отдельных участков хроматина проводят полимеразную цепную реакцию, в случае полномасштабного исследования образовавшиеся фрагменты фракционируют по размеру, проводят их амплификацию и мечение флуоресцентными красителями. Доступность хроматина для ДНКазы I в первом случае оценивают по количеству образовавшегося ПЦР-продукта. Во втором – по интенсивности свечения флуоресцентных меток после гибридизации образовавшихся амплификатов с олигонуклеотидами на специально разработанных микрочипах. На наш взгляд, описанный метод является довольно удобным для исследования эпигенетических перестроек организмов, связанных с модификацией хроматина.

Таким образом, для изучения механизмов адаптивных перестроек популяций животных и растений используются различные подходы, основанные на методах популяционной генетики, генетики количественных признаков и молекулярной биологии. Часто эти подходы используются совместно, что расширяет возможности исследования молекулярных механизмов адаптации популяций.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 гг.», соглашение 8050, № г. р. 01201274586.

Литература

- Алтухов Ю. П. Генетические процессы в популяциях. М.: Академкнига, 2003. 431 с.
- Артемяева А. М., Руднева Е. Н., Цао Ж., Боннема Г., Будан Х., Чесноков Ю. В. Поиск ассоциаций молекулярных маркеров с признаком времени перехода к цветению в естественных и искусственных популяциях *Brassica rapa* L. // Сельскохозяйственная биология. 2012. № 1. С. 21–32.
- Баранов В. Ю. Эколого-морфологический анализ популяционной изменчивости рыб Уральского региона (на примере леща и речного окуня): автореф. дис. ... канд. биол. наук. Екатеринбург: ИЭРиЖ УрО РАН, 2007. 18 с.
- Васильев А. Г. Эпигенетическая изменчивость: неметрические пороговые признаки, фены и их композиции // Фенетика природных популяций. М.: Наука, 1988. С. 158–169.
- Васильев А. Г. Феногенетическая изменчивость и популяционная мерономия // Журнал общей биологии. 2009. Т. 70, № 3. С. 195–209.

- Васильева И. А., Васильев А. Г., Любашевский Н. М. и др. Феногенетический анализ популяций малой лесной мыши (*Apodemus uralensis* Pall.) в зоне влияния Восточно-Уральского радиоактивного следа // Экология. 2003. № 6. С. 325–332.
- Ванюшин Б. Ф. Метилирование ДНК и эпигенетика // Генетика. 2006. Т. 42, № 9. С. 1–14.
- Гродницкий Д. Л. Эпигенетическая теория эволюции как возможная основа нового эволюционного синтеза // Журнал общей биологии. 2004. Т. 62, № 2. С. 99–109.
- Животовский Л. А. Динамика полигенных систем под действием отбора // Математические модели в экологии и генетике. М.: Наука, 1981. С. 120–148.
- Левонтин Р. С. Генетические основы эволюции. М.: Мир, 1978. 351 с.
- Тимофеев-Ресовский Н. В., Воронцов Н. Н., Яблоков А. В. Краткий очерк теории эволюции. М.: Наука, 1969. 408 с.
- Сергеева Л. И. QTL-анализ и его применение в физиологических исследованиях. Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений / Ред. Вл. В. Кузнецова, В. В. Кузнецова, Г. А. Романова. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. С. 185–200.
- Трут Л. Н., Плюснина И. З., Оськина И. Н. Эксперимент по доместикации лисиц и дискуссионные вопросы эволюции собак // Генетика. 2004. Т. 40, № 6. С. 794–807.
- Шапошников Г. Х. Специфичность и возникновение адаптации к новым хозяевам у тлей (Homoptera, Aphidoidea) в процессе естественного отбора (экспериментальные исследования) // Энтومол. обозрение. 1961. Т. 40, № 4. С. 739–762.
- Шапошников Г. Х. Морфологическая дивергенция и конвергенция в эксперименте с тлями (Homoptera, Aphidinea) // Энтومол. обозрение. 1965. Т. 44, № 1. С. 3–25.
- Шишкин М. А. Индивидуальное развитие и естественный отбор // Онтогенез. 1984. Т. 15, № 2. С. 115–136.
- Шкорбатов Г. Л. К построению общей теории адаптации // Журнал общей биологии. 1982. Т. XLIII, № 6. С. 775–787.
- Хедрик Ф. Генетика популяций. М.: Техносфера, 2003. 588 с.
- Angers B., Castonguay E., Massicotte R. Environmentally induced phenotypes and DNA methylation: how to deal with unpredictable conditions until the next generation and after // Molecular Ecology. 2010. Vol. 19, N. 7. P. 1283–1295.
- Ansorge H., Ranyuk M., Kauhala K. et al. Raccoon dog, *Nyctereutes procyonoides*, populations in the area of origin and in colonized regions – the epigenetic variability of an immigrant // Ann. Zool. Fennici. 2009. Vol. 46. P. 51–62.
- Bachem C. W., van der Hoeven R. S., de Bruijn S. M., Vreugdenhil D., Zabeau M., Visser R. G. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development // Plant J. 1996. Vol. 9, N. 5. P. 745–753.
- Bastow R., Mylne J. S., Lister C., Lippman Z., Martienssen R. A., Dean C. Vernalization requires epigenetic silencing of FLC by histone methylation // Nature. 2004. Vol. 427. P. 164–167.
- Bender M. A., Bulger M., Close J., Groudine M. Beta-globin gene switching and DNase I sensitivity of the endogenous beta-globin locus in mice do not require the locus control region // Mol Cell. 2000. Vol. 5. P. 387–393.
- Bibikova M., Lin Z., Zhou L., Chudin E., Garcia E. W., Wu B., Doucet D., Thomas N. J., Wang Y., Vollmer E. et al. High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays // Genome Res. 2006. Vol. 16. P. 383–393.
- Bird A., Taggart M., Frommer M., Miller O. J., Macleod D. A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA // Cell. 1985. Vol. 40. P. 91–99.
- Borneman A. R., Gianoulis T. A., Zhang Z. D., Yu H., Rozowsky J., Siringhaus M. R., Wang L. Y., Gerstein M., Snyder M. Divergence of transcription factor binding sites across related yeast species // Science. 2007. Vol. 317. P. 815–819.
- Bricelj V. M., Connell L., Konoki K. et al. Sodium channel mutation leading to saxitoxin resistance in clams increases risk of PSP // Nature. 2005. Vol. 434. P. 763–767.
- Brodie E. D. III, Brodie E. D. Jr. Evolutionary response of predators to dangerous prey: reduction of toxicity of newts and resistance of garter snakes in island populations // Evolution. 1991. Vol. 45. P. 221–224.
- Brodie E. D. III, Brodie E. D. Jr. Costs of exploiting poisonous prey: evolutionary trade-offs in a predator-prey arms race // Evolution. 1999. Vol. 53. P. 626–631.
- Brodie E. D. Jr., Ridenhour B. J., Brodie E. D. III. The evolutionary response of predators to dangerous prey: hotspots and coldspots in the geographic mosaic of coevolution between garter snakes and newts // Evolution. 2002. Vol. 56. P. 2067–2082.
- Bouck A., Vision T. The molecular ecologist's guide to expressed sequence tags // Molecular Ecology. 2007. Vol. 16, N 5. P. 907–924.
- Clark S. J., Statham A., Stirzaker C., Molloy P. L., Frommer M. DNA methylation: bisulphite modification and analysis // Nat. Protoc. 2006. Vol. 1. P. 2353–2364.
- Carroll S. B. Evolution at two levels: on genes and form // PLoS Biol. 2005. Vol. 3, N 7. P. 1159–1166.
- Coupland G. Genetic and environmental control of flowering time in *Arabidopsis* // Trends Genet. 1995. Vol. 11. P. 93–97.
- Crawford D. L., Powers D. A. Evolutionary adaptation to different thermal environments via transcriptional regulation // Molecular Biology and Evolution. 1992. Vol. 9. P. 806–813.
- Crawford G. E., Davis S., Scacheri P. C., Renaud G., Halawi M. J., Erdos M. R., Green R., Meltzer P. S., Wolfsberg T. G., Collins F. S. DNase-chip: a high-resolution method to identify DNase I hypersensitive sites using tiled microarrays // Nat. Methods. 2006. Vol. 3. P. 503–509.
- Dennis E. S., Peacock W. J. Epigenetic regulation of flowering // Current Opinion in Plant Biology. 2007. Vol. 10. P. 520–527.

- DiMichele L., Powers D. A.* Physiological basis for swimming endurance differences between LDH-B genotypes of *Fundulus heteroclitus* // *Science*. 1982. Vol. 216. P. 1014–1016.
- Dorschner M. O., Hawrylycz M., Humbert R., Wallace J. C., Shafer A., Kawamoto J., Mack J., Hall R., Goldy J., Sabo P. J., Kohli A., Li Q., McArthur M., Stamatoyannopoulos J.* Highthroughput localization of functional elements by quantitative chromatin profiling // *Nat Methods*. 2004. Vol. 1. P. 219–225.
- Eckhardt F., Lewin J., Cortese R., Rakyan V. K., Attwood J., Burger M., Burton J., Cox T. V., Davies R., Down T. A. et al.* DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22 // *Nat. Genet*. 2006. Vol. 38. P. 1378–1385.
- Ellegren H., Sheldon B. C.* Genetic basis of fitness differences in natural populations // *Nature*. 2008. Vol. 452. P. 169–175.
- Elmer K. R., Fan S., Gunter H. M., Jones J. C., Boekhoff S., Kuraku S., Meyer A.* Rapid evolution and selection inferred from the transcriptomes of sympatric crater lake cichlid fishes // *Molecular Ecology*. 2010. Vol. 19. P. 197–211.
- Feldman C. R., Brodie E. D. Jr., Brodie E. D. III., Pfrender M. E.* The evolutionary origins of beneficial alleles during the repeated adaptation of garter snakes to deadly prey // *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 2009. Vol. 106. P. 13415–13420.
- Feng J., Villeponteau B.* High-resolution analysis of c-fos chromatin accessibility using a novel DNase I-PCR assay // *Biochim Biophys Acta*. 1992. Vol. 1130. P. 253–258.
- French-Constant R. H., Steichen J. C., Rocheleau T. A., Aronstein K., Roush R. T.* A single-amino acid substitution in a γ -aminobutyric acid subtype A receptor locus is associated with cyclodiene insecticide resistance in *Drosophila* populations // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993. Vol. 90. P. 1957–1961.
- Geffeney S., Brodie E. D. Jr., Ruben P. C., Brodie E. D. III.* Mechanisms of adaptation in a predator-prey arms race: TTX-resistant sodium channels // *Science*. 2002. Vol. 297. P. 1336–1339.
- Geffeney S. L., Fujimoto E., Brodie E. D. III., Brodie E. D. Jr., Ruben P. C.* Evolutionary diversification of TTX-resistant sodium channels in a predator-prey interaction // *Nature*. 2005. Vol. 434. P. 759–763.
- Gilad Y., Oshlack A., Rifkin S. A.* Natural selection on gene expression // *Trends Genet*. 2006. Vol. 22, N 8. P. 456–461.
- Goll M. G., Bestor T. H.* Eukaryotic cytosine methyltransferases // *Annu. Rev. Biochem*. 2005. Vol. 74. P. 481–514.
- Hanifin C. T., Yotsu-Yamashita M., Yasumoto T., Brodie E. D. III., Brodie E. D. Jr.* Toxicity of dangerous prey: variation of tetrodotoxin levels within and among populations of the newt *Taricha granulose* // *Journal of Chemical Ecology*. 1999. Vol. 25. P. 2161–2175.
- He X.-J., Chen T., Zhu J.-K.* Regulation and function of DNA methylation in plants and animals // *Cell Research*. 2011. Vol. 21. P. 442–465.
- Heard E., Disteché C. M.* Dosage compensation in mammals: fine-tuning the expression of the X chromosome // *Genes Dev*. 2006. Vol. 20. P. 1848–1867.
- Hereford J.* A quantitative survey of local adaptation and fitness trade-offs // *Am Nat*. 2009. Vol. 173, N 5. P. 579–588.
- Hereford J., Winn A. A.* Limits to local adaptation in six populations of the annual plant *Diodia teres* // *New Phytol*. 2008. Vol. 178, N 4. P. 888–896.
- Hoekstra H. E., Coyne J. A.* The locus of evolution: evo devo and the genetics of adaptation // *Evol. Int. J. Org. Evol*. 2007. Vol. 61. P. 995–1016.
- Hoekstra H. E., Hirschmann R. J., Bunday R. A., Insel P. A., Crossland J. P.* A single amino acid mutation contributes to adaptive beach mouse color pattern // *Science*. 2006. Vol. 313.
- King M. C., Wilson A. C.* Evolution at two levels in humans and chimpanzees // *Science*. 1975. Vol. 188. P. 107–116.
- Khulan B., Thompson R. F., Ye K., Fazzari M. J., Suzuki M., Stasiak E., Figueroa M. E., Glass J. L., Chen Q., Montagna C. et al.* Comparative isoschizomer profiling of cytosine methylation: the HELP assay // *Genome Res*. 2006. Vol. 16. P. 1046.
- Koornneef M., Alonso-Blanco C., Peeters A. J. M., Soppe W.* Genetic control of flowering time in *Arabidopsis* // *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1998. Vol. 49. P. 345–370.
- Koornneef M., Hanhart C. J., van der Veen J. H.* A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana* // *Mol. Gen. Genet*. 1991. N 229. P. 57–66.
- Kuittinen H., Sillanpaa M. J., Savolainen O.* Genetic basis of adaptation: flowering time in *Arabidopsis thaliana* // *Theor. Appl. Genet*. 1997. Vol. 95. P. 573–583.
- Law J. A., Jacobsen S. E.* Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals // *Nat Rev Genet*. 2010. Vol. 11, N 3. P. 204–220.
- Lenz T. L., Eizaguirre C., Rotter B., Kalbe M., Milinski M.* Exploring local immunological adaptation of two stickleback ecotypes by experimental infection and transcriptome-wide digital gene expression analysis // *Molecular Ecology*. 2013. Vol. 22, N 3. P. 774–786.
- Lindsay S., Bird A. P.* Use of restriction enzymes to detect potential gene sequences in mammalian DNA // *Nature*. 1987. Vol. 327. P. 336–338.
- Lynch M.* The frailty of adaptive hypotheses for the origins of organismal complexity // *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 2007. Vol. 104. P. 8597–8604.
- Liang P., Pardee A. B.* Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction // *Science*. 1992. Vol. 257, N 5072. P. 967–971.
- Lippman Z., Gendrel A. V., Black M., Vaughn M. W., Dedhia N., McCombie W. R., Lavine K., Mittal V., May B., Kasschau K. D. et al.* Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control // *Nature*. 2004. Vol. 430. P. 471–476.
- Lippman Z., Gendrel A. V., Colot V., Martienssen R.* Profiling DNA methylation patterns using genomic tiling microarrays // *Nat. Methods*. 2005. Vol. 2. P. 219–224.
- Madlung A., Comai L.* The Effect of Stress on Genome Regulation and Structure // *Annals of Botany*. 2004. Vol. 94. P. 481–495.

- Mather E. L., Perry R. P. Methylation status and DNase I sensitivity of immunoglobulin genes: changes associated with rearrangement // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1983. Vol. 80. P. 4689–4693.
- Matsumura H., Ito A., Saitoh H. et al. SuperSAGE // Cellular Microbiology. 2005. Vol. 7. P. 11–18.
- McArthur M., Gerum S., Stamatoyannopoulos G. Quantification of DNaseI-sensitivity by real-time PCR: quantitative analysis of DNaseI-hypersensitivity of the mouse beta-globin LCR // J. Mol. Biol. 2001. Vol. 313. P. 27–34.
- McGregor A. P., Orgogozo V., Delon I., Zanet J., Srinivagan D. G., Payre F., Stern D. L. Morphological evolution through multiple cis-regulatory mutations at a single gene // Nature. 2007. Vol. 448. P. 587–590.
- Momparler R., Bovenzi V. DNA Methylation and Cancer // Journal of Cellular Physiology. 2000. Vol. 183. P. 145–154.
- Oleksiak M. F., Churchill G. A., Crawford D. L. Variation in gene expression within and among natural populations // Nat Genet. 2002. Vol. 32, N 2. P. 261–266.
- Orzack S. H., Sober E. How (not) to test an optimality model // Trends Ecol. Evol. 1994. Vol. 9, N 7. P. 265–267.
- Pavlidis P., Hutter S., Stephan W. A population genomic approach to map recent positive selection in model species // Molecular Ecology. 2008. Vol. 17. P. 3585–3598.
- Pigliucci M. Ecological and evolutionary genetics of *Arabidopsis* // TREE. 1998. N 3. P. 485–489.
- Place A. R., Powers D. A. Kinetic characterization of the lactate dehydrogenase (LDH-B4) allozymes of *Fundulus heteroclitus* // Journal of Biological Chemistry. 1984. Vol. 259. P. 1309–1318.
- Pfeifer G. P., Riggs A. D. Chromatin differences between active and inactive X chromosomes revealed by genomic footprinting of permeabilized cells using DNase I and ligation-mediated PCR // Genes Dev. 1991. Vol. 5. P. 1102–1113.
- Powers D. A., Place A. R. Biochemical genetics of *Fundulus heteroclitus*: temporal and spatial variation in gene frequencies of LDH-B, MDH-A, GPI-B, and PGM-A // Biochemical Genetics. 1978. Vol. 16. P. 593–607.
- Powers D. A., Schulte P. M. Evolutionary adaptations of gene structure and expression in natural populations in relation to a changing environment: a multidisciplinary approach to address the million-year saga of a small fish // Journal of Experimental Zoology. 1998. Vol. 282. P. 71–94.
- Rollins R. A., Haghghi F., Edwards J. R., Das R., Zhang M. Q., Ju J., Bestor T. H. Large-scale structure of genomic methylation patterns // Genome Res. 2006. Vol. 16. P. 157–163.
- Sabo P. J., Kuehn M. S., Thurman R., Johnson B. E., Johnson E. M., Cao H., Yu M., Rosenzweig E., Goldy J., Haydock A. et al. Genome-scale mapping of DNase I sensitivity in vivo using tiling DNA microarrays // Nat Methods. 2006. Vol. 3. P. 511–518.
- Salome P. A., Bomblies K., Laitinen R. A. E., Yant L., Mott R., Weigel D. Genetic architecture of flowering-time variation in *Arabidopsis thaliana* // Genetics. 2011. Vol. 188. P. 421–433.
- Schluter D. The Ecology of Adaptive Radiation. Oxford University Press, Oxford. 2000 p.
- Schulte P. M., Glemet H. C., Fiebig A. A., Powers D. A. Adaptive variation in lactate dehydrogenase-B gene expression: role of a stress-responsive regulatory element // Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. 2000. Vol. 97. P. 6597–6602.
- Schulte P. M., GomezChiari M., Powers D. A. Structural and functional differences in the promoter and 5 flanking region of Ldh-B within and between populations of the teleost *Fundulus heteroclitus* // Genetics. 1997. Vol. 145. P. 759–769.
- Schumacher A., Kapranov P., Kaminsky Z., Flanagan J., Assadzadeh A., Yau P., Virtanen C., Winegarden N., Cheng J., Gingeras T. et al. Microarray-based DNA methylation profiling: technology and applications // Nucleic Acids Res. 2006. Vol. 34. P. 528–542.
- Shu H., Gruissem W., Hennig L. Measuring *Arabidopsis* chromatin accessibility using DNase I-polymerase chain reaction and DNase I-Chip assays // Plant Physiology. 2013. Vol. 164, N 4. P. 1794–1781.
- Soong T. W., Venkatesh B. Adaptive evolution of tetrodotoxin resistance in animals // Trends in Genetics. 2006. Vol. 22. P. 621–626.
- Soppe W. J., Jacobsen S. E., Alonso-Blanco C., Jackson J. P., Kakutani T., Koornneef M., Peeters A. J. The late flowering phenotype of *fwa* mutants is caused by gain-of-function epigenetic alleles of a homeodomain gene // Mol. Cell. 2000. Vol. 6. P. 791–802.
- Stinchcombe J. R., Weinig C., Ungerer M. et al. A latitudinal cline in flowering time in *Arabidopsis thaliana* modulated by the flowering time gene *FRIGIDA* // PNAS. 2004. Vol. 101, N 13. P. 4712–4717.
- Su J., Yan H., Wei Y., Liu H., Liu H., Wang F., Lv J., Wu Q., Zhang Y. CpG_MPs: identification of CpG methylation patterns of genomic regions from high-throughput bisulfite sequencing data // Nucleic Acids Research. 2013. Vol. 41, N 1. P. 1–15.
- Symonides E. Population dynamics of annual plants // Davy A. J., Hutchings M. J., Watkinson A. R. (Eds.). 28th Symposium of the British Ecological Society, Sussex: Blackwell, 1987. P. 221–248.
- Velculescu V. E., Zhang L., Vogelstein B., Kinzler K. W. Serial analysis of gene expression // Science. 1995. Vol. 270, N 5235. P. 484–487.
- Waddington C. M. The Evolution of an Evolutionist. Edinburgh: Edinburgh Univ. Press, 1975. 328 p.
- Wang X., Simpson R. T. Chromatin structure mapping in *Saccharomyces cerevisiae* in vivo with DNase I // Nucleic Acids Res. 2001. Vol. 29. P. 1943–1950.
- Watt W. B., Wheat C. W., Meyer E. H., Martin J. F. Adaptation at specific loci. VII. Natural selection, dispersal and the diversity of molecular-functional variation patterns among butterfly species complexes (*Colias*: Lepidoptera, Pieridae) // Molecular Ecology. 2003. Vol. 12. P. 1265–1275.
- Weil M. R., Widlak P., Minna J. D., Garner H. R. Global survey of chromatin accessibility using DNA microarrays // Genome Res. 2004. Vol. 14. P. 1374–1381.
- Weber M., Hellmann I., Stadler M. B., Ramos L., Pääbo S., Rebhan M., Schübeler D. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome // Nat. Genet. 2007. Vol. 39. P. 457–466.

Wheat C. W., Watt W. B., Pollock D. D., Schulte P. M. From DNA to fitness differences: sequences and structures of adaptive variants of Colias phosphoglucose isomerase (PGI) // *Molecular Biology and Evolution*. 2006. Vol. 23. P. 499–512.

Whitehead A., Crawford D. L. Neutral and adaptive variation in gene expression // *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 2006. Vol. 103. P. 5425–5430.

Zhang X., Yazaki J., Sundaresan A., Cokus S., Chan S. W., Chen H., Henderson I. R., Shinn P.,

Pellegrini M., Jacobsen S. E. et al. Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in Arabidopsis // *Cell*. 2006. Vol. 126. P. 1189–1201.

Zilberman D., Gehring M., Tran R. K., Ballinger T., Henikoff S. Genome-wide analysis of Arabidopsis thaliana DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription // *Nat. Genet.* 2007. Vol. 39. P. 61–69.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Топчиева Людмила Владимировна

ведущий научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: topchieva67@mail.ru
тел.: (8142) 769810

Федоренко Ольга Михайловна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: fedorenko_om@mail.ru
тел.: (8142) 573107

Topchieva, Lyudmila

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: topchieva67@mail.ru
tel.: (8142) 769810

Fedorenko, Olga

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: fedorenko_om@mail.ru
tel.: (8142) 573107