

УДК 577.151.03 + 577.2.04

**Дроганов Е.И., Поликарпова Л.В., Дроганова Т.С.,  
Цветков И.Л., Коничев А.С.**

*Московский государственный областной университет*

## **БИОХИМИЧЕСКИЙ И МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ В ПОПУЛЯЦИЯХ РЕЧНОЙ ЖИВОРОДКИ (*VIVIPARUS VIVIPARUS* L.)**

*Аннотация.* Исследован внутривидовой полиморфизм брюхоногого моллюска живородка речная (*Viviparus viviparus* L.) по Km кислой фосфатазы и ДНКазы и наборам ПЦР-фрагментов геномной ДНК, фланкированных микросателлитами и ретротранспозонами. Проанализирован характер дифференциации популяций в открытых водоемах Московской области, и установлено, что основное влияние на сходство и различия в популяциях моллюсков оказывают биотические и абиотические (в частности техногенные) факторы среды, в меньшей степени территориальное (географическое) локализация популяций). *Ключевые слова:* внутривидовая дифференциация, генетическая адаптация, молекулярный дифференциатор, биохимический дифференциатор, микроэволюция, пресноводные моллюски.

***E. Droganov, I. Tsvetkov, L. Polykarpova, T. Droganova, A. Konichev***  
*Moscow State Regional University*

## **BIOCHEMICAL AND MOLECULAR POLYMORPHISM IN POPULATIONS OF RIVER *VIVIPARUS* (*VIVIPARUS VIVIPARUS* L.)**

*Abstract.* The intraspecific polymorphism of a fresh-water snail *Viviparus viviparus* L. is studied by using the Km value of the acid phosphatase and DNase and PCR fragments flanked with microsatellites and retrotransposones. The character of differentiation of snail populations in open reservoirs of the Moscow region is analyzed. It is shown that similarities and distinctions in snail populations are affected mainly by biotic and abiotic environment factors including the technogenic pressure and, to a much smaller degree, by territorial factors including the geographical localization of populations.

*Key words:* intraspecific differentiation, genetic adaptation, molecular differentiator, biochemical differentiator, microevolution, fresh-water snails.

Нетранскрибируемые последовательности ядерной ДНК эукариот все больше привлекают внимание молекулярных генетиков. Изменчивость в этой, занимающей большие объемы области ДНК не отражается на фенотипе и беспрепятственно накапли-

вается в популяциях, благодаря чему даже у отдельных особей формируется уникальная первичная структура генома, своеобразный отпечаток пальцев или штрих-код. Этот штрих-код имеет большое значение, например, для идентификации личности, сортов культурных растений, пород домашних животных и решения других при-

© Дроганов Е.И., Поликарпова Л.В., Дроганова Т.С., Цветков И.Л., Коничев А.С., 2014.

кладных задач [9], однако играет весомую роль и в фундаментальной науке. Исследование сходства и различий нетранскрибируемых последовательностей, производимое методами кластерного анализа, позволяет охарактеризовать филогенетические связи между группами особей практически любого уровня, главное, чтобы эти группы имели какие-либо естественные границы своего распространения, как, например, непреодолимые препятствия или расстояния, различия в сроках или способах размножения и т.д. [10].

Однако возможна и другая трактовка результатов, которые получаются из анализа первичной структуры ДНК. Заключается она в исследовании корреляции молекулярно-генетического полиморфизма с особенностями условий обитания. Мутационный процесс, ошибки репликации, рекомбинация и, как следствие, формирование индивидуальной первичной структуры ДНК происходят в любых условиях обитания, но в состоянии стресса при усилении техногенной нагрузки становятся более вероятными. Причин тому может быть несколько, это непосредственное влияние некоторых токсикантов (мутагенов) или физических факторов (ультрафиолетовое или радиационное излучение) на структуру ДНК, а также действие, оказываемое опосредованно через нарушение синтеза ДНК, своевременной репарации, и, наконец, регуляторные процессы адаптивного значения [3; 8]. В неблагоприятных условиях обитания индуцированный внешним воздействием мутационный процесс, по-видимому, может преобладать над естественным. В соответствии с этим индивидуаль-

ная изменчивость и молекулярно-генетический полиморфизм должны быть выше в тех популяциях, которые испытывают большую техногенную нагрузку, и ниже – где условия существования близки к оптимальным.

Биохимические характеристики гидробионтов, в отличие от молекулярных, уже давно применяются для описания патологических изменений в организме вследствие острого неблагоприятного воздействия извне. К ним относятся качественный состав белков, липидов, полисахаридов, РНК, концентрация специфических метаболитов (криопротекторы, продукты окисления и др.), однако ведущую позицию в характеристике метаболизма заслуженно занимают ферменты. Активность и состав множественных форм различных ферментов считаются важнейшими диагностическими признаками для выявления системных заболеваний в медицине и ветеринарии, а также маркерами стресс-реакции животных при остром токсическом воздействии на них [5; 6; 7]. Однако использовать эти признаки для характеристики состояния популяций удастся не всегда из-за широкой нормы реакции и зависимости от многочисленных эндогенных факторов (возраст, пол животного, упитанность, физиологическое состояние и т. д.).

Более перспективными в этом отношении могут быть структурно-функциональные характеристики ферментов, которые отражают не столько стресс-реакцию организма, сколько историю генетической адаптации к определенным условиям обитания. На примере кислой фосфатазы и ДНКазы нами была изучена одна из таких характеристик – константа Михаэлиса

(Km), которая действительно позволила охарактеризовать индивидуальную изменчивость внутри популяций и межпопуляционный полиморфизм в природных экосистемах [4; 6; 7]. В настоящей работе мы сопоставили результаты анализа дифференциации

изолированных природных популяций моллюсков, полученные с использованием биохимического и более традиционных молекулярных критериев, а также исследовали зависимость межпопуляционной дифференциации от условий обитания.

### Материалы и методы

Материалом служили моллюски живородка речная (*Viviparus viviparus* Linnaeus, 1758: Viviparidae, Architaenioglossa, Gastropoda, Mollusca), которых собирали группами по несколько особей в различных водоемах Московской области в июле-августе 2011 г. Станции сбора располагались на правом берегу реки Вязь (Пушкинский р-он, с. Тишково, станция № 1), на правом берегу реки Мжут (Можайский р-он, пос. Колычево, станция № 2), в ручье возле лесного массива на окраине дачного посёлка севернее Фрязино (станция № 3) и по берегам искусственной запруды на реке Любосеевка (ст. Фрязино-Пассажирская Ярославской ж/д, станция № 4).

Станция № 1 расположена в малонаселенной местности в месте впадения реки Вязь в Пестовское водохранилище (56°5'9.44" север. шир., 37°43'44.28" вост. долг.). Берега реки – сильно заросшие водной и прибрежно-водной растительностью, преобладают рогоз, осоки, рдест, роголистник, кувшинка. Среди беспозвоночных в изобилии встречена живородка, катушка, перловица, беззубка, множество ветвистоусых рачков, попадаются мелкие раки. Вблизи берега держится множество мальков плотвы. Согласно классификации Кольквитца и Марссона (с изменениями и дополнениями Долгова и Никитского [2]) водоем можно отнести к олиго-β-мезосапробной зоне.

В целом гидробиологическое состояние водоема благоприятное, явных признаков загрязнения воды, замусоривания берегов не выявлено.

Станция № 2 расположена в среднем течении реки Мжут в пос. Колычево (55°28'15.44" север. шир., 36°0'12.5" вост. долг.) вдали от промышленных предприятий и автомагистралей, вблизи частных домовладений сельского типа. Здесь вполне вероятны загрязнения бытовыми отходами, а также удобрениями и химикатами, используемыми в частных хозяйствах. Река в месте сбора материала не превышает 6 м в ширину, течение быстрое, берега густо заросли осокой, водная растительность скудна, присутствуют нитчатые зеленые водоросли, на поверхности воды – ряска, на дне много детрита (слой 20-30 см) темно-серого цвета, имеет включения растительного и животного происхождения (в основном раковины брюхоногих моллюсков), много тубифицид и личинок хирономид. Водоем можно отнести к α-мезосапробной зоне, общее состояние водоема удовлетворительное.

Станция № 3 расположена в истоке реки Любосеевка (55°59'27.4" север. шир., 38°0'41.28" вост. долг.) в лесополосе, вдали от промышленных предприятий и автомагистралей, в дачном поселке Лесное Фрязино-2 в непосредственной близости от дачных участков

(на расстоянии 7–8 м). Вероятны загрязнения удобрениями, химическими веществами, используемыми в дачном хозяйстве, а также бытовыми отходами. Река в месте сбора моллюсков имеет ширину около 2–3 метров, течение слабое, едва заметное, берега глинистые, заросшие осокой, камышом и калужницей, водной растительности мало, местами отмечено цветение воды. Вода коричневатого-желтого цвета с выраженным болотистым запахом, на дне много детрита светло-серого цвета, содержащего остатки растительного и животного происхождения. Водоем относится к  $\beta$ -мезосапробной зоне, явных признаков загрязнения и замусоривания не отмечено.

Станция № 4 находится в верхнем течении реки Любосеевка на участке, называемом техническими прудами (55°57'51.26" сев. шир., 38°2'43.86" вост. долг.). Точка сбора равноудалена от ж/д станции Фрязино-пассажирская и НПП «Исток» (около 40 м). Вполне вероятны загрязнения металлической пылью и топливом, отходами с предприятия, а также бытовыми отходами. Берега, вода около берега и дно водоема сильно замусорены. Река в месте сбора достигает ширины примерно 50 м, течение довольно медленное, дно и край берега укреплены бетонными плитами, ввиду чего прибрежноводная и водная растительность отсутствуют. Берег слегка порос осокой и камышом. Вода мутная с желтоватым оттенком и гнилостным запахом. Детрит темно-коричневого цвета, включает раковины брюхоногих моллюсков и опавшую листву. Во множестве присутствуют мальки рыб, ловится крупная рыба. Водоем следует отнести к  $\alpha$ -мезо-полисапробной зоне.

Собранных моллюсков препарировали индивидуально, ДНК выделяли из мышц передней части ноги, которые измельчали с помощью микрогомогенизатора в микропробирках Эппендорф с четырьмя объемами лизирующего раствора на основе гуанидинтиоцианата (5,2М). Дальнейшая процедура выделения и очистки ДНК происходила в соответствии с инструкцией к использованному для этого набору реагентов «Silica uni» (ООО «Компания «Биоком», Москва). Полученные препараты ДНК непосредственно использовали для ПЦР. Реакционная смесь состояла из 1% трис-НСI буфера (рН 9,4), 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,25 мМ каждого дНТФ, 0,05% Tween 20, 1 ед. *Taq* ДНК-полимеразы, 50 нг исследуемой ДНК и смеси олигонуклеотидных праймеров (синтезированы ЗАО «Синтол», Москва), взятых в количестве 10 пмоль каждого на реакцию (подобраны для амплификации фрагментов ДНК, фланкированных микросателлитами [11; 12] и мобильными элементами [13; 14]).

Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле с 1% ТБЕ буфером. Полиморфные фрагменты идентифицировали по молекулярной массе, которую определяли с помощью маркера Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (Fermentas). Данные о «биохимической» дифференциации моллюсков, собранных на тех же станциях, были получены нами ранее [6; 7]. Внутривидовую (межпопуляционную) дифференциацию моллюсков выявляли методом кластерного анализа. Для этого использовали значения Km кислой фосфотазы и ДНКазы, полученные во всех повторных измерениях для всех проанализированных особей

Таблица 1

**Олигонуклеотидные праймеры, использованные для анализа  
молекулярной дифференциации живородки речной**

Праймер*	Последовательность 5'-3'	Температура отжига °С	Ссылка
Ha11	TCTCACTGTTCTCTCTCTC	49	[12]
Ha11-F Ha11-R	CGTGTACTACTGGGCAACGT ACGGAAAGAGACAGAAAGTGAG	49	[12]
Hita5-F Hita5-R	AAACGAAACTCAGCCAGCTA CAGCATCTGCTGCGGGGGTG	49	[12]
Ha5-F Ha5-R	GTGTGACACTGCCCTGGA CAATGGCAAACACTGAAAGCAA	53	[12]
Hita2-F Hita2-R	TGTCCTCACCTTCCTCAGCA GGAATGGAGGTGGAGGCGGC	45	[12]
Ha2-F Ha2-R	CGAAGCCTTTGGCACAATGT TCCCTGACACTGGAAGATGAA	45	[12]
AACC	AACCAACCAACCAACCAACCTT	53	[13]
BGR2-F BGR2-R	ATCACCGACCTACTTGCACC GATTCGGCTTACTGCCTTCC	49	[14]
TC1R1S	GATCGACTCGATGCCACGTCGTTG	49	[15]

\* Примечание: праймеры с обозначениями F и R являются прямым и обратным соответственно, и используются парой, не имеющие такого обозначения праймеры служат в качестве прямого и обратного одновременно и используются по одному.

вне зависимости от принадлежности к определенной выборке [6; 7], и, аналогично, состав всех полиморфных ПЦР-фрагментов. Расчет производили

с помощью программы Statistica 10.0, результат выражали в форме дендрограмм на шкале евклидова расстояния между кластерами.

### Результаты и обсуждение

Кластерный анализ количественных данных о Km кислой фосфатазы и ДНКазы выявил дивергенцию вариантов, которая привела к обособлению четырех основных групп (рис. 1). Каждую группу формируют варианты, действительно наиболее родственные друг другу – особи, отобранные из одной популяции (с одной станции сбора материала). Варианты с 1 по 6 (на рисунке обозначены: Var 1–Var 6) были получены при анализе ферментативной активности у особей, собранных

на станции 1 (р. Вязь). Далее – аналогично: варианты с 7 по 12 получены для особей со станции 2 (р. Мжут), с 13 по 18 – со станции 3 (пос. Фрязино) и с 19 по 24 – со станции 4 (запруда на р. Любосеевка). Номерами станций и были обозначены соответствующие группы вариант (кластеры) на полученной дендрограмме их распределения (рис. 1).

По данным ПЦР-анализа отдельные особи также отличаются индивидуальным набором полиморфных фрагмен-

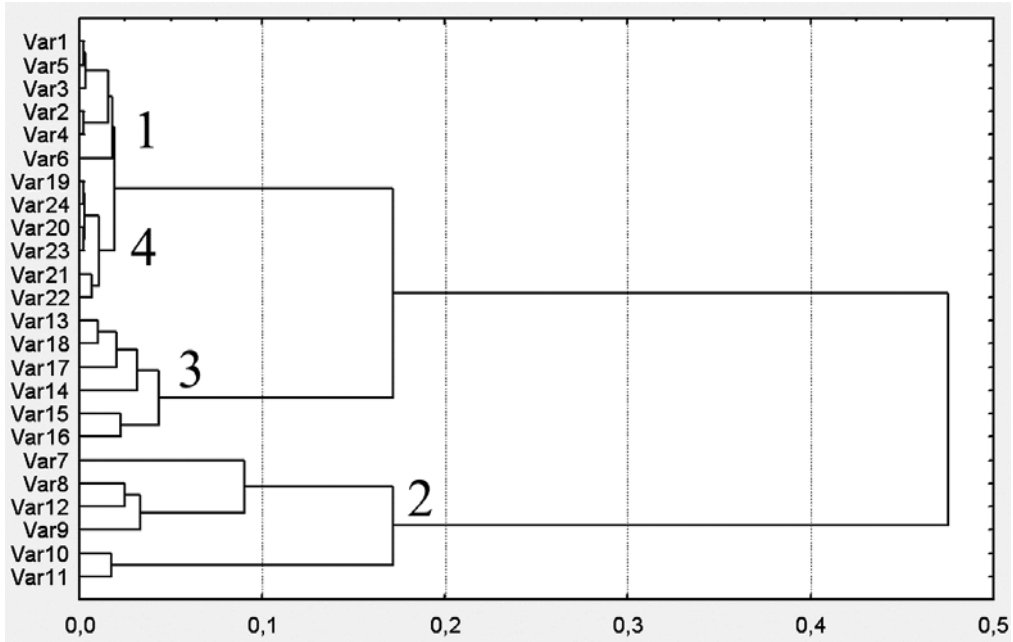


Рис. 1. Дендрограмма распределения особей живородки речной по величинам Кт кислой фосфатазы и ДНКазы, по горизонтальной оси – евклидово расстояние [7]

тов ДНК (159 фрагментов, полученных совокупно со всеми использованными праймерами), при этом собранные на одной станции особи характеризуются наибольшим сходством и распределены по отдельным группам в соответствии с местом их сбора так же, как и при использовании биохимических дифференциаторов (рис. 2).

Однако внутри всей выборки особей из разных мест сбора характер молекулярной и биохимической дифференциации принципиально отличается. Судя по биохимическим параметрам, наибольшим сходством характеризуются популяции моллюсков, обитающих в р. Вязь (станция № 1) и р. Любосеевка (станция № 4). Моллюски из р. Мжут (станция № 2) наиболее сильно отличаются от других исследованных, из лесного ручья вблизи г. Фрязино (станция № 3) занимают

промежуточное положение (см. рис. 1). По данным анализа распределения полиморфных ПЦР-фрагментов, наиболее схожими между собой являются популяции со станций № 1 и № 3, а также в практически равной степени № 2 и № 4 (см. рис. 2).

Прежде всего следует обратить внимание на то, что объединение определенных независимых вариантов в кластеры, которые совпадают с выборками особей из популяций на соответствующих станциях сбора моллюсков, объективно указывает на правомерность примененных нами методик оценки генетической близости. Действительно, к примеру, особи с 1 по 6 (Var 1–Var 6), собранные на станции № 1, формируют свой кластер на обеих дендрограммах, а особи с 7 по 12 (Var 7–Var 12), собранные на станции № 2, – другой. Генетическая

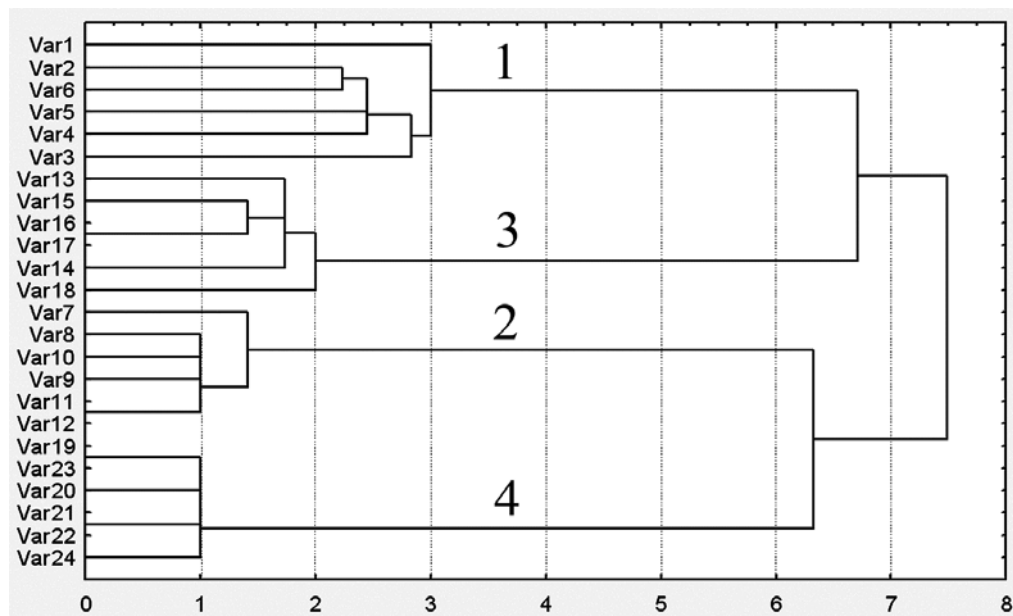


Рис. 2. Дендрограмма распределения особей живородки речной по наборам ПЦР-продуктов, по горизонтальной оси – евклидово расстояние

близость особей внутри одной популяции очевидна и не требует доказательств, и, что наиболее важно в нашем случае, она дает возможность верифицировать статистический метод и критерии, примененные нами для ее оценки.

В тоже время взаиморасположение кластеров – групп особей из отдельных популяций, т.е. характер их дифференциации на дендрограммах требует дополнительного обсуждения. Прежде всего, следует указать на тот факт, что биохимический критерий степени сходства тесно связан с фенотипом, который формируется из качественных и количественных параметров метаболизма. Состав продуктов ПЦР, в которой мишенями служили межмикросателлитные [11; 12] и межтранспозонные [13; 14] фрагменты ДНК, является молекулярной характеристикой генома. Они без ограничений пе-

редаются по вертикали и горизонтали, но поскольку мишени локализованы в нетранскрибируемой части генома, скорее всего, никак не проявляются фенотипически, а следовательно, не подвергаются естественному отбору. Однако поскольку мутации ДНК, индуцированные внешними факторами, могут отразиться на составе продуктов ПЦР, этот признак, в определенной степени, характеризует отношение организма со средой обитания, а значит, сказывается и на кластеризации определенных групп особей, подвергавшихся мутагенному воздействию.

В этой связи наиболее неожиданными результатами оказались те, что касаются р. Вязь (станция № 1) и технического пруда на р. Любосеевка (станция № 4). Согласно общепринятым критериям оценки сапробности, включающим биологическое разнообразие видов, и нашим наблюдениям за состо-

янием водоема, степенью замусоренности и техногенной загрязненности воды эти водоемы крайне отличаются друг от друга, тогда как популяции живородки, обитающие в них, весьма близки по биохимическому критерию и внутри популяций различия между особями чрезвычайно малы. В то же время различия в наборах полиморфных фрагментов ДНК указывают на значительную удаленность станций № 1 и № 4, что вполне соответствует их географическому положению и, возможно, генетической обособленности популяций живородки в них. Невысокий полиморфизм особей со станции № 4 может указывать на монофилетическое происхождение их популяции, что вполне естественно для небольших водоемов техногенного происхождения, и наоборот, самые значительные различия между особями по набору ПЦР-фрагментов выявлены на станции № 1, где не только популяция моллюсков, но и собственно водоем происходит из нескольких источников – реки Вязь, реки Какотка (Пестовское вдхр.), реки Уча (Пяловское вдхр.) и канала им. Москвы (Учинское вдхр.), объединенных в одну акваторию.

В тоже время территориальная близость станций № 3 и № 4, их расположение, по сути, на берегах одного водоема – реки Любосеевка (на станции № 3 имеет вид ручья) не привели к единообразию биохимических и молекулярных дифференциаторов. Напротив, по наборам ПЦР-фрагментов группы особей со станций № 3 и № 4 наиболее сильно отличаются друг от друга, что может указывать только на различие условий существования живородки, подтверждаемое данными о биологическом разнообразии и характером

водопользования на соответствующих акваториях. О том же может свидетельствовать дифференциация особей по величинам  $K_m$ . Для группы 4 можно предположить крайнюю степень адаптированности к специфичным условиям существования (водоем, сильно загрязненный техническим мусором и отходами) и, как следствие, высокую степень сходства особей внутри группы и их отличие от других групп.

Свидетельства генетической удаленности популяции живородки со станции № 2 (р. Мжут) и наиболее значительного отличия ее от других по биохимическому критерию можно трактовать двояко. Географическая удаленность и монофилетическое происхождение популяции, с одной стороны, и необходимость приспосабливаться к переменчивым условиям обитания в водоеме с низкой «буферной емкостью» (как и во всяком небольшом водоеме в отношении экзогенных факторов среды) и значительной техногенной нагрузкой, с другой стороны, приводят к одному и тому же результату – обособлению группы особей со станции № 2, низкому молекулярному полиморфизму внутри группы (как и в группе 4) и высокому адаптивному потенциалу, развитому вследствие обитания в нестабильных условиях с вероятной техногенной нагрузкой. Моллюски, в силу своей привязанности к очень узкой акватории, вынуждены приспосабливаться к таким условиям. При этом внутри популяции возникают многочисленные формы, отличающиеся, с одной стороны, своими биохимическими стратегиями адаптации, а следовательно, метаболическим статусом и его параметрами, в том числе структурно-функциональными харак-



теристиками ферментов [6], а с другой стороны, совокупностью мишеней для амплификации и, как следствие, набором полиморфных ПЦР-продуктов – своеобразным штрих-кодом, или пассивной составляющей уникальности популяции [1].

Таким образом, внутривидовая дифференциация речной живородки может быть следствием как генеалогической истории популяционной структуры вида, так и адаптации к условиям обитания, которая практически не зависит от направлений экспансии вида на смежные акватории. Вполне возможно и одновременное участие обоих факторов, каждый из которых привносит определенный вклад в микроэволюцию, величина которого может быть различной в каждом отдельном случае. Возможность четко различать влияния внутренних и внешних факторов в процесс видообразования позволит осуществлять мониторинг состояния водоемов в условиях все возрастающей техногенной нагрузки на природные гидробиоценозы, например, с целью прогнозирования дальнейшего развития или проведения исторических исследований, однако все это требует дальнейшего более глубокого исследования.

Работа выполнена на средства гранта Президента Российской Федерации для молодых ученых МД1168.2011.4.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях / 3-е изд., перераб. и доп. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2003. – 431 с.
2. Долгов Г.И., Никитинский Я.Я. Гидробиологические методы // Стандартные методы исследования питьевых и сточных вод. – М.: Мосполиграф, 1927. – С. 142–217.
3. Инге-Вечтомов С.Г. Экологическая генетика и теория эволюции // Вестник ВОГиС. – 2009. – Т. 13 (№ 2). – С. 362–371.
4. Поликарпова Л.В., Цветков И.Л., Коничев А.С. Константа Михаэлиса кислой фосфатазы, как критерий антропогенного влияния на внутривидовую дифференциацию леща (*Abramis brama*) в Рыбинском водохранилище // Мат. IV Всерос. конф. по водной экотоксикологии, посв. памяти Б.А. Флерова «Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы» (Борок, 24–29 сентября 2011 г.) [Ч. 1]. – Борок: Изд-во ИБВВ им. И.Д. Папанина, 2011. – С. 203–207.
5. Хочачка П., Сомеро Д. Стратегия биохимической адаптации. – М.: Мир, 1977. – 398 с.
6. Цветков И.Л., Коничев А.С. Биохимические и молекулярно-биологические аспекты адаптации гидробионтов. – М.: МГОУ, 2013. – 122 с.
7. Цветков И.Л., Поликарпова Л.В., Дроганова Т.С., Коничев А.С. Константа Михаэлиса как биохимический критерий внутривидовой дифференциации моллюсков // Вестник Московского государственного областного университета. Серия «Естественные науки». 2012. – № 4. – С. 67–71.
8. Чибисова Н.В., Долгань Е.К. Экологическая химия: учебное пособие. – Калининград: Изд-во Калининградского ун-та, 1998. – 113 с.
9. Шнеер В.С. ДНК-штрихкодирование видов животных и растений – способ их молекулярной идентификации и изучения биоразнообразия // Журнал общей биологии. – 2009. – Т. 70. – С. 296–315.
10. Шнеер В.С. О видоспецифичности ДНК: 50 лет спустя. Обзор // Биохимия. – 2007. – Т. 72. – С. 1690–1699.
11. Antunes R.S.P. Molecular characterization and phylogenetic relationships among species of the genus *Brycon* (Characiformes: Characidae) from four

- hydrographic basins in Brazil / Antunes R.S.P., Gomes V.N., Prioli S.M.A.P. et al. // *Genetics and Mol. Res.* – 2010. – Vol. 9. – P. 674–684.
12. Guiller A. Highly polymorphic microsatellite markers in the landsnail *Helix aspersa* (Mollusca: Gastropoda) / Guiller A., Arnaud J.-F., Vautrin D., Solignac M. // *Mol. Ecol.* – 2000. – Vol. 9. – P. 1191–1193.
13. Martin E. Identification of 1088 new transposon insertions of *Caenorhabditis elegans*: a pilot study toward large-scale screens / Martin E., Laloux H., Couette G. et al. // *Genetics.* – 2002. – Vol. 162. – P. 521–524.
14. Raghavana N. Nimbus (BgI): an active non-LTR retrotransposon of the *Schistosoma mansoni* snail host *Biomphalaria glabrata* / Raghavana N., Tettelinb H., Millera A. et al. // *Int. J. Parasitol.* – 2007. – Vol. 37. – P. 1307–1318.
15. Martin E., Laloux H., Couette G. et al. Identification of 1088 new transposon insertions of *Caenorhabditis elegans*: a pilot study toward large-scale screens // *Genetics.* 2002. Vol. 162. P. 521–524.