

Содержание

ФЕОДОСИЙ ГРИГОРЬЕВИЧ ДОБРЖАНСКИЙ – 110 ЛЕТ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ <i>И.А. Захаров</i>	213
СЕЛЕКЦИЯ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К МЕСТНОЙ ПОПУЛЯЦИИ И К ВИРУЛЕНТНОЙ РАСЕ Ug 99 СТЕБЛЕВОЙ РЖАВЧИНЫ В УСЛОВИЯХ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ <i>В.П. Шаманин, А.И. Моргунов, Я. Манес, Ю.И. Зеленский, А.С. Чурсин, М.А. Левинунов</i>	223
РОЛЬ ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫХ РИБОНУКЛЕАЗ В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ <i>С.С. Сангаев, А.В. Кочетов, С.С. Ибрагимова, Б.А. Левенко, В.К. Шумный</i>	232
ГЕНЕТИКА И ФЕНОГЕНЕТИКА МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ РАСТЕНИЙ <i>Р.С. Юдина</i>	243
ДИНАМИКА СОХРАННОСТИ И ПРОДУКТИВНОСТИ НАСТОЯЩИХ ТОПОЛЕЙ ПРИ ИСПЫТАНИИ В УСЛОВИЯХ УМЕРЕННОГО КЛИМАТА <i>А.П. Царев, Р.П. Царева, В.А. Царев</i>	255
ВЗАИМОСВЯЗЬ АЛЛОЗИМНОГО РАЗНООБРАЗИЯ В ПОПУЛЯЦИЯХ ТРЕХ ВИДОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ (<i>MYODES RUTILUS</i>, <i>MYODES GLAREOLUS</i>, <i>SOREX ARANEUS</i>) С ЗАРАЖЕННОСТЬЮ ГЕЛЬМИНТАМИ <i>О.Н. Жигилева</i>	265
РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С В МОСКВЕ СРЕДИ ЛИЦ, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСОМ ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА <i>В.Е. Ведерников, О.Ю. Туманова, М.К. Иванов, Г.М. Дымищ</i>	273
ПАЛЕОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ В АРХЕОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ <i>А.С. Пилипенко, В.И. Молодин, А.Г. Ромащенко</i>	280
СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МАРК/ЕРК-ЗАВИСИМОГО АЦЕТИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ В ЦНС ВЗРОСЛЫХ И ЮВЕНИЛЬНЫХ <i>HELIX</i> ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ДОЛГО-ВРЕМЕННОЙ ПАМЯТИ <i>А.Б. Данилова, П.Д. Лисачев, Л.Н. Гринкевич</i>	312

АКТИВАЦИЯ КОНСТИТУТИВНОГО РЕЦЕПТОРА АНДРОСТАНОВ И ПОВЫШЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ЕГО ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ В ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ОРТО-АМИНОАЗОТОЛУОЛА

М.А. Сметанина, М.Ю. Пахарукова, Т.И. Меркулова 320

РЕПАРАЦИЯ МЕЖЦЕПОЧЕЧНЫХ СШИВОК МОЛЕКУЛЫ ДНК

Е.В. Долгова, А.С. Лихачева, К.Е. Орищенко, Е.А. Алямкина, С.С. Богачев, М.А. Шурдов 332

СИМБИОГЕНЕТИКА И СЕЛЕКЦИЯ МАКРОСИМБИОНТА НА ПОВЫШЕНИЕ АЗОТ-ФИКСАЦИИ НА ПРИМЕРЕ ГОРОХА (*PISUM SATIVUM L.*)

К.К. Сидорова, В.К. Шумный, Е.Ю. Власова, М.Н. Гляненко, Т.М. Мищенко, Г.Г. Майстренко .. 357

ОТЧЕТ О ДЕЯТЕЛЬНОСТИ НОВОСИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ ВОГиС ЗА 2004–2009 гг.

И.Ф. Жимулев, Н.П. Гончаров, В.С. Коваль 375

Content

THEODOSIUS DOBZHANSKY – IN HONOR OF 110th ANNIVERSARY <i>I.A. Zakharov</i>	213
BREEDING OF SPRING COMMON WHEAT FOR RESISTANCE TO LOCAL POPULATIONS AND VIRULENT RACE Ug 99 OF STEM RUST IN WEST SIBERIA <i>V.P. Shamanin, A.I. Morgunov, J. Manes, Y. Zelenskiy, A.S. Chursin, M.A. Levshunov</i>	223
PHYSIOLOGICAL ROLE OF EXTRACELLULAR RIBONUCLEASES IN HIGHER PLANTS <i>S.S. Sangaev, A.V. Kochetov, S.S. Ibragimova, B.A. Levenko, V.K. Shumny</i>	232
GENETICS AND PHENOGENETICS OF MALATE DEHYDROGENASE IN PLANTS <i>R.S. Yudina</i>	243
THE TIME PATTERN OF SURVIVAL AND PRODUCTIVITY OF EUPOPULUS TESTED IN THE TEMPERATE CLIMATIC BELT <i>A.P. Tsarev, R.P. Tsareva, V.A. Tsarev</i>	255
CORRELATION BETWEEN ALLOZYME DIVERSITY IN POPULATIONS OF THREE MAMMALIAN SPECIES (<i>MYODES RUTILUS</i>, <i>MYODES GLAREOLUS</i>, AND <i>SOREX ARANEUS</i>) AND HELMINTH INFECTION RATE <i>O.N. Zhigileva</i>	265
PREVALENCE OF HEPATITIS C VIRUS GENOTYPES AMONG HIV-POSITIVE MOSCOW RESIDENTS <i>V.E. Vedernikov, O.Y. Tumanova, M.K. Ivanov, G.M. Dymshits</i>	273
PALEOGENETIC ANALYSIS IN ARCHAEOLOGICAL STUDIES <i>A.S. Pilipenko, V.I. Molodin, A.G. Romashchenko</i>	280
COMPARATIVE STUDY OF MAPK/ERK-DEPENDENT PROTEIN ACETYLATION IN THE CNS OF ADULT AND JUVENILE <i>HELIX</i> DURING LONG-TERM MEMORY FORMATION <i>A.B. Danilova, P.D. Lisachev, L.N. Grinkevich</i>	312
ORTHO-AMINOAZOTOLUENE ACTIVATES THE CONSTITUTIVE ANDROSTANE RECEPTOR AND INCREASES THE EXPRESSION OF ITS TARGET GENES IN THE MOUSE LIVER <i>M.A. Smetanina, M.Y. Pakharukova, T.I. Merkulova</i>	320

REPAIR OF INTERSTRAND CROSSLINKS IN A DNA MOLECULE <i>E.V. Dolgova, A.S. Likhacheva, K.E. Orishchenko, E.A. Alyamkina, S.S. Bogachev, M.A. Shurdov</i>	332
GENETICS OF SYMBIOSIS AND BREEDING OF A MACROSYMBIONT FOR INTENSE NITROGEN FIXATION BY THE EXAMPLE OF PEA <i>K.K. Sidorova, V.K. Shumny, E.Yu. Vlasova, M. N. Glyanenko, T.M. Mishchenko, G.G. Maystrenko ..</i>	357
A REPORT ON THE ACTIVITY OF NOVOSIBIRSK BRANCH OF VAVILOV SOCIETY FOR GENETICISTS AND BREEDING SCIENTISTS FOR 2004-2009 <i>I.F. Zhimulev, N.P. Goncharov, V.S. Koval</i>	375

ФЕОДОСИЙ ГРИГОРЬЕВИЧ ДОБРЖАНСКИЙ – 110 ЛЕТ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ

И.А. Захаров

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия, e-mail: iaz34@mail.ru

Феодосий Григорьевич Добржанский родился на Украине, получил образование в Киеве. На его становление как энтомолога и генетика оказали влияние такие ученые, как В.Н. Лучник, С.Е. Кушакевич, Г.А. Левитский. В 1924–1927 гг. Ф.Г. Добржанский работал на кафедре генетики и экспериментальной зоологии Ленинградского университета, руководимой Ю.А. Филипченко. В конце 1927 г. он был командирован в США в лабораторию Т. Моргана, где и остался. В начале 1930-х гг. начал разрабатывать проблемы эволюционной и популяционной генетики. Мировая известность пришла к Ф.Г. Добржанскому после выхода его книги «Генетика и происхождение видов», в которой он осуществил синтез генетики и теории эволюции. В книге были широко представлены достижения российской биологической науки.

Ключевые слова: Ф.Г. Добржанский, история генетики, генетика популяций, *Drosophila*, Coccinellidae.

Феодосий Григорьевич Добржанский, один из выдающихся генетиков XX в., родился 110 лет назад, 25 января (по новому стилю) 1900 г. В его родословной слились польские и украинские корни: отец происходил из шляхетского рода, мать была дочерью и внучкой православных священников в западных губерниях России. Отец Феодосия Григорьевича, Григорий Карлович, был учителем математики (по другим сведениям – гимназическим надзирателем) в гимназии города Немиров, под Винницей.

Примечательным фактом является родство Ф.Г. Добржанского с великим русским писателем Ф.М. Достоевским: мать Феодосия Григорьевича, Софья Васильевна, была дочерью Олимпиады Ивановны Черняк (в замужестве Войнарской), двоюродной сестры Федора Михайловича; их общий дед, Андрей Григорьевич Достоевский – священник в Подольской губернии, служивший в селе Войтовцы близ того же Немирова (Богданов, Роговой, 2008).

Феодосий, единственный сын своих родителей, появился на свет в г. Немиров 12 января (по старому стилю), т. е. на следующий день после дня памяти преподобного Феодосия Великого, в честь которого и был крещен. Раннее его детство прошло в Немирове, где в 1909 г.

Феодосий пошел в первый класс гимназии. Тогда же у него появился интерес к биологии – к коллекционированию бабочек; по-видимому, этот интерес возник без прямого влияния родителей. На следующий год семья переехала в Киев, где будущий ученый продолжил свое образование.

Ф.Г. Добржанский в 1931 г. сообщает о себе следующее: «... родился 12 (25) января 1900 года в Немирове Подольской губ. Учился в Киевской 6-й гимназии, которую окончил в 1917 г., и на физико-математическом факультете (естественном отделении) Киевского университета, который окончил в 1921 г. Состоял аспирантом при кафедре зоологии при Украинской академии наук (1921–1924).

В 1920–1923 гг. служил ассистентом при кафедре зоологии в Киевском политехническом (сельскохозяйственном) институте. Был зоологом Зоологического музея Украинской академии наук (1920–1922). Был лектором по биологии и зоологии на рабфаке при Киевском политехникуме (1922–1923) и лектором по биологии в Киевском педагогическом институте (1922–1923)» (У истоков..., 2008. С. 424, 425).

Реализованный талант, во всяком случае научный, – это результат благоприятного со-

четания факторов наследственности и среды. Несмотря на то что юность Ф.Г. Добржанского прошла в трудных условиях революции и гражданской войны на Украине, ему повезло на хороших учителей и на возможность общаться с выдающимися учеными, которые, несомненно, и определили его путь в науку.

Первым среди учителей должен быть назван Виктор Николаевич Лучник (1892–1936). Гимназистом Ф. Добржанский познакомился со студентом В.Н. Лучником, впоследствии ставшим известным энтомологом, специалистом по жукам-жужелицам. Примечательно, что В.Н. Лучник, переехавший в Киев в 1914 г., в этом году опубликовал свою единственную популярную работу, посвященную божьим коровкам. Вскоре после этого и состоялась его встреча с Ф. Добржанским, который был направлен В.Н. Лучником на изучение именно божьих коровок. Впоследствии один из видов божьих коровок, описанный Ф.Г. Добржанским, был назван в честь первого учителя (*Coccinella lutshniki* Dobzh. – в настоящее время он считается подвидом *Coccinella saucerotiei* Muls.).

Университетским учителем Ф.Г. Добржанского стал профессор зоологии Киевского университета С.Е. Кушакевич (1873–1920). Сейчас он мало известен и о нем следует сказать подробнее (сведения заимствованы из <http://baksheev.com.ua/articles/biblioteka-semi-baksheevih/276/>). С.Е. Кушакевич учился у знаменитого зоолога Рихарда Гертвига в Мюнхене и входил в «мюнхенскую семью зоологов», подолгу работая там. Спустя многие годы известный генетик Р. Гольдшмит вспоминает о Кушакевиче как о превосходном всесторонне образованном зоологе, который при своем огромном, почти двухметровом, росте был изысканным и чувствительным человеком, глубоко интересующимся искусством, особенно античной классикой. Он был прекрасным попутчиком в путешествиях, всегда дружелюбный и приветливый. Писал о нем и В.И. Вернадский, что помнит с ним интересные, живые разговоры о различных, больших и мелких проблемах биологии, философии, текущей жизни. От него он впервые узнал о генах... Жизнерадостный, полный научных планов, широкообразованный и замечательно милый человек... Это был настоящий университетский учитель, от которого надо было ждать многого...

Кушакевич познакомил 18-летнего Ф. Добржанского с рядом профессоров Петроградского университета, которые переехали в Киев с началом гражданской войны. Среди них самым выдающимся был В.И. Вернадский (1863–1945). Когда в Киев вошла Красная Армия, Кушакевич, бывший директором Днепровской биологической станции, и Вернадский летом 1919 г. переселились на станцию, располагавшуюся в доме лесничего, на левом берегу Днепра под Киевом. Ф. Добржанский носил туда им продукты. В конце 1919 г. Ф. Добржанский последний раз встретился с Кушакевичем в Одессе, откуда Кушакевич попытался выехать в Западную Европу, но по дороге заболел тифом и умер.

Потерявший родителей (отец умер в 1918 г., мать – в 1920 г.) Ф.Г. Добржанский оставался в Киеве; здесь он не только познакомился с Г.А. Левитским и слушал его лекции, но и жил с ним в одной квартире. Если со знакомства с В.Н. Лучником началось серьезное увлечение Ф.Г. Добржанского энтомологией, то первым учителем в генетике для него был, безусловно, Г.А. Левитский (1878–1942), выдающийся цитолог, автор одних из первых в СССР учебников по биометрии и по цитогенетике: его руководство «Материальные основы наследственности» было издано в Киеве в 1924 г. По словам Ю.Л. Горощенко, слушавшего лекции Ю.А. Филипченко, Г.Д. Карпеченко и Г.А. Левитского, последний был лучшим лектором по генетике. Кажется естественным, что он смог оказать значительное влияние на молодого энтомолога, «заразив» его генетикой.

Первая энтомологическая статья Ф.Г. Добржанского была опубликована, когда ему было 17 лет. В свой киевский период Ф.Г. Добржанский опубликовал и подготовил 11 работ (некоторые были изданы в 1924 г., когда он уже жил в Ленинграде) разного характера – по фаунистике, биологии (диапауза, скопление жуков на зиму), географической изменчивости, анатомии божьих коровок, 3 из них вышли на немецком языке.

Появившийся интерес к генетике привел Ф.Г. Добржанского в 1922 г. в Москву. Здесь в лаборатории С.С. Четверикова он смог получить первые лабораторные линии дрозофилы (незадолго до этого привезенные в СССР Г. Меллером). С дрозофилой Феодосий Григорьевич

начал работать еще в Киеве, как бы продолжив на этом объекте одно из направлений своих исследований на божьих коровках: он изучал половой аппарат разных видов коровок как важный систематический признак, на дрозофиле была выполнена работа о половом аппарате различных мутантов.

Рукопись именно этой статьи Феодосий Григорьевич привез в августе 1923 г. в Петергоф, в Биологический институт университета (У истоков..., 2008. С. 396) (где ему впоследствии пришлось некоторое время работать) и, вероятно, именно тогда Ю.А. Филипченко пригласил молодого энтомолога переехать в Петроград. К переезду в начале 1924 г. в Петроград–Ленинград Ф.Г. Добржанский был квалифицированным энтомологом, получившим подготовку и в области генетики – как теоретическую, так и практическую, в виде опыта работы с мутантными линиями дрозофилы.

Ф.Г. Добржанский проработал в Ленинградском университете в должности ассистента кафедры генетики и экспериментальной зоологии 4 года, с января 1924 по декабрь 1927 гг. Помимо педагогической и исследовательской лабораторной работы, Феодосий Григорьевич осуществил три экспедиции в Среднюю Азию, две последние – в качестве руководителя.

В одном из писем Ф.Г. Добржанский писал: «... у меня, видно, имеется этот самый так называемый ген бродяжничества» (У истоков..., 2008. С. 237). Первые две поездки на Кавказ он совершил еще гимназистом. Летом 1925 г. он отправился с молодой женой (Натальей Петровной Сиверцевой-Добржанской) в Узбекистан, где посетил Ташкент, Джелалабад, район Ферганского хребта, Андижан, совершая многодневные поездки верхом и коллекционируя насекомых. В 1926 и 1927 гг. Феодосий Григорьевич с сотрудниками и студентами кафедры



Ф.Г. Добржанский, Ю.А. Филипченко и участники экспедиции 1926 г.

Сидят, слева направо: Ф.Г. Добржанский, Ю.А. Филипченко, Я.Я. Лус; стоят: В.И. Савельев, Н.Н. Медведев.

генетики ЛГУ по заданию Ю.А. Филипченко участвовал в двух экспедициях по изучению животноводства Казахстана.

Экспедиции организовывались на средства, выделенные Комиссией по изучению естественных производительных сил СССР (КЕПС). В 1926 г. экспедиция провела обследование животноводства в Семиреченской области (по административному делению того времени) Казахской ССР, посетив районы Асинско-Чиликский, Кастекский, Илийский, Копальский, Лепсинский, Алакульский. В 1927 г. работа велась в Каркаралинском, Чингизском, Кокпектинском, Тарбагатайском, Алтайском районах Семипалатинской области (Медведев, 2006). В состав отряда в 1926 г. входили Я.Я. Лус и студенты Н.Н. Медведев и В.И. Савельев, в 1927 г. – Я.Я. Лус, студенты Б.П. Войтяцкий, Ю.Я. Керкис, Н.Н. Колесник, Н.Н. Медведев. Руководителем отрядов был Ф.Г. Добржанский.

Сохранились дневники, которые Феодосий Григорьевич вел в первой экспедиции; к сожалению, опубликованы лишь краткие из них выдержки (Из дневника..., 2000). Не сохранилось писем Феодосия Григорьевича, написанных во время первой экспедиции; зато письма из второй, адресованные Ю.А. Филипченко, опубликованы и дают представление о том, как шла работа экспедиционного отряда.

Итоги работ экспедиций были подведены в двух сборниках (Добржанский и др., 1927, 1928). В первом из них была помещена статья Ф.Г. Добржанского «Лошадь кочевого населения Семиречья», занявшая без приложений 90 страниц. В статье 12 фотографий лошадей, сводные таблицы со статистической обработкой промеров. В приложении (еще 26 страниц) результаты измерений (22 промера каждого животного) 402 кобыл и 55 жеребцов. В сборник 1928 г. вошли две подобные же статьи Ф.Г. Добржанского: одна посвящена лошадям обследованного в 1927 г. региона, другая – мараловодству на южном Алтае.

Итог своей научной деятельности в СССР подвел сам Ф.Г. Добржанский в письме, написанном перед его отъездом в США. Письмо было адресовано М.В. Волоцкому (Богданов, 2000), который собирал материалы о родственниках Ф.М. Достоевского. Феодосий Григорьевич написал: «... беру имеющийся под руками список,

где значится около половины работ... В качестве пояснения добавлю следующее. Мне пришлось работать в трех направлениях: 1) систематика, 2) генетика, 3) зоотехния. Главным я считаю второе – в этом, выражаясь громко, моя душа. Первое – остатки юношеского увлечения насекомыми, от которого до сих пор не могу освободиться. Третье – работа по принуждению, от которой я стараюсь освободиться по мере возможности». В приложенном списке – 18 публикаций (Богданов, 2000). По более полному списку (У истоков..., 2008. С. 425–429) к 1928 г. Ф.Г. Добржанский опубликовал 35 работ. К ряду генетических, опубликованных до 1928 г., Ф.Г. Добржанский в последнем списке отнес две свои первые публикации, посвященные дрозофиле – особенностям полового аппарата мутантов и множественному проявлению некоторых генов, две работы по географической изменчивости божьих коровок (*Harmonia axyridis*, *Coccinella septempunctata*) и статью о наследовании мастей киргизских лошадей. Феодосий Григорьевич в раздел «Популярные работы, рефераты» включил две важные публикации: большое (на 119 страницах) систематическое изложение основ генетики «Что и как наследуется у живых существ» (Л.: Госиздат, 1926) и «Обзор генетических исследований видов рода *Drosophila*». Первая работа, возможно, писалась как пособие к курсу лекций по генетике или служила конспектом, в котором систематизированы собственные представления молодого преподавателя о содержании науки генетики. Вторая работа является развитием и конкретизацией представлений Ю.А. Филипченко о гомологической изменчивости (высказанных в связи с законом гомологических рядов Н.И. Вавилова). Феодосий Григорьевич очень четко на материале рода *Drosophila* представил генетические основы гомологических рядов изменчивости. Данные им формулировки кажутся совершенно приемлемыми и в настоящее время. Феодосий Григорьевич, в частности, писал: «Итак, сравнительное изучение видов *Drosophila* показало, что: 1) различные виды обладают гомологичными или даже идентичными генами; 2) эти гомологичные гены способны давать и действительно дают одинаковые как фенотипически, так и по их генетическому поведению мутации; 3) расположение гомологичных генов

друг относительно друга в соответствующих хромосомах у близких видов в общем и целом одинаково; 4) однако особенно у более далеких видов могут наблюдаться перестановки гомологичных генов или отрезков хромосом друг относительно друга в пределах хромосомы; а также 5) перестановка отрезков одной хромосомы в другую хромосому; 6) распадение хромосомы на две части» (Добржанский, 1925. С. 52).

Особо надо сказать о том, как в ленинградский период складывались отношения Феодосия Григорьевича с руководителем кафедры Ю.А. Филипченко. Не сохранилось материалов, которые бы показывали обстановку на кафедре генетики в 1924–1927 гг., т. е. в то время, когда Феодосий Григорьевич пришел на кафедру и начал работать под руководством Ю.А. Филипченко. Мы можем представить только итог развития их отношений, сложившихся в это время, по многочисленным письмам ученых 1928–1930 гг., которые сохранились и опубликованы (У истоков..., 2008). Несмотря на значительную разницу в возрасте – 18 лет и в их служебном положении, между Юрием Александровичем и Феодосием Григорьевичем сложились близкие, можно сказать – товарищеские отношения. В письмах Феодосия Григорьевича, хотя он, несомненно, глубоко уважал Юрия Александровича, не видно особого почтения, никакого пиетета, обращение как к товарищу. Вместе с тем (нет оснований сомневаться в искренности) выражения не только дружеских чувств, но и большого уважения к Юрию Александровичу как к учителю. Тем не менее служебные отношения складывались, видимо, подчас напряженно. Приведу несколько цитат из писем Феодосия Григорьевича (У истоков..., 2008. С. 135, 226, 267).

«... мы с вами не всегда согласны в том, что есть лучшее. Правда, вы все же никогда не мешали мне идти своей дорогой, это я тоже ценю. И если у нас бывали недоразумения, и даже сейчас бывают, то это ни на минуту не меняет моего уважения к вам, хотя я не скрываю того, что подчас ваша десница очень больно давила мне плечо. Но все же я предпочитаю работать с человеком, которого люблю и уважаю, чем с более легким человеком, в отношении которого ко мне я не уверен».

«Мое отношение к вам лично, надеюсь, не вызывает у вас сомнений, равно как у меня не

вызывает сомнений ваше отношение лично ко мне. За четыре года нашей совместной работы не было ни единого инцидента и даже ни единого неудовольствия на личной почве... Кроме того, я не забыл и не забуду о том факте, что эти два года в Америке, которые дали мне так много, я получил только благодаря вам. Уже это одно – достаточный повод, чтобы быть вам благодарным... То, о чем вы пишете, относится к нашим отношениям на служебной почве. Я никогда не скрывал, что эти отношения для меня были тяжелы до невыносимости, и не что иное, как ужас берет меня при мысли, что это может начаться опять. Ни минуты не хочу сказать, что в этом не было моей вины... причину я усматриваю в наличии у меня известной (умной или глупой – иной вопрос) своей линии и своих взглядов на вещи и в свойстве вашего характера не допускающего или допускающего с трудом присутствия вблизи субъекта с указанными выше свойствами».

«... читая это ваше письмо (от 30.12.1929 – И.З.) я понял вашу душевную красоту больше, чем за 4 года совместной работы и за эти два года жизни врозь».

Из содержания писем достаточно ясно, что именно вызывало напряженность. Во-первых, и, по-видимому, это главное – «принуждение» заниматься «зоотехнией», изучением сельскохозяйственных животных. Второе – научные споры, получившие продолжение и в переписке, по поводу роли плазмона, т. е. цитоплазмы клетки, в наследственности и видообразовании – роли, признававшейся Ю.А. Филипченко и горячо отвергавшейся Феодосием Григорьевичем.

Хотя Ю.А. Филипченко очень рассчитывал на возвращение и активное включение в работу Феодосия Григорьевича, он, тем не менее, давал свое полное согласие на продолжение его работы за границей. Так, он писал: «... нигде и никогда вы не будете так хорошо и спокойно работать, как у Моргана. Поэтому, сколько есть возможности продлить там пребывание – на полгода, год, два – продлевайте! Если не удастся или не захотите, я приму вас с распростертыми объятиями, и будем делить вместе горе и радость, хотя первого здесь больше, чем последнего» (У истоков..., 2008. С. 351). «Если бы вам представилась возможность остаться в Америке на некоторое (небольшое) число лет – 3, 4, 5 – этим, безусловно,

следует воспользоваться... 3–4 года работы в моргановской лаборатории сделали бы из вас, Феод. Григ., если не второго Моргана, то, по крайней мере, одного из самых блестящих морганоидов вроде Стертеванта»... «Повторяю, если бы вы остались надолго, мы очень бы жалели об этом за нас, но очень радовались бы за вас!» (У истоков..., 2008. С. 353, 354).

В своем пожелании или предвидении Ю.А. Филипченко оказался прав: Ф.Г. Добржанский действительно вошел в первую пятерку или даже тройку (после Моргана и Меллера) генетиков второй трети XX в.!

Опубликованная переписка с Ю.А. Филипченко, а потом с Н.И. Вавиловым охватывает 3,5 года (1928–1931). Все это время Феодосий Григорьевич стремился не порывать связей с СССР и в то же время иметь возможность продолжать до какого-то логического завершения начатые в США исследования. Лишь сообщение об уходе из Ленинградского университета Ю.А. Филипченко (У истоков..., 2008. С. 392–402) побудило Феодосия Григорьевича послать заявления об увольнении и из ЛГУ, и из Академии наук СССР (Бюро генетики КЕПС). Сомнения в возможности остаться в США продолжались, однако, и после смерти Ю.А. Филипченко. Феодосий Григорьевич вступил в переписку с Н.И. Вавиловым, который предлагал ему работать либо в лаборатории генетики АН СССР, либо в учреждениях Академии сельскохозяйственных наук. Н.И. Вавилов писал, в частности: «Мы очень хотим, чтобы вы возможно скорее приезжали и развернули бы свою работу, и со стороны Академии наук будут приняты меры к тому, чтобы всячески содействовать вам в вашей работе» (У истоков..., 2008. С. 435), а также «... переходите Рубикон, трудности будут, но поскольку ваша работа нужна, ценится, все преодолимо и, повторяю, в Академии наук мы нуждаемся в вашей работе» (С. 434), «конечно, думаем мы уже по-разному теперь в Соединенных Штатах и в СССР, но не сомневаюсь, что при всех перипетиях бытия интереснее много в Советской стране» (С. 433).

В августе 1931 г. Феодосий Григорьевич принял, наконец, окончательное решение. Он написал Н.И. Вавилову: «... при всем моем уважении к Вам лично, при всем моем искреннем желании работать в Академии наук, а не

здесь (знаю, что в искренности этого желания многие сомневаются, но это их дело – я говорю, что думаю) вижу, что из этого ничего не выйдет» (У истоков..., 2008. С. 436). «Хуже всего то, что, судя по вашему письму, от меня потребовалось бы то, что я не могу делать... те требования о стиле и характере писания, о которых вы говорите, делают для меня положение невозможным. С этим стилем я не знаком, а поскольку знаком – чувствую себя не в силах ни его принять, ни даже под него подделываться. А к тому же, ясное дело, и лабораторию надо вести в том же духе. Значит, с первых же шагов – неприятности, унижения и прочее».

Надо признать, что находившийся уже более 3 лет вне СССР Ф.Г. Добржанский более реалистично, чем Н.И. Вавилов, оценил складывающуюся на родине обстановку. Период его колебаний закончился, Феодосий Григорьевич решил остаться в США.

В письме от 16.08.1928 г. Феодосий Григорьевич, побывавший на энтомологическом конгрессе, писал: «Я очень ясно почувствовал, что я уже не энтомолог и никакого отношения к энтомологии не имею» (У истоков..., 2008. С. 89). Тем не менее Феодосий Григорьевич продолжал сборы кокцинелл и изучение коллекций и опубликовал в США 3 статьи, в одной из которых дал наиболее полную сводку по географической изменчивости божьих коровок (Dobzhansky, 1933a).

Начав работать в генетической лаборатории Т. Моргана, Феодосий Григорьевич, в письме от 9.06.1928, так написал о своих занятиях: «нарочно выбираю вещи in different directions, чтобы взять в лаборатории максимум возможного» (У истоков..., 2008. С. 63). Исследования на *Drosophila melanogaster* велись им в нескольких направлениях, главные – изучение интерсексов, влияние хромосом на размер клеток и получение после рентгенизации и изучение транслокаций, в частности, их использование для составления цитологических карт хромосом. В связи с этим Феодосий Григорьевич прекрасно освоил цитологические методы и успешно получал препараты митотических хромосом дрозофилы – крайне трудный материал для микроскопического изучения. Своим «детисцем» в то время он считал изучение плейотропизма генов, чем он также продолжал заниматься.

Все перечисленное было, однако, достаточно далеко от интересовавших Феодосия Григорьевича проблем эволюции и от того, что он назвал географической генетикой, которая ему была «близка» (У истоков..., 2008. С. 265). Свой путь в этих направлениях он нащупал лишь в начале 1930-х гг.

Еще в 1928 г. Феодосий Григорьевич обратил внимание на сделанный в лаборатории Моргана доклад некоего Ланцефильда о стерильности межрасовых гибридов *Drosophila* («Lancefield нашел вещь, которой нет цены. Он нашел две расы *Drosophila obscura* [в дальнейшем переименована в *D. pseudoobscura* – И.З.], плодовые *inter se*, но полубесплодные при скрещивании... Можно только пожалеть, что это нашел Ланцефильд, а не кто-либо другой. Этот мужчина порядочно глуп, и у меня даже такое представление, что он сам не понимает, что он держит в своих руках. А ведь между-видовая стерильность это – о!, нечто вроде драгоценного клада, пути к которому еще никто не знает. И если только этот орешек удалось бы разгрызть, то генетика видообразования была бы совершенно ясна» (У истоков..., 2008. С. 78). Феодосий Григорьевич не смог пропустить этот клад и обратился к изучению *Drosophila pseudoobscura*. В 1933 г. он опубликовал первые работы, посвященные этому виду, в которых цитологически проанализировал поведение хромосом в мейозе у стерильных гибридов (Dobzhansky, 1933b) и оценил роль Y-хромосомы и аутосом в гибридной стерильности (Dobzhansky, 1933c).

В 1934 г. Пайнтер описал политенные хромосомы *Drosophila melanogaster*. Его техника была «взята на вооружение» сотрудниками лаборатории Моргана, особенно успешно ее использовал К. Бриджес. Метод освоил и стажер китаец Тан, которому, по его словам, приготовление давленных препаратов показал Феодосий Григорьевич (Genetics of Natural Populations, 1995. С. 4). В 1935 г. Тан опубликовал детальное описание гигантских хромосом *Drosophila pseudoobscura*. Работы Феодосия Григорьевича, опубликованные в том же году, еще были выполнены традиционной цитологической техникой, и лишь позднее изучение структуры гигантских хромосом стало основным методом работы Феодосия Григорьевича и его сотрудников.

Drosophila pseudoobscura оказалась объектом, исключительно хорошо соответствующим интересам Феодосия Григорьевича. Помимо существования двух рас (впоследствии одна из них была признана Ф.Г. Добржанским самостоятельным видом) и нескольких близких скрещивающихся с ней видов, она показала большой внутривидовой хромосомный полиморфизм и, это, может быть, было особенно важным, обитала на огромном ареале, от Канады до Гватемалы, что давало возможность изучать популяции, существующие в различных экологических условиях. Феодосий Григорьевич в 1935 г. предпринял экспедицию для сбора дрозофил, объехав штаты Колорадо, Аризона, Нью-Мексико и посетив Мексику. В дальнейшем он еще несколько раз ездил в Мексику, где популяции оказались особенно богаты на инверсии.

В двух совместных работах Стертевант и Добржанский (Dobzhansky – так в США стала писаться фамилия Феодосия Григорьевича) показали, что путь эволюции вида может быть реконструирован при сравнительном изучении хромосом с инверсиями, выявляемыми на политенных хромосомах *Drosophila pseudoobscura* (Sturtevant, Dobzhansky, 1936; Dobzhansky, Sturtevant, 1938). По утверждению Новицкого (Novitski, 2005), идея этого подхода принадлежала Стертеванту. Здесь следует остановиться на отношениях этих двух выдающихся генетиков.

Уже через полгода после приезда в Америку Ф.Г. Добржанский писал Ю.А. Филипченко, что он особенно сблизился с А. Стертевантом. Вообще последний сыграл особенную роль в жизни Феодосия Григорьевича. Вместе со Стертевантом были начаты работы по эволюционной генетике, которая вскоре стала основным научным направлением Ф.Г. Добржанского. В значительной степени именно Стертеванту Ф.Г. Добржанский обязан тем, что сроки его работы в лаборатории Моргана, куда Феодосий Григорьевич приехал на годовую стажировку, продлевались и продлевались. Сам Феодосий Григорьевич говорил впоследствии, что Стертеванту он обязан тем, что был приглашен остаться в США. Следовательно, именно ему определенно обязан своей жизнью, так как, без сомнения, его бы не было в живых, если бы он вернулся в Россию (Novitski, 2005. С. 187). Позднее близкие дружеские и рабочие отношения

Ф.Г. Добржанского и Стертеванта испортились. Изданная много лет спустя и посвященная им книга была названа «Sturtevant and Dobzhansky. Two Scientists at Odds» (Двое ученых не в ладах) (Novitski, 2005). Дж. Кроу писал, что ... затем прошла трещина. Для тех, кто хорошо знал обоих, это не было удивительно. Добржанский был общительным и ярким, вел работу по интуиции и быстро, охватывал широкий спектр проблем и неустанно публиковался. Стертевант же был спокойным и сдержанным, работал вдумчиво и медленно, делал немного, но очень тщательно, и публиковался с осторожностью (Novitski, 2005. С. vi). Новицкий (кстати, к Ф.Г. Добржанскому относящийся, судя по всему, весьма неприязненно) одной из возможных причин разлада считает религиозность Ф.Г., православного христианина, которая могла, по его мнению, претить атеистически настроенному Стертеванту.

Помимо несходства натур и, возможно, каких-то личных поводов к конфликту, у Ф.Г. Добржанского сложился иной, чем у Стертеванта взгляд на будущее генетики. Летом 1938 г. Добржанский говорил Новицкому, что Стерт(евант) и Морган будущее генетики видели в приложении к генетическим проблемам принципов физики и химии, тогда как он полагает, что классическая генетика, особенно лабораторное изучение генетики *Drosophila melanogaster*, теперь мертвы, и в будущем наиболее плодотворным будет изучение природных популяций (Novitski, 2005. С. 70).

В середине 1930-х гг. Феодосий Григорьевич добился признания в США: в октябре 1936 г. он прочел курс лекций в Колумбийском университете, получив это почетное приглашение от профессора Л. Дана.

Вскоре после этого «слепая на один глаз лошадь, на которой ехал Ф.Г. Добржанский, ударила его о створку ворот». Перелом ноги лишил Ф.Г. Добржанского подвижности, и время лечения он использовал для оформления книги на основе сделанных ранее заметок к своему курсу лекций.

Как через 20 лет случилось с другим соотечественником и сверстником Ф.Г. Добржанского, с В.В. Набоковым, одна книга радикально изменила положение ее автора в США. Книга Ф.Г. Добржанского «Генетика и происхождение видов» (Dobzhansky, 1937) была сразу признана и до сих пор считается классической. Она была

переиздана в 1941 и в 1951 гг. Через 50 и 60 лет после выхода книги ей были посвящены специальные статьи в журнале «Genetics» (Powell, 1987; Lewontin, 1997). Особенно в первой из них дан обстоятельный анализ тех факторов, которые обеспечили книге Ф.Г. Фобржанского огромный успех. В том же 1937 г. он получил американское гражданство.

Не занимаясь разбором содержания книги Ф.Г. Добржанского, хочу обратить внимание на одну ее особенность. В ней широко представлены работы русских и советских биологов. Это мог сделать только Ф.Г. Добржанский, никакой другой автор в Америке вообще бы не обратил внимание на большинство этих русских публикаций. Среди 571 процитированного в книге источника было 39 публикаций, напечатанных в СССР или в России (не считая зарубежных публикаций советских авторов).

Ф.Г. Добржанский и в дальнейшем продолжал следить за тем, что делалось в биологической науке в СССР. Он потратил время и перевел на английский язык труд Т.Д. Лысенко «О наследственности и ее изменчивости» (1943) (в это время Т. Лысенко – директор Института генетики АН СССР; он возглавил Институт после ареста Н.И. Вавилова). Издание перевода этого произведения (Lysenko, 1946) было полезно – надо было показать тем на Западе, у кого были какие-то иллюзии относительно советской «мичуринской» биологии, все убожество голого короля этой биологии.

Следует отметить стиль работы или, может быть, правильное, методологию работы Добржанского. Р. Левонтин характеризует его как «теоретика без инструментов», имея в виду инструменты математического анализа и моделирования. В своей работе (Lewontin, 1995. С. 87, 88) он утверждает, что Добржанский был в действительности теоретиком, чья интеллектуальная программа была теоретической и концептуальной, но что, не располагая абстрактными математическими инструментами, которые являются набором средств обычного теоретика, он использовал единственный инструмент, который был в его распоряжении – манипулирование живыми организмами. С этой точки зрения он был экспериментатором *faute de mieux* [за неимением лучшего], для которого организмы были чем-то вроде компьютера, скорее, чем предметом интереса сами по

себе. Справедливость такой характеристики остается на совести Р. Левонтина. Многолетнее увлечение насекомыми заставляет сомневаться, что Ф.Г. Добржанский не испытывал к этим организмам как к таковым живого интереса. Безусловно, он был «натуралистом» и, вероятно, в не меньшей степени, чем «теоретиком».

Заканчивая этот очерк о русском биологе, прославившемся в США, я не буду пересказывать его дальнейшую биографию, с которой можно познакомиться по публикациям наших «добржансковедов» М.Д. Голубовского и М.Б. Конашева. Не лишне еще раз напомнить те три синтеза, которые удалось сделать Ф.Г. Добржанскому.

Прежде всего, Ф.Г. Добржанский соединил энтомологию и генетику: его работы по географической изменчивости кокцинеллид были продолжены его ленинградским коллегой Я.Я. Лусом, осуществившим генетический анализ признаков одного из видов, *Adalia bipunctata*, а наследование описанных Ф.Г. Добржанским фенотипов другого вида, *Harmonia axyridis*, было тщательно изучено его стажером Таном. Сам Ф.Г. Добржанский посвятил свои работы в Америке географической изменчивости дрозофил и изучению генетики экзотических видов этого рода.

Второй синтез Ф.Г. Добржанского заключался в объединении достижений российской и западной науки, что он сделал в своей знаменитой книге.

Наконец, третий, наиболее значимый в истории биологии синтез – это сочетание экспериментальной генетики и теории эволюции. Ф.Г. Добржанскому удалось блестяще преодолеть существовавший разрыв между этими дисциплинами. Написанная им книга явилась краеугольным камнем синтетической теории эволюции и стимулировала все дальнейшие экспериментальные исследования ведущих к видообразованию генетических процессов в природных популяциях.

Литература

- Богданов Н.Н. Феодосий Добржанский – родственник Федора Достоевского // Генетика. 2000. Т. 36. № 2. С. 301–302.
- Богданов Н., Роговой А. Родословие Достоевских. В поисках утерянных звеньев. М.: Акрополь, 2008. 160 с.
- Добржанский Ф.Г. Обзор генетических исследований видов рода *Drosophila* // Тр. по прикл. ботаники и селекции. 1925. Т. 15. С. 45–56.
- Добржанский Ф.Г., Лус Я.Я., Медведев Н.Н. Домашние животные юго-восточной части Казахстана (Семиречья): Собр. статей под ред. Ю.А. Филиппченко. Л.: Изд-во АН СССР, 1927. 328 с.
- Добржанский Ф.Г., Лус Я.Я., Войтяцкий Б.П. и др. Домашние животные Семипалатинской губернии: Собр. статей под ред. Ю.А. Филиппченко. Л.: Изд-во АН СССР, 1928. 328 с.
- Из дневника Ф.Г. Добржанского // Природа. 2000. № 12. С. 59–64.
- Медведев Н.Н. Юрий Александрович Филиппченко. М.: Наука, 2006. 230 с.
- У истоков академической генетики в Санкт-Петербурге. СПб: Наука, 2008. 558 с.
- Dobzhansky Th.G. Geographical variation in ladybeetles // Amer. Nat. 1933a. V. 67. P. 97–126.
- Dobzhansky Th. On the sterility of the interracial hybrids in *Drosophila pseudoobscura* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1933b. V. 19. P. 397–403.
- Dobzhansky Th. Role of the autosomes in the *Drosophila pseudoobscura* hybrids // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1933c. V. 19. P. 950–953.
- Dobzhansky Th. Genetics and the Origin of Species. N.Y.: Columbia Univ. Press, 1937. 364 p.
- Dobzhansky Th. Nothing in Biology makes sense except in the light of evolution // Amer. Biol. Teacher. 1973. V. 35. P. 125–129. Цит. по: Ф. Коллинз. Доказательство Бога. Аргументы ученого. М.: Изд-во Альпина нон-фикшн, 2008. С. 157.
- Dobzhansky Th., Sturtevant A.H. Inversions in the chromosomes of *Drosophila pseudoobscura* // Genetics. 1938. V. 23. P. 28–64.
- Lewontin R.C. Theodosius Dobzhansky – a Theoretician Without Tools // Genetics of Natural Populations / Ed. L. Levine. N.Y.: Columbia Univ. Press, 1995. P. 87–101.
- Lewontin R.C. Dobzhansky's Genetics and the Origin of Species: is it still relevant? // Genetics. 1997. V. 147. P. 351–355.
- Lysenko T.D. Heredity and its variability / Translated by Th. Dobzhansky. N.Y.: King's Crown Press, 1946. 65 p.
- Novitski E. Sturtevant and Dobzhansky. Two Scientists at Odds, 2005. 241 p.
- Powell J.R. «In the air» – Theodosius Dobzhansky's genetics and the Origin of Species // Genetics. 1987. V. 117. P. 363–366.
- Sturtevant A.H., Dobzhansky Th. Inversions in the third chromosome of wild races of *Drosophila pseudoobscura* and their use in the study of the history of the species // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1936. V. 22. P. 448–450.

THEODOSIUS DOBZHANSKY – IN HONOR OF 110th ANNIVERSARY**I.A. Zakharov**

Vavilov Institute of General Genetics, Moscow, Russia, e-mail: iaz34@mail.ru

Summary

Feodosiy Grigorjevich Dobzhansky (Th. Dobzhansky) was born in Ukraine and received education in Kiev. His development as a geneticist and an entomologist was influenced by well-known scientists: V. Luchnik, S. Kushakevich, and G. Levitsky. In 1924–1927 F. Dobzhansky worked at the Department of Genetics and Experimental Zoology (headed by Yu. Filipchenko), Leningrad University. At the end of 1927 he was sent to the USA, to the laboratory of T. Morgan, and remained there. At the beginning of 1930-ies he started to work on the problems of evolutionary and population genetics. Theodosius Dobzhansky acquired distinction in 1937 after publication of his book «Genetics and Origin of Species», in which he succeeded in the synthesis of genetics and evolution theory. The achievements of biological science by Soviet authors were throughfully presented in that book.

Key words: Th. Dobzhansky, history of genetics, population genetics, *Drosophila*, Coccinellidae.

СЕЛЕКЦИЯ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К МЕСТНОЙ ПОПУЛЯЦИИ И К ВИРУЛЕНТНОЙ РАСЕ Ug 99 СТЕБЛЕВОЙ РЖАВЧИНЫ В УСЛОВИЯХ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

В.П. Шаманин¹, А.И. Моргунов², Я. Манес³, Ю.И. Зеленский⁴,
А.С. Чурсин¹, М.А. Левшунов¹

¹ Омский государственный аграрный университет, Омск, Россия,
e-mail: vpshamanin@rambler.ru;

² Представительство СИММИТ в Турции, Анкара, e-mail: a.morgounov@cgiar.org;

³ Международный центр улучшения кукурузы и пшеницы СИММИТ,
Мехико, Мексика, e-mail: y.manes@cgiar.org;

⁴ Представительство СИММИТ в Казахстане, Астана, e-mail: y.zelenskiy@cgiar.org

Представлены результаты оценки коллекции сортов, селекционного материала и изогенных линий яровой мягкой пшеницы по генам *Sr* на устойчивость к сибирской популяции рас стеблевой ржавчины в условиях опытного поля Омского ГАУ и к вирулентной расе Ug 99 в Институте фитопатологии в Кении (Африка). Выделен устойчивый исходный материал для селекции в условиях Западной Сибири. Показана селекционная ценность популяций, созданных по программе челночной селекции между научными учреждениями Казахстана, Западной Сибири и Международного центра по улучшению пшеницы и кукурузы (СИММИТ, Мексика).

Ключевые слова: пшеница, селекция, стеблевая ржавчина, раса Ug 99, изогенные линии по генам *Sr*.

Введение

В современных условиях в мире растет дефицит зерна пшеницы, и перед человечеством вновь возникает острая проблема продовольственного кризиса. Годовое производство зерна пшеницы в среднем составляет около 600 млн т, к 2020 г. потребность будет достигать уровня от 840 млн до 1 млрд т. Удовлетворение данной потребности – довольно сложная задача при учете того, что посевные площади в мире уменьшаются, а урожайность пшеницы в большинстве развитых стран уже достигла предельного уровня и, например, в странах Европы составляет более 8 т/га (Раджарам, Браун, 2006).

Яровая пшеница в Западной Сибири и Северном Казахстане высевается на площади около 20 млн га. В этом регионе имеются возможности увеличения урожайности и общего объема производства зерна, что может внести суще-

ственный вклад в решение мировой проблемы. Современные сорта в условиях производства способны давать в благоприятные годы зерна до 3–4 т/га и выше. Реальная средняя урожайность в областях Западной Сибири находится в пределах 1,2–1,4 т/га (Гончаров Н., Гончаров П., 2009). Одной из основных причин недобора урожая являются болезни с воздушно-капельной инфекцией. При эпифитотийном развитии бурой ржавчины в отдельности и совместно с септориозом потери урожая яровой пшеницы могут достигать 15–25 %, а от стеблевой ржавчины – 40–50 % и более (Койшыбаев, 2008).

В последние 3–4 года в Западной Сибири на посевах пшеницы отмечается стеблевая ржавчина. В 2009 г. поражение стебля и листьев пшеницы на производственных посевах в условиях Омской области варьировало от 10–15 до 100 %, что привело к потере не менее 25–30 % урожая. Пристальное внимание селекционеров к стеблевой ржавчине пшеницы вызвано высокой

агрессивностью данного патогена. Характерная черта этого вида ржавчины в отличие от бурой ржавчины заключается в том, что она может практически полностью уничтожить посевы пшеницы. До 2004–2005 гг. борьба со стеблевой ржавчиной приводилась в качестве классического примера эффективной и долговременной генетической защиты растений. Наличие гена *Sr31* (наряду с несколькими другими генами) во многих возделываемых сортах пшеницы обеспечивало защиту пшеницы от болезни последние 30–35 лет.

В 1999 г. в Уганде было впервые отмечено поражение стеблевой ржавчиной генотипов с геном *Sr31*, которые до того времени практически не поражались. Данный единичный случай оповестил мир о появлении новой расы стеблевой ржавчины Ug 99. Потребовалось всего несколько лет для распространения новой расы в регионы возделывания пшеницы Кении и Эфиопии. Уже в 2005–2006 гг. возделывание пшеницы в этих странах без химической обработки было практически невозможно. В 2006 г. раса Ug 99 обнаружена на пшенице в Йемене и в 2007 г. в Иране, в 2009 г. – в Пакистане. Вблизи находятся Афганистан, Узбекистан. Возможен ее занос через Казахстан в Западную Сибирь. В сопредельных с Западной Сибирью Кустанайской и Северо-Казахстанской областях Республики Казахстан в 2006–2007 гг. на яровой пшенице также отмечалось поражение посевов стеблевой ржавчиной (Рсалиев, 2008). Распространение болезни варьировало в пределах 20–40 %, на отдельных полях этот показатель достиг 80–100 %. Отмечено, что казахстанская популяция стеблевой ржавчины в 2006–2007 гг. содержит сильно вирулентные патотипы (TFK/R, TKT/C, TPS/H, TKN/RS, TDT/HS, TTH/KQ), отдельные из них поражают все изученные изогенные *Sr*-линии и по номенклатурному индексу сходны с патотипом Ug 99 (TTKS) из Африки (Рсалиев, 2008). Глобальная озабоченность появлением и распространением новой расы стеблевой ржавчины привела к ряду мероприятий, предпринятых научным сообществом. С 2006 г. проводится оценка сортов и селекционного материала на устойчивость к новой расе в Кении. Создана Глобальная инициатива по ржавчине пшеницы имени лауреата Нобелевской премии, отца «зеленой революции»

доктора Нормана Борлауга (www.globalrust.org). Проведен ряд совещаний и конференций и финансируются несколько проектов (Singh *et al.*, 2008). В период с 10 по 23 октября 2009 г. в Турции проведены три международных конференции, посвященные проблеме устойчивости растений к болезням и вредителям, в их числе 12-я Международная конференция по устойчивости к ржавчине и мучнистой росе. На данной конференции нами были представлены устные и стендовые доклады по обсуждаемой в данной статье проблеме (Shamanin, Morgunov, 2009; Zelenskiy *et al.*, 2009).

Целенаправленная работа по анализу расового состава стеблевой ржавчины в Западной Сибири практически не проводится. Имеются исследования кафедры микологии и альгологии Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, в которых в 2002 и 2005 гг. в сравнительный анализ были включены изоляты *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* pers. из Томской области (Лекомцева и др., 2008). Исследователи отмечают, что в Томской области в 2002 и 2005 гг. преобладали расы, доминирующие в сезоне среди выборок европейской части страны (МКВТ и MRLT в 2002 г. и ТКНТ, ТКСТ, ТТНТ в 2005 г.). Однако доля «собственных» рас составляла 25 %. При анализе динамики основных рас *P. graminis tritici* в 2001–2005 гг. было отмечено, что доминирующие в отдельные годы фенотипы не исчезают полностью в неблагоприятные сезоны, а с низкой частотой могут выделяться с барбариса или с дикорастущих злаков (Лекомцева и др., 2008).

Сорта яровой пшеницы Западной Сибири и Северного Казахстана специфичны, и нет никаких оснований надеяться, что устойчивые к болезням сорта могут быть импортированы из-за рубежа, так как иностранные сорта не конкурируют с отечественными по адаптивности, засухо-, холодоустойчивости и другим признакам. С целью обеспечения нового генетического разнообразия создаваемых для Западной Сибири и Казахстана сортов в 1998 г. была разработана программа челночной селекции, которая стала связующим звеном между научными учреждениями Казахстана, Западной Сибири и Программой по пшенице Международного центра по улучшению пшеницы и кукурузы (СИММИТ), расположенного в Мек-

сике. Сеть объединяет 7 научных учреждений Западной Сибири, Южного Урала и 10 учреждений Казахстана. Все участники сети раз в два года представляют 2–3 сорта или линии для совместного изучения в питомнике Казахстанско-Сибирского сортоиспытания (сокращенно КАСИБ). Данные КАСИБ представляют большой интерес, так как они отражают реальную картину поведения сортов и состояния селекции пшеницы на огромной территории. На основе выявленных наиболее адаптивных сортов питомников КАСИБ и источников устойчивости к болезням, качества зерна из коллекции СИММИТ в Мексике ежегодно создается селекционный материал. Создаваемый исходный материал оценивается на устойчивость к болезням в условиях Мексики, а отобранные по устойчивости популяции предоставляются селекционным учреждениям Сибири и Казахстана, таким, как Казахстанско-Сибирский питомник челночной селекции (сокращенно КПЧС) (Третован и др., 2006; Карабаев и др., 2007; Шаманин и др., 2009).

Таким образом, краткий анализ обсуждаемой проблемы свидетельствует об актуальности исследований по стеблевой ржавчине, в том числе по вирулентной расе Ug 99 для Западной Сибири. Выявление новых источников и генов устойчивости, создание на их основе сортов яровой пшеницы позволит защитить урожай огромного зернопроизводящего региона России.

Материал и методика исследований

В качестве материала использованы популяции, линии и сорта яровой мягкой пшеницы, изучаемые на всех этапах селекционного процесса (от коллекции до конкурсного сортоиспытания) на кафедре селекции, генетики и физиологии растений в лаборатории селекции пшеницы и озимого тритикале ФГОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет» (далее сокращенно ОмГАУ). Методики изучения исходного материала, применяемые в селекционном процессе, и статистической обработки полученных данных – общепринятые (Седловский и др., 1982; Гончаров Н., Гончаров П., 2009). Оценка степени поражения стеблевой ржавчиной в условиях опытного поля ОмГАУ проводилась в процентах, а в Кении по сле-

дующей шкале: R (Resistance – устойчивый) – 1 балл (поражение 5 %); MR (Moderately resistant – относительно устойчивый) – 2–3 балла; S (Susceptible – восприимчивый) – 4 балла (поражение более 60 %) по шкале Cobb (Peterson *et al.*, 1948).

Для оценки степени устойчивости (восприимчивости) к сибирской популяции рас стеблевой ржавчины известных в настоящее время генов *Sr* были посеяны изогенные линии по генам *Sr*, сорта и линии с их сочетанием (всего 115 линий), так называемые «ловушки». Посев линий-«ловушек» был осуществлен вручную. Каждую линию высевали по 2 рядка длиной 1 м, через каждые 10 номеров размещали стандарт устойчивости к стеблевой ржавчине – сорт Омская 37 и восприимчивости – Черныява 13. Данные линии были получены из СИММИТ.

Коллекция сортов яровой мягкой пшеницы, которая была любезно предоставлена для опытов отделом растительных ресурсов СибНИИРС СО РАСХН (раб. пос. Краснообск, Новосибирская обл.), высевалась на опытном поле ОмГАУ на делянках по 1 м². Всего 180 сортов. Повторность однократная. Дисперсионный анализ в бесповторных опытах проведен по стандартам, которые высевались не менее, чем в 4-кратной повторности.

В 2009 г. (май–октябрь) селекционные линии ОмГАУ и коллекция яровой мягкой пшеницы (всего 330 образцов) были оценены на восприимчивость к вирулентной агрессивной расе стеблевой ржавчины Ug 99 на естественном фоне Института фитопатологии в Кении (Африка) (Шаманин и др., 2009). Там же проведена оценка сортов программы КАСИБ и популяций Казахстанско-Сибирского питомника челночной селекции (КПЧС 9).

Результаты исследований

В настоящее время по Западно-Сибирскому региону Российской Федерации включены в Государственный реестр селекционных достижений 66 сортов, из них 26 сортов (39,4 %) были оценены в Кении на устойчивость к вирулентной расе стеблевой ржавчины Ug 99 и к сибирской популяции в условиях малого опытного поля ОмГАУ (Государственный реестр ..., 2009). Практически все сорта поразились си-

бирской популяцией стеблевой ржавчины и особенно вирулентной расой Ug 99 в условиях Кении. В табл. 1 приведены результаты оценки сортов, которые были поражены менее 50 % сибирской популяцией или расой Ug 99 в Кении. Как видно из табл. 1, все испытанные сорта яровой мягкой пшеницы, которые занимают в Западной Сибири значительные площади, оказались восприимчивыми к вирулентной расе стеблевой ржавчины Ug 99. Степень поражения составляет от 30–40S (Омская 37 и Сибиковская юбилейная) до 80S (Обская 14). При оценке сибирской популяции также отмечен высокий процент поражения и лишь несколько сортов можно отнести к слабовосприимчивым – это Обская 14, Златозара, Алтайская 99, Тулунская 12, Новосибирская 15, Эритроспермум 59 и Омская 37. Некоторые из перечисленных сортов относятся к ранне- и скороспелым типам (Тулунская 12, Ирень, Новосибирская 15), у которых наиболее уязвимые фазы развития прошли до наступления эпифитотия.

Наши расчетные данные свидетельствуют о том, что проверенные на устойчивость к стеблевой ржавчине сорта занимают в Западной

Сибири около 1,5 млн га, что составляет почти 30 % от общей площади посевов пшеницы. На наш взгляд, посевы яровой мягкой пшеницы Западной Сибири на данный момент практически не имеют генетической защиты от сибирской популяции стеблевой ржавчины, а также от вирулентной расы Ug 99. Химический способ защиты потребует дополнительных затрат не менее 10–15 долларов США на 1 га при средней прибыли в 50–60 долларов США с 1 га; к тому же приведет к негативным последствиям для окружающей среды.

По результатам оценки сортов и селекционных линий в Кении выделена рабочая коллекция сортов, наиболее устойчивых к Ug 99, которая представлена в табл. 2. Из 150 линий СП 2 лишь 13 линий имели толерантность к Ug 99, лучшие из них представлены в табл. 2. В питомнике КАСИБ наибольшую устойчивость проявили сорта Челябинка 75 (20MR), Степная 62 (10MR). Выделенные линии в 2010 г. будут оценены в контрольном питомнике ОмГАУ на селекционную ценность, а сорта из КАСИБ включены в гибридизацию в качестве источников устойчивости к вирулентной расе Ug 99 стеблевой

Таблица 1

Результаты оценки сортов яровой мягкой пшеницы на устойчивость к стеблевой ржавчине, 2009 г.

Сорт	Оригинатор	Кения, Ug 99	Опытное поле ОмГАУ, местная популяция			
			13.10	10.08	17.08	28.08
Новосибирская 22	СибНИИРС	60S	25	40	40	40
Обская 14	СибНИИРС	80S	5	20	20	20
Ирень	УралНИИСХ	70S	40	40	40	40
Златозара	ОмГАУ	70S	5	5	20	20
Алтайская 99	АНИИСХ	60S	20	20	20	20
Алтайская 100	АНИИСХ	60S	10	20	20	20
Тулунская 12	Иркутский НИИСХ	60S	0	0	5	5
Новосибирская 15	СибНИИРС	60S	20	20	20	20
Удача	СибНИИРС	70S	40	40	40	40
Сибиковская юбилейная	ОмГАУ	40S	20	40	60	60
Эритроспермум 59	ОмГАУ	60S	10	10	20	20
Дуэт	ЧНИИСХ	70S	20	40	40	40
Омская 37	СибНИИСХ	30S	0	10	20	20
Омская 35	СибНИИСХ	50S	20	40	40	40
Чернява 13	ОмГАУ	40MSS	40	60	80	80

Таблица 2

Линии и сорта (Кения, 2009), устойчивые к вирулентной расе Ug 99 стеблевой ржавчины

Селекционная линия, сорт	Динамика поражения расой Ug 99 по датам		
	30.09	13.10	27.10
Эритроспермум 22889 (линия)	5R	5R	20MS
Лютесценс 22902 (линия)	5R	5R	20MRMS
Эритроспермум 22912 (линия)	TR, 1R5S	5R	10MRMS
Нива 2 × Лютесценс 22211 (линия)	5RMR	5RMR	5RMS
Эритроспермум 23334 (линия)	5R	5R	20MRMS
Лютесценс 23419 (линия)	5R	5R	10MRMS
Эритроспермум 23442 (линия)	5R	5R	5MRMS
Челяба 75	5R	10R	20MR
Степная 62	TR	1R	10MR

ржавчины для создания устойчивого исходного материала.

Результаты оценки на устойчивость к стеблевой ржавчине исходного материала на опытном поле ОмГАУ в 2009 г. на естественном фоне показали, что из линий и сортов в питомниках селекционного процесса ОмГАУ, созданных совместно с коллегами Челябинского НИИСХ в течение последних 30 лет, только 3,9 % проявили иммунитет, остальной материал поразили в пределах от 10 до 100 %. В этих же условиях более 60 % популяций и линий из СИММИТ проявили высокую устойчивость и иммунитет к стеблевой ржавчине.

В питомнике челночной селекции (КПЧС 9) проведена оценка 367 популяций F₅ и F₆ из СИММИТ. Выделено 140 популяций, имеющих иммунитет к сибирской популяции стеблевой ржавчины, многие из них проявили и устойчивость к расе Ug 99 в условиях Кении. Эти популяции разосланы селекционным учреждениям Западной Сибири и Южного Урала для включения в 2010 г. в селекционный процесс. Характеристика некоторых популяций в сравнении с лучшим стандартом Омская 29 представлена в табл. 3. У представленных в табл. 3 популяций за материнские формы при создании популяций были взяты сорта Саратовская 29, Терция, Лютесценс 13, Лютесценс 504. Это сорта, которые проявили адаптивность и были выделены по результатам экологического испытания в питомнике КАСИБ 4 в 2003–2004 гг. Особый интерес для региона представляют популяции-синтектики, созданные отдаленной гибридизацией мягкой

пшеницы с *Aegilops squarrosa* L. и *Triticum dicoccum* (Schrank) Schubl.

В табл. 4 приведены результаты оценки изогенных линий по генам *Sr*. Данные оценки показывают, какие гены являются эффективными в условиях региона. Линии с геном *Sr31* были иммунны, и это свидетельствует о том, что заноса на территорию Западной Сибири агрессивной расы стеблевой ржавчины Ug 99 в 2009 г. не отмечено.

Обсуждение

Актуальность изложенной в статье проблемы основывается прежде всего на важности яровой мягкой пшеницы для экономического благосостояния населения Западной Сибири и в целом для продовольственной безопасности РФ.

Однако в ближайшие годы возможно возрастание потерь урожая яровой пшеницы от стеблевой ржавчины на фоне ухудшающейся фитопатологической обстановки, связанной с появлением агрессивных рас стеблевой ржавчины и возделыванием восприимчивых сортов на основной площади посева пшеницы в Западной Сибири. Наряду с высокой агрессивностью рас местной популяции стеблевой ржавчины возникла угроза проникновения вирулентной расы Ug 99 на территорию Западной Сибири. Применение на яровой пшенице химических средств защиты на огромной территории ее возделывания является экономически невыгодным и может привести к экологически неблагоприятным последствиям для окружающей среды.

Таблица 3

Оценка лучших популяций КПЧС 9 в ОмГАУ и в Кении, 2009 г.

Селекционный номер	Происхождение	Оценка устойчивости к стеблевой ржавчине		Урожайность в ОмГАУ, г/м ²
		к сибирской популяции (ОмГАУ)	к Ug 99 (Кения)	
КПЧС 9 (87)	Омская 29 стандарт	4/25		308
	SARATOVSKAYA29/4/KAUZ//PRL/VEE#6/3/BAV92/5/HY439/6/T.DICOCCONPI94625/AE.SQUARROSA(372)//3*PASTOR /7/LUTESCENS 210.99.10	0	15MS	357*
КПЧС 9 (227)	TERTSIYA/5/CROC_1/AE.SQUARROSA(224)//OPATA/3/BJY/COC//PRL/BOW/4/BJY/COC//PRL/BOW/6/ PARUS/PASTOR	0	25MS	352*
КПЧС 9 (229)	TERTSIYA/5/CROC_1/AE.SQUARROSA(224)//OPATA/3/ BJY/COC//PRL/BOW/4/BJY/COC//PRL/BOW /6/PARUS/PASTOR	0	30MS	288
КПЧС 9 (233)	LUTESCENS-13,KAZ/TUKURU//AC CADILLAC	0	0	234
КПЧС 9 (223)	TERTSIYA/TUKURU//WBLL1*2/TUKURU	0	15MR	262
КПЧС 9 (153)	LUTESCENS 509/BERKUT//AC CADILLAC	0	10RMR	216
	НСП 05			21

Таблица 4

Оценка изогенных линий по генам *Sr* на устойчивость к стеблевой ржавчине (в %, Омск, 2009)

Сорт, линия	ген <i>Sr</i>	Дата оценки		
		10.08	17.08	20.08
		Листья		Стебель
Омская 37 (устойчивый стандарт)	?	0	10	10
Чернява 13 (восприимчивый стандарт)	?	60	80	100
MDS7W2691A/V3498-SR7A,SR10	<i>Sr7A.Sr10</i>	0	40	10
ISR7BRA	<i>Sr7BrA</i>	0	0	10
BARLETA BENVENUTO.SR8B	<i>Sr8B</i>	10	30	40
ISR9ARA	<i>Sr9ArA</i>	1	1	10
W2691-SR9B	<i>Sr9B</i>	1	20	10
IRS5SB-SR9F	<i>Sr9F</i>	1	1	10
W2691 SR10	<i>Sr10</i>	5	5	40
ISR11RA	<i>Sr11RA</i>	0	0	5
CS-TC3B-SR12	<i>Sr12</i>	0	0	5
W2691 SR13	<i>Sr13</i>	5	5	0
W2691 '2/NORKA-SR15	<i>Sr15</i>	20	20	10
LC/KENYA HUNTER-SR17	<i>Sr17</i>	5	5	5
LC-SR19-MQ	<i>Sr19-MQ</i>	0	15	10
LC-SR20-MQ	<i>Sr20-MQ</i>	1	5	10
SWSR22T.B.	<i>Sr22T. B.</i>	0	0	10

Окончание табл. 4

Сорт, линия	ген Sr	Дата оценки		
		10.08	17.08	20.08
		Листья		Стебель
EXCHANGE-SR23. SRMCN	<i>Sr23</i>	1	20	10
EAGLE-SR26.SR9G	<i>Sr26.Sr9G</i>	0	0	0
COORONG TRITICALE-SR27	<i>Sr27</i>	1	0	0
W2691 SR28KT	<i>Sr28KT</i>	10	20	25
PUSA/EDCH-SR29	<i>Sr29</i>	5	40	25
C77.19.SR32	<i>Sr32</i>	0	0	0
COMPARE-SR34	<i>Sr34</i>	0	0	5
W3763-SR35	<i>Sr35</i>	0	0	0
W2691 SR36TT1	<i>Sr36TT1</i>	0	0	5
W2691 SR37TT2	<i>Sr37TT2</i>	0	0	0
MEDEA AP9D-SRDP-2	<i>AP9DSrDP-2</i>	0	0	0
PELIS-SRPL	<i>SrPL</i>	0	0	0
Seri 82	<i>Sr31</i>	0	0	0
Cham-8	<i>Sr31</i>	0	0	0
LcSr24Ag	<i>Sr24</i>	5	20	25
W2691SrTt-1	<i>Sr36</i>	0	0	0
Eagle	<i>Sr26</i>	0	0	0
Super Seri	<i>iSr25</i>	0	0	0
Coroong	<i>Sr27</i>	0	0	0
Utique 96	<i>Sr31 absent</i>	0	0	0
ISr6-Ra	<i>Sr6</i>	0	0	0
W2691Sr9b	<i>Sr9b</i>	5	5	5
St464Sr13	<i>Sr13</i>	0	0	0
Sr22TB	<i>Sr22</i>	0	0	0
Pusa 4/Etoile de Choisy	<i>Sr29</i>	0	0	0
BtSr30Wst	<i>Sr30</i>	0	0	0
CnsSr32AS.	<i>Sr32</i>	0	0	0
RL 5405	<i>Sr33</i>	0	0	0
Mq(2)5*G2919	<i>Sr35</i>	10	10	25
W2691SrTt-2	<i>Sr37</i>	40	40	65
RL 6081	<i>Sr38</i>	0	0	0
RL 6082	<i>Sr39</i>	0	5	25
RL 6088	<i>Sr40</i>	10	10	25
Taf-2	<i>Sr44</i>	1	1	5
W2691SrGtGt	<i>SrGt</i>	0	0	5
Bt/Wld	<i>SrWld-1</i>	0	0	0
Chris	<i>Sr7a,Sr12,Sr6</i>	0	0	0
W2691 Sr28 kt	<i>Sr28</i>	1	10	10

Стратегическое направление борьбы с ржавчиной, которое является доминирующим в современной сельскохозяйственной науке в большинстве регионов мира, – это создание устойчивых сортов. Наши исследования показали, что на основе местных, адаптивных к условиям региона сортов, которые скрещены с источниками устойчивости к стеблевой ржавчине, из коллекции СИММИТа возможно создание исходного материала для селекции в условиях Западной Сибири.

Оценка созданного исходного материала в условиях Мексики, Кении и Западной Сибири по программе челночной селекции СИММИТа позволяет отбирать наиболее конкурентные гибридные популяции яровой мягкой пшеницы, устойчивые к широкому спектру рас стеблевой ржавчины и других болезней.

В конечном итоге имеется перспектива создания сортов с более долговременной устойчивостью, возделывание которых позволит повысить конкурентоспособность отечественных производителей зерна за счет повышения урожайности и экологичности производства.

Благодарности

Авторы выражают благодарность научным сотрудникам лаборатории селекции яровой мягкой пшеницы и озимого тритикале ОмГАУ и сотрудникам Института фитапоталогии в Кении за содействие в проведении исследований.

Литература

- Гончаров Н.П., Гончаров П.Л. Методические основы селекции растений. Новосибирск: Акад. изд-во «Гео», 2009. 427 с.
- Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию (Официальное издание). Том 1. Сорты растений. М.: «Экспресс-принт ИК», 2009. 321 с.
- Карабаев М., Моргунов А., Браун Х. Программа СИММИТа по улучшению пшеницы в Казахстане: вместе в XXI веке // Агромеридиан. 2007. № 2(6). С. 9–22.
- Койшыбаев М., Болтыбаева Л.А., Копирова Г.И. Гермоплазма пшеницы с групповой устойчивостью к болезням с воздушно-капельной инфекцией // Агромеридиан. 2008. № 3(9). С. 34–42.
- Лекомцева С.Н., Сколотнева Е.С., Волкова В.Т., Зайцева Л.Г. Оценка разнообразия фенотипов возбудителя стеблевой ржавчины пшеницы *Puccinia graminis* f. sp. *tritici pers.* // Вторая Всерос. конф. «Современные проблемы иммунитета растений к вредным организмам». Санкт-Петербург, 29 сентября – 2 октября 2008. СПб: Инновационный центр защиты растений, 2008. С. 63–65.
- Раджарам С., Браун Х.Е. Потенциал урожайности пшеницы // Агромеридиан. 2006. № 2(3). С. 5–12.
- Расалиев Ш.С. Вирулентность новых патотипов стеблевой ржавчины в Казахстане // Вторая Всерос. конф. «Современные проблемы иммунитета растений к вредным организмам». Санкт-Петербург, 29 сентября – 2 октября 2008. СПб: Инновационный центр защиты растений, 2008. С. 87–90.
- Седловский А.И., Мартынов С.П., Мамонов Л.К. Генетико-статистические подходы к теории селекции самоопыляющихся культур. Алма-Ата: Наука, 1982. С. 47–143.
- Третован Р., Моргунов А., Зеленский Ю., Лаге Я. Челночная селекция между Мексикой и Казахстаном: результаты, подробности и перспективы // Агромеридиан. 2006. № 2(3). С. 23–27.
- Шаманин В.П., Моргунов А.И., Браун Х. ОмГАУ-СИММИТ: Международный договор о сотрудничестве по вопросам селекции пшеницы и подготовки кадров // Вестн. ОмГАУ. 2009. № 1. С. 11–14.
- Шаманин В.П., Моргунов А.И., Левшунов М.А. Приоритетные направления селекции пшеницы в условиях Западной Сибири // Реализация Государственной программы развития сельского хозяйства и регулирование рынков сельскохозяйственной продукции сырья и продовольствия: инновации, проблемы, перспективы: материалы международного научно-технического форума (26–27 февраля 2009 г.). Омск, 2009. Ч. 1. С. 278–281.
- Peterson R. F., Campbell A.B., Hannah A.E. A diagrammatic scale for estimating rust intensity on leaves and stems of cereals // Canad. J. Res. 1948. V. 26. P. 496–500.
- Shamanin V., Morgunov A. Spring wheat breeding in Western Siberia for resistance to leaf and stem rust // 12th Intern. cereal rusts powdery mildews conf. Antalya. Turkey. October 13–16, 2009. Antalya. Turkey, 2009. P. 82.
- Singh R.P., Hodson D.P., Huerta-Espino J. *et al.* Will stem rust destroy the world's wheat crop? // Adv. Agron. 2008. V. 98. 310 p.
- Zelenskiy Y., Morgunov A., Manes Y. *et al.* Improvement of leaf rust resistance of spring bread wheat in the North Kazakhstan // 12th Intern. cereal rusts powdery mildews conf. Antalya. Turkey. October 13–16. 2009. Antalya. Turkey, 2009. P. 147.

**BREEDING OF SPRING COMMON WHEAT
FOR RESISTANCE TO LOCAL POPULATIONS
AND VIRULENT RACE Ug 99 OF STEM RUST IN WEST SIBERIA**

V.P. Shamanin¹, A.I. Morgunov², J. Manes³, Y. Zelenskiy⁴, A.S. Chursin¹, M.A. Levshunov¹

¹ Omsk State Agrarian University, Omsk, Russia, e-mail: vpshamanin@rambler.ru;

² CIMMYT-Turkey, Ankara, Turkey, e-mail: a.morgounov@cgiar.org

³ CIMMYT-Mexico, Mexico D.F. Mexico, e-mail: y.manes@cgiar.org;

⁴ CIMMYT-Kazakhstan, PO 1443, 010000, Astana, Kazakhstan,
e-mail: y.zelenskiy@cgiar.org

Summary

The results of the evaluation of the gene pool of commercial cultivars, breeding material and near isogenic *Sr* gene lines of spring common wheat for resistance to the Siberian population of stem rust races in an experimental field of the Omsk Agrarian University and to virulent race Ug 99 at the Institute of Pathology in Kenya (Africa) was presented. Resistant material for breeding in Western Siberia was selected. The genetic value of populations created by a shuttle breeding program between scientific institutions of Kazakhstan, Western Siberia, and the International Maize and Wheat Improvement Centre (Mexico) is demonstrated.

Key words: wheat, breeding, stem rust, race Ug 99, isogenic lines for *Sr* genes.

РОЛЬ ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫХ РИБОНУКЛЕАЗ В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

С.С. Сангаев¹, А.В. Кочетов^{1,2}, С.С. Ибрагимова¹, Б.А. Левенко³, В.К. Шумный^{1,2}

¹ Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия;

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия,
e-mail: sangaevs@gmail.com;

³ Национальный ботанический сад им. Н.Н. Гришко НАН Украины, Киев, Украина

В экстраклеточном пространстве тканей растений содержится сложный комплекс белков, функции которых малоизучены. В обзоре рассмотрены современные представления о биологической роли экстраклеточных рибонуклеаз и, в частности, об их взаимосвязи с молекулярными механизмами защиты от фитопатогенов.

Ключевые слова: T₂ РНКазы, S-подобные РНКазы, стресс, фосфатное голодание, поранение, защита от патогенов.

Введение

Рибонуклеазы (РНКазы) – это фосфодиэстеразы, гидролизующие межнуклеотидную (фосфодиэфирную) связь в молекуле рибонуклеиновой кислоты (РНК). РНКазы, производящие в качестве первичного мономерного продукта 2',3'-циклические нуклеозидмонофосфаты, могут быть разделены на 3 семейства: РНКазы А, РНКазы T₁ и РНКазы T₂ (Deshpande, Shankar, 2002). Распространение РНКаз семейства А ограничено позвоночными животными, РНКазы семейства T₁ встречаются у бактерий и грибов. В отличие от них РНКазы семейства T₂ представлены у очень широкого спектра организмов, включая вирусы, бактерии, грибы, растения и животных. Такое широкое распространение РНКаз T₂ указывает на их эволюционно древнее происхождение и важную биологическую роль, однако к настоящему моменту накоплено мало данных, описывающих функции этого семейства РНКаз (Hillwig *et al.*, 2008; MacIntosh *et al.*, 2010).

В семействе РНКаз T₂ растений выделяют S- и S-подобные РНКазы. S-РНКазы относительно хорошо изучены, поскольку их функции связаны с механизмами гаметофитной самоне-

совместимости. S-подобные РНКазы растений не задействованы в генерации гаметофитной самонесовместимости и обнаружены как у самосовместимых, так и у самонесовместимых видов растений. Обнаруженные у широкого круга видов растений S-подобные РНКазы представляют собой удобный объект для изучения биологических функций РНКаз семейства T₂. В этом обзоре рассмотрена имеющаяся в настоящее время информация об экстраклеточных S-подобных рибонуклеазах и их возможной роли в контроле физиологических функций высших растений.

Экстраклеточные рибонуклеазы растений

S-РНКазы были первыми секреторными РНК-азами, открытыми у растений. Поиск гомологичных белков привел к открытию S-подобных РНКаз (Taylor, Green, 1991). Как и S-РНКазы, многие из них являются экстраклеточными. При этом несмотря на общее структурное сходство, S- и S-подобные РНКазы образуют 2 подсемейства в семействе T₂ РНКаз (Green, 1994).

Гаметофитная самонесовместимость, в которой задействованы S-РНКазы, является ярким примером цитотоксичного действия рибонук-

леаз и описана у растений семейств Rosaceae, Scrophulariaceae и Solanaceae. Самонесовместимость обычно контролируется одним мультиаллельным S-локусом. При гаметофитном типе самонесовместимости пыльца проявляет гаплоидный фенотип своего S-аллеля. При этом пыльца, несущая S-аллель, генетически идентичный S-аллелю пестика (несовместимая), распознается как «своя», и ее прорастание в пестике селективно подавляется.

S-РНказы являются продуктами S-локуса в пестике и секретируются в межклеточный матрикс. Отторжение пыльцы опосредуется РНказной активностью: S-РНказы могут проникать в цитоплазму пыльцевых трубок и ингибировать процесс трансляции. Показано, что в ходе реализации самонесовместимости происходит аллель-специфичная деградация рРНК пыльцевых зерен (Трифонов и др., 2000).

По своим биохимическим свойствам S-подобные РНказы – это неспецифические эндорибонуклеазы, обладающие низкой чувствительностью к ЭДТА и активные в кислой среде. Гены S-подобных РНказ имеются в геномах всех видов растений, исследованных на их наличие, и, по-видимому, у каждого вида представлены небольшим семейством (Taylor, Green, 1991; Dodds *et al.*, 1996; Ye, Droste, 1996; Van Nerum *et al.*, 2000; LeBrasseur *et al.*, 2002; MacIntosh *et al.*, 2010). Например, геном арабидопсиса содержит как минимум 5 генов с высокой степенью близости к РНказам семейства T₂ (LeBrasseur *et al.*, 2002). При этом РНказная активность была продемонстрирована для белковых продуктов трех из них (RNS1, RNS2, RNS3) (Bariola *et al.*, 1994). В геноме риса обнаружено 8 генов РНказ семейства T₂ (MacIntosh *et al.*, 2010).

Как правило, в нормальных условиях гены экстраклеточных S-подобных РНказ не характеризуются конститутивной экспрессией в листьях растений (Bariola *et al.*, 1994; Ye, Droste, 1996; Kariu *et al.*, 1998; Lers *et al.*, 1998). Некоторые из них экспрессируются на ранних стадиях развития растения (Rogers S.W., Rogers J.C., 1999; Hillwig *et al.*, 2008; Hillwig *et al.*, 2009). В то же время для многих генов экстраклеточных S-подобных РНказ так же, как и для генов S-РНказ, характерна конститутивная экспрессия в цветках (Bariola *et al.*, 1994; Dodds *et al.*, 1996; Ma, Oliveira, 2000; Van Nerum *et al.*, 2000). Индукция

экспрессии генов экстраклеточных S-подобных РНказ в надземных частях растений обнаружена при нехватке неорганического фосфата (Nürnberg *et al.*, 1990; Bariola *et al.*, 1994; Ma, Oliveira, 2000) во время старения (Bariola *et al.*, 1994; Lers *et al.*, 1998) в ответ на поражение патогенами (Galiana *et al.*, 1997; Hugot *et al.*, 2002; Ohno, Ehara, 2005), а также в ответ на поранение тканей (Ye, Droste, 1996; Kariu *et al.*, 1998; Lers *et al.*, 1998; LeBrasseur *et al.*, 2002).

К числу наиболее исследованных генов, кодирующих ферменты этого класса, относятся *RNS1 Arabidopsis thaliana* и *LE Lycopersicon esculentum*. *RNS1* в нормальных условиях экспрессируется в цветках. В вегетативных органах активности этого гена не наблюдается, однако недостаток неорганического фосфата и поранение индуцируют его экспрессию (Bariola *et al.*, 1994; LeBrasseur *et al.*, 2002). Кроме того, некоторый уровень экспрессии *RNS1* наблюдается при старении листьев (Bariola *et al.*, 1994).

Экспрессия гена *LE* у взрослых растений томатов в нормальных условиях не детектируется, однако наблюдается в листьях на поздней стадии старения, причем максимальный уровень экспрессии РНказы *LE* наблюдается в полностью пожелтевших листьях (Lers *et al.*, 1998). В экспериментах транскрипционная активность промотора гена *LE* зафиксирована в развивающихся сосудах флоэмы и в зоне растяжения корней у 10-дневных проростков томатов. Индукция экспрессии наблюдается при нехватке неорганического фосфата и в ответ на поранение, причем поранением *LE* индуцируется в сосудах флоэмы и в клетках паренхимы (Nürnberg *et al.*, 1990; Köck *et al.*, 2004). Этот белок, по-видимому, имеет двойную локализацию: вакуолярную и экстраклеточную (Köck *et al.*, 1995).

Функциональная роль экстраклеточных S-подобных РНказ, индуцируемых при фосфатном голодании и в ходе старения

Доступность фосфатов – один из факторов, лимитирующих рост и продуктивность растений, так как неорганический фосфат играет важную роль в первичном метаболизме. Индукция S-подобных РНказ в условиях недостатка

неорганического фосфата указывает на то, что активность этих ферментов может составлять один из компонентов системного ответа, обеспечивающего адаптацию к фосфатному голоданию. При этом, по-видимому, экспрессия S-подобных РНКаз не является общим ответом на нехватку необходимых минеральных компонентов. Так, РНКазы RNS1 экспрессируются при недостатке фосфата, но не индуцируются в условиях нехватки азота или калия (Variola *et al.*, 1994). Предполагается, что функциональная роль этих РНКаз связана с извлечением фосфата из молекул РНК в апопласте и/или в ризосфере, а также с рециркуляцией фосфата из старых отмирающих частей растений (Dodds *et al.*, 1996; Raghothama, Karthikeyan, 2005).

Подобно RNS1 и LE экстраклеточная РНКазы NE *Nicotiana glauca* индуцируется при фосфатном голодании. Экспрессия этой РНКазы наблюдается в корнях, но не в листьях (Dodds *et al.*, 1996). В целом для белков, связанных с поглощением фосфата из почвы, характерна экспрессия в корнях. Например, трансмембранные белки-переносчики с высокой аффинностью к фосфатам экспрессируются преимущественно в корнях растений, и многие из них индуцируются при нехватке неорганического фосфата. При этом способность растения поглощать фосфаты коррелирует с уровнем экспрессии генов, кодирующих эти белки (Raghothama, Karthikeyan, 2005). Экстраклеточные кислые фосфатазы, индуцируемые в корнях при недостатке фосфата и обладающие широкой субстратной специфичностью, задействованы в гидролизе органических соединений, содержащих фосфатную группу (Raghothama, Karthikeyan, 2005). S-подобные РНКазы в качестве первичного мономерного продукта производят 2',3'-циклические нуклеозидмонофосфаты, которые затем гидролизуются с образованием 3'-нуклеозидмонофосфатов (Nürnberg *et al.*, 1990; Dshpande, Shankar, 2002). Образующиеся 3'-нуклеозидмонофосфаты могут служить субстратом для экстраклеточных фосфатаз. Однако анализ реакции гидролиза РНК РНКазой LE показал, что скорость дециклизации 2',3'-циклофосфатов гораздо ниже скорости их образования (Nürnberg *et al.*, 1990). Поиск фермента, способного катализировать дециклизацию 2',3'-циклофосфатов, привел к открытию

экстраклеточной 2',3'-циклофосфат-2'-диэстеразы. Показано, что этот фермент, как и РНКазы LE, индуцируется в культуре клеток томатов при недостатке фосфата и катализирует гидролиз 2',3'-циклических нуклеозидмонофосфатов до 3'-нуклеозидмонофосфатов. Описанная циклофосфодиэстераза, как и экстраклеточные РНКазы, нечувствительна к действию ЭДТА, активна в кислой среде и обладает широкой субстратной специфичностью (Abel *et al.*, 2000).

Данные по активности РНКазы LE, 2',3'-циклофосфат-2'-диэстеразы и других ферментов, индуцируемых при фосфатном голодании, позволили группе Абеля предложить модель высвобождения фосфата из молекул РНК. Согласно этой модели, экстраклеточные РНКазы гидролизуют экстраклеточную РНК до 2',3'-циклических нуклеозидмонофосфатов, которые, будучи субстратом экстраклеточных 2',3'-циклофосфат-2'-диэстераз, дециклизируются последними с образованием 3'-нуклеозидмонофосфатов. Экстраклеточные кислые фосфатазы, секретируемые корнями, отщепляют фосфат от рибонуклеотида, а высокоаффинные белки-переносчики осуществляют транспорт высвобождаемого фосфата внутрь клеток.

Стоит отметить, что при выращивании в среде, содержащей в качестве единственного источника фосфата дрожжевую РНК (вместо KH_2PO_4), скорость роста клеток томатов не отличалась от скорости, наблюдаемой при росте в стандартной среде. При этом анализ состава среды на третий день роста клеток показал, что рибонуклеозиды, как и ожидалось, составляли основной продукт гидролиза РНК. Эти данные указывают на то, что в условиях нехватки неорганического фосфата экстраклеточные ферменты, осуществляющие гидролиз молекул РНК, важны для выживания клеток.

По-видимому, сходную роль играют РНКазы, индуцируемые при старении. Процесс старения характеризуется разрушением макромолекул и уменьшением фотосинтетической способности. При этом молекулы РНК становятся источником фосфата, который распределяется по растению. Предполагается, что экстраклеточные РНКазы вносят вклад в рециркуляцию клеточной РНК и фосфата (Трифопова и др., 2000).

Роль экстраклеточных рибонуклеаз при повреждении тканей

При поранении содержимое поврежденных клеток может выходить в апопласт. Поэтому индукция экстраклеточных РНКаз при поранении может способствовать переработке рибонуклеиновых кислот и высвобождению неорганического фосфата, которые в дальнейшем могут быть использованы другими клетками.

В то же время детальный анализ паттерна экспрессии гена *RNS1* арабидопсиса показал, что он индуцируется не только в месте поранения (локально), но и в неповрежденных удаленных тканях (системно). Локальная активность РНКазы детектируется через 3 часа после поранения и сохраняется как минимум двое суток, а системная активность *RNS1* наблюдается в промежутке между 6 и 12 часами после повреждения. Системная индукция *RNS1* в интактных тканях в ответ на поранение указывает на то, что функциональная роль этой РНКазы не ограничена процессами локальной рециркуляции рибонуклеиновых кислот и неорганического фосфата (LeBrasseur *et al.*, 2002). Среди генов арабидопсиса, экспрессия которых индуцируется поранением, ген *RNS1* характеризуется одним из наиболее высоких уровней экспрессии, причем его индукция не связана с жасмоновой кислотой и этиленом (Reymond *et al.*, 2000; LeBrasseur *et al.*, 2002). Показано, что в индукцию экспрессии *RNS1* при поранении вносит частичный вклад абсцизовая кислота (Hillwig *et al.*, 2008). Аналогичный контроль экспрессии был показан для гена *LE* (Lers *et al.*, 1998). Существует предположение, что РНКазы *RNS1* и *LE*, а также другие индуцируемые поранением экстраклеточные РНКазы могут играть роль в защите от патогенов (Ye, Droste, 1996; Galiana *et al.*, 1997; Lers *et al.*, 1998; LeBrasseur *et al.*, 2002; Ohno, Ehara, 2005).

Для большинства экстраклеточных S-подобных РНКаз в нормальных условиях характерна экспрессия в цветках. Цветки редко инфицируются патогенами, несмотря на то что органы цветка, богатые питательными веществами, могут представлять для патогенов привлекательный объект для атаки. Это наблюдение в совокупности с данными по высокому уровню РНКазной активности в тканях цветка поз-

волило предположить, что экспрессия генов S-подобных рибонуклеаз в цветках может быть связана с защитной функцией (Dodds *et al.*, 1996). Предположение о защитной роли S-подобных РНКаз находит подтверждение в том, что некоторые из них индуцируются в ответ на атаку патогенов.

Экстраклеточные белки растений, задействованные в механизмах защиты от патогенов

Считается, что компоненты апопласта играют ключевую роль во взаимодействиях растений с патогенами на первых стадиях инфекции. Распознавание патогена запускает защитный ответ, связанный, в основном, с индукцией синтеза и накоплением в апопласте антимикробных соединений и локальным укреплением клеточных стенок. Кроме того, во многих случаях запускается механизм запрограммированной гибели клеток (реакция сверхчувствительности). Этот механизм активной защиты, связанный с межклеточным пространством, подавляет жизнедеятельность бактериальных и грибных патогенов и ограничивает их распространение (Малиновский, 2009).

Экстраклеточные белки, индуцируемые при атаке патогенов, были впервые обнаружены у растений табака, проявляющих реакцию сверхчувствительности в ответ на инокуляцию вирусом табачной мозаики (ВТМ). Позднее была показана индукция этих белков в ответ на поражение грибами, вирусами и вироидами, а также в ответ на проникновение нематод и насекомых. Для обозначения этих белков был введен термин «PR-белки» (Pathogenesis-Related). Недавно был предложен более общий термин «индуцируемые белки, связанные с защитой» (Inducible defence-related proteins). Этим термином предложено называть белки, которые в основном не встречаются в здоровых тканях, но индуцируются при инфекции. В данном случае термин «связанный с защитой» подразумевает, что эти белки индуцируются в связи с защитным ответом, но не указывает на их функциональную роль в защите. Тем не менее такой паттерн экспрессии подразумевает, что их роль в формировании устойчивости весьма вероятна. К индуцируемым белкам, связанным с

защитой, относятся как уже известные PR-белки, так и другие, еще не классифицированные белки, соответствующие вышеупомянутому определению (Van Loon *et al.*, 2006).

В настоящее время PR-белки подразделяются на 17 семейств (от PR-1 до PR-17) (Van Loon *et al.*, 2006). Ряд PR-белков секретируется в апопласт, при этом многие из них являются гидролазами. Так, белки семейства PR-2 являются β -1,3-эндоглюканазами, а белки семейств PR-3, PR-4, PR-8 и PR-11 обладают эндохитиновой активностью. Члены семейств PR-7, PR-8, PR-9 и PR-10 проявляют протеиназную, лизоцимную, пероксидазную и рибонуклеазную активности соответственно. Белки семейства PR-6 – ингибиторы протеиназ. Активность других PR-белков связана с увеличением проницаемости мембран (семейства PR-5, PR-12, PR-13, PR-14), а также с производством пероксида водорода (семейства PR-15 и PR-16) (Van Loon, Van Strien, 1999; Малиновский, 2009).

PR-белки участвуют в формировании приобретенной системной устойчивости SAR (Systemic Acquired Resistance). Растения, проявляющие SAR, характеризуются неспецифической устойчивостью к широкому спектру патогенов грибковой, бактериальной и вирусной природы. При этом совокупность PR-белков рассматривается как один из основных элементов механизма, ответственного за индукцию неспецифической устойчивости к патогенам. Показано, что многие PR-белки обладают фунгицидной и бактерицидной активностями *in vivo* и *in planta*. Однако роль этих белков в формировании устойчивости к вирусам остается неясной (van Loon *et al.*, 2006; Трифонова и др., 2007; Малиновский, 2009).

РНКазная активность, обнаруженная у ряда белков семейства PR-10, может быть связана с формированием устойчивости к вирусам (Park *et al.*, 2004; Van Loon *et al.*, 2006; Малиновский, 2009). В тесте *in vitro* показана гидролазная активность PR-10 белка *Capsicum annuum* в отношении вирусной РНК. Также в опытах по инокуляции листьев перца вирулентной линией ВТМ показано, что присутствие этого белка в инокуляте существенно снижает степень размножения вируса. Этот внутриклеточный белок индуцируется в листьях *Capsicum annuum*, развивающих реакцию сверхчувствительно-

сти в ответ на инокуляцию невирулентным для данного растения штаммом вируса табачной мозаики (ВТМ). Кроме того, экспрессия СаPR-10 индуцируется системно – в непораженных листьях – при развитии SAR. В то же время при инокуляции вирулентным штаммом ВТМ индукция этого белка не наблюдается, что может быть связано с его вкладом в вирусо-устойчивость (Park *et al.*, 2004). Характерно, что РНКазная активность у СаPR-10 регулируется фосфорилированием (в норме она отсутствует, что снимает цитотоксический эффект, неизбежный при внутриклеточной локализации) (Park *et al.*, 2004). Однако РНКазная активность обнаружена только у небольшого числа белков, относящихся к семейству PR-10 (Liu, Ekramoddoullah, 2006). Другие семейства PR-белков не проявляют специфической противовирусной активности (Van Loon *et al.*, 2006). Впрочем, имеется сообщение о наличии РНКазной активности у белка пшеницы, принадлежащего семейству PR-4 (Caporale *et al.*, 2004).

Среди индуцируемых белков, потенциально связанных с защитным ответом, экстраклеточные рибонуклеазы являются возможными кандидатами на участие в формировании устойчивости растений к вирусам. Экстраклеточная локализация, низкий уровень экспрессии в интактных листьях и сходная кинетика индукции при поранении и в ответ на атаку патогенов сближают экстраклеточные РНКазы с PR-белками.

Роль экстраклеточных рибонуклеаз при взаимодействии растений с патогенами

Давно известно, что в ответ на поражение грибами и вирусами в инфицированных тканях растений наблюдается повышение РНКазной активности (Chakravorty *et al.*, 1974; Barna *et al.*, 1989; Lusso, Kuc, 1995; Galiana *et al.*, 1997). При этом в спектре белков с РНКазной активностью из грубых листовых экстрактов или смывов апопластной жидкости можно наблюдать появление нескольких новых фракций (Barna *et al.*, 1989). Такое повышение РНКазной активности не обязательно представляет собой прямой ответ на атаку патогена и может быть связано с поранением или преждевременным старением (Green, 1994).

Однако некоторые данные указывают на то, что индукция экстраклеточных РНКаз может быть связана не только с сопутствующими инфекционному процессу событиями, но и непосредственно с формированием устойчивости к патогену. У табака увеличение суммарной РНКазной активности в ответ на инокуляцию *Phytophthora parasitica* по времени совпадает с индукцией гена, кодирующего экстраклеточную рибонуклеазу NE. Экспрессия этого гена наблюдается в промежутке между 4 и 12 часами после инокуляции. Контрольная инокуляция водой тоже вызывает индукцию этого гена (вероятно, связанную с поранением тканей), однако наблюдаемый при этом уровень экспрессии существенно ниже, чем при воздействии патогена. По-видимому, стресс, вызванный процессом инокуляции (повреждением тканей листа), индуцирует некоторый базальный уровень экспрессии гена РНКазы NE, который увеличивается при грибковой инфекции (Galiana *et al.*, 1997). С помощью иммуноблот-анализа было показано, что этот белок детектируется в межклеточной жидкости уже через 8 часов после инфильтрации грибка. В тестах *in vitro* также была показана противогрибковая активность РНКазы NE в концентрациях от 1 до 50 мкг/мл. Присутствие РНКазы в инокуляте в концентрации 50 мкг/мл снижает суточный рост гифов *P. parasitica* и *Fusarium oxysporum* на 60 % и 90 % соответственно. Ферментативно-неактивная форма этой РНКазы, полученная с помощью направленного мутагенеза, теряет такую способность. Это указывает на то, что антимикробное действие этого белка связано с его рибонуклеазной активностью, а не с какими-то другими функциональными свойствами (Hugot *et al.*, 2002).

Экзогенное введение рибонуклеазы NE в межклеточное пространство тоже приводит к подавлению развития *P. parasitica*, однако эффективные концентрации белка *in planta* выше эффективных концентраций *in vitro*. Это указывает на то, что в растении патоген менее чувствителен к антимикробному действию РНКазы (Hugot *et al.*, 2002). Стоит отметить, что подобная картина часто наблюдалась также при изучении антимикробных свойств PR-белков (Van Loon *et al.*, 2006).

РНКазы Nk1, еще одна экстраклеточная РНКазы растений рода *Nicotiana*, почти идентичная

РНКазе NE (уровень идентичности аминокислотных последовательностей 97 %), индуцируется в листьях табака в ответ на механическую инокуляцию вирусом огуречной мозаики. Уровень мРНК, соответствующей РНКазе Nk1, значительно возрастает в промежутке между 3 и 6 часами после инокуляции (Ohno, Ehara, 2005). Довольно ранняя индукция этого белка, по-видимому, не связана с преждевременным старением и апоптозом, которые могут наблюдаться при развитии инфекционного процесса. В целом особенности экспрессии этой рибонуклеазы говорят в пользу ее участия в молекулярном механизме вирусостойчивости.

Считается, что во многих случаях степень поражения растения патогенами определяется скоростью развития защитного ответа, определяющей его эффективность. По-видимому, именно ранняя индукция некоторых экстраклеточных РНКаз может означать их связь с защитным ответом. В настоящее время возможные механизмы противовирусного и фунгицидного действия экстраклеточных РНКаз остаются неясными. В случае вирусной инфекции, вероятно, экстраклеточные РНКазы могут повреждать геномную РНК вирусов на тех стадиях инфекционного процесса, когда она уязвима. Также можно предположить, что во время инокуляции при поранении тканей РНКазы из апопласта могут проникать в поврежденные клетки и убивать их (разрушая пул клеточных мРНК), что не даст вирусу возможности размножиться (Trifonova *et al.*, 2007). Последний механизм может действовать и в естественных условиях: проникновение вирусов в растение, как правило, связано с механическим повреждением тканей растения, что в свою очередь позволяет экстраклеточным РНКазам проникать в клетки и должно вызывать гибель поврежденных клеток вследствие цитотоксического действия этих белков.

Механизм, аналогичный описанному выше, действует у дрожжей во время окислительного стресса. При обработке дрожжевых клеток пероксидом водорода H_2O_2 РНКазы Rny1, в норме локализованная вакуолярно или экстраклеточно, попадает в цитоплазму, где она напрямую разрушает молекулы транспортных и рибосомных РНК и способствует смерти клетки. При этом в клетках дрожжей, лишенных этой РНКазы или несущих ее неактивную форму, в стрессовых

условиях разрушение молекул транспортных РНК не наблюдается, что указывает на то, что другие РНКазы в данных условиях не проявляют такой специфической гидролитической активности (Thompson, Parker, 2009).

Имеются основания предполагать, что у растений подобное разрушение молекул транспортных РНК в стрессовых условиях может являться функцией S-подобных РНКаз. Действительно, разрушение молекул транспортных РНК вследствие окислительного стресса наблюдается также у растений и животных (Thompson *et al.*, 2008; Fu *et al.*, 2009; Yamasaki *et al.*, 2009). При этом несмотря на то, что у млекопитающих функцию гидролиза транспортных РНК при стрессе выполняет ангиогенин (представитель РНКаз семейства А) (Fu *et al.*, 2009; Yamasaki *et al.*, 2009), сверх-экспрессия T₂ РНКазы человека (RNASET2) в клетках дрожжей, лишенных РНКазы Rny1, восстанавливает процесс разрушения транспортных РНК (Thompson, Parker, 2009). В силу того что у растений секреторные РНКазы представлены только семейством T₂-РНКаз, S-подобные РНКазы остаются единственными кандидатами на выполнение этой функции в клетках растений.

Молекулярные механизмы фунгицидной активности экстраклеточных S-подобных РНКаз в настоящее время не известны. Существует предположение, что РНКазы могут проникать в цитоплазму грибов и останавливать трансляцию, разрушая мРНК (Hugot *et al.*, 2002). Это предположение поддерживается вышеописанными данными по участию секреторных РНКаз в разрушении клеточной РНК во время стресса. Однако предложенный механизм подразумевает перенос РНКазы из экстраклеточного пространства в цитоплазму гриба. Другая возможность связана с тем, что РНКазы могут изменять проницаемость клеточных мембран грибов: ранее было показано, что у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* супрессия гена экстраклеточной РНКазы из семейства T₂ приводит к увеличению размеров дрожжевой клетки (MacIntosh *et al.*, 2001). Высказано предположение о том, что некие (в настоящий момент неизвестные) молекулы РНК могут участвовать в формировании пор в мембране клеток дрожжей, что может объяснять эффект рибонуклеаз на их проницаемость. Известно

также, что активность многих PR-белков связана с увеличением проницаемости мембран. При этом показано, что они обладают фунгицидным действием (Van Loon *et al.*, 2006).

Трансгенные растения как модель для изучения рибонуклеаз

Рассмотрение свойств экстраклеточных РНКаз растений показывает, что они могут быть задействованы в механизмах адаптации к различным видам стресса, включая фосфатное голодание, поранение и атаку патогенов. Однако нет данных, демонстрирующих прямую связь между синтезом этих белков и развитием устойчивости к стрессовым факторам. Поэтому необходимы дальнейшие исследования роли экстраклеточных рибонуклеаз в физиологических процессах высших растений. Изучение функциональной роли растительных РНКаз затруднено присутствием в тканях растений одновременно нескольких ферментов с РНКазной активностью (Трифорова и др., 2000.) Одним из оптимальных подходов для изучения функций растительных рибонуклеаз является создание трансгенных растений с измененной активностью конкретных РНКаз.

В 1999 г. были получены растения арабидопсиса, несущие антисмысловой супрессор гена *RNS1*. У полученных растений накопление транскрипта гена *RNS1* было снижено на 90 %. Было обнаружено, что у трансгенных растений такое снижение экспрессии гена *RNS1* сопровождалось аномально высоким содержанием антоцианов, накопление которых часто связано с различными видами стресса, включая фосфатное голодание. При этом обнаруженный феномен проявлялся сильнее, когда растения выращивались на среде с недостатком фосфата. Таким образом, было обнаружено, что другие РНКазы не могут компенсировать уменьшение активности экстраклеточной РНКазы *RNS1* (Bariola *et al.*, 1999).

В 2007 г. было впервые продемонстрировано, что экспрессия гетерологичной экстраклеточной РНКазы может существенно повысить вирусостойкость растений. Трансгенные растения табака, экспрессирующие ген панкреатической секреторной рибонуклеазы быка (относящейся к семейству рибонуклеазы А), характеризуются

повышенной устойчивостью к вирусу табачной мозаики. Устойчивость проявляется в отсутствии или существенной задержке проявления типичных мозаичных симптомов и в замедленном накоплении вируса. Показано, что уровень рибонуклеазной активности в листьях и стеблях полученных растений значительно повышен по сравнению с контролем. При этом также показано, что трансгенные растения характеризуются повышенным уровнем РНКазной активности во фракции апопласта, что указывает на секрецию трансгенной рибонуклеазы в апопласт (Trifonova *et al.*, 2007).

В лаборатории генной инженерии ИЦиГ СО РАН также были созданы две новые генетические модели: трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum*, характеризующиеся увеличенным уровнем активности растительной S-подобной рибонуклеазы, и растения со сниженным уровнем экспрессии собственной экстраклеточной S-подобной рибонуклеазы. В первом случае был использован трансген экстраклеточной РНКазы ZRNaseII *Zinnia elegans*, и полученные линии характеризовались значительно более высоким (в 10–15 раз по сравнению с контролем) уровнем РНКазной активности в апопласте (Сангаев и др., 2007). Во втором случае трансгенные растения табака несли дцРНК-супрессор гена экстраклеточной РНКазы Nk1 табака и характеризовались сни-

женным уровнем РНКазной активности в апопласте (Сангаев и др., 2010). На рис. 1 приведен спектр белков с рибонуклеазной активностью в листовых экстрактах из трансгенных растений этих линий. При проращивании в стандартных условиях полученные трансгенные растения не характеризовались существенными отличиями по морфологическим характеристикам и срокам развития от нетрансгенных растений. Этот результат показывает, что исследуемые белки не задействованы в контроле процессов роста и развития растений. Дальнейшие эксперименты позволяют определить их связь с молекулярными механизмами стрессоустойчивости.

Заключение

РНКазы семейства T₂ широко распространены в растительном мире и задействованы во многих физиологических процессах высших растений, включая селективное отторжение несовместимой пыльцы (у растений с гаметофитным типом самонесовместимости), процессы старения, адаптацию к фосфатному голоданию и защитный ответ на поранение и атаку патогенов. При этом они характеризуются высокой степенью функциональной диверсификации. Это позволяет провести параллель между РНКазами семейства T₂ растений и РНКазами семейства А позвоночных животных. Действи-

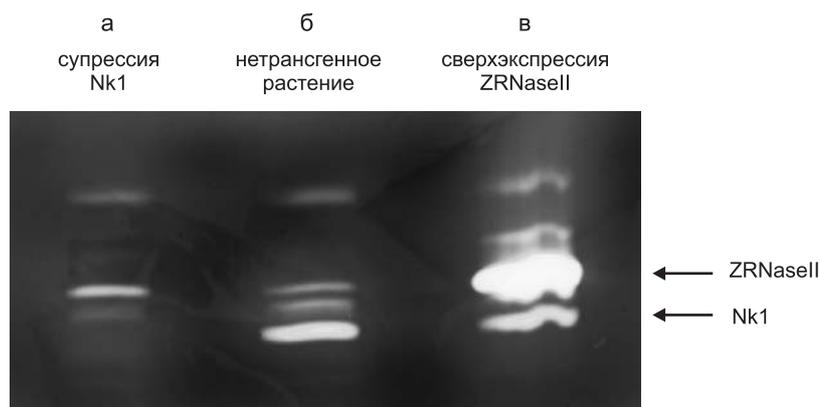


Рис. 1. Спектр белков с рибонуклеазной активностью в листовых экстрактах из: а – трансгенных растений табака, несущих супрессор гена экстраклеточной РНКазы Nk1 *Nicotiana tabacum* (супрессия Nk1) (описаны (Сангаев и др., 2010)); б – контрольных растений табака (нетрансгенное растение); в – растений табака, экспрессирующих экстраклеточную РНКазу ZRNaseII *Zinnia elegans* (сверхэкспрессия ZRNaseII) (описаны (Сангаев и др., 2007)). (Энзимограмма. В качестве субстрата в полиакриламидном геле использовалась высокомолекулярная РНК дрожжей).

тельно, РНКазы семейства А, как и секреторные РНКазы растений, задействованы во многих процессах, причем их биологические функции сходны с функциями S-подобных РНКаз. К тому же, несмотря на некоторые различия в ферментативной активности, основным субстрат РНКаз семейств Т₂ и А один и тот же.

Однако несмотря на такое сходство, РНКазы семейства А, по-видимому, не смогли полностью функционально заменить РНКазы семейства Т₂ у позвоночных животных, так как по крайней мере один ген, кодирующий РНКазу семейства Т₂, обнаружен у каждого животного, геном которого полностью секвенирован (Hillwig *et al.*, 2009). Причина такой консервативности (очевидно, связанная с выполняемыми белком функциями) пока не известна. Существует гипотеза, что экстраклеточные РНКазы, экспрессия которых наблюдается на ранних стадиях развития (в эмбриональных тканях), могут быть связаны с метаболизмом микроРНК (miRNA), транспортируемых по экстраклеточному пространству, и, как следствие, с регуляцией экспрессии генов (Hillwig *et al.*, 2009).

Таким образом, с одной стороны, изучение экстраклеточных РНКаз растений может углубить наши знания о механизмах адаптации растений к различным формам стресса, что имеет большое теоретическое и прикладное значение. С другой стороны, возможно, Т₂ РНКазы не только играют роль в процессах, рассмотренных в данной статье, но также выполняют какие-то иные важные функции, которые могут быть эволюционно консервативными.

Работа поддержана грантом Министерства образования и науки РФ (2.1.1/6382), РФФИ-НАНУ (10-04-90411), интеграционным проектом СО РАН (№ 28) и грантом программы Президиума РАН «Биологическое разнообразие» (№ 23.22). Авторы также выражают свою признательность фонду РФФИ грант № 09-04-01452 за частичную поддержку проводимых исследований.

Литература

- Малиновский В.И. РР-белки и фитовирусы // Усп. соврем. биологии. 2009. Т. 129. № 3. С. 1–9.
- Сангаев С.С., Трифонова Е.А., Титов С.Е. и др. Эффективная экспрессия гена экстраклеточной рибонуклеазы *Zinnia elegans* в растениях табака *Nicotiana tabacum* SR1 // Генетика. 2007. Т. 43. № 2. С. 1002–1005.
- Сангаев С.С., Трифонова Е.А., Титов С.Е. и др. Инактивация гена *Nk1* в растениях табака *Nicotiana tabacum* SR1 за счет РНК-интерференции // Генетика. 2010. Т. 46. № 1. С. 131–134.
- Трифопова Е.А., Кочетов А.В., Шумный В.К. Роль нуклеаз в физиологических процессах высших растений // Усп. соврем. биологии. 2000. Т. 120. С. 395–405.
- Трифопова Е.А., Кочетов А.В., Шумный В.К. Молекулярные механизмы системной устойчивости растений к вирусным инфекциям и способы повышения вирусоустойчивости путем трансгенеза // Усп. соврем. биологии. 2007. Т. 127. С. 13–24.
- Abel S., Nürnberg T., Ahnert V. *et al.* Induction of an extracellular cyclic nucleotide phosphodiesterase as an accessory ribonucleolytic activity during phosphate starvation of cultured tomato cells // Plant Physiol. 2000. V. 122. P. 543–552.
- Bariola P.A., Howard C.J., Taylor C.B. *et al.* The *Arabidopsis* ribonuclease gene *RNS1* is tightly controlled in response to phosphate limitation // Plant J. 1994. V. 6. P. 673–685.
- Bariola P.A., MacIntosh G.C., Green P.J. Regulation of S-like ribonuclease levels in *Arabidopsis*. Antisense inhibition of *RNS1* or *RNS2* elevates anthocyanin accumulation // Plant Physiol. 1999. V. 119. P. 331–342.
- Barna B., Ibenhal W.D., Heitefuss R. Extracellular RNase activity in healthy and rust infected wheat leaves // Physiol. Mol. Plant Pathol. 1989. V. 35. P. 151–160.
- Caporale C., Di Berardino I., Leonardi L. *et al.* Wheat pathogenesis-related proteins of class 4 have ribonuclease activity // FEBS Lett. 2004. V. 575. P. 71–76.
- Chakravorty A.K., Shaw M., Scrubb L.A. Ribonuclease activity of wheat leaves and rust infection // Nature. 1974. V. 247. P. 577–580.
- Deshpande R.A., Shankar V. Ribonucleases from T2 family // Crit. Rev. Microbiol. 2002. V. 28. P. 79–122.
- Dodds P.N., Clarke A.E., Newbiggin E. Molecular characterization of an S-like RNase of *Nicotiana glauca* that is induced by phosphate starvation // Plant Mol. Biol. 1996. V. 31. P. 227–238.
- Fu H., Feng J., Liu Q. *et al.* Stress induces tRNA cleavage by angiogenin in mammalian cells // FEBS Lett. 2009. V. 583. P. 437–442.
- Galiana E., Bonnet P., Conrod S. *et al.* RNase activity prevents the growth of a fungal pathogen in tobacco leaves and increases upon induction of systemic acquired resistance with elicitor // Plant Physiol. 1997. V. 115. P. 1557–1567.
- Green P.J. The ribonucleases of higher plants // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1994. V. 45. P. 421–445.

- Hillwig M.S., LeBrasseur N.D., Green P.J., MacIntosh G.C. Impact of transcriptional, ABA-dependent, and ABA-independent pathways on wounding regulation of *RNS1* expression // *Mol. Genet. Genomics*. 2008. V. 280. P. 249–261.
- Hillwig M.S., Rizhsky L., Wang Y. *et al.* Zebrafish RNase T2 genes and the evolution of secretory ribonucleases in animals // *BMC Evolutionary Biology*. 2009. DOI: 10.1186/1471-2148-9-170.
- Hugot K., Ponchet M., Marais A. *et al.* A tobacco S-like RNase inhibits hyphal elongation of plant pathogens // *MPMI*. 2002. V. 15. P. 243–250.
- Kariu T., Sano K., Shimokawa H. *et al.* Isolation and characterization of a wound-inducible ribonuclease from *Nicotiana glutinosa* leaves // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1998. V. 62. P. 1144–1151.
- Köck M., Löffler A., Abel S., Glund K. cDNA structure and regulatory properties of a family of starvation-induced ribonucleases from tomato // *Plant Mol. Biol.* 1995. V. 27. P. 477–485.
- Köck M., Gross N., Stenzel I., Hause G. Phloem-specific expression of the wound-inducible ribonuclease LE from tomato // *Planta*. 2004. V. 29. P. 233–242.
- LeBrasseur N.D., MacIntosh G.C., Pérez-Amador M.A. *et al.* Local and systemic wound-induction of RNase and nuclease activities in *Arabidopsis*: RNS1 as a marker for a JA-independent systemic signaling pathway // *The Plant J.* 2002. V. 29. P. 393–403.
- Lers A., Khalchitski A., Lomaniec E. *et al.* Senescence-induced RNases in tomato // *Plant Mol. Biol.* 1998. V. 36. P. 439–449.
- Liu J.-J., Ekramoddoullah A.K.M. The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2006. V. 68. P. 3–13.
- Lusso M., Kuc J. Increased activities of ribonuclease and protease after challenge in tobacco plants with induced systemic resistance // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 1995. V. 47. P. 419–428.
- Ma R.-C., Oliveira M.M. The RNase PD2 gene of almond (*Prunus dulcis*) represents an evolutionary distinct class of S-like RNase genes // *Mol. Genet.* 2000. V. 263. P. 925–933.
- MacIntosh G.C., Bariola P.A., Newbiggin E., Green P.J. Characterization of Rny1, the *Saccharomyces cerevisiae* member of the T₂ RNase family of RNases: Unexpected functions for ancient enzymes? // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. P. 1018–1023.
- MacIntosh G.C., Hillwig M.S., Meyer A., Flagel L. RNase T2 genes from rice and the evolution of secretory ribonucleases in plants // *Mol. Genet. Genomics*. 2010. DOI: 10.1007/s00438-010-0524-9.
- Nürnberg T., Abel S., Jost W., Glund K. Induction of an extracellular ribonuclease in cultured tomato cells upon phosphate starvation // *Plant Physiol.* 1990. V. 92. P. 970–976.
- Ohno H., Ehara Y. Expression of ribonuclease gene in mechanically injured or virus-inoculated *Nicotiana tabacum* leaves // *Tohoku J. Agric. Res.* 2005. V. 55. P. 99–109.
- Park C.-J., Kim K.-J., Shin R. *et al.* Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway // *Plant J.* 2004. V. 37. P. 186–198.
- Raghothama K.G., Karthikeyan A.S. Phosphate acquisition // *Plant and Soil*. 2005. V. 274. P. 37–49.
- Reymond P., Weber H., Damond M., Farmer E. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis* // *The Plant Cell*. 2000. V. 12. P. 707–719.
- Rogers S.W., Rogers J.C. Cloning and characterization of a gibberellin-induced RNase expressed in barley aleurone cells // *Plant Physiol.* 1999. V. 119. P. 1457–1464.
- Taylor C.B., Green P.J. Genes with homology to fungal and S-gene RNases are expressed in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Physiol.* 1991. V. 96. P. 980–984.
- Thompson D.M., Lu C., Green P.J., Parker R. tRNA cleavage is a conserved response to oxidative stress in eukaryotes // *RNA*. 2008. V. 14. P. 2095–2103.
- Thompson D.M., Parker R. The RNase Rny1p cleaves tRNAs and promotes cell death during oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* // *JCB*. 2009. V. 185. P. 43–50.
- Trifonova E.A., Sapotsky M.V., Komarova M.L. *et al.* Protection of transgenic tobacco plants expressing bovine pancreatic ribonuclease against tobacco mosaic virus // *Plant Cell Rep.* 2007. V. 26. P. 1121–1126.
- Van Loon L.C., Van Strien E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 1999. V. 55. P. 85–97.
- Van Loon L.C., Rep M., Pieterse C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2006. V. 44. P. 135–162.
- Van Nerum I., Certal A.C., Oliveira M.M. *et al.* PD1, an S-like RNase gene from a self-incompatible cultivar of almond // *Plant Cell Rep.* 2000. V. 19. P. 1108–1114.
- Yamasaki S., Ivanov P., Hu G.-F., Anderson P. Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression // *J. Cell Biol.* 2009. V. 185. P. 35–42.
- Ye Z.H., Droste D.L. Isolation and characterization of cDNAs encoding xylogenesis-associated and wounding-induced ribonucleases in *Zinnia elegans* // *Plant. Mol. Biol.* 1996. V. 30. P. 697–709.

PHYSIOLOGICAL ROLE OF EXTRACELLULAR RIBONUCLEASES IN HIGHER PLANTS

S.S. Sangaev¹, A.V. Kochetov^{1,2}, S.S. Ibragimova¹, B.A. Levenko³, V.K. Shumny^{1,2}

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia;

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia, e-mail: sangaevs@gmail.com;

³ N.N. Grishko National Botanical Garden of the Ukraine, Kiev, Ukraine

Summary

The extracellular space of plant tissues contains a complex set of proteins whose functions are poorly understood. This paper represents the current view on biological roles of extracellular ribonucleases. In particular, their relation to molecular mechanisms conferring resistance to pathogens is discussed.

Key words: T₂ RNases, S-like RNases, stress, phosphate deficiency, wounding, protection against pathogens.

ГЕНЕТИКА И ФЕНОГЕНЕТИКА МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ РАСТЕНИЙ

Р.С. Юдина

Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: yurs@bionet.nsc.ru

Статья представляет собой обзор литературных данных о структуре, функциях, свойствах и генетическом контроле фермента малатдегидрогеназы (МДГ) у растений. У большинства изученных объектов выявлен высокий уровень полиморфизма, проявляющийся в наличии множественных молекулярных форм малатдегидрогеназы. Установлено, что полиморфизм МДГ у каждого вида генетически детерминирован наличием нескольких локусов со множественными аллелями. Четкое фенотипическое проявление, высокая активность малатдегидрогеназы в разных органах и тканях делают этот фермент надежным и удобным генетическим маркером при проведении различных исследований по частной, экологической и популяционной генетике.

Ключевые слова: локусы, аллели, изоферменты, маркеры, компартменты.

Открытие изоферментов (Hunter, Markert, 1957; Markert, Moller, 1959) дало в руки исследователей простые и надежные маркерные признаки для изучения самого широкого класса биологических явлений. Появились принципиально новые возможности маркирования генов и генетических систем. Преимущество изоферментных маркеров состоит в том, что они сами являются носителями определенных функций в метаболизме и наряду с генами или локусами генома могут быть факторами идентификации этих функций. Изоферменты могут быть использованы как маркеры для филогенетического анализа и выявления интрогрессий и как маркеры для раскрытия внутривидовой дифференциации, сортовой идентификации и анализа популяций. Главными же преимуществами изоферментов как генетических маркеров являются: кодоминантный характер наследования, четкое фенотипическое проявление и легкость идентификации. Среди исследуемых изоферментных систем значительное место занимают дегидрогеназы, к числу которых относится и малатдегидрогеназа.

НАД-зависимая малатдегидрогеназа (МДГ, L-малат: НАД-оксиредуктаза; К.Ф.1.1.1.37) – широко распространенный фермент животных,

растений и микроорганизмов. МДГ катализирует окисление (дегидрирование) яблочной кислоты (L-малата) до щавелевоуксусной (оксалоацетата) в присутствии кофактора НАД⁺:

$$\text{COOH-CH}_2 - \text{CHON-COOH} + \text{НАД}^+ =$$



(Диксон, Уэбб, 1982).

МДГ относится к числу довольно хорошо изученных ферментов. Известно, что малатдегидрогеназа существует в клетке в различных молекулярных формах. У большинства исследованных объектов обнаружено две формы МДГ: митохондриальная и цитоплазматическая (Shannon, 1968; Longo, Scandalios, 1969; Scandalios, 1969; Yang, Scandalios, 1974; Yang, 1975 и др.) Митохондриальная МДГ функционирует в качестве компонента цикла Кребса, а растворимая (цитоплазматическая) может играть роль челночного механизма среди субклеточных компонентов (Ленинджер, 1974; Ting *et al.*, 1975), участвовать в кислотном метаболизме в тканях растений (Yang, 1975), в автотрофной фиксации CO₂ у высших растений и других метаболических путях (Scandalios, 1974; Yang, Scandalios, 1974; Yang, 1975).

В растительных тканях МДГ найдена также в глиоксисомах (Breidenbach, Beevers, 1967; Longo, Scandalios, 1969; Yang, Scandalios, 1974; Walk, Hock, 1977), пероксисомах (Yamazaki, Tolbert, 1969; Садунишвили, Нуцубидзе, 1980) и микросомах (Тарасова, 1988, Yudina, Levites, 2007; Юдина, Левитес, 2008). Микротельцовая форма МДГ участвует в фотодыхании и глиоксилатном цикле (Gottlieb, 1982).

Структура и свойства фермента

Изучение структуры молекулы малатдегидрогеназы у кукурузы, сельдерея, риса, авокадо и других растений показало, что молекула МДГ состоит из двух субъединиц, т. е. по своей четвертичной структуре МДГ – димер (Longo, Scandalios, 1969; Endo, Morishima, 1983; Orton, 1983; Torres, 1983; Arus, Orton, 1984).

Наиболее детально изучена малатдегидрогеназа у кукурузы (Scandalios, 1969, 1974; Yang, Scandalios, 1975a, b; Yang *et al.*, 1977; McMillin, Scandalios, 1980–1982; Goodman, Stuber, 1983; Newton, 1983). МДГ кукурузы локализована в хлоропластах (Scandalios, 1974), микротельцах, митохондриях и в цитоплазме (Ting *et al.*, 1975). По первичной структуре цитоплазматические и митохондриальные формы различаются между собой гораздо сильнее, чем митохондриальные формы МДГ разных родов (Newton, 1983). Этот вывод сделан путем сравнения реакции различных изоферментов МДГ с антисывороткой, приготовленной отдельно к продукту каждого гомозиготного *Mdh* локуса. Антисыворотка, приготовленная против очищенной митохондриальной МДГ, перекрестно реагировала с микротельцовой, но не реагировала с растворимой МДГ (Ting *et al.*, 1975; Goodman *et al.*, 1980; Newton, 1983). Изучение биохимических свойств митохондриальных и цитоплазматических МДГ кукурузы показало, что они различаются по термостабильности, оптимуму pH, кинетическим свойствам и т. д. (Yang, Scandalios, 1974; Yang, 1975).

Выявлены различия между цитоплазматическими и митохондриальными изоформами МДГ у винограда при проведении изоэлектрического фокусирования. Цитоплазматические формы имели pH 4,0–5,5, а митохондриальные были менее кислые с pH от 5,5 до 7,5, с мо-

лекулярным весом 80 тыс. дальтон (Taureilles *et al.*, 1995).

При изучении молекулярных свойств глиоксисомальной и митохондриальной МДГ семян арбуза также найдены различия. Молекулярный вес глиоксисомальной МДГ арбуза составляет 67 тыс. дальтон, а митохондриальной – 74 тыс. При высоких концентрациях энзима наблюдалась агрегация глиоксисомального фермента, а митохондриального – нет. Ферменты различаются по своим изоэлектрическим точкам, термостабильности, оптимуму pH и другим свойствам (Walk *et al.*, 1977; Walk, Hock, 1977).

При воздействии различных ингибиторов синтеза МДГ кукурузы было показано, что митохондриальные МДГ синтезируются на цитоплазматических рибосомах (Yang, Scandalios, 1975a). Есть сведения и о том, что митохондриальная и глиоксисомальная МДГ синтезируются в форме предшественников с большой молекулярной массой, затем при транспортировке этих предшественников из цитоплазмы в органеллы происходит процесс отщепления части полипептидной цепи с молекулярной массой 8 тыс. дальтон от глиоксисомального предшественника и 3,3 тыс. дальтон от митохондриального, что приводит к образованию конечных функциональных субъединиц. Цитоплазматическая МДГ не синтезировалась в форме предшественника (Gietl, Hock, 1982).

Малатдегидрогеназа исследовалась и у других растительных объектов: фасоли (Habig, Racusen, 1968), шпината (Yamazaki, Tolbert, 1969; Rocha, Ting, 1971; Zschoche, Ting, 1973a), овса (Yue, 1968; Grimwood, McDaniel, 1970), пшеницы (Mitra, Bhatia, 1971; Воденичарова, 1980; Benito, Salinas, 1983; Hart, 1983), хлопчатника (O'Sullivan, Wedding, 1972; Bortman *et al.*, 1981), арабидопсиса (Cammaerts, Jacobs, 1975), гороха (Zschoche, Ting, 1973b; Weeden, Magx, 1984), сахарной свеклы (Тарасова, 1988), амаранта (Юдина и др., 2005) и т. д.

Наряду с вышеуказанными различиями имеются и сходные характеристики множественных молекулярных форм МДГ растений. Так, у большинства изученных объектов молекулярные веса МДГ имеют размеры от 60 до 70 тыс. дальтон. При электрофорезе в крахмальном геле формы малатдегидрогеназы, связанные с органеллами,

мигрируют от катода к аноду в определенной последовательности: ближе всего к катоду, как правило, располагается микротельцовая, затем митохондриальная и цитоплазматическая (O'Sullivan, Wedding, 1972). Общим является и тот факт, что митохондриальные МДГ большинства эукариот по данным иммунологических исследований имеют сходные структурные характеристики, показывая высокую степень эволюционной сохранности (Newton, 1983).

На основании вышеизложенного и с учетом того факта, что различные и высокоспецифичные формы этого фермента находятся почти в каждом главном субклеточном компоненте, можно заключить, что МДГ является уникальным модельным ферментом для изучения взаимоотношений между органеллами (Scandalios, 1974).

Генетический контроль малатдегидрогеназы

Полиморфизм и специфичность множественных молекулярных форм НАД-МДГ характерны как для разных тканей одного растения, так и для разных компартментов клетки. Кроме того, полиморфизм по молекулярным формам выявлен и для каждого компартмента. 7 митохондриальных и 6 цитоплазматических электрофоретических вариантов выявлены у кукурузы (Goodman *et al.*, 1980; Newton, Schwartz, 1980; McMillin, Scandalios, 1981, 1982; Goodman, Stuber, 1983); по 3 варианта МДГ растворимых и митохондриальных у сои (Kiang, Gorman, 1983); 4 растворимые и 5 митохондриальных форм МДГ у арабидопсиса (Cammaerts, Jacobs, 1975); 2 растворимые и 2 митохондриальных варианта обнаружены у сосны (Guries, Ledic, 1978) 4 митохондриальных и 3 микросомальных у сахарной свеклы (Тарасова, 1988, Юдина, Левитес, 2008) и т. д.

Известно, что молекулярная гетерогенность ферментных форм либо генетически детерминирована, либо является следствием эпигенетических изменений.

Первые доказательства генетической природы полиморфизма МДГ были получены Лонго и Скандалиосом на кукурузе (Longo, Scandalios, 1969). При скрещивании двух инбредных линий кукурузы, 59 и Oh 51A, имеющих различные формы митохондриальных МДГ, были получены реципрокные гибриды. Изоферментные

спектры этих гибридов были идентичны и содержали, помимо родительских форм МДГ, гибридные. Расщепление потомства в F₂ на два родительских фенотипа и гибридный соответствовало менделевскому.

К настоящему времени изоферменты малатдегидрогеназы у кукурузы изучены более детально, чем у других культур. Существуют две модели генетического контроля МДГ у кукурузы. Согласно модели Гудмана с соавторами, митохондриальная МДГ кодируется тремя структурными генами: *Mdh1*, *Mdh2* и *Mdh3*, а цитоплазматическая – двумя: *Mdh4* и *Mdh5*. Митохондриальные формы МДГ способны взаимодействовать на уровне субъединиц с образованием межгенных и межаллельных гетеродимеров. Гибридные димеры не образуются между изоформами разных субклеточных органелл (Goodman *et al.*, 1980; Newton, 1983). Структурные гены МДГ принадлежат к различным группам сцепления: *Mdh1* локализован в хромосоме 8, *Mdh2* – в дистальном конце длинного плеча хромосомы 6 и *Mdh3* – в дистальном конце длинного плеча хромосомы 3 (Newton, Schwartz, 1980; Newton, 1983). Другая интерпретация представлена Мак-Миллином и Скандалиосом (McMillin, Scandalios, 1980, 1981). Эти модели различаются номенклатурой и постулированием отдельных вариантов МДГ (табл. 1). Одна из причин разной интерпретации изоферментных спектров заключается в применении разных буферных систем для электрофореза. С использованием трис-цитратного буфера, рН 7,0 (в работах Мак-Миллина и Скандалиоса) происходит относительно слабое разделение изоферментов, что, по мнению Гудмана и Стабера (Goodman, Stuber, 1983), может приводить к ошибкам при интерпретации результатов.

В табл. 1 приведен перечень различных растительных объектов, у которых изучен генетический контроль малатдегидрогеназы. Наследование МДГ у кукурузы, эвкалипта, сахарной свеклы и др. определяли классическим методом генетического анализа с гибридизацией контрастных форм, анализом расщепления в F₂ и бэкрассах. У пшеницы наследование изоферментов определяли по сопоставлению спектров у нормальных и анеуплоидных форм. У некоторых культур, сосны, кедра, персика и др., проводили анализ соответствия частот фенотипических классов в панмиктических попу-

Таблица 1

Генетический контроль НАД зависимой малатдегидрогеназы у растений

Культура	Локус	Аллели	Хромосома	Компартмент	Метод исследования	Буфер	Ткань	Литературный источник
Авокадо (<i>Persea americana</i>)	<i>Mdh1</i>	<i>F</i> <i>S</i>	–	–	кр.	трисцитрат, рН = 6,9	листья, пыльца, фрукты	Torres, 1983; 1984
Амарант (<i>Amaranthus L.</i>)	<i>Mdh1</i> <i>Mdh2</i>	<i>Mdh2-F</i> <i>Mdh2-N</i> <i>Mdh2-S</i>	– –	– –	кр.	трисцитрат, рН = 7,0	листья, семена, проростки	Юдина и др., 2005
Гребневик обыкновенный (<i>Cynosurus cristatus</i>)	<i>Mdh1</i> <i>Mdh2</i>	<i>F</i> <i>S</i> <i>F</i> <i>S</i>	– –	– –	д/э		побеги	Ennos, 1986
Кедр ладаный (<i>Calocedrus deccurens</i>)	<i>Mdh1</i> <i>Mdh2</i> <i>Mmdh1</i>	<i>Mdh1-0.60</i> <i>Mdh1-1.00</i> <i>Mdh1-1.07</i> <i>Mdh1-1.39</i> <i>Mdh1-1.46</i> <i>Mdh1-1.54</i> <i>Mdh1-1.77</i> <i>Mdh2-0.11</i> <i>Mdh2-1.00</i> <i>Mdh2-2.22</i>	– – –	– – –	кр.	цитрат N морфолин, рН = 6,1	макрогаметофит, зародыши	Harry, 1983
Кукуруза (<i>Zea mays</i>)	<i>Mdh1</i> <i>Mdh2</i> <i>Mdh3</i> <i>Mdh4</i> <i>Mdh5</i> <i>Mmm</i>	<i>-A1</i> <i>-A6</i> <i>-A10.5</i> <i>-A null</i> <i>-B3</i> <i>-B6</i> <i>-B null</i> <i>-C16</i> <i>-C18</i> <i>-D8</i> <i>-D12</i> <i>-D14.5</i> <i>-D null</i> <i>-E12</i> <i>-E15</i> <i>-E16.4</i> <i>-E null</i>	8 6L 3L 1L 5S 1L	м м м ц ц –	кр.	гистидин, рН = 5,7, рН = 5,0	корни, проростки, эндосперм, щиток, листья	Goodman <i>et al.</i> , 1980; Newton, Schwartz, 1980; Goodman, Stuber, 1983

Продолжение таблицы 1

Культура	Локус	Аллели	Хромосома	Компартмент	Метод исследования	Буфер	Ткань	Литературный источник
Кукуруза (<i>Zea mays</i>)	<i>Mmdh1</i>	- <i>m8</i> - <i>m10</i>	–	м	кр.	трис- цитрат, рН = 7,0	корни, проростки, эндосперм, щиток, пыльца	McMillin, Scandalios, 1981
	<i>mMdh2</i>	- <i>m5</i> - <i>m3</i> - <i>m0</i>	–	м				
	<i>mMdh3</i>	- <i>m8</i>	–	м				
	<i>mMdh4</i>	- <i>m7</i> - <i>m3</i>	–	м				
	<i>sMdh1</i>	- <i>s5</i> - <i>s1</i>	–	ц				
	<i>sMdh2</i>	- <i>s4a</i>	–	ц				
	<i>sMdh3</i>	- <i>s1</i> - <i>s4</i> - <i>s8</i> - <i>s0</i>	–	ц				
Овес (<i>Avena barbata</i>)	<i>Mdh1</i>	<i>Mdn1</i>	–	–	кр.	гистидин, трис- цитрат, рН = 7,0	проростки, зеленые листья	Price, Kahler, 1983
Опунция (<i>Opuntia basilaris</i>)	<i>MDH1</i>	<i>a1</i> <i>a2</i>	–	м/т	кр.	трис- цитрат, рН = 7,0	листвоветь	Sternberg, Ting, 1979
Орех-пекан (<i>Caria illinoien</i>)	<i>Mdh1</i>		–	–	кр.	цитрат- морфо- лин, рН = 6,1	листья, камбий, стебли, пыльца	Marquard, Skorpenske, 1989
Персик (<i>Persica vulgaris</i>)	<i>Mdh1</i>		–	ц	кр.	гистидин, трис- цитрат рН = 7,0		Arulsekar <i>et al.</i> , 1986
	<i>Mdh2</i>		–	м				
Перец (<i>Cap- sicum L.</i>)	<i>Mdh1</i>		–	–	кр.	литиевый буфер	листья	McLeod <i>et al.</i> , 1983
Петуния (<i>Petunia hybrida</i>)	<i>mdh1</i>	1 2	7	–	кр.	трис- цитрат, рН = 7,0	листья, корни, цветы	Wijsmann, 1983
Пшеница (<i>Triticum aestivum</i>)	<i>Mdh</i>	A B	1B	м	ПААГ		проростки	Flavell, McPherson, 1972; Powling <i>et al.</i> , 1981

Продолжение таблицы 1

Культура	Локус	Аллели	Хромосома	Компартмент	Метод исследования	Буфер	Ткань	Литературный источник
Пшеница (<i>Triticum aestivum</i>)	<i>MDH</i>	1 3	–	ц	ПААГ кр.	гистидин, трис- цитрат, рН = 7,0	проростки	Benito, Salinas, 1983
	<i>MDH</i>	1 3	–	–				
Рис (<i>Oryza sativa</i>)	<i>Mdh-A</i>	-1 -2 -3	–	–	кр.	боратный буфер	коле- оптиль, листья, корни	Endo, Morishma, 1983
	<i>B</i>	–	–					
	<i>C</i>	–	–					
Сахарная свекла (<i>Beta vulgaris</i>)	<i>Mor1</i>	<i>Mor1-N</i> <i>Mor1-P</i>	–	м/с	кр.	трис- цитрат, рН = 7,0	семена, проростки, листья	Левитес и др., 1980; Тарасова, 1988
	<i>Mor2</i>	<i>Mor2-F</i> <i>Mor2-S</i>	–	м				
	<i>Mor3</i>							
Сельдерей (<i>Apium graveo- lens</i>)		<i>MDH1</i> <i>MDH2</i>	– –	– –	кр.	гистидин, трис- цитрат, рН = 7,0	проростки	Orton, 1983, Arus, Orton, 1984
	<i>Mdh3</i>	<i>-F</i> <i>-S</i>	–	–				
Сосна (<i>Pinus attenuata</i>)	<i>Mdh1</i>		–	–	кр.	морфо- лин- цитрат, рН = 6,1	женский гаметофит	Strauss, Conkle, 1986
	<i>Mdh2</i>		–	–				
	<i>Mdh3</i>		–	–				
	<i>Mdh4</i>		–	–				
	<i>Mdhm</i>		–	–				
Сосна (<i>P. rigida</i> Mill.)	<i>Mdh1</i>	<i>F</i> <i>S</i>	–	ц	кр.	морфо лин- цитрат, рН = 6,1	женский гаметофит	Guries, Ledic, 1978; O' Malley <i>et al.</i> , 1986
	<i>Mdh2</i>	<i>F</i> <i>S</i>	–	м				
Сосна (<i>P. banksa</i>)	<i>Mdh3</i>	1 2	–	–	кр.	морфо- лин- цитрат, рН = 6,1	женский гаметофит	Cheliak <i>et al.</i> , 1984
	<i>Mdh4</i>	1 2	–	–				
Соя (<i>Glycine max</i>)	<i>Mdh1</i>	1 2 3	–	ц	ПААГ кр.	гистидин, рН = 6,0	семядоли, молодые листья	Kiang, Gorman, 1983
	<i>Mdh2</i>	4 5 6	–	м				

Окончание таблицы 1

Культура	Локус	Аллели	Хромо-сома	Компарт-мент	Метод исследования	Буфер	Ткань	Литературный источник
Фасоль (<i>Phaseolus lunatus</i>)	<i>Mdh1</i>	<i>Mdh1</i> ⁸⁴ <i>Mdh1</i> ¹⁰⁰	–	ц	кр.	0,1 М трис-малат, рН = 7,2	семядоли, корни, листья	Zoro <i>et al.</i> , 1999
	<i>Mdh2</i>	<i>Mdh2</i> ¹⁰⁰ <i>Mdh2</i> ¹⁴⁰	–	ц				
	<i>Mdh3</i>	<i>Mdh3</i> ¹⁰⁰ <i>Mdh3</i> ¹⁰⁴	–	м				
Хохлатка (<i>Corydalis solida</i>)	<i>MDH</i>	<i>ff</i> <i>ss</i>	–	–	ПААГ		побеги, семена	Nagy <i>et al.</i> , 1980
Цитру- совые (<i>Citrus and Pancirus trifoliata</i>)	<i>Mdh1</i>	<i>F</i> <i>S</i>	–	–	кр.		нуцеллус	Torres <i>et al.</i> , 1978, 1982
	<i>Mdh2</i>	<i>F</i> <i>S</i>	–	–				
	<i>Mdh3</i> <i>Mdh4</i>		–	–				
Эвкалипт (<i>Eucalyptus</i> L'Herit.)	<i>Mdh1</i>	1 2	–	–	кр.	гистидин- цитрат, рН = 8,0	проростки	Moran, Bell, 1983
	<i>Mdh2</i>	1 2 3 4	–	–				
Эхино- цереус (<i>Cereus peruvianus</i>)		<i>sMDH1</i> <i>sMDH2</i> <i>sMDH3</i> <i>sMDH4</i> <i>mMDH1</i> <i>mMDH2</i> <i>mMDH3</i> <i>mMDH4</i> <i>mMDH5</i> <i>gMDH1</i>	– – – – – – – – – –	ц ц ц ц м м м м м м гл/с	кр.	трис- цитрат рН = 7,0	проростки, семена, каллус	Machado <i>et al.</i> , 1993
Ячмень (<i>Hordeum vulgare</i>)	<i>Mdh1</i>	-1 -2	5	–	кр.	гистидин, цитрат, рН = 8,0	зародыши, корневые и листовые побеги	Brown, Munday, 1982; Powling <i>et al.</i> , 1981; Linde- Laursen <i>et al.</i> , 1987
	<i>Mdh2</i>	-1 -2	3	–				

Сокращенные обозначения: ПААГ – полиакриламидный гель; д/э – диск электрофорез; кр. – крахмальный гель; ц – цитоплазма, м – митохондрии; г/л – глиоксисомы; м/т – микротельца; м/с – микросомы; (–) – отсутствие данных.

лящих теоретическим частотам, вычисленным по формуле Харди–Вайнберга, а также сопоставляли изоферментные спектры в соматической ткани и пыльце. Помимо структурных локусов, контролирующих синтез МДГ, у кукурузы, сосны и кедра обнаружены гены *Mmm*, *Mdhm* и *Mdh1m* соответственно, модифицирующие как электрофоретическую подвижность, так и энзиматическую активность (Goodman, Stuber, 1983; Harry, 1983; Strauss, Conkle, 1986).

Наряду с кукурузой определена хромосомная локализация *Mdh* локусов у ячменя, пшеницы и пегунии (Goodman *et al.*, 1980; Newton, Schwartz, 1980; Powling *et al.*, 1981; Brown, Munday, 1982; Benito, Salinas, 1983; Goodman, Stuber, 1983; Wijisman, 1983).

Экспрессия локусов, контролирующих МДГ у растений

Вариации изоферментных спектров, сопровождающие процессы роста и дифференцировки тканей, описаны у многих видов растений и для разных ферментных систем. Малатдегидрогеназа не является исключением. Цитоплазматическая и митохондриальная формы МДГ кукурузы активны в корнях, проростках, эндосперме, щитке, гипокотиле, колеоптиле, листьях и пыльце (Longo, Scandalios, 1969; Goodman *et al.*, 1980; Newton, Schwartz, 1980; Newton, 1983), в то время как микротельцовая МДГ активна в эндосперме и щитке (Longo, Scandalios, 1969; Ting *et al.*, 1975; Yang, Scandalios, 1975b; Newton, 1983). В период созревания зерновки кукурузы показано возрастание количества изоферментов МДГ (Scandalios, 1974). Выявлен синтез *de novo* изоферментов МДГ при развитии проростка кукурузы (Yang, Scandalios, 1975a). Обнаружены изменения отдельных форм фермента в процессе развития пшеницы (Honold *et al.*, 1967) и арабидопсиса (Cammaerts, Jacobs, 1975).

Детально изучена органная специфичность НАД-МДГ у сахарной свеклы. Изоферментные спектры выявлялись в сухих семенах, проростках, листьях, стеблях, корнях, прицветниках, бутонах, завязи и пыльце (Тарасова, 1987). Специфичность характеризуется как определенным числом изоферментов и их относительной активностью в исследованных органах: семенах, проростках, листьях, прицветниках, бутонах, за-

вязях и семяпочках, так и полным отсутствием изоферментов на фореграммах: стебле, корне. Следует отметить, что отсутствие некоторых изоферментов МДГ на электрофореграммах в ряде органов не является доказательством того, что соответствующий локус не активен, не исключено, что изоферменты в данных случаях присутствуют в столь малых концентрациях, что их нельзя обнаружить данным методом. Генетическая детерминация изоферментов МДГ у сахарной свеклы позволяет интерпретировать тканевую специфичность как результат дифференциальной активности генов, контролирующих малатдегидрогеназу на разных этапах онтогенеза. Также может иметь место неодновременная реализация генетической информации двух различных аллелей. Например, при исследовании изоферментов МДГ в листьях сахарной свеклы у линии П-83-3, гетерозиготной по локусу *Mor1* с аллелями *Mor1-N* и *Mor1-P*, должно выявляться три изофермента: np, np и pp, что характерно для спектра димерного фермента у гетерозигот. В молодых листочках не активируется аллель *Mor1-N*, а в нормально развитых листьях выявляются все три изофермента. В литературе также имеются сведения об асинхронной активации родительских аллелей у гетерозигот в онтогенезе (Корочкин, 1977).

Таким образом, на примере малатдегидрогеназы можно видеть, что изоферменты являются эффективными инструментами для изучения регуляторных систем у эукариот. Генетический анализ позволяет сравнительно легко локализовать как структурные, так и регуляторные гены. Все это дает возможность получать надежную информацию о процессах регуляции генной активности в онтогенезе и лучше понимать пути клеточной дифференциации при развитии организмов (Хавкин, 1969; Корочкин, 1977; Созинов, 1985).

Использование изоферментов малатдегидрогеназы в популяционно-генетических исследованиях у растений

Изоферментные спектры могут служить основой для идентификации и регистрации сортов, документации генофонда культурных растений и диких сородичей с целью учета, сохранения и использования в селекции. Результа-

ты этой работы зависят от уровня изученности генетического контроля ферментов.

Так, благодаря фундаментальным работам Гудмана и др. (Goodman *et al.*, 1980) было проанализировано 25 тыс. растений кукурузы, принадлежащих к 125 расам или синтетическим сортам из Южной и Северной Америки, исследованы инбредные линии и гибриды F₁ и F₂ от их скрещивания, синтетики и различные коммерческие и экспериментальные гибриды; составлен каталог генотипов с различными комбинациями аллельных вариантов малатдегидрогеназы. Была выявлена значительная дифференциация частот встречаемости различных генотипов по МДГ среди изучаемого материала. Например, генотипы *Mdh1-A6*, *Mdh2-B6*, *Mdh3-C16* были обнаружены у 21 линии; *Mdh1-A6*, *Mdh2-B3*, *Mdh3-C16* – у 12; в то же время многие генотипы по малатдегидрогеназе встречались только у одной линии или гибрида. Возможно, здесь сказались общность происхождения одних линий и уникальность получения других. Но не исключено, что наиболее распространенные генотипы имеют какие-то преимущества, и при отборе им отдавалось предпочтение. Этот пример с малатдегидрогеназой подтверждает большие преимущества использования локусов со множественными аллелями для решения вопросов селекции, экологической и популяционной генетики.

Изоферменты НАД-зависимой малатдегидрогеназы использовались также для идентификации инбредных линий сахарной свеклы из коллекции лаборатории популяционной генетики растений ИЦиГ СО РАН (Новосибирск). Проанализировано 394 линии, и каждой линии на основании изоферментного спектра малатдегидрогеназы приписан соответствующий генотип. В коллекции определены частоты девяти генотипических классов, выявляемых обычно при двухлокусном контроле анализируемого признака с двумя аллелями в каждом локусе (Тарасова, 1987; Tarasova *et al.*, 1988). Частоты генотипических классов по обоим локусам резко различались. Соотношение генотипических классов по локусу *Mor1* было равно 285NN : 93NP : 16PP, а по локусу *Mor2* – 238SS : 136FS : 20FF.

Изучена структура популяций диких и культивируемых видов амаранта по частотам алле-

лей локусов, контролирующих изоферменты, в том числе локуса *Mdh1* (Юдина и др., 2008).

Наряду с другими изоферментами, малатдегидрогеназа использовалась при идентификации 57 сортов яблонь (Biruk, Kazlovskaya, 2008).

В качестве генетического маркера использовался один из полиморфных локусов МДГ в селекционных программах у 290 культивируемых форм персиков (Agulsekhar *et al.*, 1986).

Описана генетическая структура коллекции 570 деревьев кедра из трех регионов Калифорнии по частотам множественных аллелей двух локусов, кодирующих малатдегидрогеназу: локуса *Mdh1* с 7 аллелями и *Mdh2* с 3 аллелями (Harry, 1983) и т. д.

Все вышеизложенное свидетельствует о том, что высокий уровень активности малатдегидрогеназы в разных органах и тканях, наличие локусов с множественными аллелями, кодминантный характер наследования, четкое фенотипическое проявление изоферментных спектров делают этот фермент надежным и удобным генетическим маркером в популяционно-генетических исследованиях.

Заключение

Большое число видов, у которых МДГ изучена и используется в экспериментах для описания и характеристики различных процессов, свидетельствует о высокой эффективности данного фермента как генетического и физиологического маркера. Следует также сказать, что ферменты со всей совокупностью изоферментных систем и их белковых кофакторов представляют собой в молекулярной биологии важнейшую область биологического и генетического маркирования организма с большим числом его теоретических и практических аспектов для многостороннего использования.

Литература

- Воденичарова М.И. Генетика изоферментов у пшениц // Усп. соврем. генетики. 1980. Т. 9. С. 171–182.
Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М.: Мир, 1982. 920 с.
Корочкин Л.И. Взаимодействие генов в развитии. М.: Наука, 1977. С. 669–670.
Левитес Е.В., Юдина Р.С., Малецкий С.И. Генетический контроль НАД-зависимой малатдегидроге-

- назы у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Докл. АН СССР. 1980. Т. 255. № 4. С. 989–991.
- Ленинджер А. Биохимия. М.: Мир, 1974. С. 43–54.
- Садуншвили Т.А., Нуцубидзе Н.Н. Внутриклеточная локализация малат- и глутаматдегидрогеназы в листьях лимона // Сообщение Груз. ССР. 1980. Т. 100. № 3. С. 696–696.
- Созинов А.А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. М.: Наука, 1985. 272 с.
- Тарасова Р.С. Генетически детерминированные формы НАД-зависимой МДГ и их использование при биохимической паспортизации инбредных линий сахарной свеклы // Генетика. 1987. Т. 23. № 9. С. 1630–1636.
- Тарасова Р.С. Генетика и феногенетика малатдегидрогеназы сахарной свеклы: Дисс. ... канд. наук. Новосибирск: Наука, 1988. 134 с.
- Юдина Р.С., Железнова Н.Б., Захарова О.В. и др. Изомимная оценка генетической коллекции амаранта (*Amaranthus* L.) // Генетика. 2005. Т. 41. № 12. С. 1681–1687.
- Юдина Р.С., Ибрагимов С.С., Железнова Н.Б. Изучение структуры популяций амаранта (*Amaranthus* L.) по изоферментным спектрам // Информ. вестник ВОГуС. 2008. Т. 12. № 3. С. 385–390.
- Юдина Р.С., Левитес Е.В. Субклеточная локализация изоферментов НАД-зависимой малатдегидрогеназы сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Генетика. 2008. Т. 44. № 12. С. 1638–1643.
- Хавкин Э.Е. Формирование метаболических систем в растущих клетках растений. М.: Наука, 1969. 168 с.
- Arulsekhar S., Parfitt D.E., Beres W., Hansche P.E. Genetics of malate dehydrogenase isozymes in the peach // J. Heredity. 1986. V. 77. № 1. P. 49–51.
- Arus P., Orton T.J. Inheritance patterns and linkage relationships of eight genes of celery (*Apium graveolens*) // J. Heredity. 1984. V. 75. P. 11–14.
- Benito C., Salinas J. The chromosomal location of malate dehydrogenase isozymes in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet. 1983. V. 64. № 3. P. 255–258.
- Biruk A., Kazlovskaya Z. Prospects for using of isozyme markers in identification of apple cultivars // Sodininkyste ir darziningkyste. Mokslo Darbai. 2008. 27(2). P. 359–364.
- Bortman S.J., Trelease R.N., Miernyk J.A. Enzyme development and glyoxysome characterization in cotyledon of cotton seeds // Plant Physiol. 1981. V. 68. № 1. P. 82–87.
- Brown A.H.D., Munday J. Population genetics structure and optimal sampling of land races of barley // Genetica. 1982. V. 40. P. 315–324.
- Breidenbach R.W., Beever H. Association of the glyoxylate cycle enzymes in a novel subcellular particle from castor bean endosperm // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1967. V. 27. P. 462–469.
- Cammaerts D., Jacobs M. Study of the intracellular location and the genetic control of malate dehydrogenase isozymes in *Arabidopsis thaliana* // Plant Sci. Lett. 1975. V. 4. № 4. P. 249–256.
- Cheliak W.M., Morgan K., Dancik B.P. *et al.* Segregation of allozymes in mega-gametophytes of viable seed from a natural population of jack pine, *Pinus banksiana* Lamb // Theor. Appl. Genet. 1984. V. 69. № 2. P. 145–151.
- Endo T., Morishima H. Rise // Isozymes in plant genetics and breeding. Amsterdam: Elsevier, 1983. Part B. P. 129–146.
- Ennos R.A. Allozyme variation, linkage and duplication in the perennial grass; *Cynosurus cristatus* // J. Heredity. 1986. V. 77. P. 61–62.
- Flavell R.B., McPherson F.J. Control of wheat malate dehydrogenase by rye chromosomes // Biochem. Genet. 1972. V. 7. № 3/4. P. 259–268.
- Gietl C., Hock B. Organelle-bound malate dehydrogenase isoenzymes are synthesized as higher molecular weight precursors // Plant Physiol. 1982. V. 70. № 2. P. 483–487.
- Goodman M.M., Stuber C.W. Genetic identification of lines and crosses using isoenzyme electrophoresis // Ann. Corn Sorghum Res. Conf. Proc. 1980. V. 35. P. 10–31.
- Goodman M.M., Stuber C.W. Maize. Isozymes in plant genetics and breeding. Amsterdam: Elsevier, 1983. Part B. P. 1–33.
- Goodman M.M., Stuber C.W., Lee C.N., Johnson F.M. Genetic control of malate dehydrogenase isozymes in maize // Genetics. 1980. V. 94. P. 153–168.
- Gottlieb L.D. Conservation and duplication of isozymes in plants // Science. 1982. V. 216. № 4544. P. 373–380.
- Grimwood B.G., McDaniel R.G. Variant of malate dehydrogenase isoenzymes in mitochondrial population // Biochem. Biophys. Acta. 1970. V. 220. P. 410–415.
- Guries R.P., Ledic F.T. Inheritance of some polymorphic isozymes in pitch pine (*Pinus rigida* Mill.) // Heredity. 1978. V. 40. P. 27–32.
- Habig W., Racusen D. A malate dehydrogenase of high molecular weight from bean leaves // Can. J. Bot. 1968. P. 719–720.
- Harry D.E. Identification of a locus modifying the electrophoretic mobility of malate dehydrogenase isozymes in incense-cedar (*Calocedrus decurrens*), and its implications for population studies // Biochem. Genet. 1983. V. 21. N. 5/6. P. 417–434.
- Hart G.E. Hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell). Isozymes in plant genetics and breeding. Amsterdam: Elsevier, 1983. Part B. P. 35–56.
- Honold G.R., Masko V., Stahman M.A. NAD and

- NADP-dependent malate dehydrogenase in wheat // *Naturwissenschaften*. 1967. V. 54. 169 p.
- Hunter R.L., Markert C.L. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gel // *Science*. 1957. V. 125. № 3261. P. 1294–1295.
- Kiang Y.T., Gorman M.B. Soybean. Isozymes in plant genetics and breeding. Amsterdam: Elsevier, 1983. Part B. P. 295–298.
- Linde-Laursen I., Nelson G., Johansen H.B. Distribution of isoenzyme markers at loci in a pedigree of European spring barley // *Hereditas*. 1987. V. 106. P. 241–251.
- Longo C.P., Scandalios J.G. Nuclear gene control of mitochondrial malic dehydrogenase in maize // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1969. V. 62. № 1. P. 104–111.
- Machado M.F.P.S., Prioly A.J., Mangolin C.A. Malate dehydrogenase (MDH; EC 1.1.1.37) isozymes in tissues and callus cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae) // *Biochem. Genet.* 1993. V. 31. № 3/4. P. 167–172.
- Markert C.L., Moller F. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic and species specific patterns // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1959. V. 45. P. 753–763.
- Marquard R.D., Skorpenske R.G. Expression of heritable biochemical markers from various pecan tissues // *Euphytica*. 1989. V. 42. № 1/2. P. 65–70.
- McLeod M.J., Guttman S.I., Esbaugh W.N. Peppers (*Capsicum*). Isozymes in plant genetics and breeding. Amsterdam: Elsevier, 1983. Part B. P. 189–201.
- McMillin D.E., Scandalios J.G. Duplicated cytosolic malate dehydrogenase genes in *Zea mays* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1980. V. 77. P. 4866–4870.
- McMillin D.E., Scandalios J.G. Genetic analysis of the two groups of duplicated genes coding for mitochondrial malate dehydrogenase in *Zea mays*: Possible origin of *mMdh* genes by chromosomal segment duplication // *Mol. Gen. Genet.* 1981. P. 211–221.
- McMillin D.E., Scandalios J.G. Genetic, immunological and gene dosage studies of mitochondrial and cytosolic MDH variant in maize // *J. Heredity*. 1982. V. 73. № 3. P. 177–182.
- Mitra R., Bhatia C.R. Isozymes and polyploidy. I. Qualitative and quantitative isozyme studies in the Triticine // *Genet. Res. Camb.* 1971. V. 18. P. 57–69.
- Moran G.F., Bell J.G. *Eucalyptus*. Isozymes and plant genetics and breeding. Amsterdam: Elsevier, 1983. Part B. P. 423–442.
- Nagy A.N., Siddiqui M.O., Kocsis Z.G., Vida G. *In vitro* dissociation-recombination of malate dehydrogenase subunits in *Corydalis solida* // *Theor. Appl. Genet.* 1980. V. 58. № 2. P. 75–78.
- Newton K.J. Genetics of mitochondrial isozymes. Isozymes in plant and breeding. Amsterdam: Elsevier, 1983. Part A. P. 157–170.
- Newton K.J., Schwartz D. Genetic basis of the major malate dehydrogenase isozymes in maize // *Genetics*. 1980. V. 95. P. 425–442.
- O'Malley D.M., Guries R.P., Nordheim E.V. Linkage analysis for 18 enzyme loci in *Pinus rigida* Mill // *Theor. Appl. Genet.* 1986. V. 72. P. 530–535.
- Orton T.J. Celery and Celeriac (*Apium graveolens* L.). Isozymes in plant and breeding. Amsterdam: Elsevier, 1983. Part B. P. 351–356.
- O'Sullivan S.A., Wedding R.T. Malate dehydrogenase isoenzymes from cotton leaves. Molecular weight // *Plant Physiol.* 1972. V. 49. P. 117–123.
- Powling A., Islam A.K.M.R., Shepherd K.W. Isozymes in wheat-barley hybrid derivative lines // *Biochem. Genet.* 1981. V. 19. P. 237–254.
- Price S., Kahler A.L. Oats // Isozymes in plant and breeding. Amsterdam: Elsevier, 1983. Part B. P. 103–127.
- Rocha V., Ting I.P. Malate dehydrogenase of leaf tissue from *Spinacea oleracea*: Properties of three isoenzymes // *Arch. Biochem. Biophys.* 1971. V. 147. № 1. P. 114–122.
- Scandalios J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants; a review // *Biochem. Genet.* 1969. V. 3. № 1. P. 37–79.
- Scandalios J.G. Isoenzymes in development and differentiation // *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1974. V. 25. P. 225–258.
- Shannon L.M. Plant isoenzymes // *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1968. V. 19. P. 187–210.
- Sternberg L., Ting I.P., Hanscom Z. Polymorphism of microbody malate dehydrogenase in *Opuntia basilaris* // *Plant Physiol.* 1979. V. 59. P. 329–330.
- Strauss S.H., Conkle M.T. Segregation, linkage and diversity of allozymes in knobcone (*Pinus attenuata*) // *Theor. Appl. Genet.* 1986. V. 72. P. 483–493.
- Tarasova R.S., Levites E.V., Maletskyi S.I. Isozyme as markers for identification of sugar-beet inbred lines in the process of their development // *Biochemical identification of varieties (Materials III Intern. Symp. ISTA)*. Leningrad. USSR, 1988. C. 240–243.
- Taureilles-Saurel C., Romieu C.G., Robin J.-P., Flanzly C. Grape (*Vitis vinifera* L.) malate dehydrogenase. I. Intercellular compartmentation of the isoforms // *Am. J. Enol. Vitic.* 1995. V. 46. № 1. P. 22–28.
- Ting I.P., Fuhr I., Curry R., Zschoche W.G. Malate dehydrogenase isozymes in plant, preparation, properties and biological significance // *Isozymes / Ed. C.L. Markert. N.Y. a.o.: Acad. Press, 1975. P. 369–384.*
- Torres A.M., Soost K.K., Mau-Lastovisks T. Leaf isozymes as genetic markers in citrus // *Amer. J. Bot.* 1978. V. 68. № 8. P. 869–881.
- Torres A.M., Soost K.K., Dienenhoffen U. Genetics and distinguishing nucellar from zygotic seedlings // *J. Heredity*. 1982. V. 73. № 5. P. 335–339.
- Torres A.M. Fruit trees // *Isozymes in plant genetics*

- and breeding. Part B. Amsterdam: Elsevier, 1983. Part B. P. 329–338.
- Torres A.M. Isozymes from avocado cotyledons // J. Heredity. 1984. V. 75. P. 300–302.
- Walk R.A., Hock B. Glyoxisomal and mitochondrial malate dehydrogenase of watermelon (*Citrullus vulgaris*) cotyledons. II. Kinetic properties of the purified isoenzymes // Planta. 1977. V. 136. P. 221–228.
- Walk R.A., Michaeli S., Hock B. Glyoxisomal and mitochondrial malate dehydrogenase of watermelon (*Citrullus vulgaris*) cotyledons. I. Molecular properties of the purified isoenzymes // Planta. 1977. V. 136. P. 211–220.
- Weeden N.F., Marx G.A. Chromosomal locations of twelve isozyme loci in *Pisum sativum* // J. Heredity. 1984. V. 75. № 5. P. 365–370.
- Wijsman N.J.W. Petunia // Isozymes in plant and breeding. Amsterdam: Elsevier, 1983. Part B. P. 229–252.
- Yamazaki R.K., Tolbert N.E. Malate dehydrogenase in leaf peroxisome // Biochem. Biophys. Acta. 1969. V. 178. № 1. P. 11–20.
- Yang N.S. Biochemical properties and development expression of genetically determined malate dehydrogenase isozymes in maize // Isozymes. III Developmental Biology. N.Y. a.o.: Acad. Press, 1975. P. 191–211.
- Yang N.S., Scandalios J.G. Purification and biochemical properties of genetically defined malate dehydrogenase in maize // Arch. Biochem. Biophys. 1974. V. 161. P. 335–353.
- Yang N.S., Scandalios J.G. Cytoplasmic synthesis of soluble and mitochondrial malate dehydrogenase isozymes in maize // Arch. Biochem. Biophys. 1975a. V. 171. P. 575–585.
- Yang N.S., Scandalios J.G. *De novo* synthesis and developmental control of multiple gene-controlled malate dehydrogenase isozymes in maize scutella // Biochem. Biophys. Acta. 1975b. V. 384. P. 293–306.
- Yang N.S., Sorenson J.G., Scandalios J.G. Genetic control of mitochondrial malate dehydrogenase: evidence for duplicated chromosome segments // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 310–314.
- Yudina R.S., Levites E.V. Malate dehydrogenase isozymes as markers of organelles physiological state sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // Sugar. Tech. 2007. V. 9. № 1. P. 67–71.
- Yue S.B. Electrophoretic mobilities of malate dehydrogenase from barley seedlings // Experientia. 1968. V. 24. № 1. P. 87–88.
- Zschoche W.C., Ting I.P. Purification and properties of microbody MDH from *Spinacea oleracea* leaf tissue // Arch. Biochem. Biophys. 1973a. V. 159. P. 767–776.
- Zschoche W.C., Ting I.P. Malate dehydrogenase from *Pisum sativum*: Tissue distribution and properties of the particulate forms // Plant Physiol. 1973b. V. 51. P. 1076–1081.
- Zoro I.Bi., Maquet A., Wathelet B., Baudoin J.-P. Genetic control of isozymes in the primary gene pool *Phaseolus lunatus* L. // Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 1999. V. 3. № 1. P. 10–27.

GENETICS AND PHENOGENETICS OF MALATE DEHYDROGENASE IN PLANTS

R.S. Yudina

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: yurs@bionet.nsc.ru

Summary

Literature data on the structure, functions, properties and genetics of the enzyme malate dehydrogenase (MDH) in plants are reviewed. Most of the studied objects reveal a high level of polymorphism, which manifests itself in the presence of multiple molecular species of malate dehydrogenase. It has been shown that MDH polymorphism in each species is genetically determined by presence of several loci with multiple alleles. Clear phenotypic manifestation and high activity of MDH in various organs and tissues make this enzyme a convenient and reliable marker for genetic studies.

Key words: loci, alleles, isoenzymes, markers, compartments.

ДИНАМИКА СОХРАННОСТИ И ПРОДУКТИВНОСТИ НАСТОЯЩИХ ТОПОЛЕЙ ПРИ ИСПЫТАНИИ В УСЛОВИЯХ УМЕРЕННОГО КЛИМАТА

А.П. Царев¹, Р.П. Царева², В.А. Царев³

¹ Петрозаводский государственный университет, Петрозаводск, Россия,
e-mail: Tsarev@psu.karelia.ru;

² НИИ лесной генетики и селекции, Воронеж, Россия, e-mail: Rpopulus@yandex.ru;

³ Воронежская государственная лесотехническая академия, Воронеж, Россия,
e-mail: vadbat@comch.ru

Целью настоящей работы является установление закономерностей роста и сохранности тополей различных морфолого-систематических групп и выделение наиболее перспективных ассортиментов тополей для изучаемых условий. Представлены результаты 35-летних испытаний в Центральном Черноземье (Семилукский популетум Воронежской области) 84 клонов и сортов тополей, принадлежащих к 6 морфолого-систематическим группам. Более детальные исследования по сохранности, энергии роста и продуктивности проведены для клонов и сортов из подрода настоящих тополей (*Eurpopulus Dode*). Определен возраст количественной спелости искусственных насаждений, созданных из представителей данного подрода, составивший 26–28 лет. В перспективные ассортименты для испытанных условий отобрано 15 лучших клонов и сортов.

Ключевые слова: тополь, гибриды, клоны, сорта, сортоиспытание, сохранность, продуктивность, текущий и средний приросты, количественная спелость насаждений.

Введение

Растущие потребности в лесосырьевых ресурсах привлекают внимание исследователей и практиков мирового лесопромышленного комплекса к быстрорастущим древесным породам. Среди них наиболее заметное место в умеренной зоне занимают виды и сорта из рода *Populus L.* Род *Populus L.* является многоформенной структурой и насчитывает несколько подродов, секций, десятки видов, разновидностей и форм и сотни естественных и искусственных гибридов. Селекцией и выращиванием этой быстрорастущей породы занималось множество исследователей на протяжении всего XX века.

В ФАО для этой породы в 1947 г. была создана специальная Международная тополевая комиссия (МТК). В начале XXI в. к тополию еще раз было приковано внимание лесного мирового сообщества, когда в 2003 г. в Риме под эгидой ФАО была организована «Первая Международная конференция по будущему культуры

тополей» (First International Conference ..., 2003). Затем было проведено несколько других международных форумов, наиболее значимыми из которых были XXII Сессия МТК в Сантьяго (Чили) и Аргентине в 2004 г. (The contribution..., 2004) и XXIII Сессия МТК в Пекине в 2008 г. (Poplars..., 2008).

В России тополь также привлекал внимание ученых и практиков (Яблоков, 1956; Альбенский, 1959; Богданов, 1965; Вересин, 1974; Бакулин, 2007 и др.).

Перечисленные работы представляют малую толику имеющихся публикаций по роду *Populus L.* Однако и они дают представление о большой значимости этой древесной породы и ее огромном потенциале для обеспечения сырьем целлюлозно-бумажной, мебельной, гидролизной и других отраслей промышленности, ее защитных и рекреационных свойствах.

Созданная авторами настоящей публикации в лесной, лесостепной, степной и полупустынной зонах экспериментальная база тополей

включает более 50 объектов на площади около 100 га (маточные плантации, коллекции клонов, гибридов и сортов, сортоиспытательные, полезащитные и технологические насаждения), где испытывается более 300 клонов, отобранных в различных регионах России, Западной Европы и стран СНГ, и более 1 тыс. гибридов тополей, выведенных А.П. Царевым и Р.П. Царевой в различных условиях выращивания.

Материалы и методы

Испытания проводились на Семилукском экспериментальном участке по испытанию клонов и сортов тополей (популетуме) Воронежской области, заложенном в соответствии с методикой полевого опыта (Кокран, 1961; Доспехов, 1972) весной 1974 г. стеблевыми черенками различных сортов и клонов тополей (автор объекта А.П. Царев).

В эксперимент вводились клоны, формы (размножаемые половым или бесполом путем) и сорта (обнародованные или зарегистрированные в установленном порядке растительные объекты) различных видов тополей (Международный кодекс ..., 1974; Царев и др., 2003).

Площадь участка – 4,5 га. Почва – типичный чернозем, уровень грунтовых вод 4–5 м, размещение растений 5 × 4 м. Число высаженных клонов и сортов – 84. Число повторений – 4. Размещение делянок в повторениях рандомизировано. Число рамет (растений одного клона) на делянке – 6. Каждый клон и сорт представлены 24 растениями на площади 480 м² (20 м² × 6 рамет × 4 повторности).

Изучаемые растения были распределены на следующие морфолого-систематические группы (МСГ): 1) белые тополя с пирамидальной формой кроны; 2) белые тополя с раскидистой формой кроны; 3) черные тополя с пирамидальной формой кроны; 4) черные тополя с раскидистой формой кроны, включая группу евро-американских гибридов; 5) бальзамические тополя и их внутрисекционные гибриды; 6) межсекционные и сложные гибриды настоящих тополей. Систематическое положение, их наименование и общая характеристика, а также происхождение использованных клонов, форм и гибридов тех или иных видов тополей приведены ранее (Царев, 1985).

В соответствии с первоначальным планом в каждую МСГ в качестве контроля были введены клоны или семьи естественно произрастающих или наиболее распространенных интродуцированных ранее и уже акклиматизировавшихся в данной местности тополей. Однако большинство вновь испытываемых клонов в первые же годы показали значительное превосходство над контрольными растениями. Ввиду этого экспериментаторы вынуждены были использовать средние показатели по МСГ, а также данные по наиболее распространенному местному виду осокоря (*P. nigra* L.). Впоследствии этот подход (использование в качестве контроля среднего значения компонентов теста) был узаконен в директивах Совета Европейского союза (Council directive..., 2000).

Наблюдения проводились в первые 16 лет с участием сотрудников ЦНИИЛГиС ежегодно, а затем периодически нами. В течение всех лет наблюдений путем сплошного учета изучались сохранность растений, динамика роста по высоте, диаметру на высоте 1,3 м. Объемы стволов определялись по объемным таблицам для тополя (Hadži-Georgiev, Goguševski, 1972). Запас на площади определялся суммированием фактических объемов сохранившихся деревьев клона на каждой делянке у каждого повторения и перевода полученной величины запаса на площади четырех делянок в 480 м² на площадь в 1 га. То есть использовалась следующая формула:

$$W = W' \times 10000 / 480, \quad (1)$$

где W – расчетный запас стволовой древесины, м³/га; W' – фактический запас стволовой древесины на 4 делянках, полученный как сумма запасов на каждой делянке в 120 м², м³; 480 – общая площадь всех 4 делянок, м²; 10000 – площадь одного гектара, м².

На базе этих показателей определялись текущий и средний приросты по высоте, диаметру, объему стволов и запасам стволовой древесины и их динамика. При этом средние приросты определялись как частное от деления значения признака в данном возрасте на число лет возраста, а текущие приросты – как разница между значением признака в текущем и предшествующем годах. Ввиду большой вариабельности ростовых показателей в разные годы текущие

приросты усреднялись по 5-летним периодам, показатели динамики других показателей также приурочены к концу этих 5-летних периодов.

По динамике приростов устанавливался возраст количественной спелости по запасу ствольной древесины. Данные, полученные для отдельных клонов и сортов, усреднялись для каждой МСГ и использовались в качестве контроля.

Для обработки данных использовались стандартные математические методы (Снедекор, 1961; Доспехов, 1972).

Результаты и их обсуждение

Изучение сохранности тополей на популетуме на протяжении 35 лет его произрастания показало, что после суровой зимы 1978/1979 г. полностью выпали 11 клонов тополей. Это, прежде всего, все клоны итальянской, среднеазиатской и некоторые гибриды румынской и украинской селекции. С высокой сохранностью (свыше 70 %) на популетуме к настоящему времени произрастает 34 клон, относящиеся к 4 морфолого-систематическим группам (см. табл. 1).

Хозяйственный интерес представляют 26 клонов из подрода настоящих тополей в 35-летнем возрасте, которые были ранее рекомендованы в перспективные ассортименты для дальнейшего выращивания в Центрально-Черноземном районе (Царев, 1985, 1986).

В частности, из МСГ черных пирамидальных тополей в анализ включены: Пирамидаль-

но-осокоревый камышинский, Русский, Пионер и Черный гибрид – элитное дерево-120. Из МСГ черных с раскидистой кроной проанализирована только группа евро-американских гибридов: Регенерата (инв. № 78, 79), Робуста-236, Сакрау-59, Вернирубенс, Брабантика-175, Мариландика-239, Гельрика, Бахельери и Серотина; из МСГ бальзамических – волосистоплодный (инв. № 45, 83), бальзамический, душистый и китайский (инв. № 133). Из межсекционных и сложных гибридов настоящих тополей изучены: Воронежский гигант (э.с.-38) селекции М.М. Вересина, берлинский (инв. № 130), гибрид-10, гибрид-30 селекции П.Л. Богданова, гибрид-300 селекции И.А. Казарцева и гибрид 3Б селекции А.М. Березина.

В табл. 2 представлены средние таксационные показатели сохранности, роста и запасов древесины отобранных для анализа тополей в целом по группам.

Как видно из данных табл. 2, сохранность по различным морфолого-систематическим группам варьирует от 31 до 90 %, средняя высота – от 29,5 до 33,3 м, диаметры – от 33,8 до 44,3 см, объемы стволов – от 1 до 2 м³, а средние запасы древесины – от 194 до 707 м³/га. Возрастная динамика сохранности и запасов древесины представлена на рис. 1, 2.

С учетом разных показателей накопления биомассы и сохранности у различных морфолого-систематических групп тополей представилось целесообразным проследить динамику средних и текущих приростов запасов древеси-

Таблица 1

Сохранность испытываемых клонов тополей на Семилукском популетуме в 35-летнем возрасте

Морфолого-систематические группы	Клоны				Проанализировано
	Высажено	Погибло	Сохранилось		
			с низкой сохранностью	с высокой сохранностью	
I. Белые с пирамидальной формой кроны	6	4	2	–	–
II. Белые с раскидистой формой кроны	5	–	4	1	–
III. Черные с пирамидальной формой кроны	9	5	4	–	4
IV. Черные с раскидистой формой кроны	32	7	8	17	11
V. Бальзамические	13	1	5	7	5
VI. Межсекционные и сложные гибриды	19	3	7	9	6
Итого	84	20	30	34	26

Таблица 2

Средние таксационные показатели отобранных клонов и сортов тополей по морфолого-систематическим группам в возрасте 35 лет

Морфолого-систематические группы	Таксационные показатели						
	Сохранность, %	Высота, м	Диаметр, см	Объем ствола, м ³	Запас древесины, м ³ /га	Приросты запасов древесины, м ³ /га в год	
						средний	текущий
III. Черные с пирамидальной формой кроны	31	30,2	36,3	1,23	194	5,5	-1,4
IV. Черные с раскидистой формой кроны	71	33,3	44,3	1,96	707	20,2	9,0
V. Бальзамические	87	29,5	33,8	1,01	439	12,5	6,5
VI. Межсекционные и сложные гибриды	90	30,1	37,6	1,25	562	16,1	8,8
Осокорь (контроль)	42	31,0	38,7	1,39	292	8,3	7,4
Среднее	71	31,3	39,2	1,44	511	14,6	5,5

ны, чтобы установить возраст количественной спелости.

Количественная спелость насаждений устанавливается, как известно, в возрасте, когда общий средний прирост по запасу стволовой древесины достигает максимума (Рудзкий, 1906). При этом величины среднего и текущего приростов максимально сближаются, а сглаженные кривые их возрастной динамики пересекаются. Практическое значение количественной спелости лесов сводится к определе-

нию нижнего предела возраста рубки главного пользования. Для осиновых лесов возраст рубки установлен в 50 лет. Тополевые леса, создаваемые в основном из быстрорастущих сортов при высокой агротехнике выращивания культур, накапливают древесину гораздо быстрее, чем автохтонные осиновые.

Поэтому возраст количественной спелости в них наступает гораздо раньше. Это отражает тот факт, что быстрорастущие древесные породы быстрее достигают пика своего роста и,

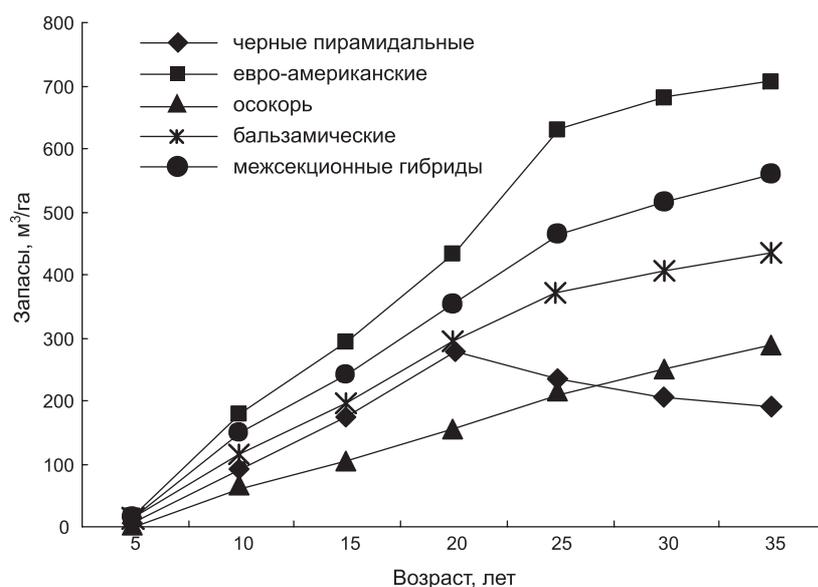


Рис. 1. Динамика запасов стволовой древесины у разных групп тополей, м³/га.

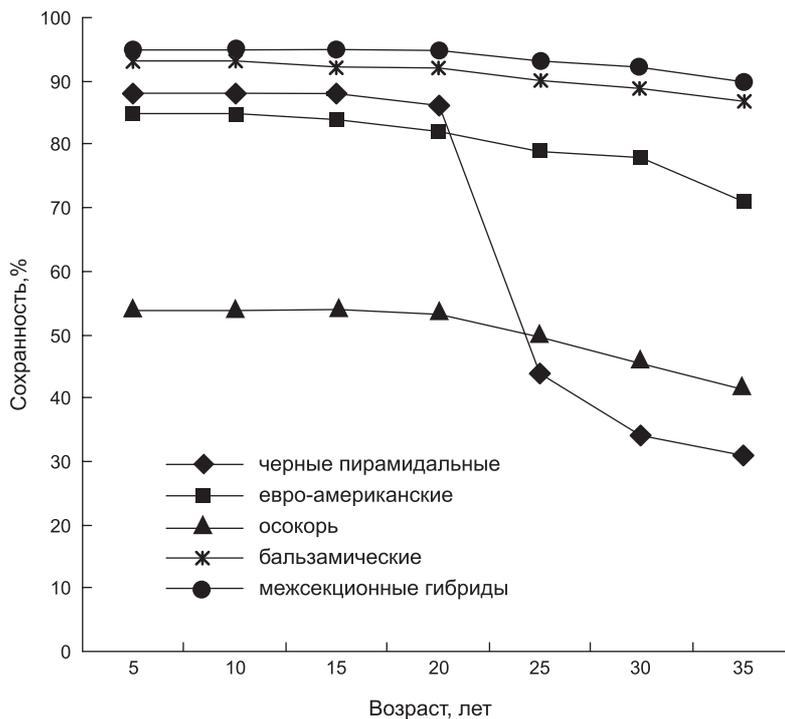


Рис. 2. Динамика сохранности деревьев в разных группах настоящих тополей, %.

соответственно, у них раньше начинают уменьшаться текущие приросты.

Считается, что количественная спелость древесины быстрорастущих сортов тополей наступает в 16–20 лет. Поскольку на размеры прироста древесины влияют условия местопроизрастания, густота размещения растений, их сортовая принадлежность, частота уходов за почвой и растениями (рубка ухода, обрезка сучьев и др.) для определения экономически обоснованного возраста максимального накопления древесины и количественной спелости насаждений, а также нижнего предела возраста рубки главного пользования тополевых плантаций необходимы специальные исследования в каждом конкретном случае. Особенно это касается насаждений, созданных из интродуцентов.

Текущие приросты древесины у всех проанализированных на Семилукском популетуме тополей к возрасту 35 лет стали существенно ниже, чем средние, т. е. насаждения довольно рано достигли возраста количественной спелости.

Графический анализ динамики приростов по запасу стволовой древесины позволил установить, что возраст количественной спелости у черных тополей с пирамидальной формой кроны наступил в 22 года, у бальзамических —

в 26 лет, у межсекционных гибридов — в 27 лет, а у черных тополей с раскидистой формой кроны — в 28 лет (рис. 3–6).

Следовательно, нижним пределом возраста рубки тополевых насаждений можно считать в основном возраст 26–28 лет.

Средние запасы древесины в возрасте количественной спелости у разных групп тополей составляли свыше 290 м³/га у черных пирамидальных, 380 м³/га у бальзамических тополей, 490 м³/га у межсекционных гибридов и около 660 м³/га у евро-американских гибридов черных тополей с раскидистой кроной (рис. 1).

Характеристика лучших представителей испытанных тополей в возрасте 25 лет (близком к возрасту количественной спелости) представлена в табл. 3.

Как видно из данных табл. 3, наиболее быстрорастущими оказался ряд евро-американских тополей (Регенерата, Гельрика, Мариландика-239; Вернирубенс), запас которых к 25-летнему возрасту достигал 612–1151 м³/га, а текущие приросты 29–88 м³/га в год. В дальнейшем эти показатели существенно снижались вследствие как падения текущих приростов (см. рис. 3–6), так и выпадения деревьев по разным причинам (рис. 2). Уменьшение текущих и средних

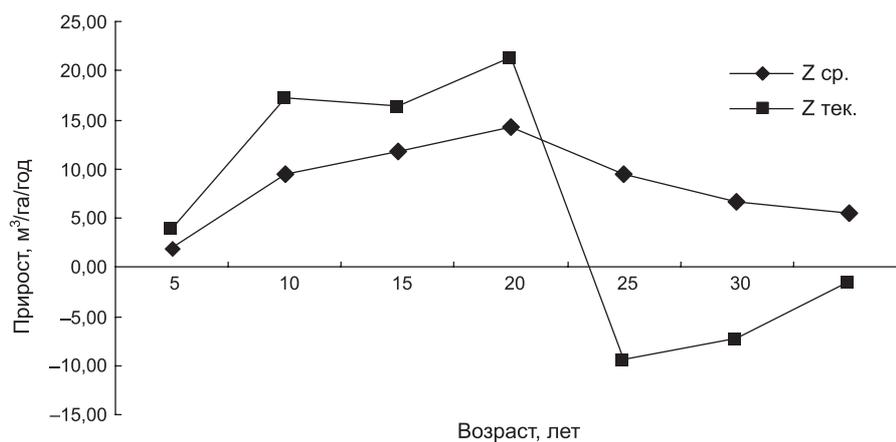


Рис. 3. Динамика приростов запасов стволовой древесины у черных пирамидальных тополей.

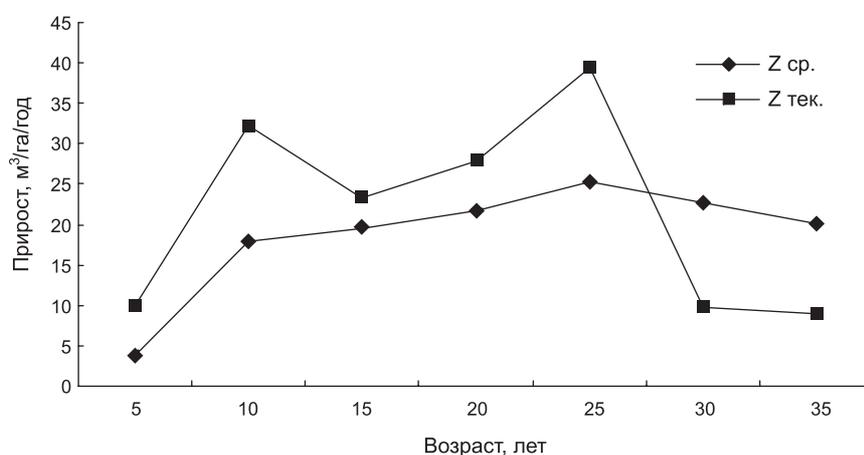


Рис. 4. Динамика приростов запасов стволовой древесины у черных тополей с раскидистой кроной (евро-американских гибридов).

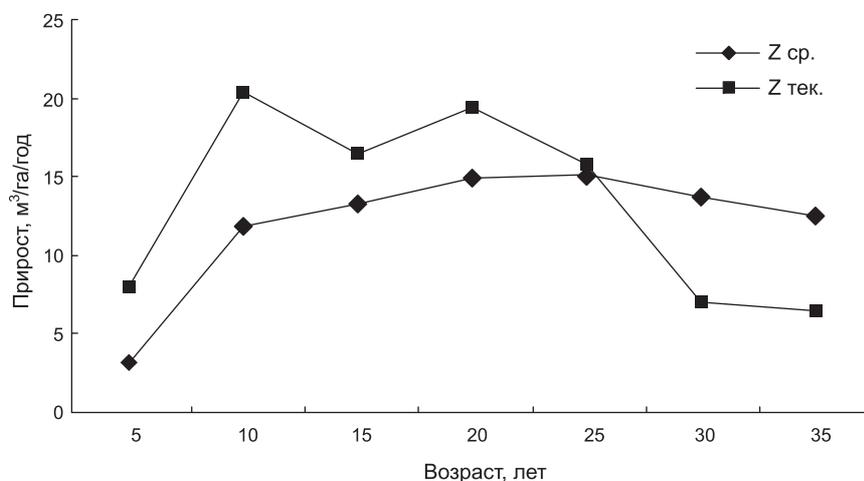


Рис. 5. Динамика приростов запасов стволовой древесины у бальзамических тополей.

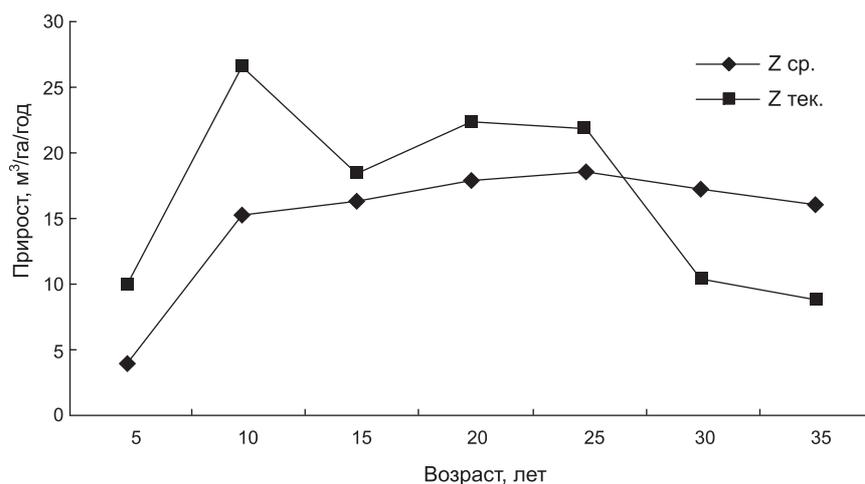


Рис. 6. Динамика приростов запасов стволовой древесины у межсекционных гибридов настоящих тополей.

Таблица 3

Характеристика продуктивности перспективных для ЦЧР клонов и сортов тополей в 25-летнем возрасте

Наименование тополя	Инв. №	Сохранность, %	Высота, м	Диаметр, см	Объем ствола, м³	Запас древесины, м³/га	Приросты, м³/га в год	
							средний	текущий
Пионер	42	50	33,6	40,5	1,64	410	16,4	25,0
Брабантика-175	158	63	31,5	41,5	1,63	512	20,5	32,0
Вернирубенс	54	88	31,7	38,1	1,39	612	24,5	29,4
Гельрика	80	79	32,8	46,1	2,09	824	33,0	57,8
Мариландика-239	34	88	28,7	40,4	1,42	624	25,0	38,2
Регенерата	78	92	34,4	49,1	2,50	1151	46,0	88,2
Регенерата	79	71	33,6	48,0	2,22	976	39,0	49,6
Робуста-236	156	88	30,1	32,3	0,94	414	16,6	8,9
Серотина	19	71	29,8	42,5	1,61	572	22,9	37,0
Волосистоплодный	83	100	28,1	32,2	0,86	428	17,1	17,2
Китайский	133	96	28,3	32,5	0,88	423	16,9	21,4
Э.с.-38	94	100	28,5	36,6	1,14	569	22,8	32,8
Берлинский	130	88	30,2	38,7	1,30	570	22,8	39,8
Гибрид – 10	106	83	26,3	37,0	1,07	442	17,7	6,4
Гибрид – 300	49	96	29,0	32,6	0,93	445	17,8	15,6
Осокорь (контроль)	131	50	26,6	33,3	0,87	218	8,7	12,0

приростов стволовой древесины к 35 годам показано в табл. 4.

Как видно из данных табл. 4, усредненные показатели по двум лучшим клонам тополя волосистоплодного к 35 годам составили в высоту 29,3 м, в диаметре – 33,7 см, запас древесины

при сохранности 94 % достиг 490 м³/га, а средний прирост 14,0 м³/га в год. У межсекционных гибридов запас хотя и возрос до 563–738 м³/га, но текущий прирост значительно снизился.

Средняя высота 35-летних евро-американских гибридов черных тополей (Регенерата (инв.

Таблица 4

Характеристика продуктивности перспективных для ЦЧР клонов и сортов тополей в 35-летнем возрасте

Наименование тополя	Инв. №	Таксационные показатели						
		сохранность, %	высота, м	диаметр, см	объем ствола, м ³	запас, м ³ /га	прирост по запасам, м ³ /га в год	
							средний	текущий
Пионер	42	42	34,6	41,7	1,78	374	10,7	-3,5
Брабантика-175	158	63	33,0	43,4	1,86	586	16,7	10,4
Вернирубенс	54	71	33,6	42,0	1,79	640	18,3	1,6
Гельрика	80	71	33,4	49,9	2,50	887	25,3	5,6
Мариландика-239	34	83	30,2	42,5	1,63	676	19,3	7,0
Регенерата	78, 79	82	35,8	51,2	2,81	1150	32,9	18,8
Робуста-236	156	83	30,9	35,1	1,14	473	13,5	4,4
Серотина	19	67	32,7	46,7	2,14	717	20,5	11,6
Волосистоплодный	45, 83	94	29,3	33,7	1,00	490	14,0	8,0
Китайский	133	96	29,3	34,5	1,05	504	14,3	9,6
Э.с.-38	94	100	31,6	40,5	1,48	738	21,1	17,6
Берлинский	130	88	31,1	38,9	1,41	620	17,7	6,6
Гибрид – 10	106	79	29,3	41,2	1,49	589	16,8	12,0
Гибрид – 30	102	83	27,1	33,0	0,88	364	10,4	4,6
Гибрид – 300	49	96	31,4	35,3	1,17	563	16,1	11,0
Осокорь (контроль)	131	42	29,2	38,7	1,39	292	8,3	7,4

№ 78, 79), Робуста-236, Вернирубенс, Брабантика-175, Мариландика-239, Гельрика, Серотина) варьировала от 30,2 до 35,8 м, средний диаметр – от 35,1 до 51,2 см, средний запас древесины – от 500 до 1150 м³/га. Средний прирост древесины у этих тополей был 13,5–32,9 м³/га в год, а текущий – снизился до 2,0–18,8 м³/га в год.

Все это еще раз свидетельствует в пользу того, что после наступления возраста количественной спелости (26–28 лет) занимать площадь переросшими насаждениями тополей нерационально.

В целом в результате проведенных исследований отобрано 15 лучших клонов и сортов (табл. 3), которые можно рекомендовать в новые ассортименты для условий Центрального Черноземья, а также для испытания в других регионах России.

Заключение

Несмотря на значительные успехи генетики и селекции XX и начала XXI вв., в лесном хозяй-

стве имеются довольно скромные достижения в этом направлении. Это связано со многими причинами, но две явно бросаются в глаза.

Во-первых, бесконечные реорганизации лесного хозяйства, и, как показывает практика, к сожалению, не в лучшую сторону. В результате этих реорганизаций проявляется тенденция на сведение лесов. Оставление на лесосеках худших, непригодных к практическому использованию деревьев ведет к обеднению генетического фонда природных популяций, поскольку последующие генерации будут возникать от этих убогих растений.

Во-вторых, лесные древесные растения – объект не очень удобный для исследователей: длительный онтогенез, сложности с регулярным мониторингом, созданием и поддержанием многолетних опытных объектов, варьирование климатических, погодных, почвенных, агротехнических и других условий. Если при культивировании однолетних растений какое-либо отрицательное явление или его воздействие можно

учесть и как-то исправить на следующий год, то при культивировании многолетних лесных древесных растений это просто невозможно. Не говоря уже о том, что существующий уровень развития лесного хозяйства, масштабы лесных площадей и финансовое регулирование не всегда позволяют применять даже давно известные приемы ведения нормального хозяйства.

Выделяемые средства в виде грантов или так называемых «лотов» до исполнителей или не доходят, или доходят в таком размере и на такой срок, что о создании новых опытных объектов длительного пользования в соответствии с существующими требованиями полевого опыта речи не идет.

В связи с этим на первый план выходит рациональное использование еще кое-где оставшихся научных объектов, созданных в предыдущие годы. В настоящей работе авторы попытались выявить тенденции хода роста одной из самых быстрорастущих древесных пород умеренного климата на одном из таких объектов.

Авторы надеются, что выявленные закономерности наступления количественной спелости тополя в Центральном Черноземье позволят более четко планировать работы по выращиванию данной породы. А отселектированные лучшие быстрорастущие сорта и клоны могут найти применение при создании различных типов насаждений (защитных, озеленительных, эколого-охранных, массивных и других), а также как исходный генетический материал для гибридизации и проведения других работ генетико-селекционного плана.

Авторы выражают благодарность работникам Семилукского лесного селекционного питомника за сохранение такого уникального объекта, которым является Семилукский популетум.

Литература

- Альбенский А.В. Селекция древесных пород и семеноводство. М.; Л.: Гослесбумиздат, 1959. 306 с.
- Бакулин В.Т. Тополь черный в Западной Сибири. Новосибирск: Академическое изд-во «Гео», 2007. 121 с.
- Богданов П.Л. Тополя и их культура. М.: Лесн. пром-сть, 1965. 104 с.
- Вересин М.М. Новый гибридный тополь для лесных культур и озеленения // Лесхоз. информация. 1974. № 6. С. 14–15.
- Доспехов Б.А. Планирование полевого опыта и статистическая обработка его данных. М.: Колос, 1972. 207 с.
- Кокран У.Д. Планирование и анализ выборочных наблюдений // Снедекор Д.У. Статистические методы в применении к исследованиям в сельском хозяйстве и биологии. М.: Изд-во с.-х. литературы, журналов и плакатов, 1961. С. 454–485.
- Международный кодекс номенклатуры культурных растений. 1969. Л.: Наука. Ленингр. отд-ние, 1974. 32 с.
- Рудзкий А.Ф. Руководство к устройству русских лесов. С.-Петербург: Изд. А.Ф. Девриена, 1906. 484 с.
- Снедекор Д.У. Статистические методы в применении к исследованиям в сельском хозяйстве и биологии. М.: Изд-во с.-х. литературы, журналов и плакатов, 1961. 503 с.
- Царев А.П. Сортоведение тополя. Воронеж: Изд-во Воронежского ун-та, 1985. 152 с.
- Царев А.П. Рекомендации по выращиванию насаждений тополя в юго-восточной части европейской территории РСФСР. Воронеж: ЦНИИЛГиС (ВНПО «Союзлесселекция»), 1986. 37 с.
- Царев А.П., Погиба С.П., Тренин В.В. Селекция и репродукция лесных древесных пород (учебник для вузов) / Под ред. А.П. Царева. М.: Изд-во ЛОГОС, 2003. Вып. 4. 520 с.
- Яблоков А. С. Пирамидальные тополи. М.; Л.: Гослесбумиздат, 1956. 58 с.
- Council directive 1999/105/EC of 22 December 1999 on the marketing of forest reproductive material // Official J. Eur. Communities/Legislation. V. 43. L. 11. 2000. P. 17–40.
- First International Conference on the future of poplar culture. Rome, 13–15 November 2003: FAO headquarters – Report and Round Table, 2003. 114 p.
- Hadži-Georgiev K., Goguševski M. Dvolazne tabele mass za topola klona *Populus euramericana* cv. I-214 u geveliskom području // Topola, 1972. T. XVI. № 90. S. 25–29.
- Poplars, Willows and People's Wellbeing. 23rd Session of International Poplar Commission Beijing, China, 27–30 October 2008. Abstract and Submitted Papers. Rome: FAO, Working Paper IPC/5, 2008. 259 p.
- The contribution of poplars and willows to sustainable forestry and rural development. 22nd Session of International Poplar Commission, Santiago, Chile, 29 November – 2 December 2004. Abstract and Submitted Papers. Rome: FAO, Working Paper IPC/2, 2004. 194 p.

**THE TIME PATTERN OF SURVIVAL AND PRODUCTIVITY
OF EUPOPULUS TESTED IN THE TEMPERATE CLIMATIC BELT**

A.P. Tsarev¹, R.P. Tsareva², V.A. Tsarev³

¹ Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia, e-mail: Tsarev@psu.karelia.ru;

² Central Scientific Research Institute of Forest Tree Breeding and Genetics, Voronezh, Russia,
e-mail: Rpopulus@yandex.ru;

³ Voronezh State Forest Technical Academy, Voronezh, Russia, e-mail: vadbat@comch.ru

Summary

The results of 35-year testing of 84 poplar clones, forms and cultivars with regard to their survival, viability, and timber productivity in the Voronezh region are presented. The growth of 26 Eupopulus clones and cultivars is presented in more detail. The quantitative economic exploitability of artificial poplar plantations has been determined at the age of 26–28 years. Fifteen best poplar cultivars and clones have been selected as promising for the Central Black Earth Region of Russia.

Key words: poplar, hybrids, clones, varieties, variety test, preservation, productivity, basic and final annual increment, quantitative crop maturity..

ВЗАИМОСВЯЗЬ АЛЛОЗИМНОГО РАЗНООБРАЗИЯ В ПОПУЛЯЦИЯХ ТРЕХ ВИДОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ (*MYODES RUTILUS*, *MYODES GLAREOLUS*, *SOREX ARANEUS*) С ЗАРАЖЕННОСТЬЮ ГЕЛЬМИНТАМИ

О.Н. Жигилева

ГОУ ВПО Тюменский государственный университет, Тюмень, Россия, e-mail: zhigileva@mail.ru

Изучено соответствие между генетической изменчивостью полевков (*Myodes rutilus*, *M. glareolus*), бурозубок (*Sorex araneus*) и параметрами зараженности их популяций гельминтами. Средняя гетерозиготность популяций мелких млекопитающих положительно коррелирует со степенью их зараженности гельминтами и отрицательно – с показателем видового разнообразия паразитов. Обсуждаются возможные механизмы взаимосвязи паразитологических и генетических параметров популяций.

Ключевые слова: млекопитающие, *Myodes*, *Sorex*, гельминты, гетерозиготность, аллозимные локусы, система «паразит–хозяин».

Введение

О наличии популяционно-генетических механизмов саморегуляции паразитарных систем пишут многие авторы, но есть лишь небольшое количество работ, описывающих эти механизмы в конкретных ассоциациях «паразит–хозяин» (Контримавичус, 1982; Евланов, Колокольникова, 1990; Евланов и др., 1992; Goater, Holmes, 1994; Hufbauer, Via, 1998; Бахвалов и др., 2005). Паразитарные заболевания являются фактором естественного отбора, способным влиять на генетическую структуру популяции хозяина (Hudson, Greenman, 1998; Carius *et al.*, 2001). Это влияние осуществляется при условии наличия генотипической изменчивости хозяев, связанной с устойчивостью к паразитам (Goater, Holmes, 1994). Кроме того, регулирующее влияние паразитов зависит от плотности популяции хозяина и усиливается в стрессовых для хозяина условиях (Грант, 1991; Kristan, Hammond, 2000). Нередко наблюдаются дифференциальная восприимчивость хозяев с разными генотипами к заражению паразитами и генетически обусловленные различия в вирулентности паразитов, причем эта неоднородность в популяциях паразитов и хозяев носит согласованный харак-

тер (Андронов и др., 1999; Сафьянова, 2001; Иешко и др., 2003; Симчук, 2008). По мнению ряда авторов (Little, Ebert, 1999), обнаруженные связи между зараженностью и генотипом хозяев могут быть следствием генетической изменчивости на устойчивость животных к паразитам или различий пространственного распределения генотипов хозяев и степеней зараженности. Изменения частот генов и генотипов, происходящие в популяции хозяина под действием паразитов, позволяют последнему регулировать паразитарную нагрузку (Беляков и др., 1987; Астафьев, Петров, 1992).

Данная работа посвящена анализу взаимосвязи между паразитологическими и генетическими показателями популяций мелких млекопитающих.

Материалы и методы

Материалом для работы послужили три наиболее массовых на юге Западной Сибири вида мелких млекопитающих: красная полевка *Myodes rutilus* Pallas, 1779 (439 особей), рыжая полевка *M. glareolus* Schreber, 1780 (129 особей), обыкновенная бурозубка *Sorex araneus* L., 1758 (372 особи). Животные были отловлены в пе-

риод 1997–2007 гг. в 9 географических пунктах Тюменской области (рис. 1). Данные о выборках представлены в табл. 1. Отлов млекопитающих производился ловчими канавками, живоловушками и капканами Геро. Гельминтологические исследования проводили стандартным методом (Ивашкин и др., 1971), определение гельминтов – по определителям (Определитель гельминтов..., 1978; 1979; Генов, 1984). Рассчитывали показатели зараженности: экстенсивность инвазии (ЭИ) – процент зараженных особей от числа обследованных, интенсивность инвазии (ИИ) – среднее число гельминтов на одну зараженную особь хозяина, индекс обилия (ИО) – среднее число гельминтов на одну исследованную особь хозяина, индекс видового разнообразия микросообществ паразитов Шеннона-Винера (Н) (Пугачев, 2000).

Для оценки генетической изменчивости применяли метод вертикального электрофореза белков в 7,5 %-м полиакриламидном геле (Маурер, 1971). Гистохимическое выявление ферментов, миогенов и белков крови проводили по стандартной методике (Корочкин и др., 1977). Всего изучено 10 белковых систем мышц и крови (табл. 2). Рассчитывали частоты аллелей и генотипов, долю полиморфных локусов ($P_{95\%}$), фактическую и ожидаемую среднюю гетерозиготность на локус ($He_{ф(ож)}$) по программе PopGen32 (Yeh *et al.*, 1999).

Для оценки взаимосвязи паразитологических и генетических показателей популяций хозяев использовали коэффициент корреляции (r), критерии Стьюдента (t_d) и Фишера (F) (Лаккин, 1990). Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ STATISTICA 6.0.

Результаты

Для анализа взаимосвязи генетических и паразитологических параметров популяций использовали данные по изменчивости белковых локусов в 15 выборках красной и 7 выборках рыжей полевок, а также данные по суммарной зараженности полевок всеми видами гельминтов. Всего у лесных полевок нами отмечено паразитирование 9 видов гельминтов, из них постоянно и повсеместно встречаются цестоды *Arostrilepis horrida*, *Catenotaenia*

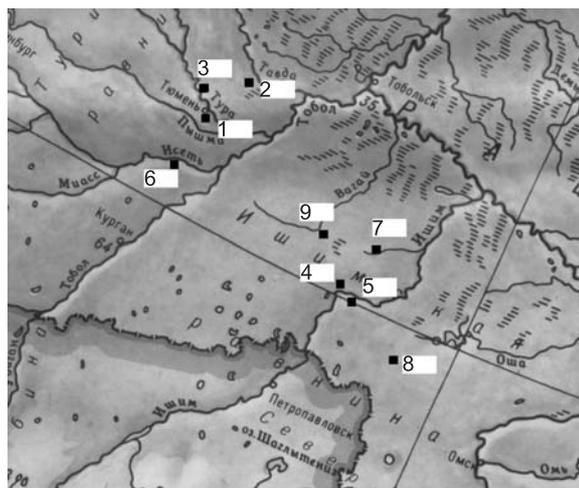


Рис. 1. Места отлова млекопитающих.

1 – г. Тюмень, 2 – окрестности оз. Кучак Нижнетавдинского района, 3 – д. Решетниково Тюменского района, 4 – г. Ишим, 5 – Ишимский район, 6 – с. Рафайлово Исетского района, 7 – д. Синицыно Ишимского района, 8 – с. Сладково Сладковского района, 9 – с. Журавли Омутинского района юга Тюменской области.

Таблица 1
Характеристика выборок

Пункт	Год	Объем выборки		
		Красная полевка	Рыжая полевка	Бурозубка
Кучак	1997	28	34	–
	2001	8	7	39
	2002	10	15	46
	2004	51	23	–
	2005	24	–	–
	2006	50	–	–
	2007	27	24	39
Решетниково	2002	–	–	13
Тюмень	2001	28	18	6
Ишим	1999	30	–	24
	2001	–	–	38
	2002	21	–	38
Ишимский р-н	2002	–	–	22
Синицыно	1999	69	–	41
Журавли	1999	44	–	66
Сладково	2002	4	–	–
Рафайлово	2004	5	8	–
	2005	40	–	–

Таблица 2

Исследованные белковые системы лесных полевков и бурозубок

Белковая система	Локус	Количество и характеристика* локусов		
		Красная полевка	Рыжая полевка	Обыкновенная бурозубка
Малатдегидрогеназа (1.1.1.40)	<i>Mdh-1,2</i>	П (2), М	2 М	2 М
Лактатдегидрогеназа (1.1.1.27)	<i>Ldh-1,2</i>	2 М, П (3)	2 М	2 М
Супероксиддисмутаза (1.15.1.1)	<i>Sod-1,2</i>	П (2), М	П (2)	1 М
Изоцитратдегидрогеназа (1.1.1.42)	<i>Idh-1</i>	М	–	–
Аспаргатаминотрансфераза (2.6.1.1)	<i>Aat-1,2</i>	П (2), М	П (2), М	П (2)
Неспецифические эстеразы (3.1.1.n)	<i>Est-1-5</i>	5 П (2)	5 П (2)	2 П (3), М
Миогены	<i>My-1-6</i>	4 М, 2 П (2)	4 М, 2 П (2)	3 П (2), 4 М
Посттрансферрин	<i>Ptf</i>	М	М	–
Трансферрин	<i>Tf</i>	П (3)	П (4)	–
Гемоглобин	<i>Hb</i>	М	М	М
Количество исследованных локусов		23	21	17

Примечание. * П – полиморфный локус; М – мономорфный; в скобках – число аллелей.

cricetorum, *Paranoplocephala omphalodes*, нематоды *Heligmosomum mixtum* и *Heligmosomoides laevis*, находки других видов (нематод *Syphacia obvelata*, трематод *Plagiorchis eutamiatidis*, скребней *Moniliformis clarki*, цестод *Taenia mustelae*) – единичны. При совместном обитании красной и рыжей полевков видовой состав гельминтов и показатели зараженности ими одинаковы (Жигилева и др., 2008). Индексы видового разнообразия микросообществ паразитов варьируют в разных выборках полевков от 0,02 до 1,28 и составляют в среднем 0,29.

Красная и рыжая полевки имеют сходные показатели белкового полиморфизма. Доля полиморфных локусов составляет 0,439 и 0,411, средняя гетерозиготность (H_e) – 0,121 и 0,132 у красной и рыжей полевков соответственно.

При расчете коэффициентов корреляции между показателями инвазивности, видового разнообразия паразитов и показателями генетической изменчивости 22 выборки лесных полевков обнаружено, что показатели зараженности положительно коррелируют с теоретически ожидаемой гетерозиготностью и полиморфностью, а показатель разнообразия сообществ паразитов отрицательно коррелирует с фактически наблюдаемой гетерозиготностью (табл. 3). Фактическая гетерозиготность не связана с величиной паразитарной нагрузки, а из показателей инвазии

достоверным оказался показатель корреляции для индекса обилия. То есть чем выше уровень изменчивости популяций лесных полевков, тем больше их зараженность гельминтами, но ниже разнообразие паразитов.

Такая же закономерность была обнаружена нами ранее при изучении популяций обыкновенной бурозубки, у которой установлена сильная достоверная отрицательная корреляция между уровнем гетерозиготности популяции и видовым разнообразием гельминтоценозов ($r = -0,89$,

Таблица 3

Коэффициент корреляции (r) между паразитологическими и генетическими параметрами популяций лесных полевков

Паразитологические показатели	Генетические показатели		
	P	H_e	$H_{ож}$
Экстенсивность инвазии	+0,24	+0,06	+0,14
Интенсивность инвазии	+0,13	+0,13	+0,30
Индекс обилия	+0,37	+0,20	+0,45*
Индекс видового разнообразия гельминтов	-0,20	-0,29	-0,21

Примечание. * Статистически достоверно ($P < 0,05$).

$P < 0,01$) (Жигилева, 2003; Жигилева и др., 2006). Тенденция к увеличению индексов видовой разнообразия сообществ гельминтов с уменьшением степени генетической изменчивости популяций наблюдается и на видовом уровне – при сравнении разных видов мелких млекопитающих (Жигилева и др., 2006). Уменьшение вероятности заражения паразитами с ростом гетерозиготности хозяина обнаружено в ряде других систем «паразит–хозяин»: трематоды–моллюски (Puurtinen *et al.*, 2004), нематоды–грызуны (Meagher, 1999). Взаимосвязь между гетерозиготностью, в том числе по некодирующим генетическим маркерам, таким, как микросателлитные локусы, и приспособленностью, к которой, несомненно, относится и устойчивость к паразитарной инвазии, некоторыми авторами объясняется неравновесием по сцеплению (Hansson *et al.*, 2004). Не исключено, что некоторые аллели белковых локусов могут иметь адаптивное значение в приспособлении к инвазии или маркировать устойчивые к паразитарной инвазии генотипы.

В связи с этим нами проанализирована дифференциальная зараженность гельминтами бурозубок с разными генотипами белковых локусов. Для изучения связи с паразитизмом выбраны полиморфные системы неспецифических эстераз (локусы *Est-1*, *Est-2* и *Est-3*) и аспартаминотрансфераз (*Aat-1*). Выбор ферментов обусловлен их участием в стрессовых реакциях животных и детоксикации паразитарных метаболитов (Серебров и др., 2001; Воронцова и др., 2006). Неодинаковые показатели зараженности паразитами обладателей разных генотипов по локусам *Est-1* и *Aat-1* были установлены лишь в 4 из 7 исследованных выборок бурозубок и в 3 из 8 выборок красных полевок. В разных выборках животных менее инвазированными были особи с разными генотипами. При объединении выборок бурозубок достоверно более зараженными оказались носители гетерозиготного генотипа по локусу *Est-1* ($F = 10,8$, $P < 0,001$; $t_d = 2,12$, $P < 0,05$). Возможно, гетерозиготы обладают способностью выдерживать повышенную паразитарную нагрузку. Или гетерозиготные генотипы маркируют определенные внутрипопуляционные группировки бурозубок, имеющие повышенную зараженность. По объединенным данным для красных полевок количество гельминтов достоверно не зависело от

индивидуальной гетерозиготности и генотипа хозяина ни по одному из локусов.

Обсуждение

Индивидуальная гетерозиготность может служить интегральной характеристикой генотипа. В большинстве случаев такие признаки, как плодовитость, жизнеспособность, скорость роста, устойчивость к заболеваниям и другие, входящие в понятие общей приспособленности и скоррелированные между собой, зависят от генотипа в целом и в частности – от уровня гетерозиготности. На преимущества гетерозигот указывает повышение среднего уровня гетерозиготности с возрастом во многих популяциях. Так, для рыб имеются свидетельства связи параметров белкового полиморфизма со скоростью роста и индивидуального развития. При анализе природных популяций нерки *Oncorhynchus nerka* обнаружена положительная корреляция уровня гетерозиготности по изоферментным локусам с размером покатных особей и отрицательная связь с размером половозрелых самцов (Алтухов, Варнавская, 1983). Отмечена связь генотипов локусов трансферринов со скоростью роста карпа, более высокой выживаемостью и долей раносозревающих самцов кижуча (Балахнин, Соломатина, 1970; Сапрыкин, 1980; Межжерин, Балахнин, 1985). Исследование полиморфизма локусов эстераз и лактатдегидрогеназы при индивидуальных скрещиваниях карпа выявило преимущество гетерозигот по одному из эстеразных локусов (Паавер, 1980). Во многих случаях связь параметров белкового полиморфизма с приспособительными признаками особей носит характер преимущества гетерозиготных генотипов. Это может быть связано, во-первых, с функциональным преимуществом гетерозигот; во-вторых, индивидуальная гетерозиготность по белковым локусам, не давая никаких функциональных преимуществ, является только индикатором общего уровня гетерозиготности. В случае положительной связи уровня гетерозиготности с размерами особей есть объяснение в преимущественном выживании гетерозигот и их превосходстве в скорости роста (Голубцов, 1988).

Оценка характера и степени скоррелированности признаков позволяет охарактеризовать

степень коадаптированности онтогенетических процессов, на устойчивость которых оказывает влияние гетерозиготность (Калинин, Калинина, 1994). В работе по изучению сопряженности гетерозиготности с фенотипической изменчивостью показана обратная пропорциональная связь (Пак, Цой, 1992). Таким образом, большая гетерозиготность сопутствует большей стабильности развития, при этом, чем выше гетерозиготность популяции, тем выше концентрация в ней стабильно развивающихся особей (Животовский, 1984).

В селекции уровень гетерозиготности отражает степень гетерогенности селекционного материала и степень инбридинга. Поэтому контроль за уровнем гетерозиготности является обязательным компонентом селекции и мониторинга искусственных популяций, а при воспроизводстве рекомендуется отбирать производителей со средним уровнем гетерозиготности по совокупности локусов (Алтухов, 1994).

Связь видовой и генетической разнообразия в биоценозах подтверждена многими теоретическими и эмпирическими исследованиями (Vellend, Geber, 2005; Букварева, Алещенко, 2007). Предположительно, согласованное изменение во времени и пространстве видовой разнообразия биоценозов и генетической изменчивости популяций может быть обусловлено параллельным влиянием на эти показатели экологических факторов или непосредственного влияния одного вида разнообразия на другой. В случае с системами «гельминты–мелкие млекопитающие» согласованное изменение гетерозиготности популяции хозяина, показателей инвазии и разнообразия паразитов может быть опосредовано через циклические изменения численности мелких млекопитающих, которые обычно сопровождаются изменениями генетической структуры популяций и коллективного иммунитета (Лохмиллер, Мошкин, 1999; Милишников, 2004; Berthier *et al.*, 2005). Однако в исследованиях Межера (Meagher, 1999) связь гетерозиготности с инвазией была достоверной и при стабильной численности грызунов.

Между тем, связь параметров биохимического полиморфизма в популяциях животных с какими-либо признаками, которая проявляется в дифференциальной выживаемости и репродуктивной способности животных с различ-

ными генотипами, может быть и случайной. Причиной могут быть как дифференциальная смертность особей, различающихся генотипами белковых локусов, так и неслучайное по отношению к генотипам перераспределение особей в пространстве, а также результат селективности выборки (Бойко, 1997). Большинство попыток найти связи между генотипами белковых локусов с хозяйственно важными признаками оказываются безрезультатными. Не исключено, что причиной этому является тот факт, что обнаруженные ассоциативные связи характеризуют конкретную генетическую систему в определенных условиях среды. При изменении условий среды ассоциативные связи разрушаются, поскольку формируются новые коадаптированные генные комплексы. По мнению Л.В. Богданова (1973), маловероятно, что функциональные различия между аллоформами одного белка могли сколько-нибудь значительно влиять на проявление полигенных признаков, имеющих невысокие коэффициенты наследуемости. Видимо, четкие корреляции наблюдаются в случае плейотропного действия генов (Смирнов, 1974). Однако факт неустойчивости ассоциативных связей во времени и пространстве не ведет к утрате актуальности подобных исследований. Тем более что использование легко выявляемых биохимических маркеров хозяйственно ценных признаков до сих пор остается важнейшим орудием селекционеров.

Заключение

Обнаружение неслучайных связей между генетическими и паразитологическими характеристиками популяций мелких млекопитающих позволяет предположить наличие подобного механизма в популяциях сельскохозяйственных животных. Уровень зараженности положительно коррелирует с показателем гетерозиготности. Возможно, повышенная гетерозиготность является механизмом сохранения жизнеспособности при инвазии или служит неспецифическим ответом популяции на стресс, связанный с повышенной паразитарной нагрузкой. В связи с этим поддержание достаточного уровня гетерозиготности популяций является условием успешного преодоления паразитарной инвазии.

Благодарности

Автор благодарит А.Ю. Левых, Н.А. Сазонову, О.А. Хританько, П.В. Тимошенко, И.А. Текова, Е.В. Сергееву, З.В. Кутаеву, в разные годы принимавших участие в отловах мелких млекопитающих. Работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (госконтракт № П712).

Литература

- Алтухов Ю.П. Генетические последствия селективного рыбоводства // Генетика. 1994. Т. 30. № 1. С. 5–21.
- Алтухов Ю.П., Варнавская Н.В. Адаптивная генетическая структура и ее связь с внутривидовой дифференциацией по полу, возрасту и скорости роста у тихоокеанского лосося – нерки *Oncorhynchus nerka* // Генетика. 1983. Т. 19. № 5. С. 796–802.
- Андронов Е.Е., Румянцева М.Л., Сагуленко В.В., Симаров Б.В. Влияние растения-хозяина на генетическое разнообразие природных популяций *Sinorhizobium meliloti* // Генетика. 1999. Т. 35. № 10. С. 1358–1366.
- Астафьев Б.А., Петров О.Е. Эволюционно-генетическая теория паразитизма // Усп. соврем. биологии. 1992. Т. 112. № 2. С. 163–175.
- Балахнин И.А., Соломатина В.Д. Типы трансферрина и их связь с некоторыми показателями экстерьера у карпа // Гидробиол. журнал. 1970. Т. 6. № 6. С. 56–61.
- Бахвалов С.А., Бахвалова В.Н., Морозова О.В. Хозяин-зависимые временные изменения полиморфизма вирусных популяций // Паразитология в Сибири и на Дальнем Востоке: Матер. науч. конф. Новосибирск, 2005. С. 17–18.
- Беляков В.Д., Голубев Д.Б., Каминский Г.Д., Тец В.В. Саморегуляция паразитарных систем. М.: Медицина, 1987. 240 с.
- Богданов Л.В. К вопросу о природе биохимического полиморфизма у домашних животных // Биохимическая генетика рыб. Л., 1973. С. 24–36.
- Бойко Е.Г. Влияние селекционно-генетических и экологических факторов на структуру популяций карповых рыб: Дис... канд. биол. наук. Тюмень, 1997. 135 с.
- Букварева Е.Н., Алещенко Г.М. Принцип оптимального разнообразия: возможные следствия для эволюции биосистем // Матер. Междунар. конф. «Современные проблемы биологической эволюции», посвященной 100-летию Государственного Дарвиновского музея. Москва, 17–20 сентября 2007. С. 198–199.
- Воронцова Я.Л., Ершов Н.И., Глупов В.В. Влияние микроспоридии *Vairimorpha ephestiae* (Microsporidia: Burenellidae) на активность и спектр неспецифических эстераз различных тканей личинок большой пчелиной огневки *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) // Паразитология. 2006. Т. 40. № 1. С. 74–84.
- Генов Т. Хельминты на насекомоядных бозайници и гризачите в Българии. София: Изд-во на българската академия на науките, 1984. 348 с.
- Голубцов А.С. Внутривидовая изменчивость животных и белковый полиморфизм. М.: Наука, 1988. 166 с.
- Грант В. Эволюционный процесс. М.: Мир, 1991. 488 с.
- Евланов И.А., Колокольникова С.Е. Изучение популяционно-генетических взаимоотношений в системе лещ – *Digamma interrupta* (Cestoda: Ligulidae) // Паразитология. 1990. Т. 24. № 4. С. 309–314.
- Евланов И.А., Колокольникова С.Е., Козловский С.В. Популяционно-генетические взаимоотношения в системе лещ – *Caryophyllaeus laticeps* (Cestoda) // Паразитология. 1992. Т. 26. № 3. С. 240–245.
- Животовский Л.А. Интеграция полигенных систем в популяциях. М.: Наука, 1984. 183 с.
- Жигилева О.Н. Уровни генетической изменчивости и зараженности гельминтами в популяциях мелких млекопитающих // Вестник ТюмГУ. 2003. № 2. С. 29–32.
- Жигилева О.Н., Левых А.Ю., Сазонова Н.А. и др. Взаимосвязь биоразнообразия паразитов и их хозяев на примере гельминто-гостальных комплексов мелких млекопитающих юга Западной Сибири // Экологический мониторинг и биоразнообразие. 2006. Т. 1. № 1. С. 42–45.
- Жигилева О.Н., Левых А.Ю., Хританько О.А. и др. Сопряженная пространственно-временная динамика популяционно-генетических и паразитологических показателей лесных полевок Западной Сибири // Проблемы популяционной экологии и рационального природопользования: Сб. науч. тр. Тюмень: Изд-во ТюмГУ, 2008. С. 90–102.
- Ивашкин В.М., Контримавичус В.Л., Назарова Н.С. Методы сбора и изучения гельминтов наземных млекопитающих. М.: Наука, 1971. 124 с.
- Иешко Е.П., Высоцкая Р.У., Евсеева Н.В. и др. Сравнительная характеристика ферментных профилей паразита *Schistocephalus solidus* и его хозяина – колюшки *Gasterosteus aculeatus* // Проблемы современной паразитологии: Матер. науч. конф. СПб, 2003. С. 174–175.
- Калинин В.В., Калинина О.В. Изучение связи различных компонент морфологической изменчи-

- ности с гетерозиготностью аллозимных локусов. Связь степени коррелированности комплекса количественных признаков с гетерозиготностью // Генетика. 1994. Т. 30. № 1. С. 95–100.
- Контримавичус В.Л. Паразитизм и эволюция экосистем (экологические аспекты паразитизма) // Журн. общ. биологии. 1982. Т. XLIII. № 3. С. 291–302.
- Корочкин Л.И., Серов О.Л., Пудовкин А.И. и др. Генетика изоферментов. М.: Наука, 1977. 278 с.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высш. школа, 1990. 352 с.
- Лохмиллер Р.Л., Мошкин М.П. Экологические факторы и адаптивная значимость изменчивости иммунитета мелких млекопитающих // Сиб. экол. журнал. 1999. № 1. С. 37–58.
- Маурер Г. Диск-электрофорез. Теория и практика электрофореза в ПААГ. М.: Мир, 1971. 243 с.
- Межжерин С.В., Балахнин И.А. Скорость роста и возрастная дифференцировка электрофоретических спектров гемоглобина у карпов с разными генотипами трансферрина // Цитология и генетика. 1985. Т. 19. № 2. С. 119–124.
- Мишлишников А.Н. Существуют ли закономерности в формировании аллозимной изменчивости у видов млекопитающих? // Вестн. ТГУ. Приложение. 2004. № 10. С. 51–53.
- Определитель гельминтов грызунов фауны СССР: цестоды и трематоды / Рыжиков К.Н., Гвоздев Е.В., Токобаев М.Н. и др. М.: Наука, 1978. 232 с.
- Определитель гельминтов грызунов фауны СССР: нематоды и акантоцефалы // Рыжиков К.Н., Гвоздев Е.В., Токобаев М.Н. и др. М.: Наука, 1979. 279 с.
- Паавер Т.К. Генетический полиморфизм белков ропшинского карпа // Проблемы генетики и селекции рыб. Л., 1980. Вып. 153. С. 81–93.
- Пак И.В., Цой Р.М. Сопряженность биохимических и экстерьерных признаков у казахстанского карпа и ее селекционная оценка // Вопросы ихтиологии. 1992. Т. 32. № 3. С. 148–155.
- Пугачев О.Н. Паразитарные сообщества речного гольяна (*Phoxinus phoxinus* L.) // Паразитология. 2000. Т. 34. № 3. С. 196–206.
- Сапрыкин В.Г. Корреляция трансферринов с ростом карпов в различных условиях среды // Проблемы генетики и селекции рыб. Л., 1980. Вып. 153. С. 100–104.
- Сафьянова В.М. Популяционная структура вида у агамных простейших на примере *Leishmania* // Изв. АН. Сер. биол. 2001. № 2. С. 149–156.
- Серебров В.В., Алексеев А.А., Глухов В.В. Изменение активности и спектра эстераз гемолимфы гусениц вошиной моли *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae) при микозах // Изв. АН. Сер. биол. 2001. № 5. С. 588–592.
- Симчук А.П. Влияние генотипа кормового растения на изменчивость приспособительно важных признаков личинок в генотипических классах зеленой дубовой листовертки // Генетика. 2008. Т. 44. № 4. С. 488–495.
- Смирнов О.К. Раннее определение продуктивности животных. М.: Колос, 1974. 112 с.
- Berthier K., Galan M., Foltete J.C. *et al.* Genetic structure of the cyclic fossorial water vole (*Arvicola terrestris*): Landscape and demographic influences // Mol. Ecol. 2005. V. 14. № 9. P. 2861–2872.
- Carius H.J., Little T.J., Ebert D. Genetic variation in a host-parasite association: Potential for coevolution and frequency-dependent selection // Evolution (USA). 2001. V. 55. № 6. P. 1136–1145.
- Goater C.P., Holmes J.C. Parasite-mediated natural selection // J. Ornithol. 1994. V. 135. № 3. P. 348.
- Hansson B., Westerdahl H., Hasselquist D. *et al.* Does linkage disequilibrium generate heterozygosity-fitness correlations in great reed warblers? // Evolution (USA). 2004. V. 58. № 4. P. 870–879.
- Hudson P., Greenman J. Competition mediated by parasites: biological and theoretical progress // Trends Ecol. Evol. 1998. V. 13. № 10. P. 387–390.
- Hufbauer R.A., Via S. Evolution of an aphid-parasitoid interaction: variation in resistance to parasitism among aphid populations specialized on different plants // Evolution (USA). 1998. V. 53. № 5. P. 1435–1445.
- Kristan D.M., Hammond K.A. Combined effects of cold exposure and sublethal intestinal parasites on host morphology and physiology // J. Exptl. Biol. 2000. V. 203. № 22. P. 3495–3504.
- Little T.J., Ebert D. Associations between parasitism and host genotype in natural populations of *Daphnia* (Crustacea: Cladocera) // J. Anim. Ecol. 1999. V. 68. № 1. P. 134–149.
- Meagher S. Genetic diversity and *Capillaria hepatica* (Nematoda) prevalence in Michigan deer mouse populations // Evolution (USA). 1999. V. 53. № 4. P. 1318–1324.
- Puurtinen M., Hytönen M., Knott K.E. *et al.* The effects of mating system and genetic variability on susceptibility to trematode parasites in a freshwater snail, *Limnaea stagnalis* // Evolution (USA). 2004. V. 58. № 12. P. 2747–2753.
- Vellend M., Geber M.A. Connection between species diversity and genetic diversity // Ecol. Lett. 2005. V. 8, № 7. P. 767–781.
- Yeh F.C., Yang R., Boyle T. POPGENE. Version 1.31. / University of Alberta and Centre for International Forestry Research. 1999.

**CORRELATION BETWEEN ALLOZYME DIVERSITY IN POPULATIONS
OF THREE MAMMALIAN SPECIES
(*MYODES RUTILUS*, *MYODES GLAREOLUS*, AND *SOREX ARANEUS*)
AND HELMINTH INFECTION RATE**

O.N. Zhigileva

Tyumen State University, Tyumen, Russia, e-mail: zhigileva@mail.ru

Summary

The indices of helminth invasion in small mammals demonstrate positive correlations with the share of polymorphic loci and expected heterozygosity. A negative correlation was found between the observed heterozygosity and the species diversity of parasites. The functions of the various genotypes of allozyme loci of voles (*Myodes*) and shrews (*Sorex*) to the parasitological invasion were shown. Carriers of heterozygous genotypes are advantageous at high indices of invasion, and carriers of rare genotypes, at low indices. Mechanisms underlying the correlation of parasitological and genetic parameters in populations are discussed.

Key words: small mammals, *Myodes*, *Sorex*, helminths, heterozygosity, allozyme loci, parasite–host system.

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С В МОСКВЕ СРЕДИ ЛИЦ, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСОМ ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА

В.Е. Ведерников^{1,2}, О.Ю. Туманова¹, М.К. Иванов^{1,2,3}, Г.М. Дымшиц^{2,3}

¹ ЗАО «Вектор-Бест», пос. Кольцово, Новосибирская область, Россия, e-mail: vve23@mail.ru;

² Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия;

³ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

ВГС-инфекция широко распространена среди ВИЧ-инфицированных пациентов, варьируя от 30 до 80 % в зависимости от пути передачи обоих вирусов. При выявлении антител к вирусу гепатита С (анти-ВГС) могут быть получены отрицательные результаты у иммунодефицитных пациентов в острой фазе ВГС-инфекции, во время которой противовирусная терапия наиболее эффективна. В свою очередь, вирусный гепатит С способствует развитию ВИЧ-инфекции. При инфицировании генотипом 1 ВГС выявлен больший риск прогрессии ВИЧ-инфекции, развития СПИДа с летальным исходом, чем при инфицировании генотипами 2 и 3. Нами определена распространенность ВГС среди 493 ВИЧ-инфицированных г. Москвы и проведен сравнительный анализ выборок больных с коинфекцией ВГС/ВИЧ и с моноинфекцией ВГС по следующим параметрам: спектр антител к ВГС, вирусная нагрузка и генотип ВГС. В проанализированной выборке ВИЧ-инфицированных 43,5 % были инфицированы ВГС; 9 % ВИЧ-инфицированных, у которых выявляется РНК ВГС, отрицательны по ИФА на анти-ВГС; у больных с моноинфекцией ВГС преобладает генотип 3 ВГС, тогда как у ВИЧ-инфицированных с коинфекцией ВГС генотипы 1 и 3 присутствуют в равном соотношении; для пациентов с коинфекцией ВГС/ВИЧ характерны более высокие вирусные нагрузки ВГС. Среди ВИЧ-инфицированных риск недоявления ВГС с помощью иммуноферментного анализа составляет 3,4 %, что может привести к задержке начала терапии и выбору неверной стратегии лечения. Следует отметить, что из 17 ВГС/ВИЧ коинфицированных пациентов, давших отрицательный результат на анти-ВГС, у 13 был выявлен ВГС именно генотипа 1, хуже поддающийся лечению и вызывающий более тяжелое поражение печени по сравнению с генотипами 2 и 3. Это указывает на необходимость ранней ПЦР-диагностики ВГС у ВИЧ-инфицированных.

Ключевые слова: вирус гепатита С, коинфекция ВИЧ и ВГС, ПЦР, спектр антител ВГС, вирусная нагрузка, генотипирование ВГС.

Введение

Согласно общемировой статистике, среди лиц, инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), более одной трети коинфицированы вирусом гепатита С (ВГС) (Alter, 2006). По данным ряда авторов, распространенность ВГС-инфекции среди ВИЧ-инфицированных пациентов варьирует от 30 до 59 % между группами населения, которые выделяются по различным критериям (пол, воз-

раст, наличие гемофилии и т. д.) (Puig-Basagoiti *et al.*, 2000; Osilla *et al.*, 2009), а у потребителей инъекционных наркотиков (ПИН) может превышать 80 % (Haydon *et al.*, 1998). Коинфекция ВИЧ и ВГС имеет широкое распространение главным образом потому, что вирусы имеют общие пути передачи. Благодаря применению (с 1996 г.) высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРВТ) для лечения ВИЧ-инфекции снизилась смертность от оппортунистических инфекций и увеличилась продолжительность

жизни больных, при этом болезнь печени, вызванная ВГС, стала основной причиной смерти ВИЧ-инфицированных (Chen *et al.*, 2009).

У больных, коинфицированных ВИЧ/ВГС, преобладают более выраженные воспалительные и фибротические процессы в ткани печени, а также увеличены темпы замещения гепатоцитов клетками соединительной ткани по сравнению с пациентами, инфицированными только ВГС (Benhamou *et al.*, 1999; Bhagani, 2009). Был обнаружен факт повышения риска летального исхода от последствий тяжелого поражения печени у больных, коинфицированных ВИЧ и ВГС (Darby *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2009). Вероятность успеха лечения гепатита С при коинфекции ВИЧ/ВГС значительно ниже, чем при моноинфекции ВГС (Tural *et al.*, 2008). Таким образом, сравнительные исследования больных, коинфицированных ВИЧ/ВГС, и больных с моноинфекцией ВГС свидетельствуют о том, что ВИЧ-инфекция оказывает серьезное отягчающее влияние на ВГС-инфекцию. Имеются сведения, согласно которым ВГС-инфекция ускоряет снижение уровня CD4+ клеток, что является неблагоприятным фактором для ВИЧ-инфицированных пациентов (Avidan *et al.*, 2009).

В ряде случаев ВИЧ-инфекция может стать препятствием в лабораторной диагностике ВГС-инфекции методом иммуноферментного анализа (ИФА). При выявлении антител к вирусу гепатита С (анти-ВГС) состояние иммунодефицита, вызванное наличием ВИЧ-инфекции, может привести к получению ложноотрицательных результатов. В итоге может остаться незамеченной острая фаза ВГС-инфекции, в ходе которой терапия оказывается, как правило, наиболее эффективной (Thomson *et al.*, 2009). В ряде исследований была продемонстрирована связь между генотипом ВГС и прогрессией ВИЧ-инфекции (Sabin *et al.*, 1997; Daar *et al.*, 2001; Yoo *et al.*, 2005). При наличии генотипа 1 ВГС выявлен бóльший риск прогрессии ВИЧ-инфекции, развития СПИДа с летальным исходом, чем при генотипах 2 и 3. В связи с этим необходимо проводить анализ всех ВИЧ-инфицированных пациентов на наличие РНК вируса гепатита С и определять генотип ВГС на ранних стадиях развития заболевания.

В настоящее время в России так же, как и во всем мире, продолжает оставаться актуальной

проблема распространения ВИЧ. По данным Минздравсоцразвития России, на 1 июля 2009 г. в Российской Федерации было зарегистрировано 494961 ВИЧ-инфицированных, из них 4278 детей.

Несмотря на ежегодное наращивание усилий по противодействию эпидемии ВИЧ-инфекции, Московская область продолжает входить в число наиболее страдающих от данной патологии регионов Российской Федерации. За 2008 г. число ее жителей с установленным диагнозом ВИЧ/СПИД увеличилось на 2598 человек и достигло 25701, за 10 месяцев 2009 г. увеличилось до 27759. Общее оценочное число ВИЧ-инфицированных может быть в 2–3 раза больше. Более 80 % ВИЧ-инфицированных представлены людьми в возрасте от 20 до 39 лет, наибольший удельный вес приходится на молодежную возрастную группу от 20 до 29 лет.

Данных о распространенности ВИЧ/ВГС коинфекции, распределении генотипов, спектра антител к ВГС и вирусной нагрузке среди ВИЧ-инфицированных в различных регионах России недостаточно для клиницистов, разрабатывающих стратегию диагностики ВГС и лечения отдельных пациентов. В цели данной работы входили: оценка распространенности ВГС-инфекции среди ВИЧ-инфицированных г. Москвы; определение доли отрицательных по ИФА на анти-ВГС ВИЧ-инфицированных, т. е. оценка вероятности ложноотрицательного результата теста ИФА у лиц с иммунодефицитом, вызванным ВИЧ-инфекцией; проведение сравнительного анализа выборки пациентов с моноинфекцией ВГС и коинфицированных ВИЧ/ВГС по следующим параметрам: распределение генотипов, вирусная нагрузка и спектр ИФА-маркеров ВГС.

Материалы и методы

Выявление РНК ВГС и ВИЧ в клинических образцах

Материалом для исследования служили образцы сыворотки крови (с добавлением в качестве антикоагулянта ЭДТА в конечной концентрации 2 мг/мл) как ВГС- (304 образца), так и ВИЧ-положительных пациентов (493 образца) по скрининговым тестам ИФА, поступившие

для анализа в НИИ скорой помощи имени Н.В. Склифосовского в 2008 г. Пробоподготовку образцов сыворотки пациентов и определение вирусной нагрузки ВГС и ВИЧ проводили с помощью наборов реагентов «РеалБест РНК ВГС» и «РеалБест РНК ВИЧ» (ЗАО «Вектор-Бест», пос. Кольцово, Новосибирская область) согласно прилагаемой инструкции.

Определение генотипа ВГС

Генотип ВГС определяли во всех образцах с детектируемой вирусной нагрузкой ВГС с помощью набора реагентов «РеалБест РНК ВГС-генотип» (ЗАО «Вектор-Бест», пос. Кольцово, Новосибирская область), в основу которого легла предложенная нами система генотипирования (Ведерников и др., 2009).

Выявление серологических маркеров

Образцы, давшие положительный результат на РНК ВГС, тестировали на наличие антител класса IgM к Core, NS3, NS4, NS5 ВГС с использованием набора реагентов «БЕСТ анти-ВГС-

СПЕКТР» (ЗАО «Вектор-Бест», пос. Кольцово, Новосибирская область) согласно прилагаемой инструкции.

Результаты и обсуждение

Из 304 анти-ВГС положительных образцов РНК вируса гепатита С была обнаружена в 226 образцах (74 %). Из 493 анти-ВИЧ положительных образцов РНК вируса иммунодефицита человека была обнаружена в 449 образцах (91 %), из которых 215 содержали также РНК ВГС. Таким образом, в проанализированной нами выборке ВИЧ-инфицированных 43,5 % коинфицированы ВГС.

Тест на наличие антител класса IgM к Core, NS3, NS4, NS5 ВГС был проведен для 200 образцов с моноинфекцией ВГС и 187 образцов с коинфекцией ВИЧ/ВГС. Результаты анализа спектра антител к ВГС представлены в табл.

Из табл. видно, что общее распределение по группам с различным количеством выявленных маркеров для обеих выборок совпадает, за исключением 12-й группы. В выборке ВИЧ-инфицированных с коинфекцией ВГС у

Таблица

Спектр антител к ВГС у ВИЧ-инфицированных пациентов с ВГС-коинфекцией и больных с ВГС-моноинфекцией

Спектр выявленных антител	Количество ВИЧ-инфицированных с ВГС-инфекцией (n = 187)		Генотип ВГС, (абс.*)				Количество больных с ВГС-инфекцией (n = 200)		Генотип ВГС, (абс.*)			
	абс.*	%	1	2	3	1+3	абс.*	%	1	2	3	1+3
1. CORE+	6	3,2	3	–	3	–	15	7,5	4	2	9	
2. CORE+, NS3+	8	4,3	6	–	2	–	6	3	5	–	1	
3. CORE+, NS3+, NS4+	47	25,4	25	5	15	2	44	22	17	1	25	1
4. CORE+, NS3+, NS4+, NS5+	87	47,0	29	3	52	3	93	46,5	39	5	48	1
5. CORE+, NS4+	9	4,9	4	–	5	–	15	7,5	4	1	10	
6. CORE+, NS4+, NS5+	6	3,2	1	–	5	–	16	8	3	1	12	
7. CORE+, NS5+	2	1,1	1	–	1	–	1	0,5	–	–	1	
8. NS3+	1	0,5	1	–	–	–	2	1	–	–	2	
9. NS3+, NS4+	2	1,1	1	–	1	–	1	0,5	–	–	1	
10. NS3+, NS4+, NS5+	–	–	–	–	–	–	2	1	–	–	2	
11. CORE+, NS3+, NS5+	2	1,1	2	–	–	–	5	2,5	1	1	3	
12. CORE-, NS3-, NS4-, NS5-	17	9,2	13	–	3	1	–	–	–	–	–	

* абс. – абсолютное значение.

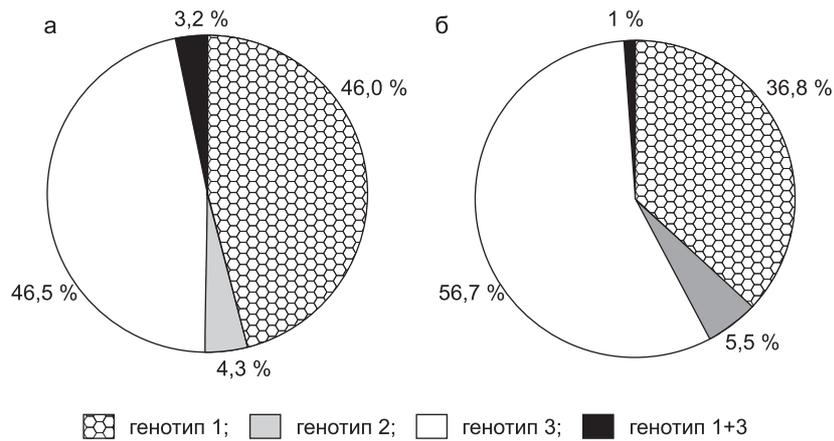


Рис. 1. Распределения генотипов ВГС у ВИЧ-инфицированных с коинфекцией ВГС (а, $n = 187$) и больных с моноинфекцией ВГС (б, $n = 200$).

9 % больных не было обнаружено антител к ВГС, тогда как при моноинфекции ВГС такие образцы встречаются крайне редко (сероконверсионное окно, иммуносупрессия) и в данной выборке обнаружены не были. Так как у ВИЧ-инфицированных больных значительно ослаблен иммунитет, при заражении ВГС может не происходить наработки специфических антител к антигенам вируса, что осложняет проведение ИФА-анализа. Именно поэтому при диагностике ВГС у ВИЧ-инфицированных наряду с ИФА необходимо использовать ПЦР для выявления РНК вируса.

В описанных выборках было определено соотношение различных генотипов ВГС (рис. 1).

В выборке больных с моноинфекцией ВГС преобладает генотип 3 (рис. 1, б), тогда как у ВИЧ-инфицированных с коинфекцией ВГС генотип 1 и генотип 3 представлены равными долями (рис. 1, а). Это отличие может быть связано с тем, что в выборке ВИЧ-инфицированных преобладают ПИН. По мнению ряда исследователей (Freeman et al., 2000; Krekulova et al., 2001; Xia et al., 2008), ПИН можно рассматривать как отдельную популяцию, в которой свои закономерности распространения различных генотипов ВГС.

Нами было установлено, что при коинфекции ВИЧ/ВГС увеличивается доля образцов с высокой вирусной нагрузкой ВГС (10^6 – 10^7 МЕ/мл), что свидетельствует об активной репликации вируса (рис. 2). Активной репликации ВГС, а вместе с тем прогрессии болезни может спо-

собствовать снижение иммунного статуса у ВИЧ-инфицированных пациентов.

Таким образом, среди ВИЧ-инфицированных в Москве 43,5 % коинфицированы ВГС; 9 % ВИЧ-инфицированных, у которых выявляется РНК ВГС, отрицательны по ИФА на анти-ВГС; в выборке больных с моноинфекцией ВГС преобладает генотип 3, тогда как у ВИЧ-инфицированных с коинфекцией ВГС генотипы 1 и 3 присутствуют в равном соотношении; для выборки с коинфекцией ВИЧ/ВГС характерны более высокие вирусные нагрузки ВГС.

Ранняя диагностика ВГС позволяет своевременно определить острую фазу инфекции, в

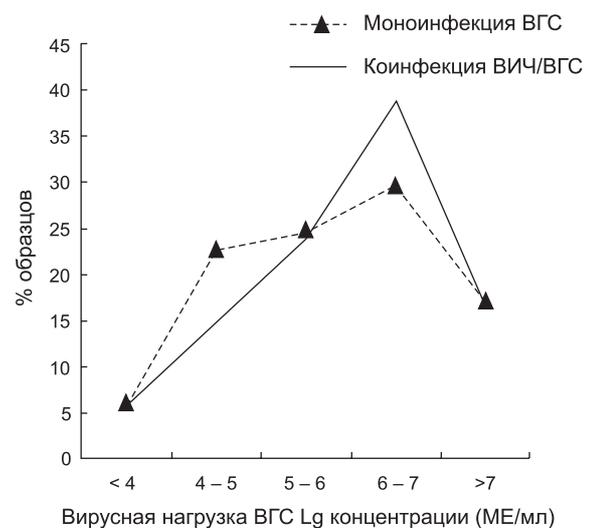


Рис. 2. Распределение вирусных нагрузок ВГС в двух выборках.

течение которой лечение наиболее эффективно. Из-за длительного серонегативного периода серологические анализы не позволяют выявлять инфекцию ВГС на ранних стадиях (Tobler *et al.*, 2003). У ВИЧ-отрицательных пациентов антитела к ВГС обычно нарабатываются через 6 недель после заражения (Netski *et al.*, 2005). У большинства ВИЧ-положительных пациентов серологические тесты на ВГС не дают адекватных результатов в течение 6 месяцев после инфицирования. Более того, у 5 % пациентов антитела к ВГС не выявляются и по прошествии одного года (Thomson *et al.*, 2009). ПЦР для выявления РНК ВГС и ИФА на Core антиген позволяют выявлять ВГС в период сероконверсионного окна. В нашей работе показано, что ВГС-инфекция широко распространена среди ВИЧ-инфицированных в Москве (43,5 % коинфицированы ВГС), что превышает общемировые среднестатистические данные (30 %). Среди проанализированных нами 251 ВИЧ-инфицированных, отрицательных на анти-ВГС, 6,8 % содержали РНК ВГС, что более чем в 2 раза превышает данные, полученные в США, – 3,2 % (Chamie *et al.*, 2007). Эта разница может быть связана как с различным иммунным статусом, так и со временем инфицирования ВГС пациентов, отобранных для анализа.

Среднее значение вирусной нагрузки выше для пациентов с ВГС генотипа 1 по сравнению с генотипами 2 и 3 (Herrero-Martinez *et al.*, 2002). Нами показано, что в выборке ВИЧ-инфицированных больных с коинфекцией ВГС в большей степени представлен генотип 1 (по сравнению с выборкой моноинфицированных ВГС), ассоциированный с высокими вирусными нагрузками, что согласуется с данными, полученными в США (Yoo *et al.*, 2005). Среди ВИЧ-инфицированных риск недоявления ВГС с помощью иммуноферментного анализа составляет 3,4 %, что может привести к задержке начала терапии и выбору неверной стратегии лечения. Следует отметить, что из 17 ВИЧ/ВГС-коинфицированных пациентов, давших отрицательный результат на анти-ВГС, у 13 был выявлен ВГС именно генотипа 1, хуже поддающийся лечению и вызывающий более тяжелое поражение печени по сравнению с генотипами 2 и 3. Это лишний раз указывает на необходимость ранней ПЦР-диагностики ВГС у ВИЧ-инфицированных.

Длительность комбинированной терапии интерферон α -2b с рибавирином у больных, моноинфицированных ВГС, обычно соответствует генотипу ВГС и степени фиброза в ткани печени: 1 год – для больных с генотипом 1 ВГС и выраженным фиброзом и 6 месяцев при генотипах 2 и 3 ВГС и минимальным фиброзом. Однако обычно коинфицированные ВИЧ/ВГС больные трудно поддаются лечению, направленному на хронический гепатит С, и поэтому предпочтительно проведение длительного курса терапии – не менее 1 года у данной категории больных, включая случаи, когда РНК ВГС становится неопределяемой через 6 месяцев. Даже в отсутствие вирусологического ответа к 6-му месяцу целесообразно продолжить лечение. Целью подобного лечения становится замедление темпов прогрессии хронического гепатита в цирроз печени, предотвращение гепатоцеллюлярной карциномы и увеличение длительности жизни пациентов. Кроме того, продолжительная поддерживающая терапия может снижать риск гепатотоксичности ВААРВТ у коинфицированных больных.

Благодарности

Авторы выражают благодарность заведующему лабораторией клинической иммунологии НИИ скорой помощи имени Н.В. Склифосовского А.И. Баженову за предоставление биологического материала. Работа выполнена при поддержке гранта Министерства образования и науки РФ (№ 02.740.11.0705).

Литература

- Ведерников В.Е., Иванов М.К., Прасолова М.А. и др. Генотипирование вируса гепатита С при помощи ПЦР-РВ с использованием 5'-гидролизующих зондов с олигодезоксиинозиновыми линкерами // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология. 2009. Т. 4. С. 32–38.
- Alter J. Epidemiology of viral hepatitis and HIV coinfection // J. Hepatol. 2006. V. 44. P. 56–59.
- Avidan N.U., Goldstein D., Rozenberg L. *et al.* Hepatitis C viral kinetics during treatment with peg IFN- α -2b in HIV/HCV coinfecting patients as a function of baseline CD4+ T-cell counts // J. Acquired Immune Deficiency Syndromes. 2009. V. 52. № 4. P. 452–458.

- Benhamou Y., Bochet M., DiMartino V. *et al.* Liver fibrosis progression in human immunodeficiency virus and hepatitis C virus coinfecting patients. The multiviral group // *Hepatology*. 1999. V. 30. P. 1054–1058.
- Bhagani S. HIV/hepatitis C co-infection and hepatic fibrosis: looking beyond HIV-associated immune suppression; the contribution of hepatic steatosis and insulin resistance // *Gut*. 2009. V. 58. P. 1579–1581.
- Chamie G., Bonacini M., Bangsberg D.R. *et al.* Factors associated with seronegative chronic hepatitis C virus infection in HIV infection // *Clin. Infect. Dis.* 2007. V. 44. № 4. P. 577–583.
- Chen T.Y., Ding E.L., Seage III G.R., Kim A.Y. Meta-analysis: increased mortality associated with hepatitis C in HIV-infected persons is unrelated to HIV disease progression // *Clin. Infect. Dis.* 2009. V. 49. № 10. P. 1605–1615.
- Daar E.S., Lynn H., Donfield S. *et al.* Hepatitis C virus load is associated with human immunodeficiency virus type 1 disease progression in hemophiliacs // *J. Infect. Dis.* 2001. V. 183. P. 589–595.
- Darby S.C., Ewart D.W., Glangrande P.L. *et al.* Mortality from liver cancer and liver disease in hemophilic men and boys in UK given blood products contaminated with hepatitis C. UK Hemophilia Center Director's Organization // *Lancet*. 1997. V. 350. № 9089. P. 1425–1431.
- Freeman A.J., Zekry A., Whybin L.R. *et al.* Hepatitis C prevalence among Australian injecting drug users in the 1970s and profiles of virus genotypes in the 1970s and 1990s // *Med. J. Aust.* 2000. V. 172. P. 588–591.
- Haydon G.H., Flegg P.J., Blair C.S. *et al.* The impact of chronic hepatitis C virus infection on HIV disease and progression in intravenous drug users // *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 1998. V. 10. № 6. P. 485–489.
- Herrero-Martinez E., Sabin C.A., Evans J.G. *et al.* The prognostic value of a single hepatitis C virus RNA load measurement taken early after human immunodeficiency virus seroconversion // *J. Infect. Dis.* 2002. V. 186. P. 470–476.
- Krekulova L., Rehak V., Madrigal N. *et al.* Genotypic and epidemiologic characteristics of hepatitis C virus infections among recent injection drug user and nonuser populations // *J. Infect. Dis.* 2001. V. 33. P. 1435–1438.
- Netski D.M., Mosbrugger T., Depla E. *et al.* Humoral immune response in acute hepatitis C virus infection // *Clin. Infect. Dis.* 2005. V. 41. P. 667–675.
- Osilla K.C., Ryan G., Bhatti L. *et al.* Factors that influence an HIV coinfecting patient's decision to start hepatitis C treatment // *AIDS Patient Care STDS*. 2009. V. 23. № 12. P. 993–999.
- Puig-Basagoiti R., Cabana M., Guilera M. *et al.* Prevalence and route of transmission of infection with a novel DNA virus (TTV), hepatitis C virus and hepatitis G virus in patients infected with HIV // *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 2000. V. 23. № 1. P. 89–94.
- Sabin C.A., Telfer P., Phillips A.N. *et al.* The association between hepatitis C virus genotype and human immunodeficiency virus disease progression in a cohort of hemophilic men // *J. Infect. Dis.* 1997. V. 175. P. 164–168.
- Thomson E.C., Nastouli E., Main J. *et al.* Delayed anti-HCV antibody response in HIV-positive men acutely infected with HCV // *AIDS*. 2009. V. 23. № 1. P. 89–93.
- Tobler L.H., Stramer S.L., Lee S.R. *et al.* Impact of HCV 3.0 EIA relative to HCV 2.0 EIA on blood-donor screening // *Transfusion*. 2003. V. 43. P. 1452–1459.
- Tural C., Galeras J.A., Planas R. *et al.* Differences in virological response to pegylated interferon and ribavirin between hepatitis C (HCV)-mono-infected and HIV-HCV coinfecting patients // *Antivir. Ther.* 2008. V. 13. № 8. P. 1047–1055.
- Xia X., Lu L., Tee K.K. *et al.* The unique HCV genotype distribution and the discovery of a novel subtype 6u among IDUs co-infected with HIV-1 in Yunnan, China // *J. Med. Virol.* 2008. V. 80. № 7. P. 1142–1152.
- Yoo T.W., Donfield S., Lail A. *et al.* Effect of hepatitis C virus (HCV) genotype on HCV and HIV-1 disease // *J. Infect. Dis.* 2005. V. 191. P. 4–10.

**PREVALENCE OF HEPATITIS C VIRUS GENOTYPES
AMONG HIV-POSITIVE MOSCOW RESIDENTS**

V.E. Vedernikov^{1,2}, O.Y. Tumanova¹, M.K. Ivanov^{1,2,3}, G.M. Dymshits^{2,3}

¹ Joint Stock Company «Vector-Best», Novosibirsk, Russia;

² Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia;

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia, e-mail: vve23@mail.ru

Summary

HCV infection is common among infected patients. Its frequency varies from 30 to 80 % depending on the mode of acquisition of both viruses. Immunocompromised patients can be negative for anti-HCV at the acute stage of HCV infection, when the antiviral treatment is most efficient. In turn, hepatitis C virus promotes AIDS development. Patients infected with HCV type 1 are at a higher risk of HIV progression and development of AIDS with the fatal outcome than those with HCV types 2 and 3. We estimated the prevalence of HCV infection among 493 HIV-positive patients in Moscow and performed comparative analysis of several parameters in groups of patients with HCV/HIV coinfection and HIV monoinfection. The parameters studied were: anti-HCV repertoire, viral load, and HCV genotype. In the experimental group of HIV-infected patients, 48 % were infected with HCV, and 9 % had HCV RNA, but were negative for anti-HCV. Patients monoinfected with HCV had genotype 3 of HCV, and HIV-patients with HCV had genotypes 1 and 3 of HCV at equal frequencies. Patients co-infected with HCV/HIV had a higher HCV load. There is risk of the false negative result of HCV detection with ELISA in 6,8 % of HIV-infected patients. It may result in late diagnosis and inadequate therapy. It should be mentioned that 13 of 17 HCV/HIV infected patients negative for anti-HCV had HCV of genotype 1, which is more resistant to treatment and causes severe liver disease than genotypes 2 and 3. We conclude that early PCR-based diagnostics of HCV is essential in HIV-positive patients.

Key words: hepatitis C virus, HIV/HCV coinfection, PCR, anti-HCV repertoire, viral load, HCV genotyping.

ПАЛЕОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ В АРХЕОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

А.С. Пилипенко¹, В.И. Молодин², А.Г. Ромащенко¹

¹ Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики СО РАН,
Новосибирск, Россия, e-mail: alexpil@bionet.nsc.ru;

² Учреждение Российской академии наук Институт археологии и этнографии СО РАН,
Новосибирск, Россия

В работе рассмотрен современный методический уровень палеогенетических исследований. Обсуждаются спектр существующих на данный момент направлений использования молекулярно-генетических методов при изучении различных типов археологических материалов, проблема эффективной интеграции анализа древней ДНК в рамки комплексного археологического исследования. Проведен критический анализ работ по изучению структуры ДНК из археологических объектов, включая исследования, проведенные авторами обзора. Обсуждаются дальнейшие перспективы развития этого научного направления.

Ключевые слова: палеогенетика, междисциплинарный подход в археологическом исследовании, древняя ДНК, этногенетические реконструкции.

Введение

Одной из современных тенденций развития науки является привлечение к изучению конкретных объектов максимально возможного числа методов и их объединение в рамках мультидисциплинарного исследования. Это ярко проявляется в современной археологии, где наряду с традиционными подходами применяется все более широкий спектр естественнонаучных методов (рис. 1). Преимущество такого подхода заключается в объективном характере получаемых данных, возможности их независимой проверки, накладывающей ограничения на свободу интерпретации результатов. Анализ полученной информации в рамках археологического контекста позволяет проводить максимально объективные реконструкции изучаемых древних феноменов. При этом новые методы не заменяют, а существенно расширяют возможности традиционных подходов. Следует подчеркнуть, что недооценка роли археологического контекста, распространенная в настоящее время в мировой практике, резко снижает информативность подобного рода мультидисциплинарных исследований.

Многочисленность задействованных в археологии естественнонаучных методов определяется разнообразием источников (и их свойств), которые исследователи выявляют в процессе изучения археологических памятников. Наиболее часто объектами для применения естественнонаучных методов являются биологические останки: микроорганизмов, растений, животных, человека. Доминирующая роль в их исследовании принадлежит биологическим дисциплинам. Методы физической антропологии, палеозоологии (остеологии), палеоботаники уже прочно вошли в археологическую практику и, как правило, подразумевают изучение останков на макроскопическом уровне. Новые подходы связаны с анализом структуры биологических макромолекул – ДНК и белков. Наибольший потенциал применительно к археологическим источникам имеют палеогенетические исследования. Их задачей являются получение и анализ структуры молекул ДНК из биологических останков различного возраста, не подвергавшихся заранее специальным процедурам консервации ДНК. Таким образом, все разнообразие биологических останков из археологических памятников, состояние которых до-



Рис. 1. Структура мультидисциплинарного археологического исследования.

пускает вероятность сохранности аутентичных молекул ДНК, попадает в категорию объектов палеогенетического исследования (Kaestle, Horsburgh, 2002).

Помимо разнообразия потенциальных объектов исследования и их конкретного археологического контекста спектр применения палеогенетического подхода в археологии определяется методическими и аналитическими возможностями молекулярной генетики. Прежде чем рассмотреть возможности использования молекулярно-генетического анализа в археологии, необходимо кратко охарактеризовать современный методический уровень, специфические трудности палеогенетического направления и степень их преодоления на данный момент.

История становления метода и современные возможности анализа древней ДНК

Первое исследование в области палеогенетики было посвящено выделению, клонированию и анализу последовательности фрагмента митохондриальной ДНК (мтДНК) из останков вымершего представителя рода лошадей/зебр

(*Equus*) – квагги (*Equus quagga*) возрастом около 140 лет (Higuchi *et al.*, 1984). Почти сразу же была опубликована первая работа по анализу ДНК из археологического объекта – останков египетской мумии возрастом около 2400 лет (Paabo, 1985). Эти работы продемонстрировали принципиальную возможность экстракции и анализа структуры ДНК из ископаемых останков животных и человека различного возраста. Было показано, что эндогенная ДНК в биологических останках представлена короткими фрагментами многокопийных локусов, таких, как мтДНК, сохраняющимися в чрезвычайно низкой концентрации (Higuchi *et al.*, 1984; Paabo, 1985, 1989). Использованный авторами первых работ метод клонирования фрагментов ДНК в бактериальных векторах был малоэффективен для амплификации деградированной древней ДНК и потенциально позволял проводить исследование образцов только с необычно высокой для древних останков степенью сохранности. Изобретение и широкое внедрение в практику молекулярно-генетических исследований метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Mullis, Falloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988), позволяющей получать практически неогра-

ниченное число копий короткого целевого фрагмента ДНК даже при чрезвычайно низкой концентрации матрицы, существенно расширили спектр ископаемых останков, потенциально пригодных для выделения и анализа древней ДНК (Paabo, Wilson, 1988; Paabo, 1989; Paabo *et al.*, 1989). Появились многочисленные работы, посвященные исследованию структуры ДНК, выделенной из ископаемых останков разнообразных животных, растений, микроорганизмов, относящихся к широким хронологическим рамкам (Thomas *et al.*, 1989; Golenberg *et al.*, 1990; Guthrie, 1990; Cano *et al.*, 1992; Poinar *et al.*, 1993; Woodward *et al.*, 1994). Впоследствии работы, посвященные изучению степени и характера деградации ДНК в останках, потенциала ее сохранности и распространенности загрязнения древних образцов современной ДНК (Paabo *et al.*, 1989; Lindahl, 1993; Handt *et al.*, 1994a; Hoss *et al.*, 1996), продемонстрировали, что на раннем этапе развития палеогенетики серьезность этих проблем недооценивалась исследователями. Повсеместное распространение современной ДНК (особенно ДНК человека и микроорганизмов) вызвало скептическое отношение к возможности получения достоверных результатов методами палеогенетики (Richards *et al.*, 1995; Stoneking, 1995; Handt *et al.*, 1996). Одним из основных направлений ее развития в этот период становится исследование биохимии процессов деградации ДНК, происходящих после смерти организма, их влияния на результаты анализа структуры древней ДНК, потенциала сохранности ДНК в останках в различных условиях и способов верификации результатов палеогенетических экспериментов (Hoss *et al.*, 1996; Lau *et al.*, 2000; Hansen *et al.*, 2001; Hofreiter *et al.*, 2001a). Основным достижением этих работ стали доказательство возможности сохранения ДНК, пригодной для анализа в останках возрастом в несколько тысяч лет (Poinar *et al.*, 1996), совершенствование методов извлечения ДНК из останков (Rohland, Hofreiter, 2007) и создание системы критериев верификации результатов палеогенетических исследований (Paabo *et al.*, 2004; Willerslev, Cooper, 2005), а также выработка рекомендаций по максимально корректному выполнению палеогенетических экспериментов (Cooper, Poinar, 2000).

Проблема достоверности палеогенетических результатов

Среди факторов, существенно осложняющих проведение палеогенетических исследований, центральное место занимают процессы деградации ДНК после смерти организма (Paabo *et al.*, 1989, 2004; Mitchell *et al.*, 2005). Именно на фоне деградированного состояния ДНК в древних останках становятся значимыми такие факторы, как загрязнение древнего материала современной ДНК.

ДНК является относительно нестабильной биологической молекулой (Paabo *et al.*, 2004; Mitchell *et al.*, 2005). После смерти организма она подвергается интенсивной ферментативной деградации внутриклеточными ферментами, а затем разрушается под влиянием организмов-редуцентов (Eglinton, Logan, 1991). Лишь в благоприятных условиях – при быстром замерзании или высыхании мягких тканей, а также при адсорбции на минеральном матриксе костной ткани – она может избежать быстрого полного разрушения. В этих случаях ДНК подвергается биохимической деградации (Hofreiter *et al.*, 2001a; Gilbert *et al.*, 2003a, b). Постепенно происходит накопление нарушений в структуре ДНК, вплоть до полного разрушения ее молекул (Paabo *et al.*, 2004).

К основным типам биохимической деградации ДНК относятся: а) *нарушения, приводящие к разрывам цепей ДНК*. Это основная причина преобладания в древних экстрактах коротких по длине фрагментов ДНК и даже полного разрушения молекул ДНК (Lindahl, 1993; Willerslev, Cooper, 2005; Mitchell *et al.*, 2005), когда ее исследование становится невозможным; б) *образование внутримолекулярных и межмолекулярных перекрестных химических связей между разными молекулами ДНК или ДНК и белками* блокирует участие молекул ДНК в ПЦР. При этом существенно возрастает риск амплификации контаминирующей современной ДНК. ДНК сохраняется в останках, но недоступна для исследования стандартными молекулярно-генетическими методами. Как правило, этот тип деградации проявляется, если в палеоматериале сохраняются достаточно протяженные молекулы ДНК: в условиях мерзлоты (Mitchell *et al.*, 2005) или при быстром высыхании тканей (Paabo,

1989). В этом случае эффективна обработка экстрактов ДНК реактивами, разрушающими внутри- и межмолекулярные связи, например N-фенилацилтиазолиум бромидом (Poinar *et al.*, 1998); в) *модификация азоти-стых оснований* может приводить к различным последствиям: некоторые продукты окисления (например 5-гидроксигидантоин) могут блокировать синтез ДНК полимеразой, что приводит к возникновению химерных продуктов ПЦР в результате так называемой «прыгающей ПЦР» (jumping PCR) (Raabo *et al.*, 1990; Gilbert *et al.*, 2003b). Другим последствием химической модификации азотистых оснований в древней ДНК может быть включение некорректных нуклеотидов во вновь синтезированную ДНК в процессе ПЦР (Hansen *et al.*, 2001; Hofreiter *et al.*, 2001a; Gilbert *et al.*, 2003a, b). Модификации азотистых оснований ДНК в останках не всегда препятствуют ее амплификации в ПЦР, но изменяют ее первичную структуру. Первоначально предполагалось присутствие в древней ДНК различных вариантов такой модификации, которые могут приводить к неправильным филогенетическим интерпретациям полученных результатов (Gilbert *et al.*, 2003a, b). Впоследствии было показано: абсолютно доминирующим типом модификации азотистых оснований (практически единственным) является дезаминирование цитозина с образованием урацила, что приводит к смене пар оснований CG → TA. Было предложено использовать это свойство древней ДНК в качестве критерия аутентичности (Brotherton *et al.*, 2007). Показано, что данный тип деградации проявляется при анализе образцов с низким содержанием целевых фрагментов ДНК, когда ПЦР инициируется менее чем с 1 тыс. копий матрицы (Cooper, Poinar, 2000; Hofreiter *et al.*, 2001b).

Интенсивность процессов биохимической деградации ДНК зависит от условий среды, в которой находятся биологические останки: температурного режима в сочетании с уровнем pH, влажностью, химическим составом среды, интенсивностью жизнедеятельности микроорганизмов (Lindahl, 1993; Hofreiter *et al.*, 2001b; Smith *et al.*, 2001; Willerslev *et al.*, 2004). Накопленные сведения о природе биохимической деградации ДНК в останках (Ehrlich *et al.*, 1990; Lindahl, 1993; Smith *et*

al., 2003; Gilbert *et al.*, 2003a, b; Mitchell *et al.*, 2005) позволяют теоретически оценить время, в течение которого возможна сохранность ДНК в останках при различных условиях внешней среды. Согласно этим расчетам, небольшие фрагменты ДНК (100–500 п.н.) могут сохраняться в среднем до 10 тыс. лет в условиях умеренного климата (Poinar *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 2001). Примечательно, что в этот хронологический период укладываются все археологические материалы с периода неолита до позднего средневековья.

К настоящему моменту разработаны меры, позволяющие избежать прямого влияния различных типов деградации ДНК в останках на результаты палеогенетического исследования (табл. 1) (Gilbert *et al.*, 2003a, b; Raabo *et al.*, 2004; Mitchell *et al.*, 2005). Однако на фоне деградированного состояния аутентичной ДНК чрезвычайно значимой становится проблема контаминации палеоматериала современной ДНК. Низкая концентрация выделяемой из древних останков ДНК, ее слабая матричная способность по сравнению с современной ДНК и высокая эффективность ПЦР, применяемой для анализа, могут приводить к получению ложных результатов при попадании даже незначительного количества современной ДНК в экстракт (Raabo *et al.*, 1989, 2004).

В проблеме ДНК-контаминации в палеогенетических исследованиях условно можно выделить два аспекта: а) загрязнение образцов в генетической лаборатории непосредственно в процессе палеогенетического эксперимента (Handt *et al.*, 1996; Hofreiter *et al.*, 2001b; Serre *et al.*, 2004b); б) контаминация палеоматериала до его попадания в генетическую лабораторию (Sampietro *et al.*, 2006). В настоящее время проблема внутрилабораторной контаминации достаточно эффективно решается комплексом мер, касающихся оборудования лаборатории и непосредственно процедуры эксперимента (табл. 1) (обзоры методов см. Raabo *et al.*, 2004; Willerslev, Cooper, 2005). Наиболее эффективным при исследовании археологического материала представляется подход, когда меры, предотвращающие контаминацию (или облегчающие ее детекцию), предпринимаются на протяжении всего периода работы с источниками. До момента передачи образцов в генетическую

Таблица 1

Распространенные методы верификации результатов палеогенетического исследования
(анализ ДНК из останков человека)

Метод верификации	Проблема, решаемая с помощью данного метода
Повторные экстракции ДНК из материала одного образца	Спорадическая контаминация в процессе предварительной обработки образца и экстракции ДНК
Повторные ПЦР из одного экстракта	Спорадическая контаминация в процессе предварительной обработки и выделения ДНК; ошибки полимеразы; результаты «прыгающей» ПЦР
Аmplификация нескольких перекрывающихся участков	Спорадическая контаминация компонентов ПЦР; ошибки полимеразы; результаты «прыгающей» ПЦР
Отрицательный контроль экстракции и ПЦР	Спорадическая и систематическая контаминация в процессе предварительной обработки образцов, экстракции ДНК и ПЦР
Клонирование продуктов ПЦР, секвенирование нескольких клонов	Спорадическая контаминация в процессе предварительной обработки образцов, экстракции ДНК и ПЦР; ошибки полимеразы; искажение полученной последовательности ДНК вследствие модификации азотистых оснований (дезаминирования цитозина)
Выделение и анализ ДНК из разных частей одного скелета (например, зубы и кости конечностей)	Загрязнение палеоматериала до его попадания в генетическую лабораторию
Анализ ДНК из сопутствующих останков животных	Косвенный показатель сохранности ДНК в останках человека в условиях конкретного археологического комплекса
Обработка экстрактов урацил-N-гликозилазой	Искажение полученной последовательности ДНК вследствие дезаминирования цитозина
Оценка стартовой концентрации матрицы в экстракте	Доказательство сохранности ДНК в палеоматериале в условиях конкретного археологического комплекса
Воспроизведение результатов в другой палеогенетической лаборатории	Систематическая внутрилабораторная контаминация
Идентификация признаков деградированного состояния древней ДНК с помощью методов высокопроизводительного секвенирования	Универсальный метод доказательства аутентичности полученных образцов мтДНК (за исключением проблемы контаминации образцов в древности)

лабораторию материалы из археологических памятников проходят несколько стадий предварительного исследования. Непосредственно в полевых условиях осуществляются тщательная расчистка комплексов, содержащих останки, их детальное документирование, изъятие и первичная камеральная обработка палеоматериалов (рис. 2). На этом этапе существует высокая вероятность загрязнения материала современной ДНК, особенно если речь идет об останках человека. Эффективными мерами против загрязнения на этой стадии по опыту авторов данной работы являются: ограничение числа сотрудников, контактирующих с каждым конкретным

образцом, их тщательное документирование в специальном журнале (и генотипирование); использование средств, предотвращающих контакт персонала с образцами, – стерильных перчаток, масок (рис. 3); изолирование части останков, потенциально пригодных для палеогенетического исследования (высокой степени сохранности), сразу после вскрытия комплексов и вплоть до их передачи в лабораторию (Молодин и др., 2006). Необходимо избегать промывания археологических останков водой в процессе их первичной камеральной обработки, так как это может приводить к проникновению загрязняющей ДНК с поверхности во внутренние облас-



Рис. 2. Пример фотодокументирования погребально-погребного комплекса. Полностью расчищенное коллективное погребение носителей андроновской (федоровской) культуры (первая половина II тыс. до н. э.), могильник Тартас-1 (Барабинская лесостепь).

ти образцов, после чего ее механическое удаление (или разрушение) становится затруднительным. Идеальным следует считать вариант, при котором отбор образцов для последующего палеогенетического исследования осуществляется немедленно после вскрытия археологического комплекса присутствующим в поле специалистом-генетиком (Молодин, 2007; Pilipenko *et al.*, 2010). Аналогичные меры предосторожности применяются и на последующих стадиях исследования материала (антропологическое, палеоботаническое или палеозоологическое изучение). Проблема загрязнения образцов до их попадания в палеогенетическую лабораторию в большинстве случаев также может быть разрешена непосредственно в процессе эксперимента такими мерами, как удаление или обработка внешнего слоя образцов веществами, разрушающими ДНК (Kemp *et al.*, 2005), анализ нескольких образцов от одной особи (из разных частей скелета, например зубы и кости посткраниального скелета) и другие (Paabo *et al.*, 2004; Willerslev, Cooper, 2005). Реализация каждой из этих мер в значительной степени снижает вероятность получения ложных результатов.

По-видимому, новый уровень верификации результатов палеогенетических исследований становится доступным с появлением высокопроизводительных методов секвенирования



Рис. 3. (а, б) Процесс расчистки погребального комплекса пазырькской культуры (IV–III вв. до н. э.) в Северо-Западной Монголии (2006 г.). Памятник Олон-Курин-Гол-10, курган 1. Фото В.П. Мильникова.

На фото: а – слева направо: А.С. Пилипенко, Ю.Н. Гаркуша, М. Мороз, В.И. Молодин. На фото: б – А.С. Пилипенко.

ДНК (методов секвенирования ДНК второго поколения). Возможность считывания полной последовательности нуклеотидов отдельных фрагментов ДНК в экстракте позволяет анализировать свойства молекул эндогенной древней ДНК, которые отличают ее от современных контаминирующих молекул и появляются вследствие длительных процессов деградации (Krause *et al.*, 2009).

Археологические источники как объекты молекулярно-генетического исследования: разнообразие и проблема квалифицированного отбора образцов

Одними из основных задач при исследовании археологических памятников являются отбор максимально возможного числа источников, несущих какую-либо информацию об изучаемом древнем населении, их тщательное документирование, сохранение в процессе полевых работ. Только при условии квалифицированного проведения полевой части исследования создаются предпосылки для последующего полноценного анализа обнаруженных археологами материалов в камеральных и лабораторных условиях. Пополнение методических возможностей археологических исследований за счет естественнонаучных методов чрезвычайно расширяет спектр информативных источников.

Если еще совсем недавно в задачи археолога входили оценка и фиксация общей ситуации на памятнике, отбор наиболее информативного с точки зрения традиционной археологии инвентаря и антропологического материала (Авдусин, 1980; Мамонова и др., 1989; Мартынов, Шер, 1989), то в настоящее время археолог еще до начала раскопок, зная общие характеристики исследуемого объекта, должен прибегать к консультации с широким кругом специалистов о методах качественного отбора образцов и проб для последующего многостороннего анализа. Другим подходом может быть участие специалистов конкретной области в работе археологической экспедиции. При исследовании особенно многообещающих объектов заранее формируется команда специалистов разного профиля, принимающая участие в археологической экспедиции. Это не только позволяет квалифицированно отобрать стандартные про-

бы для последующего анализа, но и открывает возможности для выявления новых потенциальных объектов исследования среди материалов археологического памятника при обнаружении неожиданных объектов. Например, в состав экспедиции, исследовавшей погребальные комплексы пазырыкской культуры, содержащие лед, в горах северо-западной Монголии, помимо археологов входили геофизики, мерзлотоведы и палеогенетики (Молодин, 2007; Молодин и др., 2009; Parzinger *et al.*, 2008). В результате их совместной работы при раскопках удалось получить уникальный корпус образцов для всестороннего анализа исследованных комплексов – геологического, климатологического, палеогенетического, микробиологического и др.

В настоящее время можно выделить несколько типов материалов, обнаруживаемых при археологических раскопках, которые могут быть использованы в качестве источников ДНК для палеогенетического исследования.

1. Костные останки человека и животных являются наиболее распространенными материалами для экстракции древней ДНК. Костная ткань обеспечивает наилучшие условия для сохранности молекул ДНК в останках в течение длительного периода после смерти организма. Минеральный матрикс обеспечивает защиту внутренних областей костной ткани от воздействия микроорганизмов и неблагоприятных для сохранности ДНК условий внешней среды. В адсорбированном на минеральном матриксе состоянии короткие фрагменты ДНК способны сохраняться в течение достаточно длительного времени (Rollo *et al.*, 2002a). При этом зубы, особенно находящиеся в челюсти *in situ*, меньше подвержены контаминации, чем кости посткраниального скелета. Однако их исследование, как правило, приводит к полному разрушению образцов. В связи с этим были предложены различные подходы для минимизации деструкции зубов при палеогенетическом исследовании (Shigoma *et al.*, 2004).

2. Мягкие ткани. Сохранившиеся мягкие ткани человека или животных являются редкой находкой при исследовании археологических памятников. Наиболее благоприятными в отношении сохранности мягких тканей являются территории с суровым климатом: зоны вечной мерзлоты, высокогорье, а также области с за-

сушливым климатом. Из-за климатических особенностей такие регионы относительно слабо эксплуатировались человеком. Этим объясняется и меньшая плотность обнаруживаемых здесь археологических памятников. Исключениями могут служить некоторые высокогорные области, например высокогорные районы Алтая, в которых сосредоточено огромное количество археологических объектов, относящихся к различным эпохам (Молодин и др., 2004). Эта ситуация объясняется образом жизни древнего населения региона, кочевых скотоводов, которые использовали эти территории в качестве сезонных летних пастбищ, откочевывая на неблагоприятный период года в зоны с более мягкими климатическими условиями (предгорья). Высокогорные курганные могильники, оставленные, например, носителями пазырыкской культуры (IV–III вв. до н. э., скифское время), представляют собой уникальные археологические комплексы, в которых сохранились вещи, изготовленные из органических материалов, и останки мягких тканей человека и животных. Следует отметить, что именно редкие находки сохранившихся мягких тканей были объектами палеогенетических исследований на ранних этапах развития направления (Raabo *et al.*, 1985; Handt *et al.*, 1994b; Воевода и др., 1998). Впоследствии на разнообразных материалах было продемонстрировано, что мягкие ткани не всегда являются хорошим источником для выделения древней ДНК (Clisson *et al.*, 2002; Pilipenko *et al.*, 2010). По-видимому, высокая сохранность ДНК в них обеспечивается лишь в условиях быстрого замораживания останков после смерти организма без последующего длительного или многократного размораживания, или же в случаях преднамеренной мумификации тканей. В противном случае ДНК в мягких тканях подвергается быстрой деградации, и ее сохранность и пригодность для исследования, как правило, существенно ниже, чем в костной ткани того же индивида.

3. Волосы. В последние несколько лет было показано, что волосы (стержни волос) являются чрезвычайно перспективным источником для выделения древней ДНК (Gilbert *et al.*, 2004; Amoyu *et al.*, 2007). Несмотря на редкость обнаружения в археологических памятниках, волосы являются очень удобным объектом для

палеогенетического исследования. Структура стержня волоса не позволяет контаминирующей ДНК проникать во внутренние области образца. Загрязнения могут быть легко удалены с поверхности волоса (механически или при обработке веществами, разрушающими ДНК). Таким образом, использование волос в качестве материала для выделения ДНК облегчает получение достоверных результатов. Первоначально считалось, что волосы содержат только митохондриальную ДНК, пригодную для палеогенетического исследования (Gilbert *et al.*, 2004). Однако применение высокочувствительных методов секвенирования нового поколения позволяет проводить анализ ядерной ДНК из стержня волоса (Rasmussen *et al.*, 2010).

4. Копролиты. Копролиты могут быть использованы в качестве альтернативного источника древней ДНК. Считается, что их изучение уменьшает риск контаминации образцов современной ДНК (Gilbert *et al.*, 2008). Копролиты могут служить источником информации о структуре генетических маркеров особи (Poinar *et al.*, 2003), продуктом жизнедеятельности которой они являются или реконструкции ее диеты (Poinar *et al.*, 2001; Rollo *et al.*, 2002b) и патологического статуса (присутствие ДНК гельминтов, инфекционных агентов).

Среди недостатков можно назвать сложности в определении видовой принадлежности копролита, его датировки на предварительной стадии исследования и большое число перекрестных связей сохранившихся молекул ДНК с белками (Poinar *et al.*, 1998, 2009). Потенциальные проблемы с верификацией результатов анализа ДНК из копролитов могут быть связаны также с проникновением ДНК в растворенном виде из вышележащих областей культурного слоя в нижележащие (Haile *et al.*, 2007; Poinar *et al.*, 2009).

5. Растительные остатки. Как правило, для палеогенетического исследования представляют интерес остатки культурных растений (главным образом семена), которые находят при раскопках археологических памятников (Jaenicke-Despres *et al.*, 2003), а также остатки дикорастущих растений, использовавшиеся человеком в быту или обрядовой практике. До настоящего времени значение растительных остатков как высокоинформативного объекта для молекулярно-генетического исследования

недооценивается. Об этом свидетельствуют сравнительно низкий уровень развития этого направления палеогенетики и небольшое число опубликованных работ (Gugerli *et al.*, 2005).

6. Микроорганизмы. В археологических материалах может быть представлена либо ДНК микроорганизмов, нежизнеспособных в течение длительного периода (например ДНК возбудителей заболеваний в останках человека и животных (Drancourt *et al.*, 1998; Zink *et al.*, 2003; Hershkovitz *et al.*, 2008)), либо жизнеспособных микроорганизмов, сохраняющихся в закрытых археологических комплексах (как правило, в погребениях, содержащих мерзлоту (Пучкова и др., 2008; Ханаева и др., 2008)). В последнем случае исследователь имеет дело с современной ДНК микроорганизмов. Методическая сторона такого исследования соответствует стандартному микробиологическому анализу.

Большинство археологических материалов, интересных с точки зрения палеогенетического анализа, одновременно являются объектами анализа для археологов и широкого круга других специалистов и, следовательно, отбираются в процессе раскопок для последующего изучения в лабораторных условиях, даже если проведение молекулярно-генетического анализа не было запланировано. Такие материалы из коллекций могут быть использованы в качестве источника древней ДНК при соблюдении соответствующих мер по выявлению возможной контаминации.

В отношении палеогенетических исследований особенно остро стоит проблема квалифицированного отбора образцов в связи с высокой вероятностью контаминации древнего материала современной ДНК (см. раздел «Проблема достоверности палеогенетических результатов»). Другая проблема связана с деструктивным характером палеогенетических исследований. Процедура предварительной обработки и экстракции ДНК из костных останков (или других источников) подразумевает механическое разрушение некоторого количества биологического материала. При этом биологические останки являются объектом исследования большого числа других научных направлений, включая остеометрию, краниологию, одонтологию, палеопатологию, анализ содержания стабильных изотопов и т. д. Каждое из этих направлений потенциально

позволяет получить ценную информацию об объекте исследования. В такой ситуации решением может быть последовательное изучение палеоантропологических материалов сначала недеструктивными (например, методы физической антропологии), а затем деструктивными методами (анализ стабильных изотопов, молекулярно-генетическое исследование). Однако этот вариант существенно осложняет получение достоверных палеогенетических результатов из-за вероятной контаминации образцов. Проблема может быть решена несколькими путями: 1) *исследование образца только палеогенетическими методами* целесообразно, когда информация, которая потенциально может быть получена в результате молекулярно-генетического анализа, представляется более ценной, чем данные, потерянные в результате деструкции образца; 2) *снижение количества материала, необходимого для молекулярно-генетического исследования* за счет использования малодеструктивных методов предварительной обработки костного материала (Shiroma *et al.*, 2004) или использования высокоэффективных методов молекулярно-генетического анализа, требующих минимального количества исходного материала, например методов секвенирования второго поколения (Krause *et al.*, 2009, 2010); 3) *проведение необходимых недеструктивных исследований образца* (например остеометрического или одонтологического исследования) *до молекулярно-генетического анализа в условиях, минимизирующих возможность контаминации материала*. При этом необходим учет потенциальных источников контаминации (например генотипирование специалистов, исследовавших образец, для последующего выявления возможного загрязнения). Современный комплекс методов верификации результатов в большинстве случаев позволяет получать высоко достоверные результаты даже из образцов, в некоторой степени загрязненных современной ДНК или по крайней мере выявить случаи контаминации (см. выше).

Таким образом, для развития палеогенетики актуальным на сегодняшний день является распространение культуры отбора биологических проб в процессе проведения полевых археологических исследований с учетом интересов всех специалистов, задействованных в дальнейшем изучении полученных материалов.

Применение молекулярно-генетических методов в археологических исследованиях

В настоящее время работы по анализу ДНК из археологических объектов существенно варьируют как по масштабам решаемых проблем, так и по степени их интеграции с компонентами комплексного археологического исследования. Палеогенетический анализ так же, как и археологический, направлен на реконструкцию процессов, происходивших в далеком прошлом. Существует несоответствие между палеогенетикой и традиционными подходами археологии по степени изученности имеющегося банка археологических источников. В настоящее время традиционными подходами обработаны огромные коллекции материалов. По многим проблемам уже пройден путь от накопления первичных данных до формулирования крупных обобщений.

История молекулярно-генетического исследования археологических объектов насчитывает около 3 десятков лет. Большая часть этого времени была затрачена на обеспечение возможности получения достоверных результатов анализа древней ДНК. По сути, лишь последнее десятилетие можно считать периодом полноценного применения молекулярно-генетического направления в археологическом исследовании.

Отчасти это несоответствие положительным образом отражается на развитии палеогенетики. Информативность любого исследования определяется адекватным выбором модели (материала), с учетом имеющихся методических возможностей. Выбор материала для палеогенетического исследования был бы абсолютно невозможен без учета данных, накопленных археологией. Корректный анализ археологического контекста – ключевой момент палеогенетического исследования как на стадии постановки задачи и планирования эксперимента, так и на этапе интерпретации полученных молекулярно-генетических данных.

Палеогенетический подход становится все более распространенным компонентом в составе комплексного анализа археологических материалов. Это приводит к диверсификации информации, которую удается получать методами анализа образцов древней ДНК.

Характер и объем информации, которую можно получить при анализе древней ДНК, определяются: 1) экспериментальными возможностями, т. е. уровнем методического и приборного обеспечения лаборатории: современный уровень развития молекулярно-генетической методологии и приборной базы потенциально позволяет исследовать различные участки генома в древнем материале, вплоть до полногеномного секвенирования древних образцов (Green *et al.*, 2010; Rasmussen *et al.*, 2010). Таким образом, лимитирующим фактором на данный момент выступает прежде всего финансовая обеспеченность лаборатории; 2) уровнем развития соответствующих разделов генетики: на сегодняшний день относительно небольшое число потенциально информативных генетических маркеров в геноме человека изучено достаточно, чтобы осуществлять их анализ и корректную интерпретацию в рамках палеогенетического исследования; 3) конкретным археологическим контекстом: в зависимости от его особенностей палеогенетический анализ материалов, сопоставимых по объему и сохранности, может быть направлен на решение совершенно разных задач.

Центральным объектом археологического исследования является человек. Поэтому обзор существующих (и перспективных) направлений использования методов анализа древней ДНК в археологии целесообразно начать с работ по анализу древней ДНК человека. Масштаб исследуемой модели в этом случае может варьировать от отдельно взятого индивида до населения обширного региона или даже нескольких разновременных групп населения.

Индивидуальный уровень

Информация, которую можно получить для индивидуального образца древней ДНК человека на данный момент включает: 1) структуру мтДНК, а также нерекombинируемого участка Y-хромосомы (для индивидов мужского пола), а также некоторых филогенетически информативных аутомомных локусов генома. Это позволяет судить о его положении на глобальных филогенетических деревьях мтДНК и Y-хромосомы (или аутомомных маркеров) человека. В некоторых случаях молекулярно-генетический

анализ служит для определения видовой принадлежности образца (для представителей рода *Homo*) (Krause *et al.*, 2010); 2) половую принадлежность останков, что особенно актуально для детских или сильно фрагментированных останков (Faerman *et al.*, 1995); 3) определение индивидуального профиля высоковариабельных STR-маркеров (молекулярно-генетическая идентификация индивида) (Burger *et al.*, 1999; Keyser-Tracqui *et al.*, 2003; Amory *et al.*, 2007; Keyser *et al.*, 2009); 4) наличие генетической предрасположенности к заболеваниям (Hummel *et al.*, 2005; Zawicki *et al.*, 2008); 5) наличие в останках ДНК возбудителей инфекционных заболеваний. Работы в этой области, как правило, связаны с оценкой присутствия ДНК возбудителей заболеваний человека в останках (Drancourt *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 2005; Papagrigrakis *et al.*, 2006; Hershkovitz *et al.*, 2008) (последние два пункта важны для установления возможных причин смерти индивида); 6) статус функционально значимых локусов генома, определяющих конкретный фенотип (Keyser *et al.*, 2009) или физиологическую черту (Burger *et al.*, 2007); 7) для некоторых индивидов инициирован полногеномный анализ (Green *et al.*, 2010; Rasmussen *et al.*, 2010).

Как правило, в отдельном палеогенетическом исследовании реализуется лишь небольшая часть из перечисленных потенциальных направлений анализа структуры образцов древней ДНК, в наибольшей степени отвечающая стоящей перед исследователями задаче. Примеры реализации этих направлений при изучении археологических материалов будут рассмотрены ниже.

Палеогенетические исследования материалов эпохи палеолита и мезолита

Направление археологии, посвященное исследованию памятников древнекаменного века (палеолита) и мезолита, существенно отличается от археологических исследований последующих эпох. Отличия касаются методических особенностей проведения полевых работ, набора обнаруживаемых артефактов (главным образом, каменные орудия), возможностей применения различных естественнонаучных методов и их относительной значимо-

сти. Так, на первый план среди естественнонаучных методов в археологии палеолита выходят геология, трассологические исследования и методы абсолютного датирования полученных палеолитических материалов. Важной особенностью археологических исследований памятников палеолита является большая редкость обнаружения останков человека. Это связано прежде всего с отсутствием устойчивой практики намеренного погребения умерших в палеолите (Смирнов, 1991). Останки верхнепалеолитического человека – чрезвычайно редкий и ценный материал, требующий особенно бережного обращения и строгого соблюдения процедуры квалифицированного отбора образцов. Редкость обнаружения останков человека в палеолитических материалах определяет одну из особенностей палеогенетических исследований этого материала: как правило, работы посвящены анализу единичных образцов древней ДНК, а не серий (Krings *et al.*, 1997; Ovchinnikov *et al.*, 2000; Caramelli *et al.*, 2008; Krause *et al.*, 2009, 2010). Тем не менее значение каждой такой работы очень высоко, учитывая относительно небольшое количество имеющейся информации о биологических характеристиках древних представителей рода *Homo*.

Такая ситуация, когда масштабные выводы основаны на анализе единичных образцов древней ДНК, накладывает особые требования к корректной интерпретации археологического контекста находки. Информативность исследования единичного образца древней ДНК человека в значительной степени зависит от археологического контекста, в котором были обнаружены останки. Только располагая достоверными данными об археологическом контексте останков человека, можно использовать анализ даже единичного образца для решения разнообразных задач.

Чрезвычайно важным является вопрос корректной датировки антропологических материалов эпохи палеолита. Ведущую роль в решении этого вопроса играют тонкие стратиграфические наблюдения, осуществляемые при выполнении раскопок культурного слоя палеолитических стоянок, и привязка обнаруженных палеоантропологических материалов к конкретному горизонту или стратиграфическому слою. Поскольку попадание палеоантропологических останков

в культурный слой палеолитической стоянки может объясняться различными причинами, а не преднамеренным погребением, как в случае погребальных памятников более поздних эпох, важную роль выполняют естественнонаучные методы прямого датирования материалов, которые позволяют проверить правильность дат, установленных традиционными подходами (Gilbert *et al.*, 2008; Krause *et al.*, 2009).

Другой особенностью палеоантропологических материалов эпохи палеолита является фрагментарность останков. Зачастую они представлены лишь единичным зубом или небольшим фрагментом кости черепа или посткраниального скелета. При этом чрезвычайно важным представляется как можно более разностороннее исследование образца, что в свою очередь усугубляет вероятность его контаминации, особенно если принять во внимание сильную степень деградации эндогенной ДНК в останках такого возраста. Неслучайно именно в работах, посвященных анализу ДНК из палеолитических материалов (человека или животных), впервые реализуются многие методические новшества, касающиеся минимизации деструкции образца при его предварительной подготовке, применения высокопроизводительных методов анализа структуры ДНК, новые методы верификации результатов.

Одним из основных направлений использования палеогенетических данных о представителях рода *Homo* эпохи палеолита является реконструкция ранних этапов истории человека современного типа – некоторых особенностей его становления как отдельного биологического вида. С этой проблемой тесно связаны вопросы филогенетических взаимоотношений верхнепалеолитических *Homo sapiens* с другими представителями рода *Homo*. Успешным примером в этом направлении являются работы по установлению характера генетических взаимоотношений человека современного типа и неандертальца (*Homo neanderthalensis*). Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что неандертальцы населяли обширную территорию, охватывающую Европу и Западную Азию, в период ~ 300–30 тыс. лет назад (Klein, 2003). Начало процесса заселения Евразии людьми современного типа относят к ~ 70 тыс. лет назад (по генетическим данным) (Forster, Matsumura,

2005) и к ~ 50 тыс. лет назад (по некоторым другим данным) (Tattersall, 2009). В течение достаточно длительного времени (~ с 45 до 30 тыс. лет назад) неандертальцы и анатомически современные люди могли сосуществовать друг с другом в различных регионах Евразии (Mellars, 1992). Анализ ископаемых останков и элементов материальной культуры не позволяет однозначно ответить на вопрос, внесли ли неандертальцы существенный вклад в генофонд популяций *H. sapiens* (Wolpoff *et al.*, 2000, 2001; Hawks, Wolpoff, 2001) или были полностью вытеснены людьми современного типа (Stringer, Andrews, 1988; Stringer, 2002).

Анализ последовательности гипервариабельных участков контрольного района митохондриальной ДНК из останков нескольких неандертальцев позволил установить, что они лежат за пределами внутривидовой изменчивости мтДНК в современных популяциях человека (Krings *et al.*, 1997, 1999, 2000; Ovchinnikov *et al.*, 2000; Schmitz *et al.*, 2002; Knight, 2003). На этом основании был сделан вывод о принадлежности неандертальцев и современных людей к различным видам. Дальнейшие исследования мтДНК неандертальцев и отсутствие специфических для неандертальцев последовательностей мтДНК в останках древних представителей *H. sapiens* позволили установить, что вклад неандертальцев в генофонд современного человека если и был, то должен составлять менее 25 % (Serre *et al.*, 2004a). Моделирование с дополнительным учетом данных по структуре генофондов мтДНК современных популяций человека Евразии позволило сделать вывод о том, что уровень скрещивания между неандертальцем и современным человеком не мог составлять более 0,1 % (Currat, Excoffier, 2004). Результаты определения полной последовательности мтДНК неандертальца также свидетельствуют о принадлежности *H. sapiens* и *H. neanderthalensis* к разным биологическим видам (Green *et al.*, 2008).

Следует отметить, что интенсивное использование останков неандертальцев в качестве объекта палеогенетического исследования определяется помимо высокого интереса к этой проблематике более высокими возможностями верификации результатов исследования. Поскольку последовательности ДНК неандертальцев отличаются от таковых у современного

человека, обнаружение специфичной последовательности ДНК служит достаточно надежным доказательством достоверности результатов (Green *et al.*, 2009). Это обстоятельство сделало ДНК неандертальца удобным объектом для апробации новых методов палеогенетического анализа. Так, например, применение методов секвенирования нового поколения в палеогенетике (по крайней мере, для представителей рода *Homo*) было впервые применено для анализа ДНК неандертальца (Green *et al.*, 2008). В результате именно для представителя вида *H. neanderthalensis* было впервые в палеогенетической практике инициировано полногеномное секвенирование (Green *et al.*, 2010).

На нескольких образцах ДНК неандертальца впервые был опробован новый подход к верификации результатов исследования древней ДНК, основанный на определении специфических свойств древней ДНК, являющихся следствием ее деградации. Этот подход был успешно применен для верификации полной последовательности мтДНК из останков анатомически современного человека из верхнепалеолитического памятника Костенки-14 возрастом более 30 тыс. лет (Krause *et al.*, 2009). Ранее для верификации результатов палеогенетического исследования останков сопоставимого возраста исследователям необходимо было учитывать все известные возможные последовательности мтДНК, которые могли загрязнить образец (Caramelli *et al.*, 2008).

Новый подход к верификации результатов палеогенетических исследований позволяет исследовать и другие образцы мтДНК эпохи палеолита (использование этого подхода для массового исследования менее древних образцов, по-видимому, пока ограничивается высокой стоимостью его реализации). Целесообразность и информативность таких исследований не вызывают сомнений в связи с крайне ограниченным количеством достоверной биологической информации о формировании анатомически современного человека как вида и его расселении по планете.

Это ярко иллюстрируют результаты анализа полной последовательности мтДНК, выделенной из кости фаланги пальца человека, обнаруженной при раскопках верхнепалеолитических слоев Денисовой пещеры (возраст слоя 30–48

тыс. лет). Полученные результаты позволили авторам предположить, что исследованный палеоантропологический образец мог принадлежать представителю рода *Homo*, ранее неизвестному науке. Время существования последнего общего предка современного человека, неандертальца и индивида из Денисовой пещеры оценивается по последовательности мтДНК в 1 млн лет. То есть его предок отделился от эволюционной ветви, ведущей к современному человеку, задолго до неандертальцев (500–300 тыс. лет назад) (Krause *et al.*, 2010). Полученные результаты свидетельствуют о том, что на территории Горного Алтая порядка 40 тыс. лет назад могли сосуществовать сразу три вида гоминид, что является принципиально новой информацией для данной области науки. Для окончательного определения видовой принадлежности останков необходим анализ ядерной ДНК. В случае подтверждения выдвинутой гипотезы индивид из Денисовой пещеры станет представителем третьего вида из рода *Homo*, для которого удалось получить палеогенетические результаты после *H. sapiens* и *H. neanderthalensis*.

Помимо скелетных фрагментов человека среди материалов палеолитических памятников иногда обнаруживают копролиты, которые также могут быть использованы в качестве источника для выделения ДНК человека. Примером такой работы является исследование мтДНК человека из копролитов, обнаруженных в пещере на территории штата Орегон в Северной Америке (Gilbert *et al.*, 2008). Полученные результаты, по мнению авторов, однозначно свидетельствуют о принадлежности копролитов человеку. Обнаруженные в 6 образцах варианты мтДНК относятся к подгруппам А2, В2 мтДНК, характерным для современного аборигенного населения Америки. Согласно данным прямой датировки, возраст исследованных копролитов составляет не менее 14 тыс. лет. Эти данные свидетельствуют в пользу более раннего заселения территории Северной Америки, чем это предполагается популярной на данный момент гипотезой, рассматривающей носителей культуры Кловис в качестве первого населения Америки (Dixon, 2001). Следует отметить, что эта работа подверглась серьезной критике (Poinar *et al.*, 2009). Среди основных возражений, выдвинутых против представленных в работе выводов, был и слабый

учет данных по археологическому контексту образцов – стратиграфии их залегания, анализа сопутствующего инвентаря. Высказано сомнение в адекватности применения методов прямого датирования к материалу копролитов. Эта работа – пример того, что для точной датировки материалов иногда недостаточно проведения лишь прямого датирования естественнонаучными методами. Очевидно, для проверки сделанных в работе выводов необходимо проведение масштабных работ по поиску дополнительных материалов, информативных по отношению к проблеме первоначального заселения Америки современным человеком.

Палеогенетические исследования материалов эпохи неолита – позднего средневековья

Круг задач исследования палеолитических материалов методами палеогенетики сводится, как правило, к анализу единичных (или немногочисленных) образцов ДНК с целью прояснения ранних этапов становления современного человека как вида, его взаимоотношений с другими видами гоминид и расселения по планете. Молекулярно-генетический анализ материалов последующих эпох – с неолита до позднего средневековья – позволяет решать разнообразные задачи, касающиеся последующих этапов развития человечества.

С наступлением эпохи неолита в среде древнего населения различных регионов планеты происходит распространение новаций, которые существенно повлияли на набор источников, обнаруживаемых при раскопках археологических памятников. Появляется практика преднамеренного погребения умерших, выполняемого согласно определенным погребальным традициям. В результате в распоряжении археологов появляется массовый по сравнению с эпохой палеолита палеоантропологический материал относительно высокой сохранности и комплектности. Это открыло возможности для накопления обширных палеоантропологических коллекций, для их исследования методами физической антропологии. Таким образом, появилась возможность получать значительное количество информации о биологических характеристиках представителей древних групп

населения. Принципиальное значение имеет тот факт, что погребения часто представляют собой закрытые комплексы (в случае если они не были нарушены), в которые останки человека помещены вместе с сопроводительным инвентарем. Эта дает возможность осуществления не прямой датировки останков и отнесения погребенного к конкретной этнокультурной группе (например археологической культуре). В этом контексте сложно переоценить еще одну новацию – в эпоху неолита было открыто изменение свойств глины при обжиге, благодаря чему появилась возможность изготовления глиняной посуды. Это внесло существенные изменения в диету человека, так как появилась возможность употреблять горячую и жидкую пищу, что не могло не сказаться на физиологических особенностях человека. Кроме того, керамика является одним из наиболее информативных культурнодиагностирующих маркеров для памятников рассматриваемого периода. Увеличение разнообразия артефактов, обнаруживаемых при исследовании археологических памятников, появление новых типов памятников (погребальные) позволяют получать более разностороннюю картину существования древнего человека для периодов неолита–позднего средневековья по сравнению с эпохой палеолита. Соответственно увеличивается и разнообразие задач, для решения которых потенциально применимы методы палеогенетики (Молодин и др., 2009б).

Отличием палеогенетических исследований голоценовых материалов является проведение анализа уже серии образцов. Анализ единичных образцов встречается редко. Как правило, он проводится для образцов, представляющих особую ценность для науки. Примером такого исследования может служить анализ ДНК тирольского «снежного человека». Исследованию одной только его митохондриальной ДНК посвящено пять работ в высокорейтинговых научных журналах (Handt *et al.*, 1994b; Rollo *et al.*, 2006; Ermini *et al.*, 2008; Endicott *et al.*, 2009; Olivieri *et al.*, 2010). Палеогенетический анализ останков тирольского человека осуществляется в рамках комплексного всестороннего их изучения, включающего исследование его диеты (Rollo *et al.*, 2002b), микробиома (Tito *et al.*, 2008) и многих других аспектов.

Результаты по исследованию единичных образцов вызывают повышенный интерес и в случае их несоответствия имеющимся археологическим представлениям. Так, например, в работе Хие с соавт. (2007) было показано присутствие варианта западно-евразийской гаплогруппы U5 в останках индивидуума, обнаруженных на территории центрального Китая, возраст которых оценивается в 1400 лет. Таким образом, был зафиксирован случай более раннего проникновения в этот регион носителя гаплогруппы мтДНК, типичной для населения западной части Евразии, чем это предполагалось по другим данным.

В большинстве случаев исследователь имеет дело с анализом больших или меньших серий образцов древней ДНК. Рассмотрим основные направления использования палеогенетического подхода в археологии периода неолита–позднего средневековья.

Реконструкция элементов погребальных традиций, обрядов, родственной и социальной структуры древних групп человека

Реконструкция особенностей погребальной практики – одна из фундаментальных проблем археологии. Для древних групп населения (как, впрочем, и для современного человека) характерно особое отношение к обряду погребения. Для многих этнокультурных групп археологи фиксируют удивительно устойчивые погребальные традиции, распространенные по всему ареалу культуры. Вместе с тем изменения особенностей погребальной практики, появление новых обрядов могут являться маркерами внешнего этнокультурного влияния. Некоторые особенности погребальной практики могут указывать на систему социальных взаимоотношений в исследуемой древней группе (Гуляев, Ольховский, 1999).

Молекулярно-генетический анализ останков может быть использован для реконструкции следующих черт погребальной обрядности:

1. *Сооружение коллективных погребений по родственному или половому признаку или зависимость планиграфической организации могильника от степени родства (или пола) погребенных.* Выяснение степени родства между

индивидами из коллективных погребений может прояснить мотивы их сооружения, уточнить черты наблюдаемой обрядности. В работе Наак с соавт. (2008) проведен анализ степени родства индивидов из коллективных погребений с территории Германии. Комплексный молекулярно-генетический анализ степени родства индивидов (по маркерам аутосом, митохондриальной ДНК и Y-хромосомы) подтвердил значимость степени родства погребенных при помещении их в одно погребение. В одном из погребений была выявлена целая семья – родители и двое детей. Возраст исследованных погребений составляет порядка 4600 лет.

Анализ ДНК из останков детей грудного возраста, погребенных под полом жилищ городища Чича-1 (IX–VII вв. до н. э.) в Барабинской лесостепи, позволил установить мужской пол всех исследованных индивидов. Вероятно, это является обязательным условием совершения этого обряда (Пилипенко и др., 2008б). Анализ митохондриальной ДНК показал, что в случае сооружения двух детских погребений в одном жилище их родство по материнской линии не играло существенной роли (Пилипенко и др., 2009б).

2. *Как правило, пространство могильника характеризуется довольно сложной планиграфической структурой.* Во многих случаях на территории крупных могильников можно выделить планиграфически обособленные группы (Молодин, 2001). Их появление может объясняться либо различной этнокультурной или хронологической принадлежностью погребенных индивидов, либо формированием групп погребений по родственному принципу, когда могильник состоит из родовых (семейных) некрополей. Попытка установления корреляции планиграфии могильника (формирования рядов погребений) со степенью родства индивидов в настоящее время предпринимается авторами статьи на материалах могильника эпохи бронзы Тартас-1 в Барабинской лесостепи. В некоторых случаях оценка степени родства индивидов в погребальных комплексах потенциально может прояснить особенности социальной организации общества (размещение погребений на пространстве некрополя в зависимости от социального статуса умершего и т. д. (Keyser-Tracqui *et al.*, 2003).

3. *Идентификация числа индивидов в коллективном погребении или принадлежности частей скелетов конкретным индивидам.* Это бывает необходимо в случае коллективных погребений, содержащих нарушенные скелеты людей, схожих по половозрастным характеристикам. В этом случае возникают проблемы их идентификации методами физической антропологии.

4. *Оценка корреляции изменений в погребальной практике и генетическом составе населения позволяет соотнести изменения особенностей материальной культуры и структуры генофонда древнего населения.* Эта задача, как правило, решается при исследовании особенностей этногенетических процессов (в том числе, культурогенетических) (см. ниже).

Исследование этногенетических процессов

Реконструкция общих и региональных особенностей этногенеза является одной из главных задач изучения древней истории и актуальной проблемой генетики человека, археологии, физической палеоантропологии. Различные ее аспекты традиционно решаются с помощью альтернативных подходов – изучения генофондов современных популяций человека методами этногеомики или оценки эволюции особенностей материальной культуры традиционными методами археологии в комплексе с анализом антропометрических (краниометрических, одонтологических) особенностей представителей древних этнокультурных групп, а также с привлечением данных других наук, прежде всего этнографии и лингвистики (Алексеев, 1989).

Исследования особенностей структуры генофондов современных популяций с различными расовыми характеристиками, проведенные за последние десятилетия, позволили оценить характер генетической вариативности человека по различным маркерам (митохондриальная ДНК (мтДНК), Y-хромосома, различные типы аутомных маркеров) в масштабах планеты. Накопленные данные создают объективные предпосылки для попыток реконструкции некоторых особенностей процессов расогенеза и этногенеза. Этот подход особенно эффективен в отношении реконструкции наиболее общих характеристик эволюционного прошлого че-

ловека. Так, данные этногеомики позволили сформулировать теорию недавнего африканского происхождения анатомически современного человека (Cann *et al.*, 1987), реконструировать основные маршруты его расселения по планете и общие особенности формирования генетической специфичности отдельных крупных групп населения (Малярчук, Деренко, 2006). Эти результаты в настоящее время находят подтверждение и в других областях науки (археология, физическая антропология). Возможности более тонкой реконструкции генетической истории современных популяций человека методами этногеомики, как правило, ограничены в связи с тем, что структура их генофонда сформировалась в результате разнообразных и многоступенчатых процессов. Путем интерпретации особенностей структуры генофонда современных популяций в большинстве случаев могут быть определены лишь общие закономерности формирования генетического состава населения исследуемых территорий.

Альтернативным подходом к этногенетическим реконструкциям является изучение древних этнокультурных групп человека методами археологии и физической антропологии. В этом случае информация о генетическом прошлом популяций человека извлекается из косвенных источников. Установление взаимосвязи эволюции особенностей материальной культуры (предмет исследования археологии) и генетической истории древних групп часто затруднительно. Сложная генетическая природа фенотипических признаков, которыми оперирует физическая антропология (краниометрические, одонтологические характеристики), до сих пор остается малоизученной, что иногда мешает их корректной интерпретации с точки зрения биологического прошлого популяции.

Таким образом, возможности применения каждого из подходов для реконструкции эволюционного прошлого популяций человека ограничены. Тем не менее именно комплексное археологическое представление об этногенетических процессах в настоящее время наиболее приближено к реальной картине. В нем отражены различные аспекты этногенеза – культурогенетический и биологический. Накопленные археологические материалы свидетельствуют о чрезвычайной сложности процесса этногенеза

и многообразии его действующих факторов. Согласно археологическим данным формирование состава населения каждого региона – многоступенчатый процесс, включающий смену многочисленных этнокультурных групп на протяжении многих тысячелетий. Непосредственными действующими факторами этногенеза являлись многочисленные и разнонаправленные миграционные потоки, сопровождавшиеся этнокультурным взаимодействием на уровне культурного обмена и генетических контактов, с одной стороны, и реализация механизмов генетической (и культурной) преемственности между сменявшимися друг друга этнокультурными группами, с другой. Важно, что широкомасштабные археологические исследования позволили установить выраженные региональные отличия в процессе формирования населения как на уровне больших регионов, так и на уровне археологических микрорайонов. Их анализ является ключом к пониманию процессов формирования этноспецифичности современных популяций человека.

Безусловно, дальнейший прогресс в этой области может быть достигнут при объединении археологического и генетического подходов. Такая возможность появилась с развитием палеогенетики. Удачный опыт подобной интеграции был получен при реконструкции этногенеза носителей пазырыкской культуры юга Горного Алтая (Молодин и др., 2003). Исследование этногенетических процессов – одно из наиболее бурно развивающихся направлений палеогенетики.

В палеогенетике можно условно выделить два подхода к изучению процессов этногенеза. Значительная часть работ в настоящее время посвящена изучению генетических аспектов масштабных процессов, происходивших в прошлом, путем анализа небольшого числа образцов древней ДНК (Lalueza-Fox *et al.*, 2004; Haak *et al.*, 2005; Bramanti *et al.*, 2009). Такое исследование слабо интегрировано с археологией. Учитываются лишь археологические обобщения, а более частные данные используются ограниченно, например, для выбора материала, имеющего отношение к исследуемым древним процессам. Для такого типа работ характерно широкое использование методов математического моделирования при интерпретации полу-

ченных результатов. Их корреляция с данными комплексного археологического исследования возможна только на уровне обобщения большого масштаба. Полученная информация, как правило, носит общий характер, а построенная модель по своим характеристикам может быть далека от реально происходивших в прошлом процессов. Выдвинутые по результатам таких работ гипотезы нуждаются в дополнительном обосновании посредством проведения многочисленных исследований на меньших по масштабам моделях. Безусловная положительная роль данного подхода состоит в том, что полученные первые результаты помогают правильно спланировать дальнейшие исследования на более локальном уровне и скоординировать усилия по исследованию различных аспектов проблемы. Кроме того, исследование разрозненных образцов с обширной территории в некоторых случаях позволяет обнаружить наиболее характерные и выраженные черты, объединяющие население такой территории. Так, например, исследование всего 20 образцов мтДНК от представителей групп охотников-собирателей различных регионов Европы позволило обнаружить преобладание в их генофонде линий гаплогруппы U (Bramanti *et al.*, 2009), а исследование 24 образцов мтДНК первых носителей навыков сельского хозяйства Центральной Европы – высокую частоту линий гаплогруппы N1a (Haak *et al.*, 2005).

Доминирование такого подхода особенно характерно для начальных стадий становления научного направления. Аналогией может служить история изучения этногенетических процессов методами митохондриальной этногеномики человека. Несмотря на слабую методическую базу и небольшое количество данных по полиморфизму мтДНК в популяциях, ранние работы по изучению вариативности мтДНК были посвящены решению вопросов происхождения человека современного типа как вида, дифференциации его на масштабные группы (например расы), заселения человеком континентов и т. д. Результатом стало появление нескольких противоречащих друг другу гипотез происхождения и дальнейшей эволюции человека современного типа (Denaro *et al.*, 1981; Cann *et al.*, 1987; Minshu *et al.*, 1988). И лишь проведенные в последующие годы многочисленные

исследования разнообразия мтДНК и других филогенетически информативных маркеров в популяциях человека с различными этническими и расовыми характеристиками позволили оценить каждую из гипотез и признать наиболее достоверной гипотезу недавнего африканского происхождения человека современного типа и его последующего расселения по планете (Stringer, 2002).

Аналогичная ситуация наблюдается в палеогенетике сегодня. Многие из опубликованных до настоящего времени палеогенетических исследований содержат гипотезы о характере протекания масштабных процессов в прошлом, например о заселении человеком континентов (Haak *et al.*, 2005; Bramanti *et al.*, 2009), приручении и распространении в масштабах планеты домашних животных (Troy *et al.*, 2001; Var-Gal *et al.*, 2002; Edwards *et al.*, 2007) и др. Экспериментальная часть таких исследований, как правило, состоит в анализе небольшой серии образцов древней ДНК, полученных от особей, предположительно имеющих отношение к исследуемому процессу. Выдвинутые в таких работах гипотезы, несомненно, представляют интерес, хотя иногда противоречивы. Необходимо проведение намного более масштабных экспериментальных работ на локальных моделях для получения более реальных (и детальных) представлений об исследуемом феномене. Эти задачи реализуются в рамках второго подхода к исследованию этногенеза посредством анализа древней ДНК, реализуемого на локальных моделях.

Поиск локальных моделей, адекватных цели исследования, возможен только путем тесной интеграции палеогенетического и комплексного археологического подходов. Анализ накопленной археологией обширной базы разнообразных источников с учетом имеющихся методических возможностей палеогенетики позволяет эффективно отобрать из множества локальных моделей те, которые в наибольшей степени информативны по отношению к исследуемым феноменам. Таким образом, работа, проведенная археологами на протяжении многих десятилетий, существенно сокращает для палеогенетического направления путь от накопления первичного фактического материала до формулирования первых обобщений и позволяет уже на начальных этапах исследо-

вания заниматься осторожной интерпретацией полученных данных в рамках археологического контекста сначала на локальном уровне, а затем и в большем масштабе.

В настоящее время начаты широкомащтабные работы по накоплению первичной информации о генетическом разнообразии в группах древнего населения планеты различного возраста и этнокультурной принадлежности. Исследованию подвергаются генетические маркеры, наиболее информативные при проведении исследований этногенеза методами палеогенетики. В подавляющем большинстве работ анализируется митохондриальная ДНК, из-за высокой степени сохранности в палеоантропологическом материале и уникальных свойств ее как генетического маркера. Вторым маркером, анализ которого в образцах древней ДНК начат сравнительно недавно, является нерекombинируемая часть Y-хромосомы (Bouakaze *et al.*, 2007; Keyser *et al.*, 2009). Таким образом, основные исследования этногенеза методами палеогенетики до настоящего времени связаны с однородительскими маркерами. Их выбор обусловлен уникальными генетическими свойствами (однородительский тип наследования, отсутствие рекомбинации и т. д.), обеспечивающими их высокую информативность в отношении реконструкции истории формирования генофондов популяций человека, а также высокой степенью изученности в современных этнических группах. Для этих маркеров разработана подробная классификация структурных вариантов, реконструированы филогенетические взаимоотношения между группами вариантов, установлены предполагаемое время, а также географическая локализация центров их происхождения и диверсификации. Вся эта информация легла в основу единых филогенетических деревьев мтДНК и Y-хромосомы человека, которые являются уникальными инструментами для реконструкции различных аспектов этногенеза (Ruiz-Persini *et al.*, 2006; Torroni *et al.*, 2006; Underhill, Kivisild, 2007). Аутомомные маркеры реже используются в палеогенетике, так как известно сравнительно немного аутомомных локусов, обладающих высоким разрешением по отношению к истории формирования генофонда популяции, хорошо изученных в современных популяциях

различной этнической принадлежности и при этом удобных для анализа в деградированных образцах древней ДНК.

Практика обязательной подробной публикации результатов палеогенетических исследований приводит к тому, что они становятся частью условной базы данных, аналогично данным по современным популяциям планеты. К настоящему моменту можно говорить как минимум о нескольких сотнях последовательностей древней мтДНК, которые можно считать достоверными.

Каким образом данные палеогенетического анализа останков человека используются при исследовании этногенеза? Такие исследования можно условно разделить на несколько типов. В первом типе работ анализу подвергается палеоантропологический материал от древних популяций, предположительно относящихся к единой группе, существовавшей в определенный период в прошлом. Как правило, это представители одной этнокультурной группы (например носители одной археологической культуры). Такие исследования наиболее многочисленны до настоящего времени. Выборка образцов в такой работе либо формируется из материалов одного археологического памятника (Alzualde *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2008; Adachi *et al.*, 2009), либо является сборной серией, сформированной из материалов памятников конкретного региона: от расположенных в пределах одного микрорайона могильников (Sampietro *et al.*, 2005) до обширных по площади территорий, вплоть до субконтинентального уровня (Lalueza-Fox *et al.*, 2004; Haak *et al.*, 2005; Shook, Smith, 2008).

В работах, в которых исследуется структура генофонда одной группы древнего населения, для интерпретации результатов используются накопленная информация о структуре генофонда современных популяций человека и стандартные подходы этногеомики человека (филогеографический анализ). При этом полученные данные о составе линий мтДНК (реже Y-хромосомы) в генофонде древней этнокультурной группы анализируют в контексте имеющихся представлений о возможных времени и месте происхождения, распространения и диверсификации этих вариантов. Корреляция полученных генетических результатов с

предполагаемыми конкретными этногенетическими процессами осуществляется при их сопоставлении с археологическим контекстом исследуемой группы древнего населения, а именно с ее положением в системе древних этнокультурных групп региона, предполагаемыми контактами с населением сопредельных территорий (на уровне материальной культуры или палеоантропологических характеристик) и другими данными. В последнее время источником информации при интерпретации результатов палеогенетического исследования древних групп человека становятся данные о структуре генофонда других групп древнего населения планеты, полученные и опубликованные независимыми исследовательскими коллективами (Keyser *et al.*, 2009). Этот аспект исследования по существу является сравнительным анализом, и можно предполагать усиление его роли при накоплении более значительного объема палеогенетических результатов.

Применение комплексного филогеографического подхода к анализу данных палеогенетического исследования позволило оценить характер генетических связей группы древнего населения Синьцзяна, относящейся к концу I тыс. до н. э., с современными и древними популяциями Евразии, установить ее появление в регионе в результате миграции и локализовать вероятные источники мигрантов (Gao *et al.*, 2008).

Корректный учет данных археологии на всех стадиях палеогенетического исследования в комплексе с филогеографическим анализом позволил по результатам изучения серии образцов мтДНК от представителей населения городища Чича-1 (Барабинская лесостепь) переходного периода от эпохи бронзы к эпохе железа реконструировать направления генетических связей этой древней группы, зафиксировать миграционный поток генетически контрастного населения с территории современного Казахстана непосредственно в период функционирования городища (Пилипенко и др., 2008б, 2009б).

Следует отметить, что при формировании выборки для палеогенетического анализа любой группы древнего населения с учетом археологических данных о принадлежности материалов к конкретному этнокультурному образованию возникают определенные сложности. Критерием выделения археологической культуры, как

правило, является специфика в различных компонентах материальной культуры, экономики и традиций (в том числе погребальных) древней группы, отличающих ее от других групп (Молодин, 2008). Для разных регионов планеты набор этих компонентов варьирует. Для северной Евразии он включает специфику организации поселений и жилищ, тип хозяйства, погребальной практики, вещевого комплекса (оружие, орудия труда, украшения и другие предметы быта) и один из наиболее часто анализируемых маркеров – особенности керамического комплекса. Для каждого компонента материальной культуры определены основные характеристики, которые подвергаются анализу. Например, при анализе керамического комплекса анализу подвергают состав сырья, способ приготовления «теста», способ придания формы и саму форму сосудов, способ нанесения и характер орнамента сосудов, способ обжига керамики и некоторые другие характеристики (Глушков, 1996). В результате многолетних исследований с привлечением доступных письменных источников, а также возможностей радиоуглеродного анализа археологами сформировано представление о времени бытования и ареале тех или иных типов элементов материальной культуры, построены и датированы так называемые типологические ряды, отражающие эволюцию того или иного типа артефактов. Эта информация позволяет определять культурную принадлежность и датировку исследуемых материалов с большей или меньшей точностью. При этом, как правило, материалы из разных частей ареала археологической культуры демонстрируют полиморфизм элементов материальной культуры. То есть население археологической культуры часто бывает не вполне однородно. Неоднородность эта может быть вызвана, например, разницей в направлении культурных контактов ее носителей в разных районах ее ареала. Еще более сложная ситуация складывается в отношении генетической структуры населения древней этнокультурной группы. О генетической неоднородности носителей археологических культур могут свидетельствовать данные физической антропологии. Иногда сложно даже выделить доминирующий краниологический тип, как в случае андроновской этнокультурной общности, у населения которой выявлены сразу

несколько антропологических типов (Кузьмина, 1994). Дополнительные трудности связаны с возможностью распространения элементов материальной культуры без существенного генетического влияния (через торговые контакты, обучение и т. д.). Иными словами, археология при выделении групп древнего населения оперирует культурными характеристиками, тогда как генетика и физическая антропология анализируют биологические параметры населения. Выяснение взаимоотношений между этими двумя аспектами генезиса населения региона – крайне сложная фундаментальная проблема, которую еще только предстоит решить. По-видимому, этот вопрос необходимо ставить и решать индивидуально для каждой этнокультурной группы.

Во избежание этих трудностей при формировании выборки для палеогенетического анализа древней группы необходима тщательная оценка степени достоверности культурной атрибуции материалов. Лучше всего использовать в исследовании материалы памятников, являющихся базовыми для характеристики населения культуры. Следует учитывать и возможную неоднородность материалов внутри каждого могильника. Оценить все перечисленные тонкости могут только специалисты в области археологии. Поэтому, на наш взгляд, тесное сотрудничество исследователей в области палеогенетики, археологии и антропологии на всех стадиях исследования является обязательным условием проведения изучения этногенеза методами палеогенетики.

Перспективными в отношении реконструкции этногенетических процессов являются работы, в которых осуществляются попытки проследить формирование структуры генофонда древнего населения во времени путем сравнения генетического состава популяций, сменявших друг друга на одной территории в течение некоторого периода. В этом случае сравнение генофондов древних групп населения между собой становится одним из наиболее информативных способов интерпретации результатов. Информацию о характере изменений в структуре генофонда можно затем рассматривать в рамках археологического контекста. Таким образом, появляется возможность непосредственно сопоставить данные генетики и

комплексного археологического исследования, касающиеся одних и тех же конкретных событий в этногенезе древнего населения региона.

В одной из первых подобных работ (Wang *et al.*, 2000) было проведено сравнение вариабельности мтДНК в сериях образцов ДНК представителей населения юга Китая (Линзи, провинция Гуаньдун) возрастом 2500, 2000 лет с современной популяцией. Авторы зафиксировали существенные различия в составе линий мтДНК между исследованными группами и сделали вывод о более сложной картине древних миграций в регионе, чем считалось ранее (Wang *et al.*, 2000). Впоследствии эти выводы были опровергнуты. Причиной ошибки стало использование в работе для филогеографических построений короткого участка ГВС I мтДНК, не позволявшего с достаточным уровнем достоверности провести сравнение рассматриваемых групп и их филогенетической близости с современными популяциями (Yao *et al.*, 2003).

В некоторых исследованиях ставится задача проследить динамику структуры генофонда значительных по площади регионов путем исследования небольших выборок образцов древней ДНК. Работа Lalueza-Fox с соавт. (2004) посвящена исследованию соотношения западно- и восточно-евразийских линий мтДНК в генофонде разновременных групп древнего населения с территории современного Казахстана. На основании результатов анализа 27 образцов мтДНК от представителей древнего населения из различных регионов современного Казахстана (Центрального, Южного, Восточного и Западного) из археологических памятников, датированных периодом XIV в. до н. э. – V в. н. э. (т. е. в течение ~ 2 тыс. лет), авторы делают выводы, что до периода XIV–VII вв. до н. э. генофонд населения Казахстана был представлен только западно-евразийскими линиями мтДНК, а после данного периода – имел смешанную структуру (западно- и восточно-евразийские линии). Интересно отметить, что при постановке задачи исследования и формировании выборок образцов авторы воспользовались лишь данными о предполагаемой датировке исследуемых материалов. Между тем, с точки зрения археологии, очевидно, что население, проживающее одновременно в разных частях такой обширной территории, относилось к различным, вероятно,

даже неродственным в генетическом отношении этнокультурным группам. Более того, характер процессов этногенеза (и культурогенеза) в различных частях рассмотренной в работе территории коренным образом отличался. При этом в работе не была учтена даже культурная принадлежность исследуемых материалов.

Напротив, обоснование полученных в работе выводов строится авторами на отдельных фактах в области археологии, антропологии и лингвистики, коррелирующих с полученными выводами. Таким образом, налицо выраженный дисбаланс в использовании данных археологии на разных стадиях исследования. На наш взгляд, представленные палеогенетические результаты интересны, но не позволяют сделать однозначных выводов ввиду чрезвычайно низкой репрезентативности исследованных серий образцов ДНК по отношению к исследуемым древним популяциям и некорректного формирования серий.

Другим примером работ, где предпринята попытка выявить характер изменения генофонда мтДНК, является серия из двух статей, посвященных распространению в Европе носителей навыков ведения сельского хозяйства. В результате исследования останков первых носителей производящего типа хозяйства Центральной Европы (Haak *et al.*, 2005) и потомков автохтонных для региона групп охотников-собирателей (Bramanti *et al.*, 2009) и сравнения их с современным населением Центральной Европы удалось установить, что первые носители сельскохозяйственных навыков были не потомками аборигенного европейского населения (охотников-собирателей), а мигрантами. Более того, пришлые группы с производящей системой экономики внесли незначительный вклад в структуру генофонда современного населения Центральной Европы. Тем не менее авторам не удалось прояснить вопрос о происхождении структуры генофонда современных европейцев и вкладе в эти процессы аборигенных групп охотников-собирателей, пришлых носителей сельскохозяйственных навыков и более поздних мигрантов. В работе отмечено, что простые модели, положенные в основу интерпретации полученных данных не могут полностью объяснить современную картину. В частности необходим корректный

учет многочисленных более поздних этногенетических процессов (миграции, ассимиляции, энтокультурное взаимодействие и др.) (Bramanti *et al.*, 2009).

В работе Keyser с соавт. (2009) проведено палеогенетическое исследование древних групп человека, составлявших население Минусинской котловины на протяжении около 2 тыс. лет – с середины II тыс. до н. э. до середины I тыс. н. э. Исследованию были подвергнуты носители четырех археологических культур – андроновской, карасукской, тагарской и таштыкской (суммарно 26 образцов). Комплексный генетический подход, при котором был проведен анализ мтДНК, нерекombинируемого участка Y-хромосомы, а также аутомных STR-маркеров и ОНП, предположительно играющих роль в детерминировании пигментации глаз и волос человека, позволил существенно увеличить информативность работы. Это помогло авторам установить доминирование в исследованных сериях западно-евразийских вариантов мтДНК и Y-хромосомы. Причем доля восточно-евразийского компонента генофонда увеличивалась от эпохи бронзы к эпохе железа, что коррелирует с данными, полученными Lalueza-Fox с соавт. (2004) по генофонду населения Казахстана аналогичного периода, а также с результатами исследования древнего населения Синьцзяна (Gao *et al.*, 2008). Авторы связывают преобладание западно-евразийских линий в генофонде древнего населения региона с миграцией популяций с запада. Филогеографический анализ выявленных линий мтДНК и в большей степени Y-хромосомы позволил предположить, что западно-евразийские генетические компоненты проникли на территорию юга Центральной Сибири с территории Восточной Европы. По мнению авторов, полученные результаты согласуются с предполагаемой принадлежностью населения андроновской культуры к индоевропейской языковой группе.

Основным недостатком рассмотренной работы является резкое несоответствие низкой репрезентативности исследованных выборок (26 образцов мтДНК и 10 Y-хромосомы для четырех этнокультурных групп) и масштабов сделанных выводов. Очевидно, что в данном исследовании нашла отражение лишь незначительная часть состава генофонда населения развитой

и поздней бронзы Минусинской котловины. Хотя исследованный регион является крайней восточной периферией ареала анализируемых в работе этногенетических процессов, на основании полученных для его населения результатов авторы обсуждают модель возникновения, распространения и роли культур, соорудивших погребальные конструкции в виде курганов, практически в масштабах всего евразийского материка. Это выглядит необоснованно.

Реконструкция процессов этногенеза путем интеграции комплексного археологического исследования и палеогенетического подхода осуществляется авторами обзора на материалах эпохи бронзы из памятников Барабинской лесостепи, занимающей лесостепное междуречье Оби и Иртыша. В результате многолетних археологических работ создана хорошо аргументированная классификация этнокультурных групп, населявших регион с эпохи неолита до позднего средневековья. Накоплены обширные палеантропологические коллекции. Костные останки из могильников Барабинской лесостепи характеризуются высокой сохранностью, что позволяет успешно проводить их молекулярно-генетический анализ. На территории центральной Барабы (Венгеровский район Новосибирской области и прилегающие к нему территории) открыты и исследованы памятники, расположенные близко друг к другу и давшие коллекции останков от представителей всех этнокультурных групп региона эпохи бронзы. Важно, что в этом археологическом микрорайоне локализованы памятники, которые являются базовыми для характеристики древних групп региона и даже для выделения некоторых археологических культур западно-сибирского региона, например усть-тартасской и одиновской (Молодин, 2001, 2008). Это позволило сформировать многочисленные серии образцов от представителей каждой этнокультурной группы, при использовании для этого только материала с высоко достоверным определением культурной принадлежности и наилучшей сохранности. Расположение Барабы в области между таежным поясом с севера и евразийским степным поясом с юга, а также между зонами распространения классических европеоидов и монголоидов обусловило высокую роль в этногенезе миграционных потоков,

сопровождавшихся взаимодействием контрастных этнокультурных групп. Таким образом, Барабинская лесостепь на данный момент является одним из наиболее перспективных районов для исследования этногенетических процессов с привлечением междисциплинарного подхода, объединяющего комплексный археологический (включая антропологический) и палеогенетический. Исследование более 100 образцов мтДНК от семи этнокультурных групп, населявших этот микрорайон в течение 3 тысячелетий (IV–начало I), позволило непосредственно сопоставить данные археологии, физической антропологии и палеогенетики. В результате удалось доказать, что в ранние периоды эпохи бронзы здесь доминировали процессы генетической преемственности между одновременными популяциями. В последующие периоды конца развитой и поздней бронзы население формируется в результате смешения аборигенных и пришлых популяций (Пилипенко и др., 2008а, 2009а).

Полученные к настоящему времени результаты информативны для решения таких вопросов, как особенности происхождения ранних групп населения Барабинской лесостепи, характер взаимодействия мигрировавшего в регион в эпоху развитой бронзы андроновского (федоровского) населения с аборигенным позднекротовским, соотношение вклада андроновского (федоровского) населения в формирование этнокультурных групп в эпоху бронзы на уровне материальной культуры и структуры генофонда. Развитие работы требует исследования новых серий образцов как из памятников Барабинской лесостепи, так и с сопредельных территорий с привлечением к анализу других филогенетически информативных маркеров помимо мтДНК.

Таким образом, анализ опубликованных независимыми группами данных и наш собственный опыт позволяют констатировать, что уже на данном этапе развития методологии палеогенетических исследований их применение для анализа археологических материалов позволяет получать уникальную информацию об особенностях древних этногенетических процессов при условии тесной интеграции палеогенетической части исследования в комплексный археологический подход.

Анализ останков животных, растений и микроорганизмов из археологических памятников

Одной из фундаментальных задач археологического исследования является реконструкция среды обитания древнего человека. Важной составляющей этой среды являлись животные, растения и микроорганизмы, сосуществовавшие с древним человеком. Их останки часто обнаруживают при раскопках археологических памятников различных типов – погребальных, поселенческих, культовых. Специфика памятника определяет и характер вероятного использования биоты человеком. Останки животных и растений являются традиционным объектом археологического исследования. На макроскопическом уровне (морфология, определение видовой принадлежности и т. д.) их исследуют в рамках палеозоологии (остеологии) и палеоботаники. Микроорганизмы являются новым объектом для археологии, так как их изучение стало возможным только в результате применения в археологической практике методов молекулярной биологии и генетики.

Молекулярно-генетический анализ останков животных из археологических памятников. Исследование ДНК из останков животных является одним из наиболее развитых направлений палеогенетики. Его результаты в меньшей степени подвержены влиянию контаминации, чем останки человека. Современная ДНК большинства животных не характеризуется широким распространением. Отсутствие потенциальных источников контаминации существенно упрощает методологию верификации палеогенетических результатов. Значительная часть работ в этом направлении связана с анализом останков животных из археологических памятников. Как правило, в культурный слой попадают останки животных, так или иначе используемых человеком в своей хозяйственной деятельности. Это либо останки диких животных, являвшихся объектами охоты древнего человека, либо останки одомашненных животных, разводимых человеком с различными целями. Большое число костей животных находят на поселенческих комплексах. Кроме того, для носителей многих археологических культур помещение останков животных в могилу с человеком было

неотъемлемой частью погребального обряда и наделялось особым сакральным смыслом. Например, неотъемлемой частью погребальной обрядности большинства скифских и тюркских культур являлось помещение коня в погребальный комплекс с человеком (Нестеров, 1990).

Палеогенетические исследования диких животных чаще всего проводят для памятников, оставленных населением, в хозяйстве которого существенную роль играла охота. Целью такого исследования, помимо выяснения характера использования фауны человеком, может быть реконструкция экологической обстановки в исследуемый период. Кроме того, генетические данные могут быть полезны для выяснения филогенетических отношений древних популяций (или даже видов) животных с ныне существующими. В первую очередь это касается памятников древнекаменного века. Наибольшую известность получили исследования ДНК представителей позднеплейстоценовой фауны, сосуществовавших с верхнепалеолитическим человеком, – мамонтов, пещерного медведя и позднеплейстоценового бурого медведя (Hanni *et al.*, 1994; Leonard *et al.*, 2000; Barnes *et al.*, 2002; Hofreiter *et al.*, 2002, 2004).

Большинство работ в области палеогенетики животных из археологических памятников связано с останками представителей domesticiрованных видов (Keyser-Tracqui *et al.*, 2005). Процесс одомашнивания животных – один из ключевых для понимания истории человечества. Этому вопросу уделяется большое внимание археологами и этнографами (Шнирельман, 1980). Исследования структуры ДНК из останков одомашненных животных, которые находят в археологических памятниках, уже способствовали реконструкции общих и региональных особенностей процессов доместикиции и распространения основных видов сельскохозяйственных животных. В частности, анализ древней ДНК позволил прояснить историю доместикиции свиней (Watanabe *et al.*, 2001, 2002), коров (Bailey *et al.*, 1996; Troy *et al.*, 2001; Edwards *et al.*, 2007), коз (Bar-Gal *et al.*, 2002).

Полученные данные позволяют не только реконструировать центры доместикиции сельскохозяйственных животных, но и прояснить пути их распространения. Поскольку распространение сельскохозяйственных животных часто

происходило параллельно с миграцией больших или малых по численности групп людей – носителей сельскохозяйственных традиций, выяснение пути расселения животных может быть дополнительным способом исследования древних миграционных волн, а также других элементов этногенетических процессов. Например, установление ближневосточного происхождения генофонда современных и древних коров Центральной Европы является дополнительным аргументом в пользу происхождения первых европейских носителей сельскохозяйственных навыков в эпоху неолита из ближневосточного региона наряду с непосредственным исследованием структуры генофонда их митохондриальной ДНК (Edwards *et al.*, 2007).

Молекулярно-генетический анализ останков животных из погребальных или культовых комплексов может быть использован для реконструкции элементов погребальных традиций древних культурных групп. Примером может служить исследование ДНК из останков лошадей, погребенных вместе с людьми в элитном погребальном комплексе скифского времени Аржан-2 с территории Тувы (Benecke *et al.*, 2010). Мужской пол всех 14 погребенных лошадей, неожиданно высокое разнообразие линий митохондриальной ДНК свидетельствуют в пользу предположения археологов о том, что погребенные животные являлись даром различных групп людей представителю элиты скифского общества, погребенному в Аржане-2. Эти данные хорошо согласуются с результатами остеометрического анализа, которые выявили необычный для скифского времени высокий рост лошадей, свидетельствующий об их элитном происхождении.

Помимо самостоятельной научной ценности анализ ДНК из останков животных, сопутствующих останкам человека, имеет методическое значение. Успешный анализ ДНК животных, извлеченных из археологических комплексов вместе с останками человека, является убедительным аргументом в пользу сохранности древней ДНК в останках человека и достоверности результатов ее исследования (Burger *et al.*, 2007; Pilipenko *et al.*, 2010).

Исследование ДНК растений. Основные результаты в области палеогенетики растений получены при исследовании останков растений

из археологических памятников (Gugerli *et al.*, 2005). Исследования ДНК из растительных остатков, не связанных с археологическими памятниками, представлены лишь немногочисленными работами с коллекциями гербариев небольшого возраста (Savolainen *et al.*, 1995). Наиболее часто исследованию подвергаются остатки сельскохозяйственных растений. Эти работы внесли большой вклад в понимание таких вопросов, как возникновение и распространение земледелия, происхождение и эволюция некоторых культурных (сельскохозяйственных) растений (Freitas *et al.*, 2003). Удалось исследовать эволюцию зерновых культур (Jaenicke-Despres *et al.*, 2003) и даже некоторых систем генов растений под воздействием селекции хозяйственно полезных признаков человеком (Goloubinoff *et al.*, 1993; Allaby *et al.*, 1999). Анализ ДНК растительных остатков, содержащихся в копролитах или в пищеварительном тракте, используется для реконструкции палеодиеты животных и человека (Poinar *et al.*, 2001; Hofreiter *et al.*, 2003). Примером использования этого подхода в археологии является реконструкция диеты тирольского «снежного человека» (Rollo *et al.*, 2002b).

Исследование ДНК микроорганизмов. Выделение и анализ структуры ДНК микроорганизмов из древних образцов осложнены высокой вероятностью контаминации, в связи с повсеместным распространением современных микроорганизмов (Paabo *et al.*, 2004; Willerslev *et al.*, 2004). Только реализация строгой системы верификации результатов позволяет получать достоверные данные. Палеогенетические исследования в данной области могут использоваться для изучения древних пищевых технологий, а также в экологических и климатологических реконструкциях. Отдельной областью исследования является определение ДНК возбудителей заболеваний (бактерий, вирусов) в останках человека из археологических памятников (Drancourt *et al.*, 1998; Zink *et al.*, 2001, 2003; Hershkovitz *et al.*, 2008), а также микробиомов древних людей (Tito *et al.*, 2008).

Особняком стоят исследования жизнеспособных микроорганизмов, сохраняющихся в закрытых археологических комплексах. Как правило, это становится возможным для памятников, содержащих мерзлоту. Такой анализ был

проведен при непосредственном участии авторов данной статьи для проб льда и органических материалов, извлеченных при раскопках погребальных памятников, содержащих мерзлоту, на могильниках пазырыкской культуры в Северо-Западной Монголии (Пучкова и др., 2008; Ханаева и др., 2008).

С методической точки зрения эта работа близка к обычным микробиологическим исследованиям. В таких исследованиях возможно получение результатов, имеющих потенциальное прикладное значение наряду с фундаментальными, например, открытие новых ферментов, потенциально применимых в молекулярной биологии. Так, при исследовании ферментативной активности штаммов микроорганизмов, полученных из материалов пазырыкских могильников с мерзлотой, был обнаружен продуцент эндонуклеазы рестрикции Asp103I – изоизомера рестриктазы *Bam*HI. Отличием нового фермента является низкая оптимальная температура активности фермента (6–10 °С по сравнению с 37 °С у *Bam*HI) (Пучкова и др., 2008).

Перспективным направлением использования анализа ДНК микроорганизмов из археологических материалов представляется реконструкция особенностей климата и экологической обстановки, существовавшей на момент сооружения закрытого археологического комплекса.

Таким образом, исследование останков представителей биоты из археологических памятников представляется информативным в отношении широкого круга вопросов. При этом исследование останков животных, растений и микроорганизмов из археологических памятников (по крайней мере для периода голоцена) практически всегда направлено на исследование различных сторон жизни человека и редко имеет самостоятельное фундаментальное значение (за исключением вопросов филогенетических взаимоотношений исчезнувших видов животных с современными).

Заключение

Современный методический уровень исследований структуры ДНК из биологических останков различного возраста и наличие системы критериев достоверности палеогенетических

данных позволили приступить к полноценному использованию молекулярно-генетических методов для решения разнообразных вопросов, возникающих при исследовании археологических культур. Масштаб решаемых проблем варьирует от определения конкретных биологических характеристик отдельных древних индивидов до реконструкции особенностей этногенетических процессов обширных регионов и даже проблем становления анатомически современного человека как вида. Дальнейший методический прогресс в данной области, очевидно, будет связан с внедрением в рутинную практику высокопроизводительных методов анализа структуры древней ДНК. Информативность палеогенетических исследований будет определяться степенью их интеграции с другими составляющими комплексного археологического подхода. В перспективе палеогенетический анализ, по-видимому, станет обязательно составляющей археологических исследований, особенно в области этногенетических реконструкций.

Работа поддержана грантами РФФИ 09-06-00357а, 10-06-00406а, РГНФ 10-0100193а, Междисциплинарным интеграционным проектом СО РАН № 115 (2009–2011).

Литература

- Авдусин Д.А. Полевая археология СССР. М.: Высш. шк., 1980. 335 с.
- Алексеев В.П. Историческая антропология и этногенез. М.: Наука, 1989. 445 с.
- Воевода М.И., Ситникова В.В., Чикишева Т.А. и др. Молекулярно-генетический анализ митохондриальной ДНК представителей Пазырыкской культуры Горного Алтая (IV–II вв. до н. э.) // Докл. РАН. 1998. Т. 358. № 4. С. 564–566.
- Глушков И.Г. Керамика как археологический источник. Новосибирск: Изд-во Ин-та археологии и этнографии СО РАН, 1996. 327 с.
- Гуляев В.И., Ольховский В.С. Погребальные памятники и погребальная обрядность: проблемы анализа и интерпретации // Погребальный обряд. Реконструкция и интерпретация древних идеологических представлений. М.: Восточная лит-ра РАН, 1999. С. 10–18.
- Кузьмина Е.Е. Откуда пришли индоарии? М.: Восточная лит-ра РАН, 1994. 464 с.
- Малярчук Б.А., Деренко М.В. Филогеографические аспекты изменчивости митохондриального генома человека // Информ. вестник ВОГиС. 2006. Т. 10. № 1. С. 41–56.
- Мамонова Н.Н., Романова Г.П., Харитонов В.М. Первичная обработка и определение антропологического материала в полевых условиях // Методика полевых археологических исследований. Л.: Наука, 1989. С. 50–83.
- Мартынов А.И., Шер Я.А. Методы археологического исследования. М.: Высш. шк., 1989. 223 с.
- Молодин В.И. Памятник Сопка-2 на реке Оми (культурно-хронологический анализ погребальных комплексов эпохи неолита и раннего металла). Новосибирск: Изд-во Ин-та археологии и этнографии СО РАН, 2001. Т. 1. 128 с.
- Молодин В.И. Исследования российско-германско-монгольской экспедиции на Северо-Западе Монголии летом 2006 г. // Рос. археология. 2007. № 4. С. 42–50.
- Молодин В.И. Одиновская культура в Восточном Зауралье и Западной Сибири. Проблема выделения // Россия между прошлым и будущим: исторический опыт национального развития. Екатеринбург: УрО РАН, 2008. С. 9–13.
- Молодин В.И., Воевода М.И., Чикишева Т.А. и др. Население Горного Алтая в эпоху раннего железного века как этнокультурный феномен: происхождение, генезис, исторические судьбы (по данным археологии, антропологии, генетики). Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2003. 286 с.
- Молодин В.И., Новиков А.В., Богданов Е.С. и др. Археологические памятники плоскогорья Укок (Горный Алтай). Новосибирск: Изд-во ИАЭТ СО РАН, 2004. 255 с.
- Молодин В.И., Новикова О.И., Гришин А.Е. и др. Изучение памятника эпохи развитой бронзы Таргас-1 // Проблемы археологии, этнографии, антропологии Сибири и сопредельных территорий. Новосибирск: Изд-во Ин-та археологии и этнографии СО РАН, 2006. Т. XII. С. 422–427.
- Молодин В.И., Парцингер Г., Цевээндорж Д. Замерзший погребальный комплекс пазырыкской культуры Олон-Курин-Гол-10 в Западной Монголии. Предварительные результаты // Вестн. истории, литературы, искусства. 2009а. Т. 6. С. 9–24.
- Молодин В.И., Ромашенко А.Г., Пилипенко А.С. Археология и палеогенетика. Некоторый опыт и перспективы мультидисциплинарных исследований // Роль естественнонаучных методов в археологических исследованиях: Сб. науч. тр. / Отв. ред. Ю.Ф. Кирюшин, А.А. Тишкин. Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2009б. С. 228–232.
- Нестеров С.П. Конь в культурах тюркоязычных племен Центральной Азии. Новосибирск: Наука, 1990. 143 с.
- Пилипенко А.С., Журавлев А.А., Ромашенко А.Г. и др.

- Генофонд мтДНК населения лесостепной полосы Западной Сибири эпохи развитой бронзы: влияние миграционных потоков // Факторы экспериментальной эволюции организмов: Сб. науч. тр. Киев: Логос, 2009а. Т. 7. С. 369–372.
- Пилипенко А.С., Ромашенко А.Г., Молодин В.И. и др. Формирование этнокультурных сообществ в западносибирской лесостепи на основе данных палеогенетики (первые результаты) // Тр. II (XVIII) Всерос. археологического съезда в Суздале. М.: ИА РАН, 2008а. Т. III. С. 391–394.
- Пилипенко А.С., Ромашенко А.Г., Молодин В.И. и др. Особенности захоронения младенцев в жилищах городища Чича-1 Барабинской лесостепи по данным анализа структуры ДНК // Археология, этнография и антропология Евразии. 2008б. № 2. С. 57–67.
- Пилипенко А.С., Ромашенко А.Г., Молодин В.И. и др. Особенности структуры генофонда митохондриальной ДНК населения городища Чича-1 (IX–VII вв. до н. э.) в Барабинской лесостепи // Чича – городище переходного от бронзы к железу времени в Барабинской лесостепи. Новосибирск: Изд-во ИАЭТ СО РАН, 2009б. Т. 3. Гл. 7. С. 108–127.
- Пучкова Л.И., Андреева И.С., Печуркина Н.И. и др. Штамм *Acinetobacter sp.* 103р – продуцент эндонуклеазы рестрикции Asp103I, узнающей нуклеотидную последовательность 5'-GGATCC-3' // Достижения современной биотехнологии. Новосибирск, 2008. С. 300–306.
- Смирнов Ю.А. Мустьерские погребения Евразии: Возникновение погребальной практики и основы тафологии. М.: Наука, 1991. 341 с.
- Ханаева Т.А., Сулова М.Ю., Парфенова В.В. и др. Разнообразие культивируемых органотрофных бактерий в пробах из археологических комплексов пазырыкской культуры (IV–III вв. до н. э.) Северо-Западной Монголии // Новости палеонтологии и стратиграфии. 2008. Вып. 10/11. (Приложение к журналу Геология и геофизика. Т. 49). С. 67–68.
- Шнирельман В.А. Происхождение скотоводства. М.: Наука, 1980. 330 с.
- Adachi N., Shinoda K., Umetsu K., Matsumura H. Mitochondrial DNA analysis of Jomon skeletons from the Funadomari site, Hokkaido, and its implication for the origins of native american // *Am. J. Phys. Anthropol.* 2009. V. 138. P. 255–265.
- Allaby R.G., Banerjee M., Brown T.A. Evolution of the high-molecular weight glutenin loci of the A, B, D and G genomes of wheat // *Genome.* 1999. V. 42. P. 296–307.
- Alzualde A., Izagirre N., Alonso S. et al. Insights into the «Isolation» of the Basques: mtDNA lineages from the historical site of Aldaieta (6th–7th centuries AD) // *Am. J. Phys. Anthropol.* 2006. V. 130. P. 394–404.
- Amory S., Keyser C., Crubezy E., Ludes B. STR typing on ancient DNA extracted from hair shafts of Siberian mummies // *Forensic Sci. Int.* 2007. V. 166. P. 218–229.
- Bailey J.F., Richards M.B., Macaulay V.A. et al. Ancient DNA suggest a recent expansion of European cattle from a diverse wild progenitor species // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.* 1996. V. 263. P. 1467–1473.
- Bar-Gal G.K., Khalaily H., Mader O. et al. Ancient DNA evidence for the transition from wild to domestic status in Neolithic goats: a case study from the site of Abu Gosh, Israel // *Ancient Biomolecules.* 2002. V. 4. P. 9–17.
- Barnes I., Matheus P., Shapiro B. et al. Dynamics of Pleistocene population extinctions in Beringian brown bears // *Science.* 2002. V. 295. P. 2267–2270.
- Benecke N., Pruvost M., Weber C. Die Pferdeskelette – Archäozoologie und Molekulargenetik // K.V. Cugunov, H. Parzinger, A. Nagler. Der skythenzeitliche Fürstenkurgan Arzan 2 in Tuva. Archäologie in Eurasien, Band 26; Steppenvölker Eurasiens, Band 3. Verlag Philipp von Zabern, Mainz, 2010. S. 249–256.
- Bouakaze C., Keyser C., Amory S. et al. First successful assay of Y-SNP typing by SNaPshot minisequencing on ancient DNA // *Int. J. Legal. Med.* 2007. V. 121. P. 493–499.
- Bramanti B., Thomas M.G., Haak W. et al. Genetic discontinuity between local hunter-gatherers and Central Europe's first farmers // *Science.* 2009. V. 326. P. 137–140.
- Brotherton P., Endicott P., Sanchez J.J. et al. Novel high resolution characterization of ancient DNA reveals C > U-type base modification events as the sole cause of post mortem miscoding lesions // *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. P. 5717–5728.
- Burger J., Hummel S., Herrmann B., Henke W. DNA preservation: A microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains // *Electrophoresis.* 1999. V. 20. P. 1722–1728.
- Burger J., Kirchner M., Bramanti B. et al. Absence of the lactase-persistence-associated allele in early Neolithic Europeans // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. P. 3736–3741.
- Cann R.L., Stoneking M., Wilson A.C. Mitochondrial DNA and human evolution // *Nature.* 1987. V. 325. № 1. P. 31–36.
- Cano R.J., Poinar H.N., Poinar Jr.G.O. Isolation and partial characterisation of DNA from the bee *Proplebeia dominicana* (Apidae: Hymenoptera) in 25–40 million year old amber // *Med. Sci. Res.* 1992. V. 20. P. 249–251.
- Caramelli D., Milani L., Vai S. et al. A 28,000 years old cromagnon mtDNA sequence differs from all potentially contaminating modern sequences // *PLoS*

- ONE. 2008. V. 3. № 7. e2700.
- Clisson I., Keyser C., Francfort H.-P. *et al.* Genetic analysis of human remains from a double inhumation in a frozen kurgan in Kazakhstan (Berel site, Early 3rd Century BC) // *Int. J. Legal. Med.* 2002. V. 116. P. 304–308.
- Cooper A., Poinar H. Ancient DNA: do it right or not at all // *Science*. 2000. V. 289. P. 1139.
- Currat M., Excoffier L. Modern humans did not admix with Neanderthals during their range expansion into Europe // *PLoS Biol.* 2004. V. 2. № 12. P. 2264–2274.
- Denaro M., Blanc H., Johnson M.J. *et al.* Ethnic variation in *HpaI* endonuclease cleavage patterns of human mitochondrial DNA // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1981. V. 78. P. 5768–5772.
- Dixon E.J. Human colonization of the Americas: timing, technology and process // *Quat. Sci. Rev.* 2001. V. 20. P. 277–299.
- Drancourt M., Aboudharam G., Signoli M. *et al.* Detection of 400-year-old *Yersinia pestis* DNA in human dental pulp: an approach to the diagnosis of ancient septicemia // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. P. 12637–12640.
- Edwards C.J., Bollongino R., Amelie Scheu A. *et al.* Mitochondrial DNA analysis shows a Near Eastern Neolithic origin for domestic cattle and no indication of domestication of European aurochs // *Proc. Biol. Sci.* 2007. V. 274. P. 1377–1385.
- Eglinton G., Logan G.A. Molecular preservation // *Philos. Trans. R. Soc. London*. 1991. V. 333. P. 315–327.
- Ehrlich M., Zhang X.Y., Inamdar N.M. Spontaneous deamination of cytosine and 5-methylcytosine residues in DNA and replacement of 5-methylcytosine residues with cytosine residues // *Mutat. Res.* 1990. V. 238. P. 277–286.
- Endicott P., Sanchez J.J., Pichler I. *et al.* Genotyping human ancient mtDNA control and coding region polymorphisms with a multiplexed Single-Base-Extension assay: the singular maternal history of the Tyrolean Iceman // *BMC Genet.* 2009. V. 10. P. 29.
- Ermini L., Olivieri C., Rizzi E. *et al.* Complete mitochondrial genome sequence of the Tyrolean Iceman // *Curr. Biol.* 2008. V. 18. P. 1687–1693.
- Faerman M., Filon D., Kahila G. *et al.* Sex identification of archaeological human remains based on amplification of the X and Y amelogenin alleles // *Gene*. 1995. V. 167. P. 327–332.
- Forster P., Matsumura S. Did early humans go north or south? // *Science*. 2005. V. 308. P. 965–966.
- Freitas F.O., Bendel G., Allaby R.G., Brown T.A. DNA from primitive maize landraces and archaeological remains: implications for the domestication of maize and its expansion into South America // *J. Archaeol. Sci.* 2003. V. 30. P. 901–908.
- Gao S.Z., Cui Y.Q., Yang Y.D. *et al.* Mitochondrial DNA analysis of human remains from the Yuansha site in Xinjiang, China // *Sci. China Ser. C-Life Sci.* 2008. V. 51. P. 205–213.
- Gilbert M. T.P., Willerslev E., Hansen A.J. *et al.* Distribution patterns of post-mortem damage in human mitochondrial DNA // *Amer. J. Hum. Genet.* 2003a. V. 72. P. 32–47.
- Gilbert M.T.P., Hansen A.J., Willerslev E. *et al.* Characterization of genetic miscoding lesions caused by post-mortem damage // *Amer. J. Hum. Genet.* 2003b. V. 72. P. 48–61.
- Gilbert M.T.P., Jenkins D.L., Gothenstrom A. *et al.* DNA from pre-clovis human coprolites in Oregon, North America // *Science*. 2008. V. 320. P. 786–789.
- Gilbert M.T.P., Wilson A.S., Bunce M. *et al.* Ancient mitochondrial DNA from hair // *Curr. Biol.* 2004. V. 14. R463–R464.
- Golenberg E.M., Giannasi D.E., Clegg M.T. *et al.* Chloroplast DNA from a Miocene *Magnolia* species // *Nature*. 1990. V. 344. P. 656–658.
- Goluboinoff P., Paabo S., Wilson A.C. Evolution of maize inferred from sequence diversity of an *adh2* gene segment from archaeological specimens // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1993. V. 90. P. 1997–2001.
- Green R.E., Briggs A.W., Krause J. *et al.* The Neanderthal genome and ancient DNA authenticity // *The EMBO J.* 2009. V. 28. P. 2494–2502.
- Green R.E., Krause J., Briggs A.W. *et al.* A draft sequence of the Neanderthal genome // *Science*. 2010. V. 328. P. 710–722.
- Green R.E., Malaspina A.S., Krause J. *et al.* A complete Neanderthal mitochondrial genome sequence determined by high-throughput sequencing // *Cell*. 2008. V. 134. P. 416–426.
- Gugerli F., Parducci L., Petit R.J. Ancient plant DNA: review and prospects // *New Phytologist*. 2005. V. 166. P. 409–418.
- Guthrie R.D. *Frozen Fauna of the mammoth steppe: the story of blue babe*. Chicago: The University of Chicago Press, 1990. 346 p.
- Haak W., Brandt G., de Jongh H.N. *et al.* Ancient DNA, strontium isotopes, and osteological analyses shed light on social and kinship organization of the later stone age // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. P. 18226–18231.
- Haak W., Forster P., Bramanti B. *et al.* Ancient DNA from the first European farmers in 7500-year-old Neolithic sites // *Science*. 2005. V. 305. P. 1016–1018.
- Haile J., Holdaway R., Oliver K. *et al.* Ancient DNA chronology within sediment deposits: are paleobiological reconstructions possible and is DNA leaching a factor? // *Mol. Biol. Evol.* 2007. V. 24. P. 982–989.
- Handt O., Hoss M., Krings M., Paabo S. Ancient DNA:

- methodological challenges // *Experientia*. 1994a. V. 50. P. 524–529.
- Handt O., Krings M., Ward R.H., Paabo S. The retrieval of ancient human DNA sequences // *Amer. J. Hum. Genet.* 1996. V. 59. P. 368–376.
- Handt O., Richards M., Tromsdorff M. *et al.* Molecular genetic analyses of the Tyrolean iceman // *Science*. 1994b. V. 264. P. 1775–1778.
- Hanni C., Laudet V., Stehelin D., Taberlet P. Tracking the origins of the cave bear (*Ursus spelaeus*) by mitochondrial DNA sequencing // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1994. V. 91. P. 12336–12340.
- Hansen A.J., Willerslev E., Wiuf C. *et al.* Statistical evidence for miscoding lesions in ancient DNA templates // *Mol. Biol. Evol.* 2001. V. 18. P. 262–265.
- Hawks J.D., Wolpoff M.H. The accretion model of Neanderthal evolution // *Evolution*. 2001. V. 55. P. 1474–1485.
- Hershkovitz I., Donoghue H.D., Minnikin D.E. *et al.* Detection and molecular characterization of 9000-year-old *Mycobacterium tuberculosis* from a Neolithic settlement in the Eastern Mediterranean // *PLoS ONE*. 2008. V. 3. № 10. e3426.
- Higuchi R., Bowman B., Freiberger M. *et al.* DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family // *Nature*. 1984. V. 312. P. 282–284.
- Hofreiter M., Betancourt J.L., Sbriller A.P. *et al.* Phylogeny, diet, and habitat of an extinct ground sloth from Cuchillo Cura, Neuquen Province, southwest Argentina // *Quat. Res.* 2003. V. 59. P. 364–378.
- Hofreiter M., Capelli C., Krings M. *et al.* Ancient DNA analyses reveal high mitochondrial DNA sequence diversity and parallel morphological evolution of Late Pleistocene cave bears // *Mol. Biol. Evol.* 2002. V. 19. P. 1244–1250.
- Hofreiter M., Jaenicke V., Serre S. *et al.* DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA // *Nucl. Acids Res.* 2001a. V. 29. P. 4793–4799.
- Hofreiter M., Rabeder G., Jaenicke-Despres V. *et al.* Evidence for reproductive isolation between cave bear populations // *Curr. Biol.* 2004. V. 14. P. 40–43.
- Hofreiter M., Serre D., Poinar H.N. *et al.* Ancient DNA // *Nat. Rev. Genet.* 2001b. V. 2. P. 353–360.
- Hoss M., Jaruga P., Zastawny T.H. *et al.* DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues // *Nucl. Acids Res.* 1996. V. 24. P. 1304–1307.
- Hummel S., Schmidt D., Kremeyer B. *et al.* Detection of the CCR5_Delta32 HIV resistance gene in Bronze Age skeletons // *Genes. Immun.* 2005. V. 6. P. 371–374.
- Jaenicke-Despres V., Buckler E.S., Smith B.D. *et al.* Early allelic selection in maize as revealed by ancient DNA // *Science*. 2003. V. 302. P. 1206–1208.
- Kaestle F.A., Horsburgh K.A. Ancient DNA in anthropology: Methods, applications, and ethics // *Yearbook of Physical Anthropol.* 2002. V. 45. P. 92–130.
- Kemp B.M., Smith D.G. Use bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth // *Forensic Sci. Int.* 2005. V. 154. P. 53–61.
- Keyser-Tracqui C., Blandin-Frappin B., Francfort H.-P. *et al.* Mitochondrial DNA analysis of horses recovered from a frozen tomb (Berel site, Kazakhstan, 3rd Century BC) // *Anim. Genet.* 2005. V. 36. P. 203–209.
- Keyser-Tracqui C., Crubezy E., Ludes B. Nuclear and mitochondrial DNA analysis of a 2,000 year-old necropolis in the Egyin Gol valley of Mongolia // *Amer. J. Hum. Genet.* 2003. V. 73. P. 247–260.
- Keyser C., Bouakaze C., Crubezy E. *et al.* Ancient DNA provides new insights into the history of south Siberian Kurgan people // *Hum. Genet.* 2009. V. 126. P. 395–410.
- Klein R.G. Paleoanthropology. Whither the Neanderthals? // *Science*. 2003. V. 299. P. 1525–1527.
- Knight A. The phylogenetic relationship of Neanderthal and modern human mitochondrial DNAs based on informative nucleotide sites // *J. Hum. Evol.* 2003. V. 44. P. 627–632.
- Krause J., Briggs A.W., Kircher M. *et al.* A Complete mtDNA genome of an early modern human from Kostenki, Russia // *Curr. Biol.* 2009. V. 20. P. 1–6.
- Krause J., Fu Q., Good J.M. *et al.* The complete mitochondrial DNA genome of an unknown hominin from southern Siberia // *Nature*. 2010. V. 464. P. 894–897.
- Krings M., Capelli C., Tschentscher F. *et al.* A view of Neanderthal genetic diversity // *Nat. Genet.* 2000. V. 26. P. 144–146.
- Krings M., Geisert H., Schmitz R.W. *et al.* DNA sequence of the mitochondrial hypervariable region II from the Neanderthal type specimen // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1999. V. 96. P. 5581–5585.
- Krings M., Stone A., Schmitz R.W. *et al.* Neanderthal DNA sequences and the origin of modern humans // *Cell*. 1997. V. 90. P. 19–30.
- Lalueza-Fox C., Sampietro M.L., Gilbert M.T.P. *et al.* Unravelling migrations in the steppe: mitochondrial DNA sequences from ancient Central Asians // *Proc. R. Soc. Lond.* 2004. V. 271. P. 941–947.
- Lau A., Wyatt M., Glassner B. *et al.* Molecular basis for discrimination between normal and damaged bases by the human alkyladenine glycosylase, AAG // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. P. 13575–13578.
- Leonard J.A., Wayne R.K., Cooper A. Population genetics of Ice Age brown bears // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. P. 1651–54.
- Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA // *Nature*. 1993. V. 362. P. 709–715.
- Mellars P.A. Archaeology and the population-dispersal

- hypothesis of modern human origins in Europe // *Philos. Trans. Roy. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 1992. V. 337. P. 225–324.
- Minshu Y., Xinfang Q., Jinglum X. *et al.* Mitochondrial DNA polymorphism in Chinese // *Sci. Sinica (Ser. B)*. 1988. V. 31. № 7. P. 860–872.
- Mitchell D., Willerslev E., Hansen A. Damage and repair of ancient DNA // *Mutat. Res.* 2005. V. 571. P. 265–276.
- Mullis K.B., Faloona F.A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction // *Methods Enzymol.* 1987. V. 155. P. 335–350.
- Olivieri C., Ermini L., Rizzi E. *et al.* Characterization of nucleotide misincorporation patterns in the Ice-man's mitochondrial DNA // *PLoS ONE*. 2010. V. 5. № 1. e8629.
- Ovchinnikov I.V., Gotherstrom A., Romanova G.P. *et al.* Molecular analysis of Neanderthal DNA from the Northern Caucasus // *Nature*. 2000. V. 404. P. 490–493.
- Paabo S. Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA // *Nature*. 1985. V. 314. P. 644–645.
- Paabo S. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1989. V. 86. P. 1939–1943.
- Paabo S., Higuchi R.G., Wilson A.C. Ancient DNA and the polymerase chain reaction // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. P. 9709–9712.
- Paabo S., Irwin D., Wilson A. DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. P. 4718–4721.
- Paabo S., Poinar H., Serre D. *et al.* Genetic analyses from ancient DNA // *Annu. Rev. Genet.* 2004. V. 38. P. 645–679.
- Paabo S., Wilson A.C. Polymerase chain reaction reveals cloning artifacts // *Nature*. 1988. V. 334. P. 387–388.
- Papagrigorakis M.J., Yapijakis C., Synodinos P.N., Baziotopoulou-Valavani E. DNA examination of ancient dental pulp incriminates typhoid fever as a probable cause of the plague of Athens // *Int. J. Infect. Dis.* 2006. V. 10. № 3. P. 206–214.
- Parzinger H., Molodin V., Ceveendorz D. *Der Skythezeitliche Krieger aus dem Eis: Neue entdeckungen im Mongolischen Altaj*. Amsterdam, 2008. 66 s.
- Pilipenko A.S., Romaschenko A.G., Molodin V.I. *et al.* Mitochondrial DNA studies of the Pazyryk people (4th to 3rd centuries BC) from northwestern Mongolia // *J. Archaeol. Anthropol. Sci.* 2010. (In press).
- Poinar H., Fiedel S., King C.E. *et al.* Comment on «DNA from Pre-Clovis Human Coprolites in Oregon, North America» // *Science*. 2009. V. 325. P. 148.
- Poinar H.N., Hofreiter M., Spaulding W.G. *et al.* Molecular coproscopy: dung and diet of the extinct ground sloth *Nothrotheriops shastensis* // *Science*. 1998. V. 281. P. 402–406.
- Poinar H.N., Hoss M., Bada J.L., Paabo S. Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA // *Science*. 1996. V. 272. P. 864–866.
- Poinar H., Kuch M., McDonald G. *et al.* Nuclear gene sequences from a Late Pleistocene sloth coprolite // *Curr. Biol.* 2003. V. 12. P. 1150–1152.
- Poinar H.N., Kuch M., Sobolik K.D. *et al.* A molecular analysis of dietary diversity for three archaic Native Americans // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. P. 4317–4322.
- Poinar H.N., Poinar G.O., Cano R.P. DNA from an extinct plant // *Nature*. 1993. V. 363. P. 677.
- Rasmussen M., Li Y., Lindgreen S. *et al.* Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo // *Nature*. 2010. V. 463. P. 757–762.
- Richards M.B., Sykes B.C., Hedges R.M. Authenticating DNA extracted from ancient skeletal remains // *J. Archaeol. Sci.* 1995. V. 22. P. 291–299.
- Rohland N., Hofreiter M. Comparison and optimization of ancient DNA extraction // *BioTechniques*. 2007. V. 42. P. 343–352.
- Rollo F., Ermini L., Luciani S. *et al.* Fine characterization of the iceman's mtDNA haplogroup // *Am. J. Phys. Anthropol.* 2006. V. 130. P. 557–564.
- Rollo F., Ubaldi M., Ermini L., Marota I. Otzi's last meals: DNA analysis of the intestinal content of the Neolithic glacier mummy from the Alps // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2002b. V. 99. P. 12594–12599.
- Rollo F., Ubaldi M., Marota I. *et al.* DNA diagenesis: effect of environment and time on human bone // *Ancient Biomol.* 2002a. V. 4. P. 1–7.
- Ruiz-Pesini E., Lott M.T., Procaccio V. *et al.* An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 35. P. 823–828.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S. *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase // *Science*. 1988. V. 239. P. 487–491.
- Sampietro M.L., Caramelli D., Lao O. *et al.* The genetics of the Pre-Roman Iberian Peninsula: a mtDNA study of ancient Iberians // *Ann. Hum. Genet.* 2005. V. 69. P. 1–14.
- Sampietro M.L., Gilbert M.T.P., Lao O. *et al.* Tracking down human contamination in ancient human teeth // *Mol. Biol. Evol.* 2006. V. 23. P. 1801–1807.
- Savolainen V., Cuenoud P., Spichiger R. *et al.* The use of herbarium specimens in DNA phylogenetics—evaluation and improvement // *Plant System. Evol.* 1995. V. 197. P. 87–98.
- Schmitz R.W., Serre D., Bonani G. *et al.* The Neanderthal type site revisited: Interdisciplinary investigations of skeletal remains from the Neander Valley, Germany // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99.

- P. 13342–13347.
- Serre D., Hofreiter M., Paabo S. Mutations induced by ancient DNA extracts? // *Mol. Biol. Evol.* 2004b. V. 21. P. 1463–1467.
- Serre D., Langaney A., Chech M. *et al.* No evidence of Neanderthal mtDNA contribution to early modern humans // *PLoS Biol.* 2004a. V. 2. № 3. P. 313–317.
- Shiroma C.Y., Fielding C.G., Lewis J.A. *et al.* Minimally destructive technique for sampling dentin powder for mitochondrial DNA testing // *J. Forensic Sci.* 2004. V. 49. № 4. P. 1–5.
- Shook B.A., Smith D.G. Using ancient mtDNA to reconstruct the population history of Northeastern North America // *Am. J. Phys. Anthropol.* 2008. V. 137. P. 14–29.
- Smith C.I., Chamberlain A.T., Riley M.S. *et al.* Neanderthal DNA: not just old but old and cold? // *Nature.* 2001. V. 410. P. 771–772.
- Smith C.I., Chamberlain A.T., Riley M.C. *et al.* The thermal history of human fossils and the likelihood of successful DNA amplification // *J. Hum. Evol.* 2003. V. 45. P. 203–217.
- Stoneking M. Ancient DNA: how do you know when you have it and what can you do with it? // *Amer. J. Hum. Genet.* 1995. V. 57. P. 1259–1262.
- Stringer C. Modern human origins: progress and prospects // *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B.* 2002. V. 357. P. 563–579.
- Stringer C.B., Andrews P. Genetic and fossil evidence for the origin of modern humans // *Science.* 1988. V. 239. P. 1263–1268.
- Tattersall I. Out of Africa: modern human origins special feature: human origins: out of Africa // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 16018–16021.
- Taylor G.M., Young D.B., Mays S.A. Genotypic analysis of the earliest known prehistoric case of tuberculosis in Britain // *J. Clin. Microbiol.* 2005. V. 43. P. 2236–2240.
- Thomas R.H., Schaffner W., Wilson A.C. Paabo S. DNA phylogeny of the extinct marsupial wolf // *Nature.* 1989. V. 340. P. 465–467.
- Tito R., Macmil S., Wiley G. *et al.* Phylotyping and functional analysis of two ancient human microbiomes // *PLoS ONE.* 2008. V. 3. № 11. e3703.
- Torrioni A., Achilli A., Macaulay V. *et al.* Harvesting the fruit of the human mtDNA tree // *Trends Genet.* 2006. V. 22. P. 339–345.
- Troy C.S., MacHugh D.E., Bailey J.F. *et al.* Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle // *Nature.* 2001. V. 410. P. 1088–1091.
- Underhill P.A., Kivisild T. Use of Y-chromosome and mitochondrial DNA population structure in tracing human migrations // *Annu. Rev. Genet.* 2007. V. 41. P. 539–564.
- Wang L., Oota H., Saitou N. *et al.* Genetic structure of a 2,500 years old human population in China and its spatiotemporal changes // *Mol. Biol. Evol.* 2000. V. 17. P. 1396–1400.
- Watanabe T., Ishiguro N., Nakano M. *et al.* Prehistoric introduction of domestic pigs onto the Okinawa islands: ancient mitochondrial DNA evidence // *J. Mol. Evol.* 2002. V. 55. P. 222–231.
- Watanabe T., Ishiguro N., Okumura N. *et al.* Ancient mitochondrial DNA reveals the origin of *Sus scrofa* from Rebun Island, Japan // *J. Mol. Evol.* 2001. V. 52. P. 281–289.
- Willerslev E., Cooper A. Ancient DNA // *Proc. R. Soc. Lond. B.* 2005. V. 272. P. 3–16.
- Willerslev E., Hansen A.J., Poinar H.N. Isolation of nucleic acids and cultures from ice and permafrost // *Trends Ecol. Evol.* 2004. V. 19. P. 141–147.
- Wolpoff M.H., Hawks J., Caspari R. Multiregional, not multiple origins // *Amer. J. Phys. Anthropol.* 2000. V. 112. P. 129–136.
- Wolpoff M.H., Hawks J., Frayer D.W., Hunley K. Modern human abcestry at the peripheries: a test of the replacement theory // *Science.* 2001. V. 291. P. 293–297.
- Woodward S.R., Weyand N.J., Bunell M. DNA sequence from Cretaceous period bone fragments // *Science.* 1994. V. 266. P. 1229–1232.
- Xie C.Z., Li C.X., Cui Y.Q. *et al.* Evidence of ancient DNA reveals the first European lineage in Iron Age Central China // *Proc. R. Soc. Lond. B.* 2007. V. 274. P. 1597–1601.
- Yao Y.G., Kong Q.P., Man X.Y. *et al.* Reconstructing the evolutionary history of China: a caveat about inferences drawn from ancient DNA // *Mol. Biol. Evol.* 2003. V. 20. P. 214–219.
- Zawicki P., Witas H.W. HIV-1 protective CCR5-Delta32 allele in medieval Poland // *Infect. Genet. Evol.* 2008. V. 8. P. 146–151.
- Zink A.R., Grabner W., Reischl U. *et al.* Molecular study of human tuberculosis in three geographically distinct and time delineated populations from ancient Egypt // *Epidemiol. Infect.* 2003. V. 130. P. 239–249.
- Zink A., Haas C.J., Reischl U. *et al.* Molecular analysis of skeletal tuberculosis in an ancient Egyptian population // 2001. *J. Med. Microbiol.* V. 50. P. 355–366.

PALEOGENETIC ANALYSIS IN ARCHAEOLOGICAL STUDIES

A.S. Pilipenko¹, V.I. Molodin², A.G. Romashchenko¹

¹Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: alexpil@bionet.nsc.ru;

²Institute of Archaeology and Ethnography, SB RAS, Novosibirsk, Russia

Summary

The article deals with the present-day methodological level of paleogenetics. The range of currently existing applications of molecular genetics to various types of archaeological materials and fruitful integration of ancient DNA analysis in multidisciplinary archaeological research are considered. Critical analysis of studies on DNA from archaeological materials, including those conducted by the author, is quoted. Further prospects of this line of inquiry are discussed.

Key words: paleogenetics, interdisciplinary approach in archaeology, ancient DNA, ethnogenesis reconstruction.

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МАРК/ЕРК-ЗАВИСИМОГО АЦЕТИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ В ЦНС ВЗРОСЛЫХ И ЮВЕНИЛЬНЫХ *HELIX* ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ДОЛГОВРЕМЕННОЙ ПАМЯТИ

А.Б. Данилова¹, П.Д. Лисачев², Л.Н. Гринкевич¹

¹ Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия;

² Конструкторско-технологический институт вычислительной техники СО РАН,
Новосибирск, Россия, e-mail: larisa_gr_spb@mail.ru

Животные, обладающие простой нервной системой, являются одним из основных объектов исследования молекулярно-клеточных механизмов памяти. Известно, что способность к формированию различных форм условных рефлексов как у позвоночных, так и у беспозвоночных животных созревает неравномерно в процессе онтогенеза. Так, у моллюска *Helix* созревание механизмов сенситизации, лежащей в основе пластичности оборонительных рефлексов, формируется после 3-месячного возраста. Поэтому для выявления критических звеньев механизмов долговременной памяти сравнительный онтогенетический подход является перспективным. Ранее нами было показано, что важную роль в формировании условного оборонительного рефлекса пищевой аверзии у взрослых *Helix* играет регуляторный каскад МАРК/ЕРК. У ювенильных животных (с незрелыми механизмами пластичности оборонительного поведения), подвергнутых процедуре обучения, активации МАРК/ЕРК, как и нижележащих транскрипционных факторов, не происходит.

В связи с важной ролью в функционировании клетки процессов ацетилирования задачей данного исследования являлось выяснение роли МАРК/ЕРК в индукции ацетилирования белков в ЦНС *Helix* в механизмах долговременной памяти. Методом Вестерн-блот анализа показано, что при формировании рефлекса пищевой аверзии в ЦНС взрослых животных индуцируется МАРК/ЕРК-зависимое ацетилирование белков с ММ 53кДа и 72кДа. У ювенильных животных изменений в ацетилировании этих белков при обучении не происходит. Стимулирование процессов ацетилирования у ювенильных животных введением ингибитора гистондеацетилаз бутирата натрия перед обучением индуцирует процесс ацетилирования белков с ММ 72кДа и, как показано нами ранее, приводит к улучшению формирования долговременной памяти. Полученные данные свидетельствуют о важной роли гистон-ацетилтрансфераз и гистондеацетилаз в регуляции ацетилирования белков в механизмах долговременной памяти у моллюска *Helix* и участии сигнального каскада МАРК/ЕРК в этих процессах.

Ключевые слова: ацетилирование негистоновых белков, МАРК/ЕРК, обучение, моллюск *Helix*, гистондеацетилазы.

Введение

Выяснение молекулярно-генетических механизмов обучения и памяти уже в течение длительного времени является одной из основных задач фундаментальной нейробиологии. Важную роль в исследовании этих механизмов благодаря уникальному строению ЦНС и размеру нейронов сыграли моллюски. На модели фасилитации синаптической связи между ней-

ронами Э. Канделом были обнаружены базовые механизмы пластичности (Kandel, 2001).

Показано, что как у моллюсков, так и у высших позвоночных животных значительную роль в формировании долговременной памяти играет внутриклеточный регуляторный каскад МАРК/ЕРК (Atkins *et al.*, 1998; Kandel, 2001). В нервной системе МАРК/ЕРК каскад контролирует процесс выживания нейронов, регенерацию отростков и синаптический спраунтинг

(Kaplan, Miller, 2000). Дисфункция MAPK/ERK является причиной ряда нейродегенеративных заболеваний (Kyoosseva, 2004). MAPK/ERK индуцирует фосфорилирование довольно широкого круга белков, в том числе ряда ДНК-связывающих транскрипционных факторов (ТФ) и гистонов. Активации ТФ и посттрансляционной модификации гистонов в последнее время отводится важное место в геном-зависимых пластических перестройках при обучении (Guan *et al.*, 2002; Levenson, Sweatt, 2006; Wood *et al.*, 2006; Sweatt, 2009).

Важнейшую роль в посттрансляционной модификации как гистонов, так и негистоновых белков играет также ацетилирование по лизину (Swank, Sweatt, 2001; Sweatt, 2009; Spange *et al.*, 2009). Уровень ацетилирования контролируется ферментами гистонацетилтрансферазами и гистондеацетилазами. Гистонацетилтрансферазы (НАТ) катализируют перенос ацетильной группы с ацетил-КоА на лизиновый остаток белков. Гистондеацетилазы (HDAC) контролируют деацетилирование. Ацетилированию могут подвергаться транскрипционные факторы, структурные и транспортные белки. Таким образом, ацетилирование регулирует многие процессы в клетке, в том числе перестройки цитоскелета, клеточный метаболизм и экспрессию генов. Известно, что ацетилированию кроме гистонов подвергается такой хорошо известный транскрипционный фактор, как p53, играющий важную роль в индукции апоптоза, а также транскрипционные факторы GATA-1, Myo-D и NFkB. При этом ацетилирование увеличивает их ДНК-связывающую активность и соответственно индуцирует транскрипцию (Spange *et al.*, 2009). Однако ацетилирование этих ТФ в связи с обучением остается неизученным.

В последнее время появились работы о возможном влиянии MAPK/ERK каскада на процессы не только фосфорилирования, но и ацетилирования. При этом может индуцироваться ацетилирование как гистонов, так и негистоновых белков (Levenson *et al.*, 2004; Wood *et al.*, 2006; Sweatt, 2009; Spange *et al.*, 2009). Однако данные носят довольно фрагментарный характер. Предполагается, что MAPK/ERK каскад может вовлекаться в индукцию процессов ацетилирования через активацию транскрипционного коактиватора CREB-связывающего

белка СВР, обладающего ацетил-трансферазной активностью. При этом дисфункция СВР приводит к невозможности формирования долговременной памяти (Alarcon *et al.*, 2004; Korzus *et al.*, 2004; Wood *et al.*, 2006).

Известно, что способность к формированию различных форм условных рефлексов как у позвоночных, так и у беспозвоночных животных созревает неравномерно в процессе онтогенеза (Nolen, Carew, 1988; Figuero *et al.*, 1996; Stark, Carew, 1999; Barbas *et al.*, 2003). Так, у моллюска *Helix* механизмы сенситизации, лежащей в основе пластичности оборонительных рефлексов, созревают после 3-месячного возраста (Balaban, 2002). Поэтому для выявления критических звеньев механизмов долговременной памяти сравнительный онтогенетический подход является перспективным.

Ранее нами была показана необходимость активации MAPK/ERK для формирования долговременной памяти у улиток *Helix lucorum*. При обучении взрослых животных наблюдается активация как MAPK/ERK, так и нижележащих ТФ, а ее дисфункция предотвращает формирование долговременной памяти (Гринкевич и др., 2006; Grinkevich *et al.*, 2008). У ювенильных животных с незрелыми механизмами формирования долговременных форм пластичности оборонительного поведения, подвергнутых процедуре обучения, в отличие от взрослых активации MAPK/ERK не наблюдается (Grinkevich *et al.*, 2008). Кроме того, у этих животных изменен состав нижележащих ТФ (Grinkevich *et al.*, 2003).

Таким образом, для выяснения роли MAPK/ERK каскада в индукции ацетилирования негистоновых белков в обучении в работе поставлена задача: провести сравнительные онтогенетические исследования статуса ацетилирования белков в ЦНС взрослых и ювенильных животных при выработке рефлекса пищевой аверзии у *Helix*.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на взрослых и ювенильных виноградных улитках *Helix lucorum*. В качестве модели обучения использовали условный рефлекс пищевого избегания (условный стимул – морковь, безусловный –

удар током 6 мА (для ювенильных 1 мА), предъявление сочетаний с интервалом 15 мин). Перед обучением животных 3 суток содержали без корма. После получения животными 8 пар стимулов (по 4 сочетания в день) спустя 1 час извлекали ЦНС и экстрагировали белки (буфер: 10 mM Трис-НСl pH 7,5, 1 mM EDTA, 2,5 mM натрийпирофосфат, 1 mM β -глицерофосфат, 0,1 mM PMSF, 1 % коктейль протеазных ингибиторов (Sigma), 0,1 mM Na_3VO_4 и 1 % Igepal CA-630). Для экстракции белков у ювенильных *Helix* в связи с их небольшими размерами объединяли ЦНС из 3 животных. Для изучения ацетилирования белков применяли метод Вестерн-блот-гибридизационного анализа с использованием антител к ацетилированному лизину. Концентрацию белка в экстрактах определяли по методу Брэдфорда. Экстракты, содержащие искомые белки, разделяли электрофорезом в 12 %-м полиакриламидном геле (система Лэмбли) на трис-глициновом буфере (pH 8,3) в присутствии 0,1 % SDS. Предварительно белковые пробы кипятили с буфером нанесения (50 mM Трис-НСl pH 6,7; 6 % SDS; 20 % глицерин; 8 % 2-меркаптоэтанол; 0,25 % бромфеноловый синий) в отношении 1 : 1. В качестве маркеров молекулярного веса использовали белки («Novex»). Разделенные белки переносили на нитроцеллюлозные фильтры. Для проверки качества переноса белков на мембрану использовали окрашивание Ронсеау. Нитроцеллюлозные фильтры после проведения процедур, уменьшающих неспецифическую сорбцию (инкубация с 3 %-м молоком), последовательно инкубировали в растворах, содержащих первичные и вторичные (конъюгированные с пероксидазой хрена) антитела согласно рекомендации фирмы «Amersham pharmacia biotech» (протокол для работы с ECL – western blotting analysis system). Инкубацию с первичными антителами осуществляли в течение ночи при 4 °С. Визуализацию и количественный анализ связавшихся антител проводили с использованием хемоллюминесцентного метода (система ECL, фирма «Amersham»). Рентгеновские пленки сканировали. Количественный анализ осуществляли при помощи компьютерной программы Gel-Pro Analyzer. В работе использовали первичные поликлональные антитела к ацетилированному лизину (Cell Signaling) в

разведении 1 : 1000. Вторичные антитела фирмы «Amersham» (ECL-система) применяли в разведениях 1 : 1500.

Для изучения возможной связи ацетилирования изучаемых белков с индукцией регуляторного каскада MAPK/ERK применяли ингибитор MEK-киназы, лежащей над ERK, PD98095 (40 μM).

Статистическая обработка проводилась методом ANOVA. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Результаты были представлены как значение \pm стандартная ошибка.

Результаты

В связи с важной ролью в функционировании клетки ацетилирования белков задачей данного исследования являлось выяснение роли регуляторного каскада MAPK/ERK в ацетилировании белков в ЦНС *Helix* при формировании условного рефлекса пищевой аверзии. В качестве подхода использовали сравнительное онтогенетическое исследование статуса ацетилирования белков у взрослых и ювенильных животных при обучении и влиянии на эти процессы ингибитора MEK киназы, предшествующей ERK, PD98095.

Анализ статуса ацетилирования белков в ЦНС взрослых виноградных улиток при выработке условного рефлекса пищевой аверзии

Ацетилирование белков оценивали методом Вестерн-блот анализа с применением антител к ацетилированному лизину. Эти антитела выявляют различные группы белков, содержащие ацетилированный лизин. Для нивелирования возможных погрешностей в переносе белка применяли антитела к MAPK/ERK-киназе, для которой был показан постоянный уровень экспрессии (Grinkevich *et al.*, 2008).

Анализ степени ацетилирования белков в ЦНС проводили спустя 1 час после обучения. Обнаружили 2 класса белков с молекулярной массой 72кДа и 53кДа, ацетилирование которых значительно изменяется спустя один час после обучения (рис. 1).

Для белков с молекулярным весом 72кДа: $F(1, 13) = 27,11$, $p < 0,0002$ (one-way Anova).

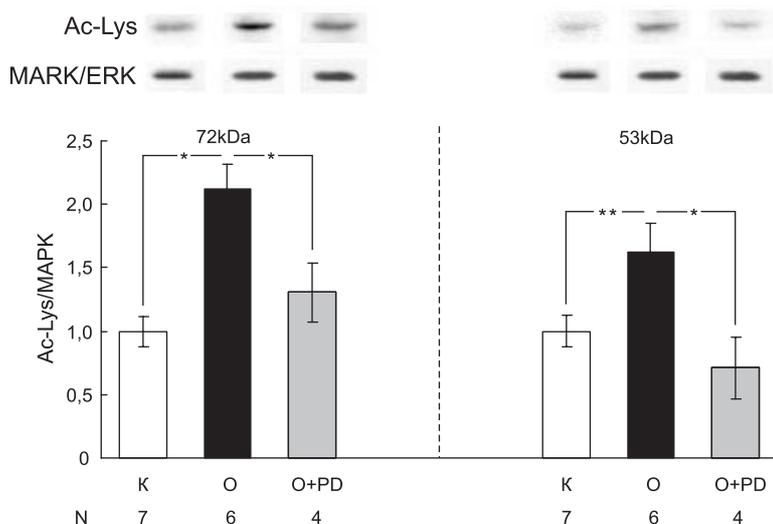


Рис. 1. Ацетилирование белков с молекулярным весом 72кДа и 53кДа в ЦНС взрослых улиток при обучении.

При обучении у взрослых улиток индуцируется ацетилирование белков с молекулярным весом 72кДа и 53кДа, которое снимается введением ингибитора MAPK/ERK-киназного каскада PD-98059. К – контроль, О – обучение, О+PD – обучение с введением PD-98059. * $p < 0,01$, ** $p < 0,03$ (Anova). По оси ординат – содержание ацетилированных белков 72кДа и 53кДа, отнесенное к MAPK/ERK и контролю.

Разница контроля с обучением достоверна при $p < 0,0001$ (тест Фишера). Для белков с молекулярным весом 53кДа: $F(1, 13) = 6,06$, $p < 0,03$ (one-way Anova). Разница контроля с обучением достоверна при $p < 0,03$ (тест Фишера).

С учетом важной роли MAPK/ERK-киназного каскада в формировании долговременной памяти у *Helix* (Grinkevich *et al.*, 2008) и данных литературы о возможности вовлечения этого каскада в индукцию ацетилирования (Swank, Sweatt, 2001; Sweatt, 2009), представлялось интересным проверить влияние MAPK/ERK на ацетилирование белков с 72кДа и 53кДа. Для того чтобы исследовать этот вопрос, улиткам за 30 минут до обучения был введен ингибитор MEK киназы, предшествующей ERK, PD98059 (40 μ M). Как видно из рис. 1, введение PD98059 снимает ацетилирование белков молекулярным весом как 72кДа, так и 53кДа. Для белка 72кДа: $F(2, 16) = 13,36$, $p < 0,0004$ (one-way Anova). Обучение достоверно отличается от обучения + PD при $p < 0,01$ (тест Фишера). Для белка 53кДа: $F(2, 16) = 5,26$, $p < 0,02$. Обучение достоверно отличается от обучения + PD при $p < 0,01$ (тест Фишера).

Таким образом, в процессе обучения взрослых улиток наблюдается MAPK/ERK-зависимая

индукция ацетилирования белков молекулярным весом 72кДа и 53кДа.

Анализ статуса ацетилирования белков в ЦНС ювенильных *Helix* при выработке условного рефлекса пищевой аверзии

Далее был проведен сравнительный анализ ацетилирования белков в ЦНС ювенильных улиток. Для этого использовали улиток возрастом 2–3 месяца, так как было показано, что они не способны к формированию долговременных форм оборонительных рефлексов (Balaban, 2002). В связи с малым размером ювенильных улиток для исследований объединяли ЦНС из 3 животных.

Показано, что у ювенильных улиток в отличие от взрослых индукции ацетилирования белков молекулярным весом 72кДа не происходит (рис. 2). Текущий эффект: $F(1, 4) = 3,77$, $p = 0,12$ (Anova). Также не наблюдалось ацетилирование белков 53кДа. Текущий эффект: $F(1, 4) = 0,01$, $p = 0,91$ (Anova).

С учетом полученных нами ранее данных о возможности стимулирования долговременной памяти *Helix* через индукцию процессов ацетилирования (статья на рецензии) введением

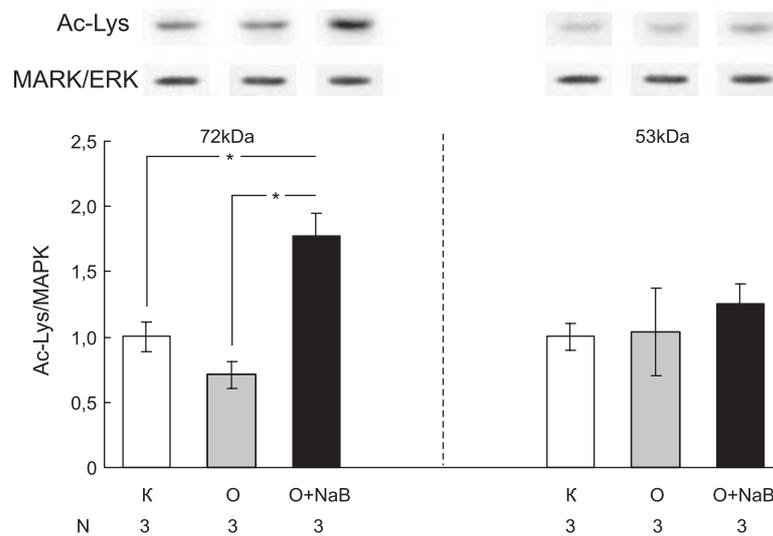


Рис. 2. Ацетилирование белков с молекулярным весом 72кДа и 53кДа в ЦНС ювенильных улиток при обучении.

У ювенильных улиток в отличие от взрослых индукция ацетилирования белков молекулярным весом 72кДа и 53кДа при обучении не происходит. Введение ювенильным улиткам блокатора деацетилаз бутирата натрия (NaB) стимулирует ацетилирование белка 72кДа, но не 53кДа. * $p < 0,01$ (Anova). К – контроль, О – обучение, О+NaB – обучение с введением бутирата натрия.

блокатора деацетилаз бутирата натрия (NaB) представлялось интересным проверить, влияет ли этот блокатор HDAC на ацетилирование белков 72кДа 53кДа. Было обнаружено, что введение бутирата натрия (NaB) стимулирует ацетилирование белков 72кДа в ЦНС ювенильных улиток (рис. 2, а). Текущий эффект: $F(2, 6) = 16,72, p < 0,004$ (Anova); контроль против обучения + NaB, $p < 0,01$, обучение против обучения + NaB, $p < 0,01$ (тест Фишера).

При этом стимулирование ацетилирования белка 53кДа введением бутирата натрия не наблюдается (рис. 2). Текущий эффект: $F(2, 6) = 0,37, p = 0,7$ (Anova). Обучение против обучения + NaB, $p = 0,52$ (тест Фишера).

Таким образом, у ювенильных улиток в отличие от взрослых при обучении не происходит индукции ацетилирования белков 72кДа и 53кДа. Введение блокатора деацетилаз бутирата натрия стимулирует ацетилирование белка 72кДа, но не влияет на ацетилирование белка 53кДа.

Обсуждение

В данном исследовании нами обнаружено, что при формировании рефлекса пищевой

аверзии в ЦНС взрослых *Helix* индуцируется MAPK/ERK-зависимое ацетилирование белков с ММ 53кДа и 72кДа. У ювенильных животных изменений в ацетилировании этих белков при обучении не происходит. Полученные данные свидетельствуют о важной роли процессов ацетилирования в обучении и зависимости ацетилирования белков с ММ 53кДа и 72кДа от индукции регуляторного каскада MAPK/ERK. Ранее нами показано, что дисфункция MAPK/ERK предотвращает формирование рефлекса пищевой аверзии у взрослых *Helix* и является одной из причин неспособности ювенильных животных к формированию долговременных форм пластичности оборонительного поведения (Grinkevich *et al.*, 2008). Таким образом, результаты нашей работы подтверждают данные Swank и Sweatt (2001) о возможности MAPK/ERK-зависимой индукции ацетилирования негистоновых белков.

Одним из возможных механизмов влияния MAPK/ERK каскада на индукцию процессов ацетилирования при обучении может быть вовлечение MAPK/ERK-зависимых протеинкиназ RSK и MSK в активацию коактиватора транскрипции CREB-связывающего белка CBP, обладающего ацетилтрансферазной активностью (Alarcon *et*

al., 2004; Korzus *et al.*, 2004; Wood *et al.*, 2006). Показано, что гистонацетилтрансферазы, в том числе и СВР, могут индуцировать ацетилирование как гистонов, так и негистоновых белков. С дисфункцией СВР связывают ментальные нарушения у больных с синдромом Рубинштейна–Тейби и невозможность формирования долговременной памяти у нокаутных мышей (Alarcon *et al.*, 2004; Korzus *et al.*, 2004).

К сожалению, функции белков с ММ 53кДа и 72кДа, посттрансляционная модификация которых происходит при обучении *Helix*, не известны. Это могут быть и группы белков со сходной молекулярной массой. В настоящее время описан ряд транскрипционных факторов, ацетилирование которых может влиять на экспрессию генов. Например, ацетилирование p53 (53кДа), играющего ключевую роль в регуляции апоптоза, повышает эффективность связывания ДНК и, таким образом, увеличивает экспрессию подконтрольных ему генов. Среди других молекул-кандидатов можно назвать GATA-1 (46кДа), Myo-D (45кДа) и E2F1 (47кДа). Предполагается, что ацетилирование этих ТФ может осуществляться через гистонацетилтрансферазу СВР.

Подтверждением важной роли MAPK/ERK являются полученные нами сведения об отсутствии у ювенильных животных с незрелыми механизмами пластичности оборонительных рефлексов изменений в ацетилировании белков 53кДа и 72кДа. Как отмечалось выше, у ювенильных животных при обучении MAPK/ERK не активируется (Grinkevich *et al.*, 2008). Таким образом, дисфункция MAPK/ERK каскада у ювенильных животных, предположительно связанная с незрелостью серотониновых рецепторов (Grinkevich *et al.*, 2008), через дисфункцию транскрипционного коактиватора СВР, может являться причиной недостатка экспрессии генов, необходимых для формирования долговременной памяти.

Интересными представляются полученные нами данные по стимулированию процессов ацетилирования у ювенильных животных введением блокатора гистондеацетилаз бутирата натрия. Ранее нами было обнаружено, что ингибитор деацетилаз бутират натрия стимулирует формирование долговременной памяти у ювенильных животных. В данной

работе показано, что введение бутирата натрия индуцирует процесс ацетилирования белков с ММ 72кДа, но не 53кДа. Учитывая, что бутират натрия ингибирует не все классы деацетилаз (Sweatt, 2009), представляется вероятным, что в процессы регуляции ацетилирования данных белков вовлечены разные классы деацетилаз. Наши исследования подтверждают уникальную работу Фишера о возможности улучшения долговременной памяти введением ингибиторов НДАС даже у животных со значительной потерей нейронов (Fischer *et al.*, 2007).

Полученные данные свидетельствуют о важной роли гистонацетилтрансфераз и гистондеацетилаз в регуляции ацетилирования белков при формировании долговременной памяти у моллюска *Helix* и участии внутриклеточного регуляторного каскада MAPK/ERK в этих процессах. Дисфункция MAPK/ERK каскада у ювенильных животных через нарушение процессов фосфорилирования и ацетилирования нижележащих белков-мишеней, в том числе ТФ и гистонов, может являться причиной недостатка экспрессии генов, необходимых для формирования долговременной памяти.

Работа поддержана грантом РФФИ № 08-04-01325.

Литература

- Гринкевич Л.Н., Лисачев П.Д., Баранова К.А., Харченко О.А. Сравнительный анализ активации MAPK/ERK-киназ в ЦНС животных, обладающих разной способностью к обучению // Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 2006. Т. 87. Вып. 6. С. 762–768.
- Alarcon J.M., Malleret G., Touzani K. *et al.* Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP +/- mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration // Neuron. 2004. V. 42. № 6. P. 947–959.
- Atkins C.M., Selcher J.S., Petraitis J.J. *et al.* The MAPK cascade is required for mammalian associative learning // Nat. Neurosci. 1998. V. 1. P. 602–609.
- Balaban P.M. Cellular mechanisms of behavioral plasticity in terrestrial snail // Neurosci. Biobehav. Rev. 2002. V. 26. № 5. P. 597–630.
- Barbas D., Des Croseillers L., Castellucci V.F. *et al.* Multiple serotonergic mechanisms contributing to sensitization in Aplysia: evidence of diverse

- serotonin receptor subtypes // *Learn. Mem.* 2003. V. 10. P. 373–386.
- Figurov A., Pozzo-Miller L.D., Olafsson P. *et al.* Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus // *Nature*. 1996. V. 381. P. 706–709.
- Fischer A., Sananbenesi F., Wang X. *et al.* Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodeling // *Nature*. 2007. V. 447. P. 178–182.
- Grinkevich L.N., Lisachev P.D., Merkulova T.I. Formation of AP-1 transcription factors during learning in *Helix* // *Neurosci. Behav. Physiol.* 2003. V. 33. P. 39–47.
- Grinkevich L.N., Lisachev P.D., Kharchenko O.A., Vasil'ev G.V. Expression of MAP/ERK kinase cascade corresponds to the ability to develop food aversion in terrestrial snail at different stages of ontogenesis // *Brain Res.* 2008. V. 1187. P. 12–19.
- Guan Z., Giustetto M., Lomvardas S. *et al.* Integration of long-term-memory-related synaptic plasticity involves bidirectional regulation of gene expression and chromatin structure // *Cell*. 2002. V. 111. № 4. P. 483–493.
- Kandel E.R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses // *Science*. 2001. V. 294. P. 1030–1038.
- Kaplan D.R., Miller F.D. Neurotrophins signal transduction in the nervous system // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2000. V. 10. P. 381–391.
- Korzus E., Rosenfeld M.G., Mayford M. CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation // *Neuron*. 2004. V. 42. № 6. P. 961–972.
- Kyosseva S.V. Mitogen-activated protein kinase signaling // *Intern. Rev. Neurobiol.* 2004. V. 59. P. 201–220.
- Levenson J.M., O'Riordan K.J., Brown K.D. *et al.* Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 40545–40559.
- Levenson J.M., Sweatt J.D. Epigenetic mechanisms: a common theme in vertebrate and invertebrate memory formation // *Cell. Mol. Life Sci.* 2006. V. 63. P. 1009–1016.
- Nolen T.G., Carew T.J. The cellular analog of sensitization in *Aplysia* emerges at the same time in development as behavioral sensitization // *J. Neurosci.* 1988. V. 8. P. 212–222.
- Spange S., Wagner T., Heinzl T., Kramer O.H. Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signaling at multiple levels // *Intern. J. Biochem. Cell Biol.* 2009. V. 41. P. 185–198.
- Stark L.L., Carew T.J. Developmental dissociation of serotonin-induced spike broadening and synaptic facilitation in *Aplysia* sensory neurons // *J. Neurosci.* 1999. V. 19. P. 334–346.
- Swank M.W., Sweatt J.D. Increased histone acetyltransferase and lysine acetyltransferase activity and biphasic activation of the ERK/RSK cascade in insular cortex during novel taste learning // *J. Neurosci.* 2001. V. 21. № 10. P. 3383–3391.
- Sweatt J.D. Experience-dependent epigenetic modifications in the central nervous system // *Biol. Psychiatry*. 2009. V. 65. P. 191–197.
- Wood M.A., Hawk J.D., Abel T. Combinatorial chromatin modifications and memory storage: A code for memory // *Lern. Mem.* 2006. V. 13. P. 241–244.

COMPARATIVE STUDY OF MAPK/ERK-DEPENDENT PROTEIN ACETYLATION IN THE CNS OF ADULT AND JUVENILE *HELIX* DURING LONG-TERM MEMORY FORMATION

A.B. Danilova¹, P.D. Lisachev², L.N. Grinkevich¹

¹ Pavlov Institute of Physiology RAS, St. Petersburg, Russia;

² Design Technological Institute of Digital Techniques, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: larisa_gr_spb@mail.ru

Summary

Animals with simple nervous systems are among the main model objects to study the molecular grounds of memory. It is known that the ability to form different conditioned reflexes does not mature simultaneously in the development of vertebrate and invertebrate animals. Thus, the sensitization mechanisms underlying the plasticity of the defensive reflexes in mollusk *Helix* become mature as late as 3 months after birth. Therefore, the ontogenetic

approach is very promising for detection of the principal units of long-term memory formation. We have shown the important role of the MAPK/ERK pathway in the formation of the conditioned food aversion reflex in the adult mollusk *Helix*. In juvenile animals possessing immature mechanisms of avoidance reflex plasticity, neither MAPK/ERK nor downstream TFs are activated after learning. The aim of this study is to investigate the role of the MAPK/ERK pathway in the induction of protein acetylation in *Helix* CNS during food aversion reflex formation. We applied here comparative ontogenetic approach.

Western blot analysis indicates that MAPK/ERK-dependent induction of the 53kDa и 72kDa protein acetylation occurs in the CNS of adult animals during food aversion formation. No change in acetylation of these proteins is recorded in juvenile snails after training. Stimulation of acetylation processes by injection of histone deacetylase (HDAC) inhibitor sodium butyrate prior training induces acetylation of 72kDa proteins in juveniles and, as shown before, improves long-term memory formation. Our data suggest an important role of histone acetyltransferases (HATs) and HDACs in the regulation of protein acetylation during long-term memory formation in *Helix* and involvement of the MAPK/ERK regulatory pathway in these processes.

Key words: nonhistone protein acetylation, MAPK/ERK, learning, mollusk *Helix*, histone deacetylases.

АКТИВАЦИЯ КОНСТИТУТИВНОГО РЕЦЕПТОРА АНДРОСТАНОВ И ПОВЫШЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ЕГО ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ В ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ ПОД ДЕЙСТВИЕМ *ОРТО*-АМИНОАЗОТОЛУОЛА

М.А. Сметанина^{1,2}, М.Ю. Пахарукова¹, Т.И. Меркулова¹

¹ Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: maria.smetanina@gmail.com;

² Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA

Промышленный аминоазокраситель *орто*-аминоазотолуол (ОАТ) широко известен как канцероген для грызунов и считается потенциальным канцерогеном для человека. Механизм действия этого соединения остается неясным. Изучена вовлеченность конститутивного рецептора андростанов (CAR) в реализацию эффектов ОАТ. С использованием mCAR-репортерной системы показано, что в клетках гепатобластомы человека (HepG2) транскрипционная активность этого рецептора увеличивалась под действием ОАТ и что этот эффект является специфическим, так как другой азокраситель, 3'-метил-4-диметил-аминоазобензол (3'-MeДАБ), не активировал mCAR. С использованием мышей дикого типа (*car*^{+/+}) и CAR-нокаутных (*car*^{-/-}) мышей линии C57BL/6 было установлено CAR-зависимое увеличение экспрессии в печени под действием ОАТ следующих генов: *Cyp2b10*, *Cyp2c29*, *Cyp3a11*, *Ugt1a1*, *Mrp4*, *Mrp2* и *c-Мус*. Методом иммуногистохимии на срезах печени мышей выявлено, что ОАТ увеличивает пролиферацию гепатоцитов CAR-зависимым образом. Исследования показывают, что mCAR является ксеносенсором для ОАТ и по крайней мере часть эффектов этого соединения реализуется через этот ядерный рецептор.

Ключевые слова: *Орто*-аминоазотолуол (ОАТ), аминоазокрасители, конститутивный рецептор андростанов (CAR), гены-мишени, пролиферация гепатоцитов.

Введение

Орто-аминоазотолуол (ОАТ) используется в промышленности для окрашивания масел, жиров и восков (National Toxicology Program, 2002), в производстве других красителей, а также в фармацевтике (Hazardous Substances ..., 2001). ОАТ может попадать в окружающую среду со сточными водами и при вентиляционных выбросах в процессе его производства и использования. За последние несколько десятилетий получено большое количество данных о канцерогенной активности ряда аминоазокрасителей. В частности, ОАТ известен как мышинный канцероген (Каледин и др., 1978; Каледин и др., 1985). Кроме того, ОАТ был оценен Международным агентством по изучению рака (IARC) как возможный канцероген (класса 2B) для человека (International ..., 1975).

Поскольку азокрасители обладают выраженной видовой и линейной специфичностью канцерогенного действия (Каледин и др., 1990), они являются удобной моделью для изучения механизмов предрасположенности к развитию опухолей. Так, ОАТ с высокой частотой индуцирует опухоли печени у ряда линий мышей, таких, как SWA, SWR, DBA/2, A/He, DD, и слабо действует на крыс и мышей других линий (AKR и CC57Br) (Каледин, Захарова, 1984; Каледин и др., 1990). А его структурный аналог – гепатоканцерогенный для крыс 3'-метил-4-диметиламиноазобензол (3'-MeДАБ) – почти не вызывает опухоли у мышей (Merkulova *et al.*, 2005). Механизмы гепатоканцерогенного действия этих соединений все еще остаются неясными. Известно, что при попадании в организм они активируют систему биотрансформации в печени, а именно: ферменты I фазы метаболизма ксенобиотиков (цитохромы

P450), II фазы (такие, как УДФ-глюкуронозилтрансферазы и сульфотрансферазы) и транспортеры ксенобиотиков (Mikhailova *et al.*, 2005). Экспрессия печеночных ферментов биотрансформации и транспортеров регулируется ксенобиотик-чувствительными транскрипционными факторами: Ah рецептором (Aryl-hydrocarbon receptor, Ah-R), X рецептором прегнанов (Pregnane X Receptor, PXR), конститутивным рецептором андростанов (Constitutive Androstane Receptor, CAR) и др. (Pascussi *et al.*, 2008).

Ранее нами была показана видоспецифическая активация CAR под действием ОАТ у мышей и под действием 3'-МеДАБ – у крыс (Пахарукова и др., 2007). CAR (NR1H3) является членом суперсемейства ядерных рецепторов гормонов и известен как «ксеносенсор» (Choi *et al.*, 1997). Активность CAR может модулироваться широким кругом структурно различных веществ (Chang, Waxman, 2006), воздействие которых на данный рецептор может отличаться между видами (Moore *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2002). Наши исследования показали также, что ОАТ и 3'-МеДАБ способны конкурировать с известным лигандом CAR – андростенолом за связывание с белками цитозоля клеток печени мышей и крыс соответственно (Пахарукова и др., 2007).

В связи с полученными результатами большой интерес представляет изучение влияния ОАТ и 3'-МеДАБ на трансактиваторные свойства CAR и экспрессию его генов-мишеней у мышей и крыс. В данной работе мы изучили влияние ОАТ и 3'-МеДАБ на активность CAR мыши (mCAR) в его репортерной системе, их влияние на экспрессию ряда генов-мишеней CAR в печени мышей дикого типа (*car*^{+/+}) и CAR-нокаутных мышей (*car*^{-/-}), а также исследовали пролиферацию гепатоцитов через длительные сроки после введения ОАТ этим животным.

Материалы и методы

Реагенты

Использовали *Орто*-аминоазотолуол (ОАТ) и 1,4-бис-[2-(3,5-дихлоропиридилокси)]бензол (ТСРОВОР) фирмы Sigma-Aldrich Inc. (США); 3'-Метил-4-диметиламиноазобензол – фирмы ABCR GmbH&Co.KG (Германия); 5 α -Андростан-3 α -ол – фирмы Steraloids Inc. (США).

Трансактивационный анализ

Плазмида, экспрессирующая CAR мыши (pCMX-mCAR) (Forman *et al.*, 1998), контрольная плазмида pCMX и репортерная плазмида LXRE-TK-Luc (Tzamelis *et al.*, 2000) были любезно предоставлены доктором Дэвидом Муром (David D. Moore, Baylor College of Medicine, Хьюстон, США). Плазмида pCMX- β -галактозидаза синтезирована в Promega (США). Трансактивационный анализ проводили согласно протоколу (Hernandez *et al.*, 2007). Клетки гепатобластомы человека (HepG2) (American Type Culture Collection, Rockville MD) культивировали в атмосфере 5 %-го углекислого газа при 37 °C в культуральной среде DMEM, дополненной 10 %-й эмбриональной бычьей сывороткой (FBS) и 1 %-й смесью пенициллин/стрептомицин (50 ед./мл). Клетки высевали в 24-луночные планшеты (около 100000 на лунку) за 24 ч до трансфекции. 200 нг pCMX-mCAR либо pCMX трансфицировали в клетки вместе с 200 нг LXRE-TK-Luc и 100 нг pCMX- β -галактозидазы, используя липофектамин («lipofectamine plus» reagent, GIBCO BRL). Спустя 12 ч клетки промывали D-PBS (GIBCO®/Invitrogen) и добавляли культуральную среду, содержащую ОАТ или 3'-МеДАБ в концентрациях от 0,5 до 200 мкМ или 500 нМ ТСРОВОР в комбинации с 10 мкМ андростенолом (обратным агонистом CAR, подавляющим конститутивную активность рецептора и увеличивающим чувствительность анализа (Forman *et al.*, 1998)). Все вещества растворяли в ДМСО, конечная концентрация которого в среде составляла 0,1 %. В контроле в среду вносили ДМСО до концентрации 0,1 %. После инкубации в течение 12 ч клетки лизировали и определяли активность огненной люциферазы и β -галактозидазы при помощи Dual-Luciferase reporter assay system (Promega, США) согласно инструкциям производителя на люминометре (MLX Microliter® Plate Luminometer, «DYNEX Technologies», США). Активность люциферазы нормализовали на активность β -галактозидазы.

Животные

В работе были использованы мыши-самцы дикого типа (*car*^{+/+}) линии C57BL/6 и CAR-но-

каутные мыши (*car^{-/-}*) той же линии. Мышей разводили в виварии для трансгенных животных Бэйлор колледжа медицины (Baylor College of Medicine, Хьюстон, США) в свободной от патогенов среде при 12-часовом темновом/световом цикле при свободном доступе к воде и пище. Все эксперименты проводили согласно протоколу об использовании и охране животных данного Института.

Для анализа экспрессии генов 8–10-недельным CAR-нокаутным мышам и мышам дикого типа внутрибрюшинно вводили ОАТ или 3'-МеДАБ (225 мг на 1 кг массы тела). Контрольным животным вводили растворитель (кукурузное масло). ТСРОВОР (3 мг на 1 кг массы тела) был использован в качестве положительного и отрицательного контроля для мышей дикого типа и CAR-нокаутных мышей соответственно. Животных умерщвляли цервикальной дислокацией спустя 3 ч (в случае выделения РНК) или 6 ч (в случае выделения белков) после введения исследуемых веществ. Печень изымали, разрезали на несколько кусков и хранили при -80°C до использования.

Для изучения пролиферации гепатоцитов 13-дневным CAR-нокаутным мышатам, а также мышатам дикого типа внутрибрюшинно вводили ОАТ (225 мг на 1 кг массы тела) или кукурузное масло в качестве контроля. Через 7 месяцев после обработки мышам за 2 ч до забоя вводили раствор бромдезоксипридина (BrdU, 50 мг на 1 кг массы тела). После забоя мышей и их печени взвешивали. Печеночный индекс вычисляли как отношение массы печени к массе тела мыши. Срезы свежей печени использовали для иммуногистохимического анализа.

ПЦР в режиме реального времени

РНК выделяли с помощью набора TRIzol (Invitrogen, США) согласно протоколу производителя. Целостность РНК подтверждали визуализацией интактных 18S и 28S рРНК при УФ излучении. Концентрацию РНК в каждом образце измеряли при длине волны 260 нм. Синтез кДНК проводили при помощи набора SuperScriptTM III RT (Invitrogen, США). Количественную ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием машины ABI

PRISM 7700 Sequence Detection SystemTM (Applied Biosystems Inc., США) и наборов SYBR Green либо Taq Man Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Праймеры (и пробы) подбирали с помощью программы Primer Express версии 3.0 (Applied Biosystems, США), синтез олигонуклеотидов осуществлен в Sigma-Genosys (США). Последовательности праймеров доступны по востребованию. Значение экспрессии изучаемого гена для каждого образца (представленного трипликатом) было нормализовано на соответствующее ему значение экспрессии гена домашнего хозяйства GAPDH. За основу для расчетов был взят метод стандартных кривых (Bookout *et al.*, 2006).

Вестерн-блот анализ

Замороженные кусочки печени разрушали ультразвуком в охлажденном на льду лизирующем буфере (25 мМ Трис-НСl (рН 7,4), 10 мМ ортованадат натрия, 10 мМ пиродифосфат натрия, 100 мМ фторид натрия, 10 мМ ЭДТА, 10 мМ ЭГТА, и 1 мМ фенил-метил-сульфонил фторид). Аликвоты белков (по 30 мкг) фракционировали в ступенчатом ПААГ (NuPAGE[®] Novex[®] 10 % Bis-Tris Mini Gel, Invitrogen, США) и переносили на мембрану Hybond-P PVDF Transfer Membrane (Amersham Biosciences, США) при помощи прибора iBlotTM Dry-Blotting System (Invitrogen, США). Мембрану инкубировали с первичными кроличьими антителами к Сур2b10 и мышинными антителами к с-Мус в разведении 1 : 450 и 1 : 500 соответственно в буфере TBS-T (20 мМ трис-НСl, рН = 7,6, 137 мМ NaCl, 0,1 % – 0,5 % Tween20). Кроличьи антитела к β -актину использовали в качестве контроля нанесения. После инкубации мембраны отмывали и инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена в разбавлении 1 : 5000 в буфере TBS-T. Снова повторяли отмывку и визуализовали с использованием реагентов набора SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, США) на проявочной машине Kodak X-OMAT 2000 processor (Kodak Inc., США). Денситометрический анализ проводили с помощью программы LabWorks image analysis software (UVP laboratory products, США).

Иммуногистохимический анализ

В качестве первичных антител были использованы мышинные моноклональные антитела к бромдезоксипуридину (BrdU) (Dako North America Inc., США). В качестве вторичных антител были использованы биотинилированные лошадиные антитела к IgG (H+L) мыши (Vector Laboratories Inc., США). Залитые парафином срезы печени (толщиной 5 мкм) депарафинизировали и дегидратировали. Для окрашивания BrdU-положительных гепатоцитов использовали Vectastatin Elite ABC kit (Vector Laboratories Inc., США), следуя инструкциям производителя. Иммуногистохимическое окрашивание визуализировали при 20× увеличении светового микроскопа Nikon Eclipse E400, оборудованного цветной видеокамерой Sony ExWaveHAD 3CCD. Индекс включения бромдезоксипуридина выражает соотношение BrdU-положительных ядер к 100 ядрам.

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили в пакете программ Microsoft Office Excel 2003 с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты

ОАТ специфически усиливает трансактиваторную способность mCAR

Для того чтобы установить, активирует ли ОАТ mCAR *in vitro*, клетки HepG2 котрансфицировали плазмидой, экспрессирующей полноразмерный CAR мыши (mCAR) и CAR-репортерной плазмидой, экспрессирующей ген люциферазы под контролем CAR-чувствительного элемента. Как показано на рис. 1, а, ОАТ активировал mCAR уже при концентрации 0,5 мкМ. С возрастанием концентрации ОАТ активность mCAR постепенно увеличивалась. При концентрации 200 мкМ наблюдалась максимальная активность рецептора. В качестве положительного контроля был использован известный агонист и лиганд CAR – ТСРОВОР в дозе 500 нМ. Для достижения эффекта, аналогичного эффекту ТСРОВОР, потребовалась концентрация ОАТ в 200 раз большая (рис. 1, а).

При этой концентрации транскрипционная активность mCAR увеличивалась в 4,4 раза по сравнению с контролем (рис. 1, а, б). Однако структурный аналог ОАТ, но неканцерогенный для мышей 3'-МеДАБ не активировал mCAR ни при 100, ни при 200 мкМ (рис. 1, б). Таким образом, наши эксперименты демонстрируют, что ОАТ является специфичным активатором mCAR, хотя и менее сильным, чем ТСРОВОР.

ОАТ влияет на уровень мРНК ряда генов-мишеней CAR в печени мышей

Известно, что CAR регулирует многие гены метаболизма ксенобиотиков, а также ряда генов пролиферации и апоптоза. Методом ПЦР в реальном времени мы оценили изменение экспрессии под воздействием ОАТ следующих генов: I фазы метаболизма ксенобиотиков

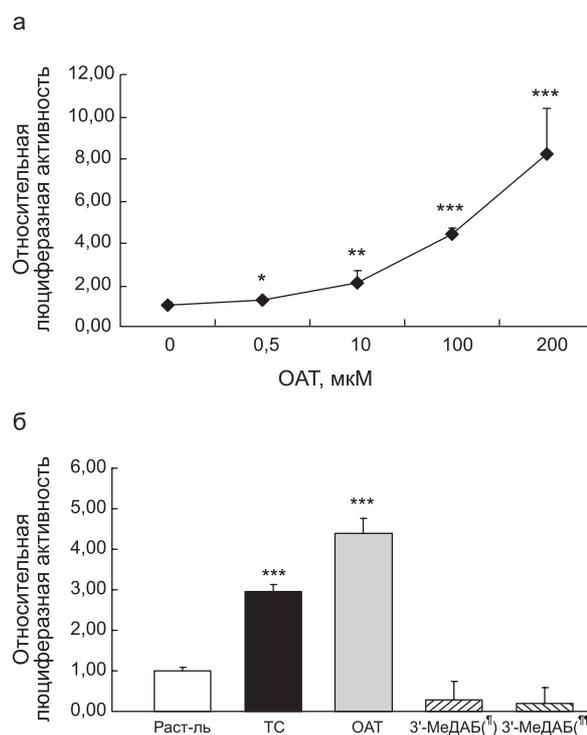


Рис. 1. ОАТ активирует mCAR в клетках HepG2.

а – дозозависимая активация mCAR под действием ОАТ; б – эффекты ОАТ (100 мкМ), ТСРОВОР (ТС, 0,5 мкМ) и 3'-МеДАБ (100⁽¹⁾ или 200⁽²⁾ мкМ) на трансактивацию mCAR. Приведены результаты одного из трех независимых экспериментов, в каждом из которых $n = 4$ для группы клеток, обрабатываемых исследуемым веществом. Данные, помеченные звездочками, указывают на достоверную разницу по сравнению с контролем (растворителем) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, согласно t-критерию Стьюдента).

(*Cyp2b10*, *Cyp2c29* и *Cyp3a11*); II фазы метаболизма ксенобиотиков (*Ugt1a1* и *NADPH CYP450 oxidoreductase*); транспорта ксенобиотиков (*Mrp2* и *Mrp4*); регуляции апоптоза (*Mdm2*), клеточного цикла (*Cyclin D1*) и пролиферации (*c-Myc*). Все эти гены являются генами-мишенями CAR (Honkakoski *et al.*, 1998; Xie *et al.*, 2000; Goodwin *et al.*, 2001; Smirlis *et al.*, 2001; Kast *et al.*, 2002; Maglich *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2002; Ledda-Columbano *et al.*, 2003; Assem *et al.*, 2004; Columbano *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005; Hernandez *et al.*, 2006; Urquhart *et al.*, 2007; Blanco-Bose *et al.*, 2008;

Buckley, Klaassen, 2009; Ross *et al.*, 2009). Для 7 из 10 изученных нами генов была показана CAR-зависимая индукция под действием ОАТ. Радикальное повышение экспрессии под влиянием ОАТ было зарегистрировано для гена *Cyp2b10* – в 42,3 раза (рис. 2, а). 3'-МеДАБ повышал уровень мРНК этого гена лишь в 3,8 раза. На CAR-нокаутных мышах действия ОАТ на экспрессию мРНК *Cyp2b10* не наблюдалось (рис. 2, б), а 3'-МеДАБ повышал ее экспрессию почти в 7 раз. Следовательно, ОАТ повышает экспрессию мРНК *Cyp2b10* через CAR, а действие 3'-МеДАБ на экспрессию этого гена

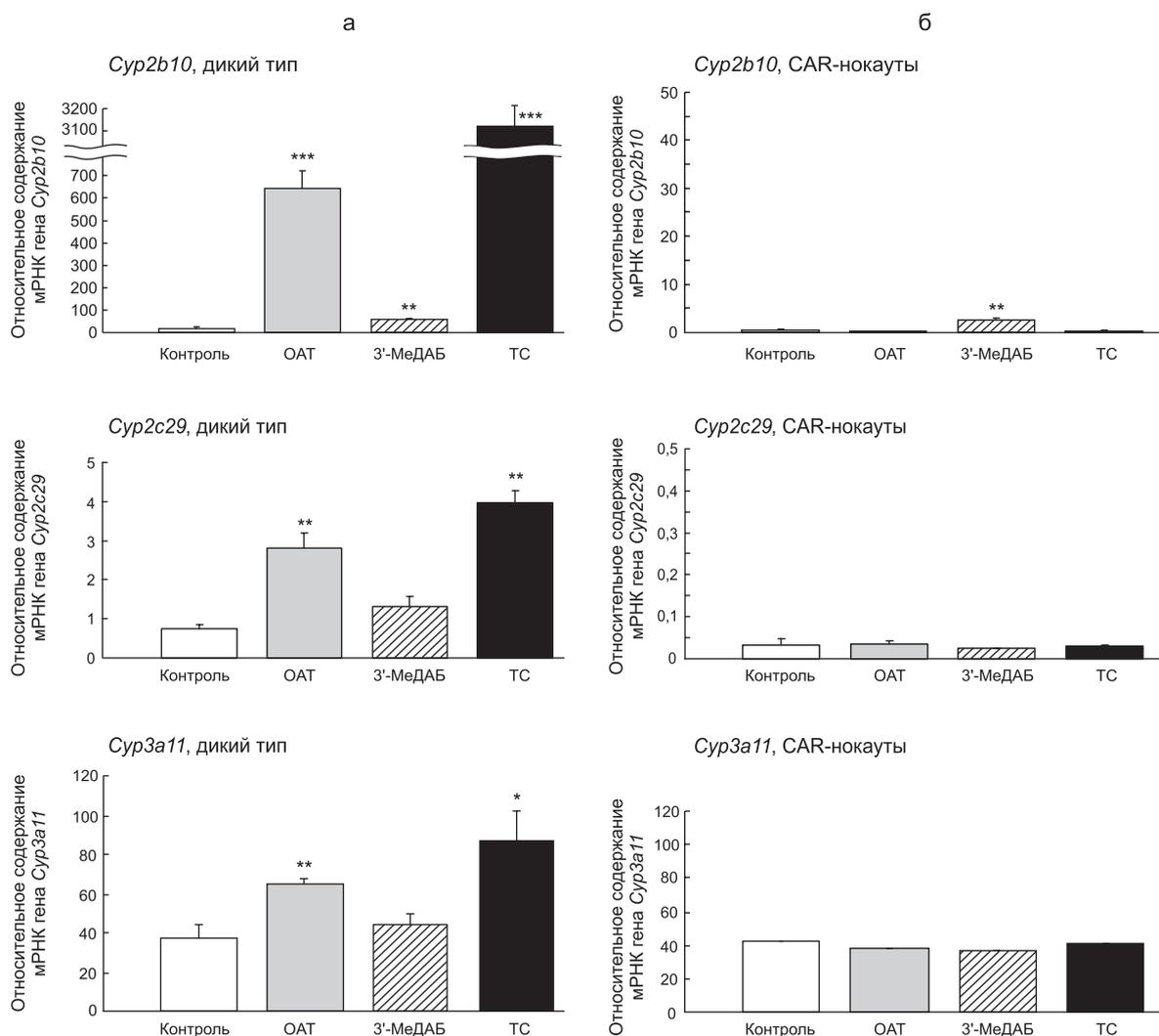


Рис. 2. Влияние ОАТ и 3'-МеДАБ на уровень мРНК генов *Cyp2b10*, *Cyp2c29*, *Cyp3a11* в печени мышей дикого типа (а) и CAR-нокаутных мышей (б).

Здесь и на рис. 3: измерения уровней мРНК соответствующих генов проводили методом ПЦР в реальном времени. В качестве внутреннего контроля взят ген домашнего хозяйства GAPDH. Столбцы на диаграммах соответствуют средним значениям по группе из 3 животных \pm CO, образец от каждого животного представлен в трех повторах. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

осуществляется CAR-независимым образом. Для ряда генов уровень мРНК после введения ОАТ мышам дикого типа возрастал существенно меньше: *Cyp2c29* (4,3 раза), *Cyp3a11* (1,75 раза), *Ugt1a1* (1,42 раза), *Mrp4* (1,68 раза) и *Mrp2* (2,22 раза), *c-Myc* (1,62 раза) (рис. 2, 3, а). На CAR-нокаутных мышах индукции этих генов в ответ на ОАТ не было обнаружено (рис. 2, 3, б). В отличие от ОАТ 3'-МеДАБ не влиял на экс-

прессию всех этих генов. Остальные гены (*NADPH CYP450 oxidoreductase*, *Mdm2* и *Cyclin D1*) не отреагировали на воздействие ни ОАТ, ни 3'-МеДАБ (данные не приведены).

Таким образом, наши данные демонстрируют, что индукция транскрипции *Cyp2b10*, *Cyp2c29*, *Cyp3a11*, *Ugt1a1*, *Mrp4*, *Mrp2* и *c-Myc* под воздействием ОАТ осуществляется через CAR.

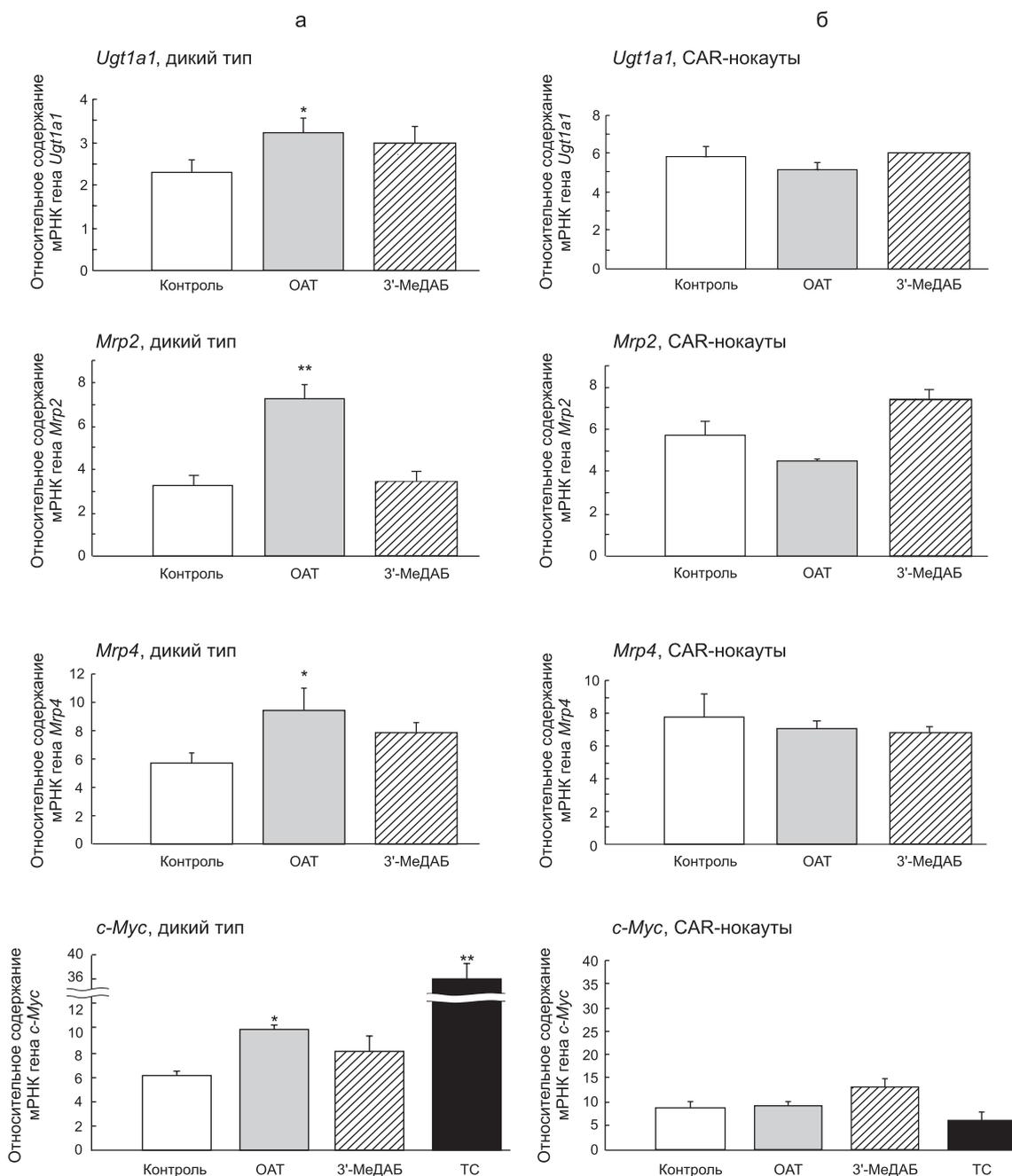


Рис. 3. Влияние ОАТ и 3'-МеДАБ на уровень мРНК генов *Ugt1a1*, *Mrp4*, *Mrp2* и *c-Myc* в печени мышей дикого типа (а) и CAR-нокаутных мышей (б).

ОАТ влияет на уровень белков *Cyp2b10* и *c-Мус* в печени мышей *CAR*-зависимым образом

Для генов *Cyp2b10* (как общеизвестного биомаркера активации *CAR*) и *c-Мус* (как потенциального звена в пролиферативных эффектах ОАТ, опосредуемых *CAR*) было проведено исследование изменения содержания их белковых продуктов в ответ на ОАТ в печени мышей дикого типа и *CAR*-нокаутных мышей. На рис. 4 представлены результаты Вестерн-блот анализа белков лизатов клеток печени контрольных и обработанных ОАТ животных. Из рис. 4, а видно, что уровень белков *Cyp2b10* и *c-Мус* в печени мышей дикого типа под действием ОАТ значительно увеличивался по сравнению с контролем (в 18 и 3 раза соответственно, согласно данным денситометрии). Таким образом, уровень индукции *Cyp2b10* и *c-Мус* под влиянием ОАТ согласуется с уровнем индукции соответствующих транскриптов (рис. 2, а и 3, а). В печени *CAR*-нокаутных мышей (рис. 4, б) под действием ОАТ не было обнаружено никаких изменений в содержании белков *Cyp2b10* и *c-Мус*, как и в случае содержания мРНК этих генов (рис. 2, б и 3, б). Полученные данные демонстрируют, что индукция *Cyp2b10* и *c-Мус* под влиянием ОАТ как на уровне мРНК, так и на уровне белка, является *CAR*-зависимой.

CAR вовлечен в пролиферацию гепатоцитов, индуцированную ОАТ

Пролиферация клеток является необходимым процессом в развитии химически индуцированных опухолей. Хорошо известным регуляторным

белком, задействованным в процессе пролиферации, является онкопротеин *c-Мус* (Dose, Goupari, 2009). Мы показали *CAR*-зависимое увеличение уровней мРНК и белка *c-Мус* в печени в ответ на гепатоканцерогенный для мышей ОАТ. Это дает возможность предполагать, что *CAR* может быть вовлечен в ОАТ-индуцированную пролиферацию гепатоцитов. Поэтому мы исследовали влияние ОАТ на пролиферацию гепатоцитов у мышей дикого типа по сравнению с *CAR*-нокаутными мышами. Результаты, представленные на рис. 5, демонстрируют, что у мышей дикого типа ОАТ увеличивает количество гепатоцитов, вошедших в S-фазу, почти в 7 раз. У *CAR*-нокаутных мышей под воздействием ОАТ изменений в пролиферативном статусе гепатоцитов не наблюдали. Включение BrdU в клетки печени *CAR*-нокаутных мышей, обработанных ОАТ, было сравнимо с таковым у необработанных мышей дикого типа. Таким образом, мы показали, что однократное введение ОАТ индуцирует пролиферацию гепатоцитов у мышей дикого типа, но не у *CAR*-нокаутных мышей, и, следовательно, конститутивный рецептор андростанов ответствен за этот процесс. Также мы наблюдали достоверное, хотя и небольшое, увеличение печеночного индекса (отношение массы печени к массе тела) под действием ОАТ у мышей дикого типа в сравнении с *CAR*-нокаутными мышами. Кроме того, была получена одна опухоль у мыши дикого типа, у *CAR* нокаутных мышей опухолей не обнаружено.

Обсуждение

До недавнего времени работы, посвященные изучению механизмов действия азокрасителей,

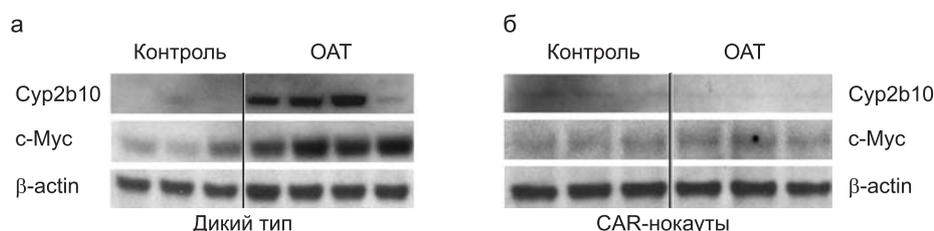


Рис. 4. Влияние ОАТ на уровень белков *Cyp2b10* и *c-Мус* в печени мышей дикого типа (а) и *CAR*-нокаутных мышей (б).

ОАТ вводили животным внутрибрюшинно за 6 ч до забоя. Вестерн-блот анализ белков лизатов клеток печени выполнен с помощью антител к *Cyp2b10*, *c-Мус* и β -актину. Каждая дорожка соответствует образцу из печени одной мыши.



Показатели	Дикий тип		CAR-нокауты	
	кукурузное масло	ОАТ	кукурузное масло	ОАТ
Печеночный индекс	0,0461 ± 0,0028 (3)	0,0476 ± 0,0032 (9)	0,0390 ± 0,0010 (3)	0,0441 ± 0,0027 (9)*
BrdU+ клетки, %	2,3428 ± 1,3831 (3)	16,0105 ± 8,4626 (9)#	1,5588 ± 0,3401 (3)	1,9628 ± 0,4743 (9)**

Рис. 5. Разница в пролиферации гепатоцитов между мышами дикого типа и CAR-нокаутными мышами в ответ на ОАТ.

Включение BrdU оценено методом иммуногистохимического анализа срезов печени мышей. Печеночные индексы (отношение массы печени к массе тела) и BrdU-положительные клетки (%) измерены у 9 или 3 животных (числа указаны в скобках) на группу ± СО. Статистический анализ выполнен с помощью t-критерия Стьюдента (CAR-нокауты в сравнении с диким типом после введения одинакового раствора: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; ОАТ против кукурузного масла: # $p < 0,05$).

были сфокусированы на активации Ah-рецептора (AhR) этими соединениями (Beischlag *et al.*, 2008). Като и др. (Kato *et al.*, 2002) показали, что более половины из 35 изученных ими азокрасителей активировали AhR. Также было показано, что несколько азокрасителей конкурировали с [3H]тетрахлородибензо-*p*-диоксин (ТХДД) за связывание с AhR, причем наиболее эффективными в этом отношении оказались ОАТ и 3-метокси-4-аминоазобензол (Cheung *et al.*, 1994). Другие рецепторы ксенобиотиков, которые также могли бы быть потенциальными ксеносенсорами аминокрасителей, до последнего времени оставались вне поля зрения исследователей. Недавно в нашей лаборатории было показано, что ОАТ увеличивал ДНК-связывающую активность CAR и конкурировал с природным лигандом mCAR андростенолом за

связывание с белками цитозоля клеток печени мышей (Пахарукова и др., 2007). Мы предполагаем, что ОАТ может быть либо лигандом mCAR, либо непрямым агонистом, действуя на этот рецептор опосредованно.

Известно, что активность mCAR может быть модулирована широким кругом структурно различных веществ (Chang, Waxman, 2006). Среди таких веществ есть агонисты, которые могут быть как лигандами этого рецептора (ТСРОВОР (Tzamelis *et al.*, 2000), – меклизин (Huang *et al.*, 2004), клотримазол (Moore *et al.*, 2000; Makinen *et al.*, 2003)), так и непрямыми активаторами (фенобарбитал (Honkakoski *et al.*, 1998; Kawamoto *et al.*, 1999), ацетаминофен (Zhang *et al.*, 2002), фенитоин (Jackson *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004), билирубин (Huang *et al.*, 2003); нонилфенол (Hernandez *et al.*, 2007) и др.). Среди веществ,

которые изменяют активность CAR, существуют также антагонисты. Два андростановых метаболита, 5 α -андрост-16-ен-3 α -ол (андростенол) и 5 α -андростан-3 α -ол (андростанол), были идентифицированы как лиганды CAR, которые подавляют его конститутивную активность (Fogman *et al.*, 1998). Подобным образом прогестерон и тестостерон подавляют конститутивную активность CAR, но при гораздо больших концентрациях (Swales, Negishi, 2004).

Выявление новых веществ, способных влиять на активность CAR и изменять экспрессию его специфических генов-мишеней, позволит лучше понять природу ответа на действие ксенобиотиков. До нас роль CAR как ксеносенсора в опосредовании эффектов ОАТ никто не изучал. Наши предыдущие исследования указывают на возможную вовлеченность CAR в механизм действия этого соединения. Данная работа демонстрирует, что конститутивный рецептор андростанов действительно участвует в реализации эффектов ОАТ. Во-первых, эксперименты по трансфекции CAR показали, что его транскрипционная активность увеличивается под действием ОАТ специфическим образом, так как другой азокраситель, 3'-МеДАБ, не активировал mCAR. Во-вторых, наши результаты показали, что ОАТ индуцирует экспрессию ряда генов-мишеней CAR: *Cyp2b10*, *Cyp2c29*, *Cyp3a11*, *Ugt1a1*, *Mrp4*, *Mrp2* и *c-Мус*. Мы показали индукцию экспрессии этих генов в ответ на ОАТ у мышей дикого типа, но не у CAR-нокаутных мышей. Однако ряд выбранных нами генов-мишеней CAR (такие, как *NADPH CYP450 oxidoreductase*, *Mdm2* и *Cyclin D1*) не отреагировали на воздействие ОАТ либо их индукция была CAR-независимая. Этот феномен может быть связан с тем, что конформация mCAR после взаимодействия с конкретным соединением становится таковой, что данный рецептор является транскрипционным фактором лишь для определенного спектра генов. Похожие различия в ответе генов-мишеней CAR на разные индукторы этого рецептора наблюдали и другие ученые. Например, ТСРОВОР строго индуцирует экспрессию как *Cyp2b10*, так и *Cyp3a11*, а хлорпромазин – только первого (Wei *et al.*, 2002). Подобным образом фенобарбитал индуцирует экспрессию *Cyp2f2*, тогда как ТСРОВОР – нет (Braeuning *et al.*, 2009).

Помимо детоксификации, ядерный рецептор CAR участвует в регуляции многих других процессов в клетках: гомеостазе стероидных и тиреоидных гормонов (Goodwin, Moore, 2004; Masi *et al.*, 2009), гомеостазе желчных кислот (Lu *et al.*, 2000; Pascussi *et al.*, 2008), метаболизме билирубина и биосинтезе гема (Masi *et al.*, 2009), энергетическом метаболизме (влияя на метаболизм жирных кислот, липидов и глюкозы) (Wada *et al.*, 2009), сигнальной трансдукции (Swales, Negishi, 2004), и др. Показана его связь с процессами пролиферации и апоптоза в печени (Ledda-Columbano *et al.*, 2003; Beilke *et al.*, 2009), а также участие в процессах промоции химически индуцированных опухолей печени (Yamamoto *et al.*, 2004; Ross *et al.*, 2009).

Опухолообразующее действие гепатоканцерогенного ОАТ может быть также связано с активацией CAR в печени мышей. Поэтому можно предполагать, что потенциально важным интермедиатором в этом процессе может быть ген-мишень CAR – *c-Мус*. Белковый продукт этого гена является транскрипционным фактором, который регулирует различные процессы в клетках: клеточный рост и пролиферацию, прогрессию клеточного цикла, транскрипцию, дифференцировку, апоптоз и подвижность клеток (Vita, Henriksson, 2006). Одной из ключевых биологических функций *c-Мус* является его способность промотировать прогрессию клеточного цикла (переход из фазы G₁ в S) посредством активации и репрессии генов (Pelengaris, Khan, 2003). Было показано, что сверхэкспрессия *c-Мус* в печени промотирует пролиферацию гепатоцитов, что в конечном итоге может привести к раку печени (Beer *et al.*, 2004; Blanco-Bose *et al.*, 2008). Мы показали, что ОАТ увеличивает экспрессию *c-Мус* CAR-зависимым образом. Кроме того, методом иммуногистохимии на срезах печени мышей мы показали, что ОАТ увеличивает пролиферацию гепатоцитов у мышей дикого типа, в то время как у CAR-нокаутных мышей достоверного увеличения пролиферации под влиянием этого вещества не наблюдали. Поскольку данные по увеличению экспрессии *c-Мус* пролиферации гепатоцитов в ответ на ОАТ согласуются, это дает основание предполагать, что *c-Мус* вовлечен в ОАТ-индуцированную пролиферацию гепатоцитов. Таким образом, наши исследова-

ния помогают глубже понять механизм действия ОАТ и получить более полное представление о роли mCAR в этом механизме.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке гранта Фулбрайт (№ 15073775). Выражаем благодарность доктору Дэвиду Муру (David D. Moore) из Бэйлор колледжа медицины (Baylor College of Medicine, Хьюстон, США) за предоставленные ресурсы и помощь в работе.

Литература

- Каледин В.И., Алексеева Г.В., Волкова А.И. Канцерогенность орто-аминоазотолуола для кишечника мышей // Бюлл. эксперим. биол. медицины. 1978. Т. 86. Вып. 10. С. 476–477.
- Каледин В.И., Захарова Н.П. Исследования по индукции и метастазированию злокачественных опухолей у экспериментальных животных / Под ред. Е.В. Груntenко. Новосибирск: ИЦиГ, 1984. С. 146–185.
- Каледин В.И., Серова И.А., Целлариус Ю.Г., Семенова Л.А. Соотношение частот спонтанных и индуцированных орто-аминоазотолуолом опухолей у мышей // Эксперим. онкология. 1985. Т. 7. Вып. 6. С. 23–26.
- Каледин В.И., Серова И.А., Семенова Л.А. Различная предрасположенность к развитию спонтанных и индуцированных опухолей печени у мышей различных линий и их гибридов // Эксперим. онкология. 1990. Т. 12. С. 28–30.
- Пахарукова М.Ю., Сметанина М.А., Каледин В.И. и др. Активация конститутивного рецептора андростанов (CAR) под действием гепатоканцерогенных азокрасителей в печени мышей и крыс // Бюлл. эксперим. биол. медицины. 2007. Т. 144. Вып. 3. С. 338–341.
- Assem M., Schuetz E.G., Leggas M. *et al.* Interactions between hepatic Mrp4 and Sult2a as revealed by the constitutive androstane receptor and Mrp4 knockout mice // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 21. P. 22250–22257.
- Beer S., Zetterberg A., Ihrie R.A. *et al.* Developmental context determines latency of MYC-induced tumorigenesis // *PLoS Biol.* 2004. V. 2. № 11. P. e332.
- Beilke L.D., Aleksunes L.M., Olson E.R. *et al.* Decreased apoptosis during CAR-mediated hepatoprotection against lithocholic acid-induced liver injury in mice // *Toxicol. Lett.* 2009. V. 188. № 1. P. 38–44.
- Beischlag T.V., Morales J.L., Hollingshead B.D., Perdew G.H. The Aryl Hydrocarbon Receptor complex and the control of gene expression // *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Exptl.* 2008. V. 18. № 3. P. 207–250.
- Blanco-Bose W.E., Murphy M.J., Ehninger A. *et al.* C-Myc and its target FoxM1 are critical downstream effectors of constitutive androstane receptor (CAR) mediated direct liver hyperplasia // *Hepatology.* 2008. V. 48. № 4. P. 1302–1311.
- Bookout A.L., Cummins C.L., Mangelsdorf D.J. High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2006. C. 15. U. 15.8.
- Braeuning A., Sanna R., Huelsken J., Schwarz M. Inducibility of drug-metabolizing enzymes by xenobiotics in mice with liver-specific knockout of *Cttnb1* // *Drug Metab. Dispos.* 2009. V. 37. № 5. P. 1138–1145.
- Buckley D.B., Klaassen C.D. Induction of mouse UDP-glucuronosyltransferase mRNA expression in liver and intestine by activators of aryl-hydrocarbon receptor, constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, peroxisome proliferator-activated receptor alpha, and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 // *Drug Metab. Dispos.* 2009. V. 37. № 4. P. 847–856.
- Chang T.K., Waxman D.J. Synthetic drugs and natural products as modulators of constitutive androstane receptor (CAR) and pregnane X receptor (PXR) // *Drug. Metab. Rev.* 2006. V. 38. № 1/2. P. 51–73.
- Cheung Y.L., Puddicombe S.M., Gray T.J., Ioannides C. Mutagenicity and CYP1A induction by azobenzenes correlates with their carcinogenicity // *Carcinogenesis.* 1994. V. 15. № 6. P. 1257–1263.
- Choi H., Chung M., Tzamelis I. *et al.* Differential transactivation by two isoforms of the orphan nuclear hormone receptor CAR // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 38. P. 23565–23571.
- Columbano A., Ledda-Columbano G.M., Pibiri M. *et al.* Gadd45beta is induced through a CAR-dependent, TNF-independent pathway in murine liver hyperplasia // *Hepatology.* 2005. V. 42. № 5. P. 1118–1126.
- Costa R.H., Kalinichenko V.V., Tan Y., Wang I.C. The CAR nuclear receptor and hepatocyte proliferation // *Hepatology.* 2005. V. 42. № 5. P. 1004–1008.
- Dose M., Gounari F. The My(c)stery of iNKT cell ontogeny // *Cell Cycle.* 2009. V. 8. № 19. P. 3082–3085.
- Forman B.M., Tzamelis I., Choi H.S. *et al.* Androstanemetabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR // *Nature.* 1998. V. 395. № 6702. P. 612–615.
- Goodwin B., Moore L.B., Stoltz C.M. *et al.* Regulation of the human CYP2B6 gene by the nuclear pregnane X receptor // *Mol. Pharmacol.* 2001. V. 60. № 3. P. 427–431.
- Goodwin B., Moore J.T. CAR: detailing new models // *Trends Pharmacol. Sci.* 2004. V. 25. № 8. P. 437–441.
- Hazardous Substances Data Base. National Library of Medicine. 2001. available at <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>.

- Hernandez J.P., Chapman L.M., Kretschmer X.C., Baldwin W.S. Gender-specific induction of cytochrome P450s in nonylphenol-treated FVB/NJ mice // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2006. V. 216. № 2. P. 186–196.
- Hernandez J.P., Huang W., Chapman L.M. *et al.* The environmental estrogen, nonylphenol, activates the Constitutive Androstane Receptor // *Toxicol. Sci.* 2007. V. 98. № 2. P. 416–426.
- Honkakoski P., Zelko I., Sueyoshi T., Negishi M. The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the CYP2B gene // *Mol. Cell. Biol.* 1998. V. 18. № 10. P. 5652–5658.
- Huang W., Zhang J., Chua S. *et al.* Induction of bilirubin clearance by the constitutive androstane receptor (CAR) // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. P. 4156–4161.
- Huang W., Zhang J., Washington M. *et al.* Xenobiotic stress induces hepatomegaly and liver tumors via the nuclear receptor constitutive androstane receptor // *Mol. Endocrinol.* 2005. V. 19. № 6. P. 1646–1653.
- Huang W., Zhang J., Wei P. *et al.* Meclizine is an agonist ligand for mouse Constitutive Androstane Receptor (CAR) and an inverse agonist for human CAR // *Mol. Endocrinol.* 2004. V. 18. № 10. P. 2402–2408.
- International Agency for Research on Cancer. Some Aromatic Azo Compounds // *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Lyon, France, 1975.* V. 8. P. 357.
- Jackson J.P., Ferguson S.S., Moore R. *et al.* The constitutive active/androstane receptor regulates phenytoin induction of Cyp2c29 // *Mol. Pharmacol.* 2004. V. 65. № 6. P. 1397–1404.
- Kast H.R., Goodwin B., Tarr P.T. *et al.* Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor and constitutive androstane receptor // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 2908–2915.
- Kato T.A., Matsuda T., Matsui S. *et al.* Activation of the aryl hydrocarbon receptor by methyl yellow and related congeners: structure-activity relationships in halogenated derivatives // *Biol. Pharm. Bull.* 2002. V. 25. № 4. P. 466–471.
- Kawamoto T., Sueyoshi T., Zelko I. *et al.* Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the CYP2B gene // *Mol. Cell. Biol.* 1999. V. 19. № 9. P. 6318–6322.
- Ledda-Columbano G.M., Pibiri M., Concas D. *et al.* Sex difference in the proliferative response of mouse hepatocytes to treatment with the CAR ligand, TCPOBOP // *Carcinogenesis.* 2003. V. 24. № 6. P. 1059–1065.
- Lu T.T., Makishima M., Repa J.J. *et al.* Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors // *Mol. Cell.* 2000. V. 6. № 3. P. 507–515.
- Maglich J.M., Stoltz C.M., Goodwin B. *et al.* Nuclear pregnane X receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification // *Mol. Pharmacol.* 2002. V. 62. P. 638–646.
- Makinen J., Reinisalo M., Niemi K. *et al.* Dual action of estrogens on the mouse constitutive androstane receptor // *Biochem. J.* 2003. V. 376. Pt 2. P. 465–472.
- Masi A., Marinis E., Ascenzi P., Marino M. Nuclear receptors CAR and PXR: molecular, functional, and biomedical aspects // *Mol. Aspects Med.* 2009. V. 30. № 5. P. 297–343.
- Merkulova T.I., Kropachev K.Y., Timofeeva O.A. *et al.* Species-specific effects of the hepatocarcinogens 3'-methyl-4-dimethyl-aminoazobenzene and ortho-aminoazotoluene in mouse and rat liver // *Mol. Carcinog.* 2005. V. 44. № 4. P. 223–232.
- Mikhailova O.N., Vasyunina E.A., Ovchinnikova L.P. *et al.* o-Aminoazotoluene does induce the enzymes of its own mutagenic activation in mouse liver // *Toxicology.* 2005. V. 211. № 1/2. P. 132–138.
- Moore L.B., Maglich J.M., McKee D.D. *et al.* Pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR), and benzoate X receptor (BXR) define three pharmacologically distinct classes of nuclear receptors // *Mol. Endocrinol.* 2002. V. 16. № 5. P. 977–986.
- Moore L.B., Parks D.J., Jones S.A. *et al.* Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 15122–15127.
- National toxicology program. o-Aminoazotoluene // 11th Rep. on Carcinogenesis. 2002. V. 10. № 12. P. 3.
- Pascussi J., Gerbal-Chaloin S., Duret C. *et al.* The tangle of nuclear receptors that controls xenobiotic metabolism and transport: crosstalk and consequences // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2008. V. 48. P. 1–32.
- Pelengaris S., Khan M. The many faces of c-MYC // *Arch. Biochem. Biophys.* 2003. V. 416. № 2. P. 129–136.
- Ross P.K., Woods C.G., Bradford B.U. *et al.* Time-course comparison of xenobiotic activators of CAR and PPAR α in mouse liver // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2009. V. 235. № 2. P. 199–207.
- Smirlis D., Muangmoonchai R., Edwards M. *et al.* Orphan receptor promiscuity in the induction of cytochromes p450 by xenobiotics // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 16. P. 12822–12826.
- Swales K., Negishi M. CAR, driving into the future // *Mol. Endocrinol.* 2004. V. 18. № 7. P. 1589–1598.
- Tzamelis I., Pissios P., Schuetz E.G., Moore D.D. The xenobiotic compound 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene is an agonist ligand for the nuclear receptor CAR // *Mol. Cell. Biol.* 2000. V. 20. № 9. P. 2951–2958.
- Urquhart B.L., Tirona R.G., Kim R.B. Nuclear receptors and the regulation of drug-Metabolizing enzymes

- and drug transporters: implications for interindividual variability in response to drugs // *J. Clin. Pharmacol.* 2007. V. 47. № 5. P. 566–578.
- Vita M., Henriksson M. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer // *Semin. Cancer Biol.* 2006. V. 16. № 4. P. 318–330.
- Wada T., Gao J., Xie W. PXR and CAR in energy metabolism // *Trends Endocrinol. Metab.* 2009. V. 20. № 6. P. 273–279.
- Wang H., Faucette S., Moore R. *et al.* Human constitutive androstane receptor mediates induction of CYP2B6 gene expression by phenytoin // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 28. P. 29295–29301.
- Wei P., Zhang J., Dowhan D.H. *et al.* Specific and overlapping functions of the nuclear hormone receptors CAR and PXR in xenobiotic response // *Pharmacogenomics J.* 2002. V. 2. № 2. P. 117–126.
- Xie W., Barwick J.L., Simon C.M. *et al.* Reciprocal activation of xenobiotic response genes by nuclear receptors SXR/PXR and CAR // *Genes Dev.* 2000. V. 14. P. 3014–3023.
- Yamamoto Y., Moore R., Goldsworthy T.L. *et al.* The orphan nuclear receptor constitutive active/androstane receptor is essential for liver tumor promotion by phenobarbital in mice // *Cancer Res.* 2004. V. 64. № 20. P. 7197–7200.
- Zhang J., Huang W., Chua S. *et al.* Modulation of acetaminophen-induced hepatotoxicity by the xenobiotic receptor CAR // *Science.* 2002. V. 298. № 5592. P. 422–424.

ORTHO-AMINOAZOTOLUENE ACTIVATES THE CONSTITUTIVE ANDROSTANE RECEPTOR AND INCREASES THE EXPRESSION OF ITS TARGET GENES IN THE MOUSE LIVER

M.A. Smetanina^{1,2}, M.Y. Pakharukova¹, T.I. Merkulova¹

¹Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: maria.smetanina@gmail.com;

²Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA

Summary

The industrial azo dye *ortho*-aminoazotoluene (OAT) is well known as a rodent carcinogen and as a putative human carcinogen. The pathway of its action still remains unclear. We examined the role of the Constitutive Androstane Receptor (CAR) in the mediation of OAT effects. Using the mCAR reporter system in HepG2 cells, we showed that OAT increased the transcriptional activity of this receptor. That effect was specific because another azo dye 3'-methyl-4-dimethyl-aminoazobenzene (3'-MeDAB) did not activate mCAR. Experiments with wild-type (*car*^{+/+}) and CAR-null (*car*^{-/-}) C57BL/6 mice showed CAR-dependent induction of hepatic mRNA expression of the following CAR target genes in response to OAT: *Cyp2b10*, *Cyp2c29*, *Cyp3a11*, *Ugt1a1*, *Mrp4*, *Mrp2* and *c-Myc*. Immunohistochemical analysis of liver sections of wild-type and CAR-null C57BL/6 mice demonstrated that OAT induced hepatocyte proliferation in a CAR-dependent manner. It follows from our results that mCAR is OAT xenosensor and at least part of the effects of this compound are mediated by this nuclear receptor.

Key words: *o*-aminoazotoluene (OAT), azo dyes, constitutive androstane receptor (CAR), target genes, hepatocyte proliferation.

РЕПАРАЦИЯ МЕЖЦЕПОЧЕЧНЫХ СШИВОК МОЛЕКУЛЫ ДНК

Е.В. Долгова¹, А.С. Лихачева², К.Е. Орищенко², Е.А. Алямкина¹,
С.С. Богачев², М.А. Шурдов³

¹ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия;

² Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: gorbi@bionet.nsc.ru;

³ ООО «Панаген»

В обзоре дается анализ литературы, в котором характеризуются процессы, протекающие при репарации межцепочечных сшивок, индуцированных кросслинквирующими цитостатиками. Описаны основные механизмы репарации межцепочечных сшивок у прокариот (*Escherichia coli*), дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) и высших эукариот. Для млекопитающих дополнительно приведены некоторые экспериментально обоснованные схемы репарации межцепочечных сшивок, описанные в мировой литературе за последние пять лет.

Ключевые слова: циклофосфан, межцепочечная сшивка, FA/BRCA фактор, гомологичная рекомбинация, репарация, ERCC1-XPF, двухцепочечный разрыв.

Введение

Межцепочечные сшивки (МЦС) в молекуле ДНК представляют собой повреждения, имеющие признанное терапевтическое значение в онкологической практике. Именно такие повреждения, индуцируемые определенной группой цитостатиков, приводят к нарушениям в молекулярных процессах клетки, определяющим ее гибель. Противоопухолевый эффект цитостатиков этого ряда связан со свойством опухолевых клеток эффективно, наряду с любыми другими активно пролиферирующими клетками организма, захватывать молекулы цитостатического вещества. Доставленный в ядро опухолевой клетки цитостатик приводит к формированию МЦС. При этом подбирается такая концентрация активного вещества, что опухолевая и любая другая активно пролиферирующая клетка организма не в состоянии корректно осуществить репарацию всех индуцированных повреждений, что и определяет ее гибель.

Противоопухолевое действие кросслинквирующих цитостатиков определяет повышенный интерес как к изучению молекулярных событий, протекающих в клетке после попадания во внутренние компартменты цитостатического

препарата, так и к изучению самого процесса репарации МЦС.

В предлагаемом обзоре представлены молекулярные события, протекающие при репарации МЦС в клетках организмов, относящихся к различным эволюционным группам. Модели механизма репарации МЦС в клетках высших эукариот представляют собой на настоящий момент времени неустоявшуюся совокупность экспериментальных фактов. В связи с этим мы даем характеристику репаративных процессов при репарации МЦС эукариот в соответствии с представлениями различных авторов, не объединяя многочисленные схемы в одну обобщенную последовательность событий.

1. Цитостатические препараты. Механизм формирования МЦС

МЦС молекулы ДНК хромосомы, возникающие в результате действия химических алкилирующих агентов, являются в высшей степени губительными для эукариотической клетки. При дефектах в системах репарации достаточно одного такого повреждения для того, чтобы клетка вступила в aberrantный митоз, заканчивающийся, как правило, апоптотиче-

ской гибелью клетки (Magaña-Schwencke *et al.*, 1982). Для здоровой клетки предельным для выживания является количество МЦС от 100 до нескольких тысяч на одно клеточное ядро (Magaña-Schwencke *et al.*, 1982; Akkari *et al.*, 2000). Цитостатики, вызывающие МЦС, широко применяются в онкологической практике как агенты, легко доставляемые в опухолевые клетки и индуцирующие МЦС. К таким цитостатикам относятся мустин, циклофосфан (ЦФ), псорален, митомицин С, препараты платины, хлорбутин и т. д. (Dalbiès *et al.*, 1994; Kasparikova *et al.*, 2002). Механизм действия кросслинкующего цитостатика определяется его химическим строением. В общем случае все кросслинкующие цитостатики интеркалируют в молекулу ДНК и формируют ковалентно связанные аддукты с находящимися в непосредственной близости нуклеотидами, расположенными на разных цепях нити ДНК.

Мустин (нитроген мустард) – метил-бис-(2-хлорэтил)-амин, стал первым веществом, использовавшимся в систематической терапии (рис. 1).

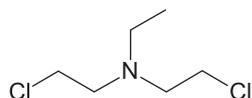


Рис. 1. Мустин.

Метил-бис-(2-хлорэтил)-амин взаимодействует с N-7 атомом гуанина и в меньшей степени с N-3 атомом аденина. Наиболее предпочтительной для атаки является последовательность 5'-GNC-3'/3'-CNG-5', а также связь между ДНК и белком (McHugh *et al.*, 1999).

ЦФ, а также его изомер ифосфамид, относятся к алкилирующим противоопухолевым препаратам, широко используемым в онкологической клинике. ЦФ также находит применение как иммунодепрессант при лечении аутоиммунных заболеваний и при трансплантации аллогенного костного мозга.

Фармакологический эффект ЦФ определяется его метаболитами, поскольку сам по себе он не проявляет цитостатической активности. К настоящему времени хорошо изучены пути метаболизма ЦФ, приводящие как к его активации, так и к инактивации, а также вещества, ускоряющие эти процессы или препятствующие им.

Метаболизм ЦФ у человека, а также у мышей и крыс осуществляется преимущественно в печени при участии системы ферментов цитохрома P450 (Fleming, 1997; Yu *et al.*, 1999).

Было доказано, что метаболизм ЦФ в печени может идти по двум альтернативным путям (рис. 2). ЦФ активируется в печени 4 реакциями гидроксирования, катализируемыми цитохромом P4502B и P4502C, или дезактивируется дехлорэтированием, катализируемым цитохромом P4503A (Yu *et al.*, 1999).

Первый путь – ЦФ-4-гидроксирование, приводящее к образованию 4-гидроксиЦФ, который в конечном итоге приводит к образованию фосфорамид мустарда, цитотоксичного метаболита. Из альдофосфамида, таутомерной формы 4-гидроксиЦФ, спонтанно образуются алкилирующий метаболит фосфорамид мустард и акролеин. Противоопухолевый эффект ЦФ связан, как считается в настоящее время, с активностью фосфорамид мустарда, в то время как акролеин ответственен за его токсическое воздействие на клетку. Акролеин проявляет сродство к SH-группам и взаимодействует с глутатионом и белками цитоплазмы. Фосфорамид мустард образует аддукты с пуриновыми основаниями ДНК, в особенности соседствующими с остатками гуанина, и приводит к возникновению перекрестных сшивок в двойной цепи молекулы ДНК (Yu *et al.*, 1999; De Silva *et al.*, 2000; Karle *et al.*, 2001).

Второй путь – ЦФ-N-дехлорэтирование, ведущее к образованию дехлорэтилЦФ и хлор-ацетальдегида в эквимолярных количествах. ДехлорэтилЦФ не приводит к образованию ДНК-кросслинкующих агентов в клетке и, таким образом, не обладает противоопухолевым действием. Однако активность хлор-ацетальдегида определяет различные виды токсического воздействия на клетку.

Известно, что разная роль индивидуальных P450 в клетке позволяет производить контроль между двумя альтернативными путями метаболизма ЦФ (Yu *et al.*, 1999).

Псорален (рис. 3) – еще один известный препарат, вызывающий образование МЦС в молекуле ДНК в присутствии ультрафиолетового излучения.

Взаимодействие псоралена с двуцепочечной ДНК является высокоспецифичным и легко

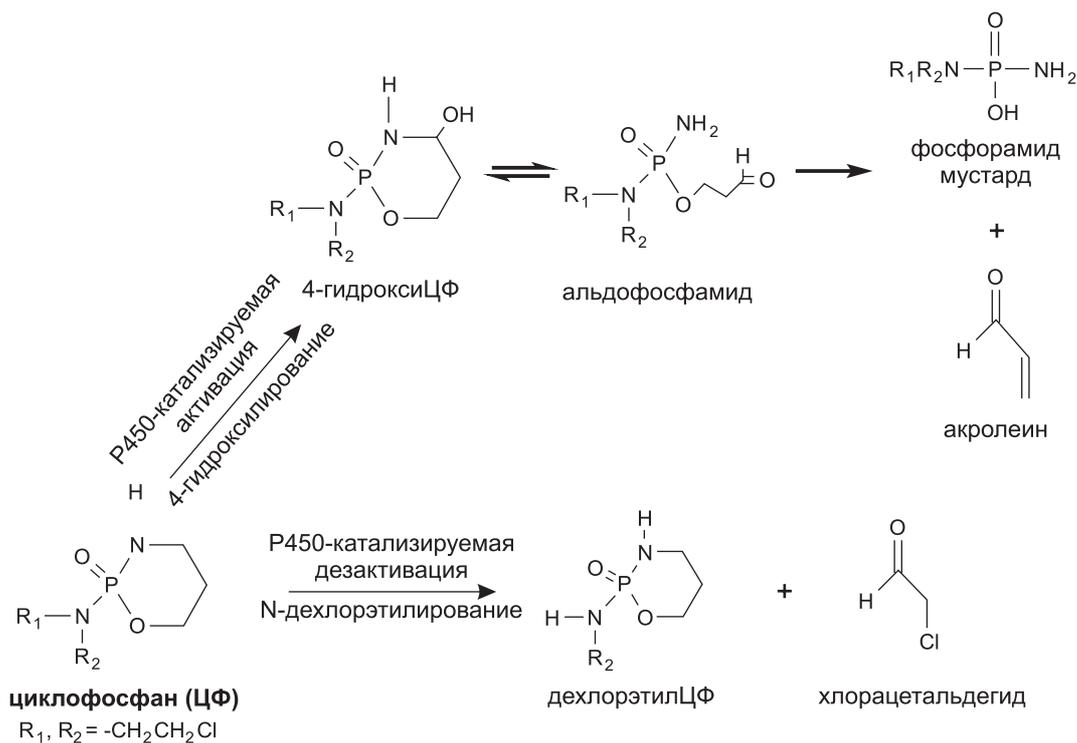


Рис. 2. Пути метаболизма ЦФ в организме (Yu *et al.*, 1999).

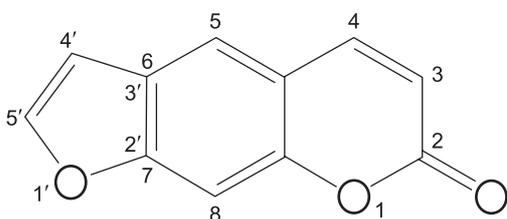


Рис. 3. Псорален.

контролируется при помощи изменения дозы облучения. Псорален – трехкольцевое асимметричное ароматическое соединение, которое интеркалирует в молекулу ДНК. Возбужденное при помощи длины волны 300–400 нм фурановое или пириновое кольцо псоралена формирует циклобутановый аддукт с атомами С-5 и С-6 соседнего тимина. Дальнейшее облучение ультрафиолетом вызывает поглощение второго фотона сформировавшимся моноаддуктом, что ведет к образованию ковалентной связи между пириновым кольцом и тиминкомplementарной цепи, в результате чего формируется МЦС. Энергия фотонов при дальнейшем облучении может быть использована для другой молекулы псоралена и формирования другой МЦС.

2. Основные молекулярные механизмы репарации МЦС

После возникновения МЦС в клетке активируются многочисленные системы контроля прогрессии клеточного цикла и репаративные механизмы, обеспечивающие репарацию губительных повреждений и восстановление целостности генома. Однако при терапии онкологических заболеваний концентрация цитостатических препаратов подбирается таким образом, что на одно клеточное ядро любой активно делящейся клетки приходится не менее 2500 МЦС. Такое количество МЦС обеспечивает практически неизбежную гибель клетки. При этом гибнет любая клетка, получившая цитостатик. Воздействие на опухолевую и любую другую клетку при такой обработке связано с невозможностью репарации всех возникших МЦС. Возможны две причины, по которым клетка не в состоянии репарировать все МЦС. Первая – это стерические препятствия, возникающие при нахождении гомологии в геноме, необходимой для репарации и восстановления некоторых

промежуточных интермедиатов. Вторая – недостаточное количество репаративных комплексов, обеспечивающих репарацию всех индуцированных МЦС. Тем не менее в клетке активируются репаративные процессы, и понимание механизма их работы является необходимым условием для правильного выбора режима терапевтического воздействия цитостатических препаратов. Репарация МЦС – сложный многостадийный процесс, имеющий много отличий у прокариот, дрожжей и высших эукариот.

2.1. Механизм репарации МЦС у прокариот

У *Escherichia coli* репарация МЦС требует функционирования двух систем репарации – эксцизионной репарации нуклеотидов (NER) и гомологичной рекомбинации (ГР) (рис. 4).

В настоящее время известно, что у *E. coli* при репарации МЦС, вызванных псораленом, эксцизионный комплекс UvrABC делает два надреза с 5'- и 3'-стороны от МЦС. Надрезы делаются на той цепи, где тимин ковалентно соединен с фурановым кольцом псоралена. В результате образуется олигонуклеотид длиной 11 нуклеотидов, ковалентно связанный через молекулу псоралена с интактной цепью молекулы ДНК. *In vitro* показано, что комплекс UvrABC остается связанным с ДНК, и что UvrD и PolI необходимы для освобождения молекулы ДНК. Во время этого процесса возможна физическая ассоциация между цепью ДНК и PolI, которая садится на образовавшийся 3'-конец и благодаря своей экзонуклеазной активности в направлении 5'→3' формирует брешь размером ~ 700 нуклеотидов. Такая брешь может образовываться и с левой стороны от МЦС в результате 3'→5' экзонуклеазной активности экзонуклеазы 3. Однако если реализуется последний вариант событий, то последующая рекомбинация будет проходить мимо сшивки и репарация не произойдет.

На отрезке, содержащем брешь, молекула ДНК состоит из одной цепи, с которой связывается белок рекомбинации RecA. При участии RecA осуществляется этап гомологичного спаривания с подходящей матрицей и индуцируется замещение цепей. На следующем этапе осуществляется репаративный синтез ДНК, за-

крывающий брешь. Далее происходят миграция цепей и разъединение кроссоверов. После кроссинговера цепь ДНК в месте присоединения олигонуклеотида разрезается с двух сторон от МЦС UvrABC системой в ходе второго раунда эксцизионной репарации. Образовавшаяся в ходе второго раунда эксцизии брешь закрывается в ходе репаративного синтеза и лигирования (Sinden, Cole, 1978; Van Houten *et al.*, 1986; Sladek *et al.*, 1989).

Кроме описанного пути репарации МЦС с привлечением механизма рекомбинации известен путь с участием синтеза через повреждение (TLS) по цепи с оставшимся аддуктом после первого раунда эксцизии (Berardini *et al.*, 1997).

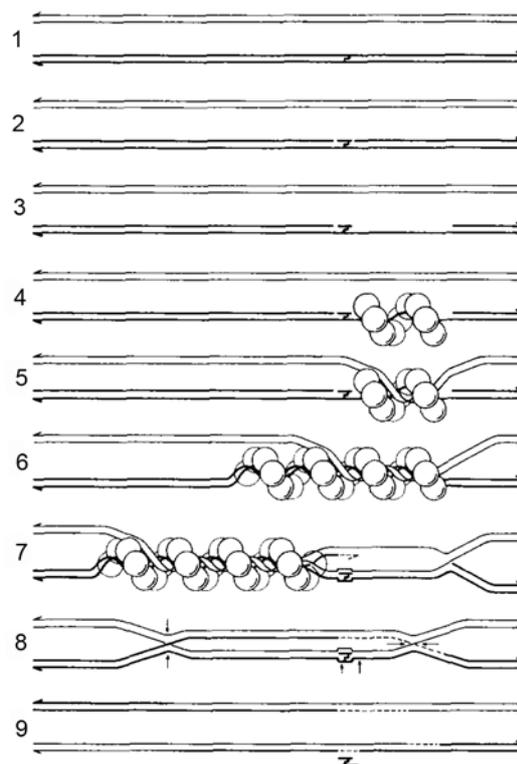


Рис. 4. Репарация МЦС у *E. coli*.

1 – образование МЦС; 2 – надрезание нити ДНК эксцизионным комплексом UvrABC; 3 – формирование бреши с 3'-стороны от МЦС в результате 5'→3' экзонуклеазной активности PolI; 4 – связывание с белком рекомбинации RecA; 5 – инициация контакта гомологичных цепей; 6 – гомологичное спаривание и обмен цепями; 7 – процесс репаративного синтеза ДНК; 8 – миграция цепей, разъединение кроссоверов; 9 – полное вырезание аддукта, репаративный синтез, лигирование цепи (Sladek *et al.*, 1989).

2.2. Механизм репарации МЦС у дрожжей

2.2.1. Основные системы и факторы репарации

У дрожжей также все три системы принимают участие в репарации МЦС. Это NER, ГР и TLS. Кроме этих трех систем описан фактор Pso2/Snm1, задействованный в репарационном процессе в промежутке между эксцизионной репарацией и ГР. Мутанты по генам любой из этих систем экстремально чувствительны к действию кросслинквирующих агентов.

Группа белков, относящаяся к системе NER, принадлежит Rad3 эпистатическому семейству. К ним относятся факторы Rad1, Rad2, Rad3, Rad4, Rad9, Rad10, Rad14. Фактор Rad2 разрезает одну цепь ДНК в непосредственной близости от МЦС с 3'-конца. Гетеродимер Rad10-Rad1 делает разрез той же нити ДНК в 5'-области от шивки. Другие факторы NER участвуют в механизмах, контролирующих прогрессию клеточного цикла. Так, Rad3 и Rad9 – трансдуцирующие киназы, запускающие каскад событий, связанных с арестом клеточного цикла. Rad1-Rad9-Hus1 комплекс представляет из себя «скользящую застежку», для ассоциации которой с аберрантной ДНК необходим Rad17 (Jachymczyk *et al.*, 1981; Lambert *et al.*, 2003).

ГР имеет, по-видимому, множественную роль в репарационном процессе МЦС. Одна из наиболее важных – это участие в репарации двуцепочечных разрывов (ДЦР), возникающих при заживании МЦС (McHugh *et al.*, 2001). Другая роль – это формирование субстрата для второго раунда NER, в результате которого происходит полное высвобождение аддукта (Van Houten *et al.*, 1986; Cheng *et al.*, 1988; Sladek *et al.*, 1989).

Для *Saccharomyces cerevisiae* описана Rad51 эпистатическая группа белков, отвечающая за репаративную ГР. Rad51 представляет собой белок рекомбинации, формирующий филамент с одноцепочечным участком конца разорванной молекулы ДНК, процессированного после возникновения ДЦР. Rad54 – фактор, отвечающий за поиск гомологии по геному, а Rad52 – за инвазию цепи и формирование гетеродуплекса.

Показано, что гетеродимер Rad10-Rad1, кроме того что участвует в NER, вовлечен также

в ГР по механизму спаривания одноцепочечного участка, сопряженного с синтезом ДНК (SSA) (Jachymczyk *et al.*, 1981; Miller *et al.*, 1982; McHugh *et al.*, 1999; Simon *et al.*, 2000). В процессе SSA фактор принимает участие как специфичная нуклеаза при процессинге интермедиатов, формирующихся при ГР. Одноцепочечный 3'-конец процессированного ДЦР объединяется с найденными 60–90 нуклеотидами общей гомологии, и свисающий участок цепи обрезаются Rad10-Rad1 гетеродимером (Fishman-Lobell *et al.*, 1992; Fishman-Lobell, Haber, 1992; Harrington, Lieber, 1994; Ivanov, Haber, 1995).

При репарации МЦС для дрожжей описан механизм, протекающий без участия ГР. Фактор Pso1/Rev3, отвечающий за этот путь, является TLS полимеразой дзета (Pol ζ). Мутанты по Pso1/Rev3 не жизнеспособны при индукции в клетке МЦС. Фермент важен при процессинге интермедиатов МЦС в неделящихся клетках. Pol ζ (Pso1/Rev3), по-видимому, осуществляет TLS до стадии разъединения МЦС (Henriques, Moustacchi, 1980; Morrison *et al.*, 1989; Nelson *et al.*, 1996; McHugh *et al.*, 2000) (рис. 5).

В дополнение к перечисленным системам, контролирующим репарацию МЦС, существует еще один независимый фактор Pso2/Snm1, мутанты по которому также уникально чувствительны к действию кросслинквирующих цитостатиков (Henriques, Moustacchi, 1980; Ruhland *et al.*, 1981a, b). Предполагается, что Pso2 в комплексе с PIAS1 регулирует иммобилизацию и модификацию в сайте повреждения (фокусах репарации) других репаративных белков и действует как структурный белок, формирующий подходящий субстрат для ГР (Ishiai *et al.*, 2004).

2.2.2. Репарация МЦС у дрожжей на разных стадиях клеточного цикла

Пути репарации и комплекс механизмов, принимающие участие в репарации МЦС у дрожжей, связаны со стадией клеточного цикла. В работе, выполненной в группе McHugh (Barber *et al.*, 2005), рассматривается участие систем, отвечающих за репарацию МЦС, возникающих на различных стадиях клеточного цикла – G1, G2, S.

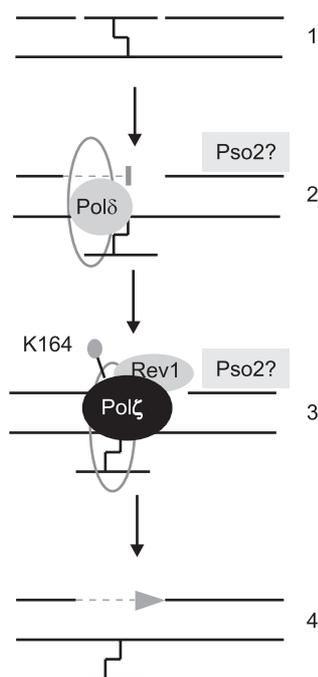


Рис. 5. Репарация МЦС путем TLS.

1 – вырезание олигонуклеотида вокруг МЦС белками NER системы; 2 – попытка нормальной репарации бреши при помощи полимеразы дельта (Polδ), столкновение которой с МЦС вызывает сигнал, эквивалентный тому, который образуется при остановке репликативной вилки; 3 – моноубиквитинирование PCNA и быстрая замена Polδ на Polζ (Pso1/Rev3), возможно, в кооперации с Rev1; 4 – заполнение бреши путем TLS (Sarkar *et al.*, 2006).

В G1-фазе (рис. 6) на первом этапе происходит формирование надрезов с обеих сторон от МЦС при помощи белков NER-системы. После эксцизии обнаруживается активность фактора Pso2 (Sarkar *et al.*, 2006). Мутанты по Rad52 не чувствительны к действию цитостатика в G1-фазе, что свидетельствует о том, что аппарат ГР не играет роли в репарации МЦС в G1-фазе клеточного цикла *S. cerevisiae*. Для репарации в стационарной фазе необходима активность Polζ, что предполагает участие TLS для завершения репаративного процесса (McHugh *et al.*, 2000). В целом в G1-фазе репарация происходит с участием NER и TLS. В результате активности NER-системы формируются надрезы с обеих сторон от МЦС и происходит «выворачивание» олигонуклеотида размером 24–32 нуклеотида, ковалентно связанного через МЦС с противоположной цепью молекулы ДНК (McHugh *et al.*, 1999). Формируется одноцепочечная брешь. Polδ осуществляет попытку заполнения

одноцепочечной бреши, но останавливается в месте оставшегося аддукта, соединенного с олигонуклеотидом (рис. 5). Это приводит к убиквитинированию белка репликации PCNA и привлекает в сайт репарации Polζ (Pso1/Rev3). Полимераза TLS заполняет брешь, проходя насквозь нуклеотид с оставшимся аддуктом. Моноубиквитинирование PCNA служит в качестве молекулярного сигнала, необходимого для запуска процесса, замещающего репликативную Polδ на TLS полимеразу Polζ (Stelter, Ulrich, 2003; Kannouche *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2004). На конечном этапе осуществляется второй раунд NER, характеризующийся вырезанием аддукта, синтезом по комплементарной цепи ДНК и последующим лигированием.

Для G2-фазы механизм ГР также не является главным путем репарации МЦС. NER, Pso2 и TLS – основные механизмы репарации на этой стадии клеточного цикла. Тем не менее Rad52 мутанты чувствительны к действию цитостатика, что предполагает некоторый вклад в репаративный процесс механизма ГР. По-видимому, в G2-фазе могут работать оба механизма, NER и

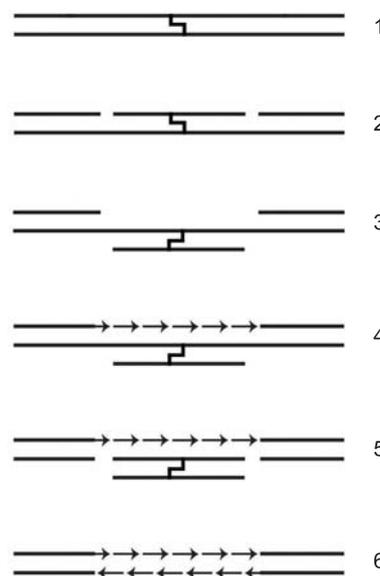


Рис. 6. Репарация МЦС в G1-фазе у *S. cerevisiae*.

1 – появление МЦС; 2 – формирование надрезов с обеих сторон от МЦС при участии белков NER-системы и эпистатического ей Pso2 фактора; 3 – «выворачивание» олигонуклеотида; 4 – заполнение бреши путем TLS; 5 – второй раунд NER, вырезание аддукта; 6 – синтез по комплементарной цепи ДНК и лигирование (Barber *et al.*, 2005).

ГР, причем механизм NER совместно с активностью Pso2 более предпочтителен для клетки (рис. 7). При выборе основного пути репарации МЦС в G2-фазе после действия NER так же, как и в G1-фазе активируется TLS (Barber *et al.*, 2005). Предположительно, факторы Rad6 и Rad18 обладают TLS полимеразной активностью. Клетки, несущие мутации по этим генам, чувствительны к действию кросслинкующих цитостатиков на протяжении всего клеточного цикла, что предполагает их ответственность за репарацию МЦС в пострепликационной стадии клеточного цикла.

При использовании клеткой минорного пути репарации после вырезания олигонуклеотида осуществляется поиск гомологичного геномного участка белками Rad52 семейства, инвазия 3'-конца и синтез по гомологичной матрице. На последней стадии в обоих случаях происходит

второй раунд NER, характеризующийся вырезанием аддукта и последующим репаративным синтезом и лигированием цепи ДНК.

Ситуация в S-фазе более сложная. МЦС блокирует движение репликативной вилки. При этом активируется NER – первоочередной механизм, делающий повреждение доступным для следующих этапов репарации. Белки NER-системы формируют надрезы с двух сторон от МЦС. Предполагается, что в результате этого процесса пассивно образуется ДЦР. Для S-фазы показано снижение активности Pso2, связанное, по-видимому, с существованием другого конкурентного процесса, ассоциированного с активностью механизма репарации нуклеотидных замен (mismatch репарация) и активностью экзонуклеазы 1 (Barber *et al.*, 2005). Вырезанный NER участок нити ДНК восстанавливается либо путем TLS, либо в результате неконсервативной

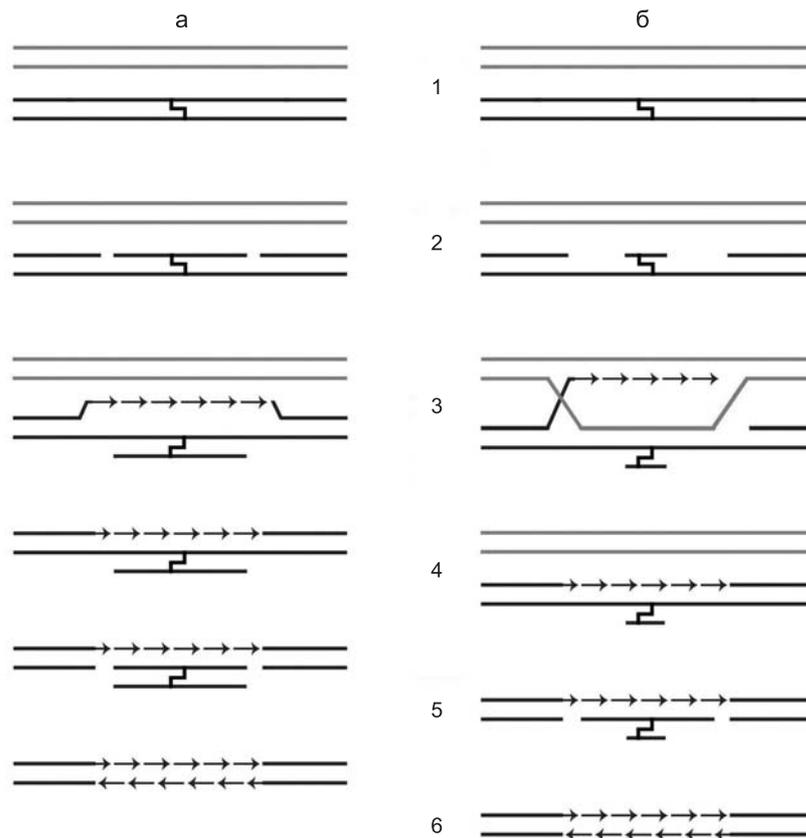


Рис. 7. Репарация МЦС в G2-фазе у *S. cerevisiae*. а – основной путь репарации МЦС с участием механизма TLS. Все стадии сходны с таковыми в G1-фазе. б – минорный путь репарации МЦС.

1 – появление МЦС; 2 – вырезание олигонуклеотида с участием NER белков; 3, 4 – поиск гомологичного участка белками Rad52 семейства, инвазия 3'-конца и синтез ДНК по гомологичной матрице; 5 – второй раунд NER, вырезание аддукта; 6 – репаративный синтез цепи ДНК (Barber *et al.*, 2005).

ГР с использованием механизма SSA. Репарация ДЦР идет с участием белков ГР, при этом формируется свободный 3'-конец, который находит гомологию, инвазирует и образует гетеродуплекс с гомологичным участком ДНК (рис. 8).

Как следует из проведенного генетического и молекулярного анализа, ГР не является основным путем репаративного процесса и важна в случае дрожжей только на стадии деления клетки. На стадиях G1 и G2 клеточного цикла основными механизмами репарации являются NER, система Pso2/Snm1 и TLS. При репарации МЦС у дрожжей все факторы NER-системы необходимы для репаративного процесса.

2.2.3. Увеличение и уменьшение количества tandemных повторов, индуцированные репарацией ДЦР (на модели дрожжей)

ДЦР появляются в клетке как естественным путем, связанным с различными молекулярными процессами, так и при воздействии внешних факторов, таких, как кросслинквирующие цитостатики, γ -радиация, некоторые антибиотики. Репарация ДЦР может быть причиной увеличения или уменьшения количества tandemных повторов в геноме (Paques *et al.*, 1998). Как известно, нестабильность повторов у человека является причиной многих генетических заболеваний, например, увеличение количества минисателлитов приводит к болезни Хантингтона, изменение количества микросателлитов также является губительным для клетки. Как следует из результатов, полученных на дрожжах, эти процессы также могут быть следствием неправильной репарации ДЦР.

ДЦР у дрожжей в S-фазе главным образом репарируются путем ГР. Так, если отсутствует гомологичная матричная цепь, то эффективность репарации ДЦР падает до 0,3 %. Однако если в гомологичную матричную цепь внести ряд tandemных повторов, то в процессе ГР можно обнаружить целый ряд новосинтезированных цепей ДНК, содержащих разное количество данных повторов. В большинстве случаев такая реорганизация ДНК наблюдается только у вновь синтезированной молекулы ДНК, в которой находилось повреждение. В этом случае процессированный 3'-конец ин-

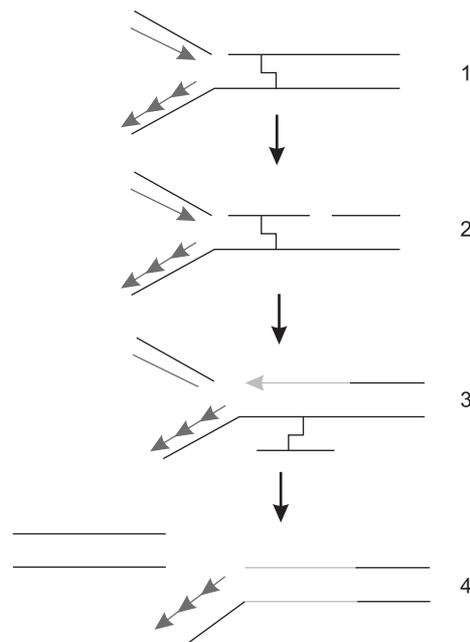


Рис. 8. Репарация МЦС в S-фазе у *S. cerevisiae*.

1, 2 – движущая репликативная вилка наталкивается на МЦС, вследствие чего происходит ее остановка и блокирование; после обнаружения клеткой повреждения активируются белки NER-системы, которые формируют надрезы с двух сторон от МЦС, в результате чего образуется ДЦР; 3 – восстановление участка ДНК либо путем TLS, либо синтезом по гомологичной матрице; 4 – второй раунд NER. Репарация ДЦР идет с участием белков ГР (Barber *et al.*, 2005).

вазирует в гомологичную нить ДНК, и с него, как с затравки, начинается синтез ДНК, после чего он отсоединяется от матричной молекулы, оставляя ее в интактном виде (рис. 9, а 1–3). Изменение в структуре ДНК наблюдается и в матричной цепи ДНК, что может быть объяснено конверсией или кроссинговером. В этом случае второй процессированный конец ДЦР спаривается с отодвинутой первым 3'-концом цепью матричной ДНК, с него также начинается синтез, образуется структура Холлидея, и вновь синтезируемые цепи не уходят от матричной цепи (рис. 9, а 4–6). Данная модель также может объяснить увеличение или уменьшение количества tandemных повторов в геноме (рис. 9, б). Так, если вновь синтезированная цепь ДНК отсоединилась от матричной молекулы и не находит внешний гомологичный участок, необходимый для спаривания, то она может заново инвазировать в то же место гомологичной цепи

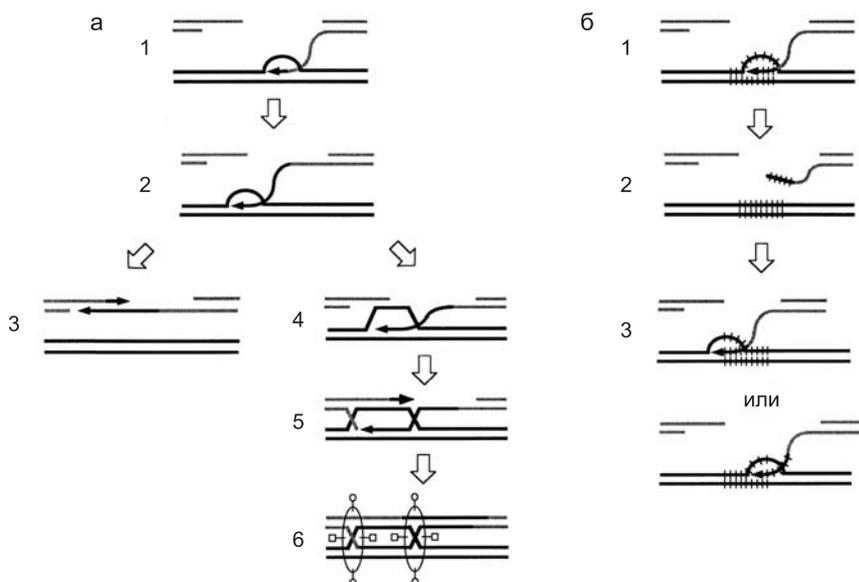


Рис. 9. Репарация ДЦР у дрожжей (а) и модель увеличения или уменьшения количества tandemных повторов в геноме (б).

а: 1 – инвазия процессированного 3'-конца ДЦР в гомологичный участок цепи ДНК; 2 – начало синтеза ДНК с матрицы гомологичной цепи ДНК; 3 – отсоединение новосинтезированной цепи ДНК, матричная гомологичная цепь ДНК остается в исходном виде; 4 – образование структуры Холлидея; 5 – использование второго 3'-конца ДЦР в качестве затравки для синтеза ДНК; 6 – разрезание структуры Холлидея эндонуклеазами, при этом может произойти либо генная конверсия, либо кроссингвер, оба эти процесса ведут к изменениям в структуре как репарируемой, так и матричной нитей ДНК. б: 1, 2 – инвазия и синтез ДНК с процессированного 3'-конца ДЦР; 3 – повторная инвазия (Paques *et al.*, 1998).

ДНК. Последующий синтез того же фрагмента будет служить причиной амплификации данного участка в геноме.

Уменьшение копийности tandemных повторов можно объяснить следующей схемой (рис. 10). Оба процессированных 3'-конца молекулы ДНК, в которой произошел ДЦР, инвазируют в гомологичную матричную молекулу и служат

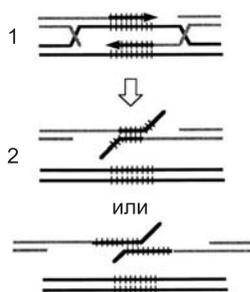


Рис. 10. Уменьшение копийности tandemных повторов.

1 – синтез tandemных повторов с обоих 3'-концов ДЦР по матрице гомологичной цепи ДНК; 2 – возможные пути отжига концов ДЦР после отсоединения от гомологичной цепи ДНК (Paques *et al.*, 1998).

затравками для синтеза ДНК. Если при этом происходит синтез нескольких расположенных подряд повторов, вновь синтезированные цепи могут отжигаться друг с другом не только концевыми участками повторов, но и повторами, находящимися в середине синтезированной цепи ДНК (рис. 10). При дальнейшей репарации выступающие концы, содержащие какое-то количество повторов, отрезаются специфичной эндонуклеазой.

2.3. Механизм репарации МЦС у высших эукариот

Репарация МЦС у высших эукариот имеет общие черты с таковой, описанной для дрожжей. Одним из наиболее важных отличий репарации МЦС у млекопитающих является тот факт, что факторы NER высших эукариот не являются абсолютно необходимыми для репарации МЦС (Чмуж и др., 2006). При этом у дрожжей большая часть, если не все белки репарации системы NER, вовлечены в репаративный процесс, как это продемонстрировано

с использованием соответствующих мутантов (Jachymczyk *et al.*, 1981; Lambert *et al.*, 2003). У млекопитающих только мутанты по генам ERCC1 и XPF экстремально чувствительны к появлению МЦС. Мутанты по другим генам NER, таким, как XPA/Rad14, RPA, TFIIH, XPG/Rad2, XPC-HR23B/Rad4-Rad23, проявляют умеренную чувствительность к цитостатикам, индуцирующим МЦС (Guzder *et al.*, 1995; Mu *et al.*, 1995; De Silva *et al.*, 2000; Dronkert, Kanaar, 2001; Zhang *et al.*, 2007).

Гетеродимер ERCC1-XPF, являющийся структурно-специфичной эндонуклеазой (De Laat *et al.*, 1998), играет центральную роль в репарации МЦС. XPG и ERCC1-XPF ограничивают повреждение надрезами нити ДНК по обе стороны от МЦС. При этом XPG делает надрез первым с 3'-конца от повреждения (O'Donovan *et al.*, 1994). После этого гетеродимер ERCC1-XPF вырезает олигонуклеотид размером 28 нуклеотидов в 5'-области от МЦС (Mu *et al.*, 1996; Smeaton *et al.*, 2008). Надрезы эндонуклеазами происходят, по-видимому, на расправленном участке хроматина, который формируется с участием геликазы, находящейся в комплексе ферментов, обслуживающих Ori репликации (Park *et al.*, 1995; Evans *et al.*, 1997). Эндонуклеазная активность комплекса ERCC1-XPF сопряжена с физическим взаимодействием с XPA – полипептидом, относящимся к белкам ядерного матрикса. XPA в свою очередь взаимодействует с ДНК и набором репаративных факторов, включая RPA (репликативный белок А) и TFIIH (Park, Sancar, 1994; Li *et al.*, 1995; Saijo *et al.*, 1996). Показано, что XPA опознает специфические интермедиаты NER процесса и физически ассоциирует с ними (Jones, Wood, 1993; Camenisch *et al.*, 2006; Krasikova *et al.*, 2008; Maltseva *et al.*, 2008). При этом фактор XPA направляет в точку сформированного комплекса ERCC1-XPF гетеродимер (Volker *et al.*, 2001) и физически связывается с районом 96–214 аминокислотных остатков ERCC1 субъединицы своей короткой областью 67–80 аминокислотных остатков. Именно это взаимодействие является абсолютно необходимым для NER функции комплекса ERCC1-XPF (Tsodikov *et al.*, 2007).

ERCC1-XPF не принимает участия в формировании ДЦР при репарации МЦС. При

этом появление ДЦР связано с прохождением клеткой S-фазы. В одних работах показано, что гетеродимер ERCC1-XPF в обязательном порядке необходим для конечной репарации ДЦР. Причем восстановление целостности репарируемого участка ДНК происходит с участием механизма ГР. Гетеродимер ERCC1-XPF вовлечен в репарацию ДЦР посредством как механизма неконсервативной рекомбинации – SSA, так и полноценной ГР с образованием кроссоверных продуктов (Sargent *et al.*, 1997; Pâques, Haber, 1999; Adair *et al.*, 2000; Langston, Symington, 2004; Niedernhofer *et al.*, 2004). Факты, приведенные в других работах, заставляют предположить, что активность гетеродимера ERCC1-XPF несущественна для репарации ДЦР (De Silva *et al.*, 2000).

Описано еще одно важнейшее свойство комплекса ERCC1-XPF – это его 3'→5' экзонуклеазная активность и способность проходить сшивки. Оказалось, что гетеродимер может гидролизовать линейную ковалентно сшитую с другой цепью цепь ДНК, проходя МЦС насквозь. Этой активностью МЦС конвертируется в одноцепочечную ДНК с динуклеотид аддуктом. Размер гидролизуемого участка согласно экспериментам, выполненным в работе (Mu *et al.*, 2000), составляет ~150 п.н. Как следует заметить, для *E. coli* размер одноцепочечного участка составляет ~700 п.н. Reardon с соавт. (1991), анализируя процесс репарации МЦС, впервые показали, что удаление МЦС сопряжено с высоким уровнем синтеза ДНК. По-видимому, репарация оставшегося одноцепочечного интермедиата связана с активностью TLS полимераз, что и определяет высокий уровень синтеза ДНК, обнаруживаемый при репарации МЦС (Reardon *et al.*, 1991).

В промежутке между процессами NER и ГР для эукариот определены еще два фактора, нокауты по генам которых также приводят к сверхчувствительности клеток к МЦС. Это Artemis/Snm1 и Mus81. Pso2/Snm1 абсолютно необходим как фактор репарации МЦС у дрожжей. Его аналог (паралог) у человека Artemis/Snm1 определен как ген, дефект которого приводит к иммунодефициту вследствие чувствительности иммунокомпетентных клеток к радиации и невозможности репарации ДЦР по механизму негомологичного объединения концов (NHEJ).

Artemis/Snm1 является специфичной 5'→3' экзонуклеазой, субстратом для которой служит одноцепочечная ДНК. При ассоциации с каталитической субъединицей АТМ фактор Artemis/Snm1 фосфорилируется и проявляет гидролитическую активность в отношении свисающих 5'- и 3'-концов и экзонуклеазную активность, расщепляющую петли ДНК. Для репарации МЦС высших эукариот этот фактор существенного значения не имеет, и его функция полностью отличается от функции его паралога у дрожжей (Ishiai *et al.*, 2004).

Механизм появления ДЦР при репарации МЦС до последнего времени оставался загадочным. Было достоверно известно, что это связано с процессом репликации. Недавно было установлено, что Mus81-Eme1 комплекс, представляющий собой структурно-специфичную экзонуклеазу, отвечает за формирование ДЦР при репарации МЦС (Hanada *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007). Экзонуклеаза Mus81 делает надрез одной нити ДНК в разветвленной структуре ДНК, имеющей три двуцепочечных ответвления, которая как интермедиат появляется при остановке репликативной вилки. При этом показано, что при остановке репликативной вилки, вызванной одноцепочечными разрывами, сформированными вследствие воздействия химических или медицинских препаратов, активности Mus81 не требуется. Один двуцепочечный конец, возникший в результате действия Mus81-Eme1 комплекса, является подходящим субстратом для ГР. Генерированные экзонуклеазой ДЦР процессируются и участвуют в ГР с привлечением Rad54, при этом Mus81 и Rad54 физически контактируют друг с другом (Hanada *et al.*, 2006) (рис. 11).

Существуют несколько точек зрения на последовательность событий при репарации МЦС у высших эукариот и набор факторов, участвующих в этом процессе. Для всех экспериментально подкрепленных схем репарации МЦС предполагаются следующие участники процесса.

В S-фазе происходит встреча репликативной вилки с повреждением. Вследствие экзонуклеазной активности Mus81 возникают ДЦР. Гетеродимер ERCC1-XPF проявляет эксцизионную или экзонуклеазную активность совместно с RPA. Происходит репаративная неконсервативная ГР, за которой следует второй раунд

эксцизии гетеродимером ERCC1-XPF и полное удаление диаддукта. Двуцепочечный конец процессируется репарирующими факторами. Далее следует консервативная ГР и восстановление репликативной вилки.

Последовательность событий в некоторых случаях дискуссионна. Так, показано, что на начальном этапе репаративного процесса NER и формирование ДЦР могут следовать друг за другом в обратном порядке. В таком случае первоначально индуцируется эксцизия повреждения и освобождение МЦС. Далее при движении репликативная вилка обрывается на участке одноцепочечного интермедиата и таким образом формируется ДЦР (Rothfuss, Grompe, 2004).

Для G1- и G2-фаз процесс репарации может начинаться с активации эксцизионной системы, однако завершение процесса, как указывается в большинстве работ, требует продвижения клетки в S-фазу, формирования ДЦР и их репарации после полного удаления аддукта.

Показано, что МЦС, возникающие в активно транскрибирующихся районах хромосом, репарируются предпочтительнее по сравнению с транскрипционно молчащими локусами (Heyer, 2004). Предполагается, что блокирование транскрипции определяет токсичность МЦС в G1- и G2-фазах клеточного цикла (Hanada *et al.*, 2006).

Экспериментальная неоднозначность представлений о последовательности событий при репарации МЦС не позволяет в настоящем обзоре обобщить до общепризнанной схемы механизм репарации такого повреждения. Мы полагаем, что анализ полученных фактов в контексте, обозначенном авторами, будет наиболее правильным подходом в оценке молекулярных событий, имеющих место при репарации МЦС у высших эукариот.

2.4. Некоторые экспериментально обоснованные схемы репарации МЦС у млекопитающих, описанные в мировой литературе за последние пять лет

В работе группы Kanaar (Hanada *et al.*, 2006) было показано, что Mus81-Eme1 комплекс вовлечен в формирование ДЦР при репарации МЦС в S-фазе клеточного цикла. Показано, что ДЦР возникают после индукции МЦС в ходе

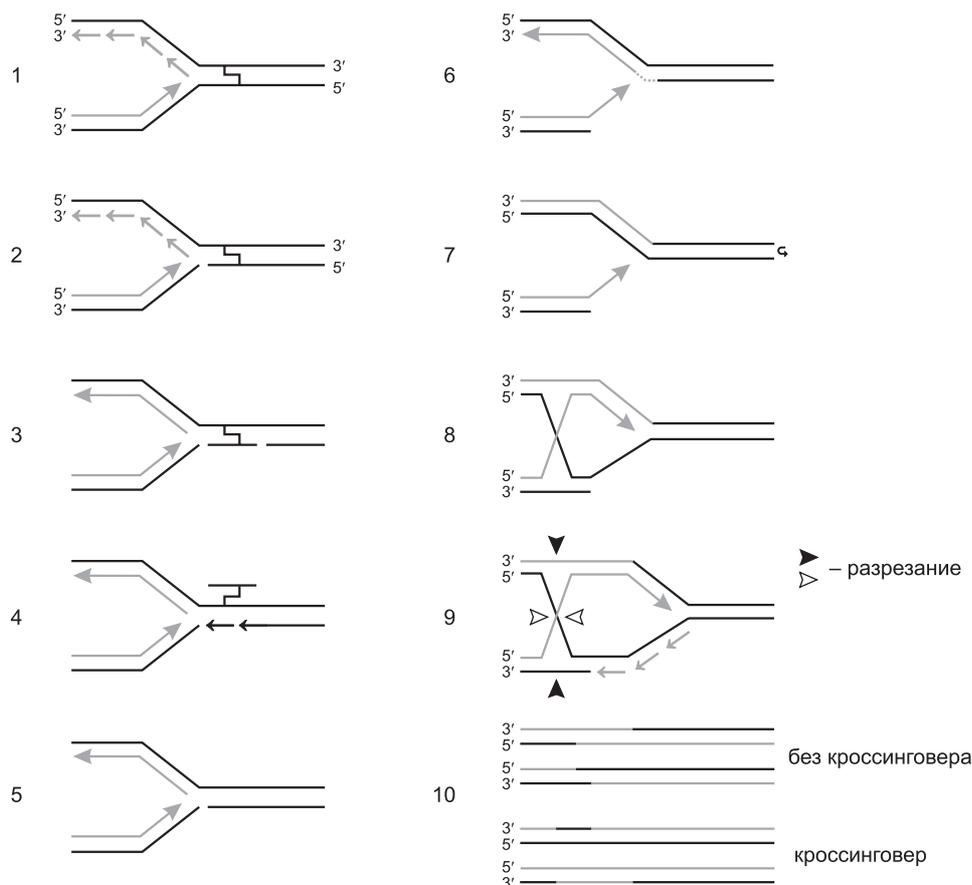


Рис. 11. Репарация МЦС в S-фазе у высших эукариот.

1 – репликативная вилка останавливается при столкновении с МЦС; 2 – Mus81-Eme1 фактор осуществляет надрез одной нити ДНК, что приводит к возникновению ДЦР; 3 – ERCC1-XPF эндонуклеаза осуществляет надрезы в расплавленной цепи ДНК с двух сторон от МЦС; 4 – происходят «выворачивание» аддукта (олигомера, прикрепленного при помощи МЦС к одной из цепей ДНК) и начало ресинтеза ДНК TLS полимеразой; 5 – второй раунд эксцизии и репарации с использованием матричного синтеза; 6 – генерированный двухцепочечный конец процессируется специфичной экзонуклеазой, в результате чего образуется свободный 3'-конец; 7 – лигирование ресинтезированной ДНК; 8 – поиск гомологии фактором Rad54 и инвазия свободного 3'-конца при помощи Rad52; 9 – восстановление репликативной вилки со сменой лидирующей и отстающей цепей; 10 – продукты репликации (Helleday, 2003).

репликации без участия ERCC1-XPF комплекса (Niedernhofer *et al.*, 2004).

Этот факт определяет некоторые особенности репаративного процесса МЦС. В целом схема репарации выглядит следующим образом (рис. 12). МЦС препятствует плавлению нити ДНК, требуемой для репликации, и это индуцирует остановку репликативной вилки. Точная позиция остановки репликативного комплекса не известна, репликативные геликазы могут остановиться в нескольких нуклеотидах от сшитой нуклеотидной пары. Появление одноцепочечного участка в синтезируемой цепи ДНК связано с раскоординацией в синтезе лидирующей и опаздывающей цепей.

В области репарации МЦС формируются интермедиатные разветвленные структуры двуцепочечной ДНК, содержащие одноцепочечный участок. Эти структуры являются субстратом для разрезания Mus81 нуклеазой, которая, как показано в анализируемой работе, отвечает за формирование ДЦР при репарации МЦС. Установлено, что для ERCC1-XPF субстратом для разрезания служит трехразветвленная структура ДНК, две ветви которой представляют собой одноцепочечные участки, в то время как для активности Mus81 требуется трехразветвленная структура ДНК, все ветви которой представляют собой дуплексы (De Silva *et al.*, 2002). Mus81 разрезает указанный интермедиат,

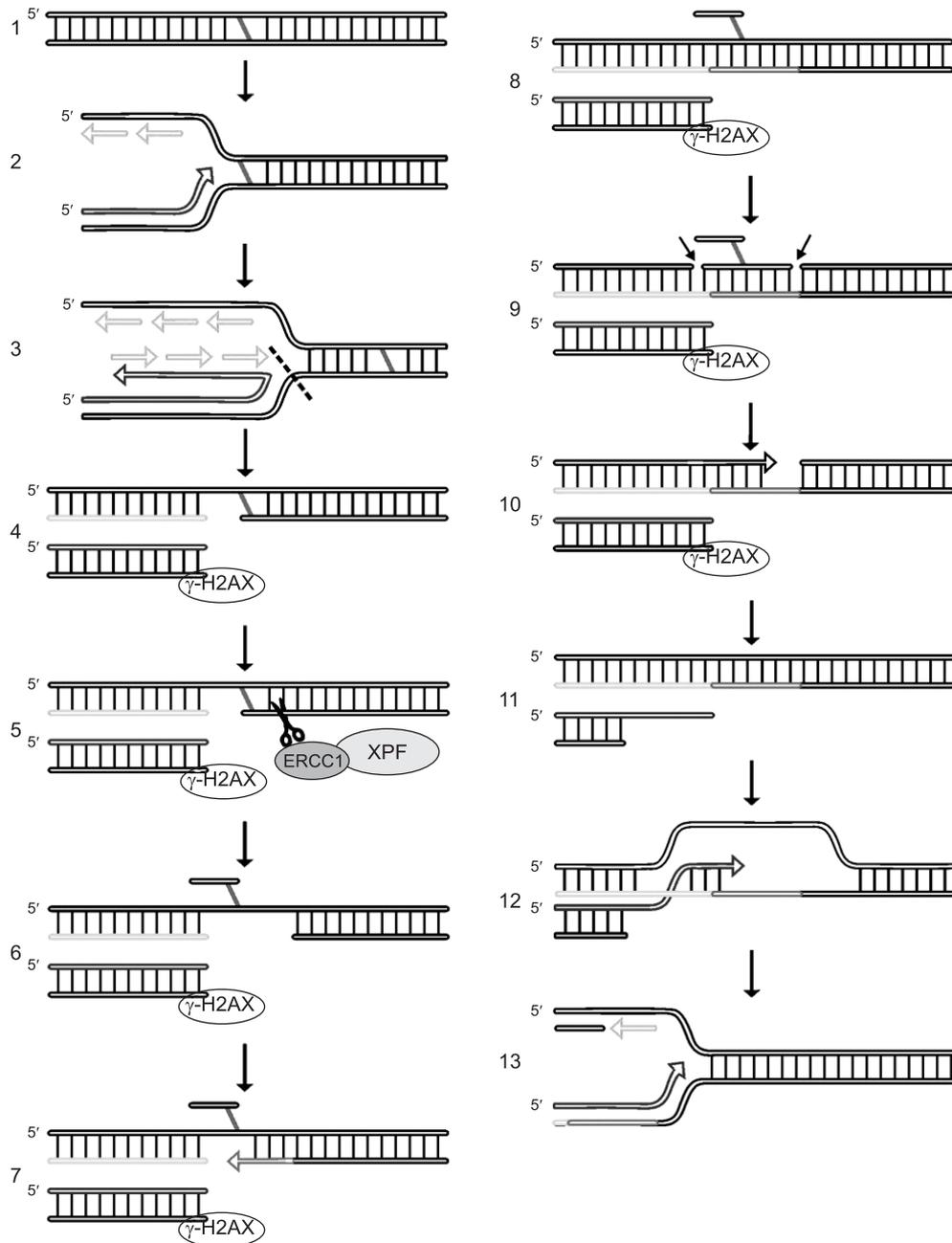


Рис. 12. Схема репарации МЦС по: Niedernhofer с соавт. (2004).

1, 2 – возникновение МЦС, остановка репликативной вилки при встрече с повреждением; 3 – гидролиз Mus81 и формирование ДЦР; 4 – фосфорилирование гистона H2AX на 3'-конце ДЦР нити ДНК; 5, 6 – надрезание нити ДНК с 5'-стороны от МЦС ERCC1-XPF комплексом и «выворачивание» олигонуклеотида, присоединенного через МЦС; 7, 8 – заполнение бреши TLS полимеразой Pol ζ по матрице комплементарной цепи ДНК; 9, 10 – второй этап эксцизии ERCC1-XPF фактором, окончательное вырезание аддукта и второй этап ресинтеза ДНК; 11 – процессирование 3'-конца ДЦР; 12 – инвазия активированного конца в гомологичный участок ДНК; 13 – восстановление репликативной вилки.

что приводит к возникновению ДЦР, фосфорилированию гистона H2AX и формированию фокусов репарации. Несмотря на серьезную опасность для клетки, ДЦР необходимы для удаления МЦС и восстановления репликатив-

ной вилки. ДЦР могут служить как «точка выхода» для белков репликации остановившейся репликативной вилки. Также не исключается возможность того, что при формировании ДЦР происходит сбрасывание позитивных витков

суперспирали, ингибирующих присоединение к ДНК множества ДНК-связывающих белков, к которым принадлежат многие репарирующие МЦС факторы. В обоих случаях появление ДЦР создает условия для направления в сайт репарации факторов репарации, включая эксцизионные нуклеазы.

Для репарации сайта МЦС требуется активность гетеродимера ERCC1-XPF, надрезающего ДНК дуплекс по одной цепи в нереплицированном районе от МЦС. «Выворачивание» кросслинкованного аддукта от центра спирали создает эффект одноцепочечного участка, который затем расширяется до нескольких сот пар оснований (De Silva *et al.*, 2000; Akkari *et al.*, 2001; Rothfuss, Grompe, 2004).

Следующим шагом в репарации предполагается TLS через сайт МЦС. Для дрожжей при репарации в стационарных фазах клеточного цикла показан путь с участием TLS полимераз. Предполагается, что у высших эукариот может существовать аналогичный механизм, позволяющий репарировать МЦС (Zhang *et al.*, 2007).

После второго раунда эксцизии ERCC1-XPF и XPG и матричного синтеза репарация МЦС завершается. ГР между дочерними молекулами ДНК может заново восстановить репликативную вилку. Предполагается, что Mus81 нуклеаза формирует 3'-конец разрезанного дуплекса, который инвазирует и спаривается с другой дочерней молекулой таким образом, что образуется праймер для полимеризации. Показано физическое взаимодействие между Mus81 и белком ГР Rad54. Считается, что оба фактора вовлечены в одни и те же связанные с репликацией пути репарации МЦС.

Таким образом, в предложенной схеме (рис. 12) ДЦР формируются до функционирования эксцизионной системы ERCC1-XPF. Предполагается привлечение TLS для полного восстановления интермедиатов репарации МЦС. Восстановление репликативной вилки требует ГР между дочерними молекулами ДНК.

Другая модель предлагается в работе De Silva с соавт. (2000) (рис. 13). В проведенных экспериментах показано, что ДЦР возникают сразу после обработки нитроген мустардом. Максимальное количество ДЦР обнаруживается в S-фазе клеточного цикла, когда отсутствуют какие-либо

признаки репарации МЦС. Этот факт свидетельствует о том, что для активации процессов репарации требуется репликация, и что появление ДЦР предшествует вырезанию аддукта.

Как было установлено в цитируемой работе, репарация ДЦР происходит при обязательном участии комплекса ERCC1-XPF-RPA, который функционирует в таком ансамбле, как 3'→5' экзонуклеаза, проходящая МЦС. Также в репарации задействован механизм ГР и не обнаружены факторы NHEJ механизма. Для репарации МЦС обязательны XRCC2 и XRCC3 – белки высших эукариот, определяющие ГР и относящиеся к Rad51 эпистатической группе. Замещение цепей, стимулированное возникновением МЦС, требует как ERCC1-XPF-RPA, так и XRCC2 и XRCC3 факторов для эффективного завершения процесса рекомбинации. При этом установлено, что гетеродимер ERCC1-XPF не требуется для репарации ДЦР.

На основании полученных экспериментальных фактов была предложена следующая модель репарации МЦС (рис. 13). В делящихся клетках репликативная вилка встречается с МЦС, инактивируется и формируется ДЦР. ДЦР индуцирует ГР, которая сопряжена с инвазией, по-видимому, внешней гомологичной цепи, опосредованной функционированием XRCC2 и XRCC3. Это наиболее ранние события, предшествующие ERCC1-XPF эксцизионной активности. Миграция цепи может останавливаться в сайте МЦС, и это требует вырезания аддукта для продолжения миграции цепи, как это описано для *E. coli* (см. рис. 6, аддукт с олигонуклеотидом прикреплен через МЦС только к одной из цепей ДНК, вторая цепь свободна и по ней ведется синтез с комплементарной цепи ДНК). Ранее было отмечено, что гетеродимер ERCC1-XPF в присутствии RPA функционирует как специфичная экзонуклеаза и способен проходить повреждение. Предполагается, что в этот момент времени ERCC1-XPF проходит повреждение за счет своей 3'→5' экзонуклеазной активности. Одноцепочечный участок, сформированный как результат такого гидролиза, заполняется за счет продолжающейся миграции гомологичной цепи, привлеченной в качестве матрицы для синтеза. Оставшаяся половина аддукта последовательно удаляется вторым раундом эксцизии ERCC1-XPF. Последующие события, определя-

ющие восстановление репликативной вилки и возобновление репликации, в данной модели не рассматриваются.

В следующей работе (Rothfuss, Grompe, 2004) были приведены факты того, что атака МЦС гетеродимером ERCC1-XPФ происходит независимо от ДНК репликации и соответственно S-фазы клеточного цикла. При этом ДЦР появляется только тогда, когда клетка входит в стадию синтеза (рис. 14).

Цитируемая работа связана с анализом участия FA/BRCA метаболического пути в репарации МЦС. FA (Fanconi anemia) мутантные клетки в отличие от нормальных проявляют значительную задержку в S-фазе (Akkarı et al., 2000; Kugaoka et al., 2000). BRCA факторы

контролируют ГР при появлении ДЦР ДНК (Krasnoshtein, Buchwald, 1996; Larminat et al., 2002; Bhagwat et al., 2009). При появлении повреждения в молекуле ДНК происходит активация FANCD2 фактора. Активированный (моноубиквитинированный) FANCD2 (FANCD2-L) обеспечивает соединение BRCA2 с RAD51 и посадку комплекса на сайты повреждения ДНК. Комплекс BRCA2-RAD51 в свою очередь осуществляет поиск гомологичных последовательностей на гомологичных хромосомах или в гомологичных регионах сестринских хроматид, что необходимо для процесса ГР.

Показано, что FA/BRCA метаболический путь, требующийся в ходе репарации МЦС, активируется в S-фазе после формирования ДЦР.

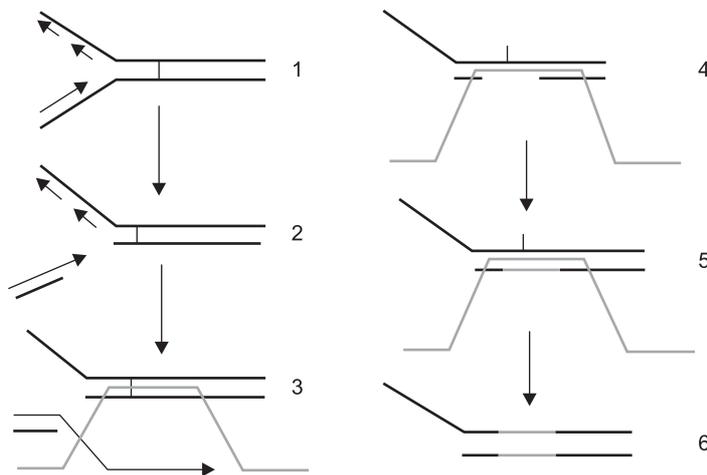
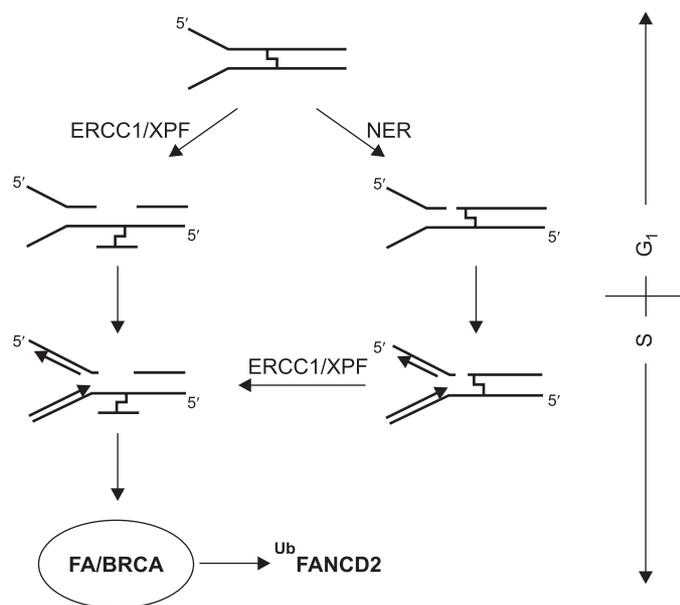


Рис. 13. Схема репарации МЦС по: De Silva с соавт. (2000).

1, 2 – остановка репликативной вилки и формирование ДЦР; 3 – направление гомологичного участка ДНК в сайт репарации за счет функционирования XRCC2 и XRCC3; 4 – «отъякоривание» динуклеотидааддукта за счет экзонуклеазной активности ERCC1-XPФ и RPA; 5 – репаративный синтез по гомологичному участку; 6 – полная элиминация аддукта и второй этап репаративного синтеза, в результате чего происходит удаление МЦС.

Рис. 14. Схема репарации МЦС по: Rothfuss, Grompe (2004).

МЦС опознается клеткой мгновенно. Первый путь ответа клетки на повреждение – активация ERCC1-XPФ в комплексе с hMutSβ, что приводит к надрезанию цепи ДНК с двух сторон от МЦС и «отъякориванию» аддукта. При использовании клеткой второго пути белки NER системы осуществляют надрез с 5'-стороны от МЦС, при этом не образуется интермедиата с олигонуклеотидом, прикрепленным к цепи ДНК через МЦС. В S-фазе при столкновении репликативной вилки с повреждением в обоих случаях происходит образование ДЦР. Активируются FA/BRCA белки, что приводит к убиквитинированию FANCD2. Эта система инициирует процесс ГР с последующей репарацией ДЦР.



Авторы приводят модель иницирующих событий при репарации МЦС. Данные, полученные в работе (Rothfuss, Grompe, 2004), свидетельствуют о том, что повреждение, такое, как МЦС, обнаруживается клеткой практически мгновенно. После обнаружения МЦС формируется расплетенный ДНК-интермедиат, позволяющий гетеродимеру ERCC1-XPF и XPG сделать надрезы, обрамляющие сайт сшивки. Это приводит к «отъякориванию» аддукта, соединенного с олигонуклеотидом. Такая структура формируется независимо от репликации в любом месте генома. Обнаруженные факты предполагают, что инцизия МЦС в исследуемой клеточной системе не связана со входом клетки в S-фазу цикла.

Биохимические данные предполагают возможность участия в инцизии МЦС двух различающихся механизмов. В первом случае активность гетеродимера ERCC1-XPF в комбинации с фактором hMutS β производит надрезы в 3'- и 5'-области от МЦС, что приводит к освобождению одного плеча сшивки. Одноцепочечный участок заполняется в ходе TLS. Во втором раунде инцизии происходит двойной надрез в 5'-области от сшивки, приводящий к вырезанию 28 нуклеотидов. МЦС в положении снаружи от центра спирали сохраняется.

В другом варианте уже экзонуклеазная активность ERCC1-XPF в комплексе с RPA может осуществлять репаративные действия также без участия репликации и в конечном счете приводит к «отъякориванию» МЦС в ходе G1-фазы.

Для дальнейшего процесса репарации требуется участие других молекулярных систем. В ходе репликации ДНК возникают ДЦР и запускается клеточный ответ на возникшее повреждение. Сравнение кинетики появления одноцепочечных надрезов и ДЦР свидетельствует о том, что ДЦР появляются позднее. И поскольку ДЦР формируются в S-фазе, то было высказано предположение, что ДЦР формируются пассивно при аресте репликативной вилки в сайте процессированного инцизионными нуклеазами повреждения.

Две группы белков необходимы клетке для нормального процесса репарации МЦС: ERCC1-XPF комплекс и FA семейство белков. FA белки не требуются на начальных стадиях репарации МЦС и важны только после форми-

рования ДЦР. Тем не менее экспериментально не установлено, в какое время происходит активация FA пути репарации – до «отъякоривания» МЦС или после. Данные, полученные в работе Bhagwat с соавт. (2009), показывают, что активность ERCC1-XPF нуклеазы не является необходимым условием для активации FA пути, который заключается в моноубиквитинировании FANCD2. Предполагается, что остановка реплисомы при столкновении с повреждением в ДНК является сигналом для активации ATR-киназы, которая и активирует FA путь. Собранные вместе все имеющиеся данные, можно представить следующую модель репарации МЦС в клетке (рис. 15).

FA белки синтезируются в клетке при появлении ДЦР в случае γ -радиации и являются факторами механизма NHEJ. Также FA белки требуются и для репарации МЦС. Известно, что FA белки обнаруживаются в высокой концентрации в тканях, содержащих быстро реплицирующиеся прогениторные клетки (Escarceller *et al.*, 1998; Shimura *et al.*, 2008). Кроме этого, описано, что FANCD2-L обнаруживается в клетке в течение нормальной S-фазы. Эти факты могут свидетельствовать о возникновении ДЦР при нормально протекающей репликации. На существование таких так называемых транзитных ДЦР указывает работа Derbyshire с соавт. (1994), где показано, что для репарации таких повреждений используется механизм, аналогичный NHEJ, позволяющий в течение нескольких минут репарировать дефект, не вызывая при этом активации системы контроля и ареста клеточного цикла. Спонтанное образование ДЦР в клетке может быть связано не только с ошибками, возникающими в процессе репликации, но и с перемещением мобильных генетических элементов в геноме, как это показано у *Drosophila melanogaster* (Чмуж и др., 2007).

В работе Rothfuss, Grompe (2004) рассматривается еще один вариант репарации МЦС. В S-фазе в момент возникновения сшивки остановившаяся репликативная вилка формирует подходящий субстрат для ERCC1-XPF. Это может приводить к возникновению двойного надреза в 5'-области от сшивки, но сама МЦС остается интактной. В ходе дальнейшей прогрессии через S-фазу естественным путем образуется ДЦР. При этом торсионные напряже-

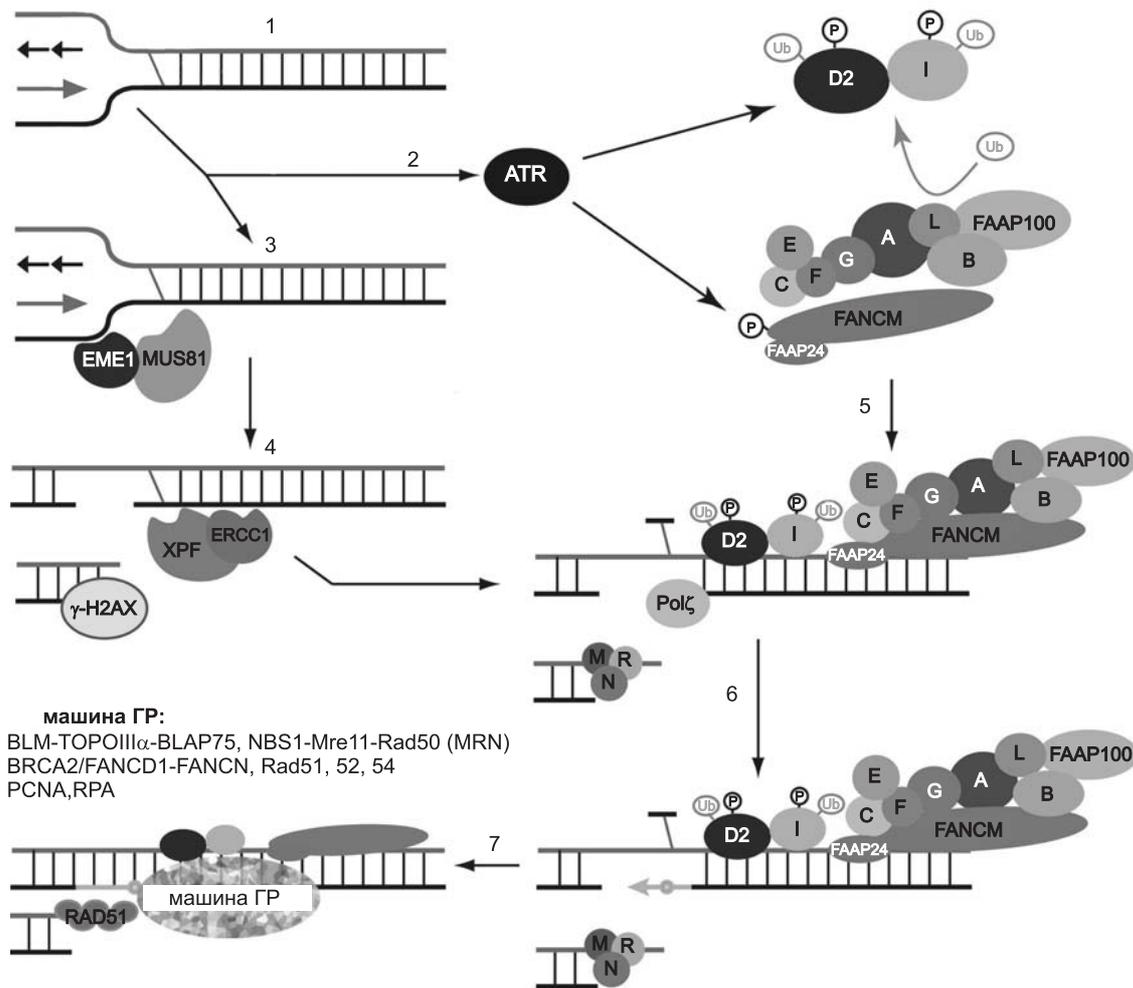


Рис. 15. Схема репарации МЦС по: Bhagwat с соавт. (2009).

1 – остановка репликативной вилки в результате столкновения с повреждением в молекуле ДНК; 2 – активация ATR-киназы, которая фосфорилирует белки FA семейства, что в свою очередь приводит к моноубиквитинированию FANCD2 и активации FA пути репарации; 3, 4 – Mus81-Eme1 и ERCC1-XPF нуклеазы вносят одноцепочечные разрывы с двух сторон от МЦС, что приводит к высвобождению и выворачиванию олигонуклеотида, связанного с ДНК через МЦС, и образованию ДЦР; 5 – посадка активированных белков FA семейства на хроматин и образование фокуса репарации; 6 – одноцепочечная брешь заполняется с использованием TLS; 7 – репарация ДЦР и восстановление репликативной вилки при помощи молекулярной машины ГР.

ния сбрасываются и возникает структура ДНК, которая плавится в 3'-области от МЦС. Далее расплетенный участок ДНК также может быть надрезан гетеродимером ERCC1-XPF, что приведет к «отъякориванию» сшивки. При такой схеме репарации в зависимости от ситуации (одно-/двунаправленная репликативная вилка) в сайте МЦС могут сформироваться два ДЦР. Образование ДЦР запускает метаболический путь, связанный с активностью FA/BRCA, который по механизму, аналогичному NHEJ, репарирует возникший интермедиат. Считается, что такой

путь репарации МЦС ведет к возникновению и накоплению мутаций.

В следующей работе (Evans *et al.*, 2008) говорится о том, что негомологичная рекомбинация – главный путь репарации ДЦР в ДНК соматических клеток млекопитающих. Одним из главных путей негомологичной репарации ДЦР является breakage-fusion-bridge cycle (BFBC) (Derbyshire *et al.*, 1994). В процессе BFBC разорванная хромосома реплицируется во время S-фазы, и концы сестринских хроматид, у которых отсутствует теломерный конец, объединяются друг с дру-

гом. В результате образуется дицентрическая хромосома, которая при расхождении в митозе разрывается, что в свою очередь приводит к потере части генетической информации и к смерти клетки, если данное событие не стабилизируется другими мутационными процессами.

В процессе негомологичного объединения концов участвует NHR-лигаза, активность которой отлична от активности трех известных лигаз в клетках млекопитающих. На модели опухолевых клеток (легочная карцинома человека A549) было показано, что NHR-лигаза не является чувствительной к природе концов ДНК. Она может сшивать тупые концы ДНК, липкие негомологичные концы с выступающей 5'-частью и даже тупой конец с липкими (однако при выступающем 3'-конце лигирование идет намного хуже). При этом концы ДНК модифицируются, прежде чем происходят их объединение и ковалентная сшивка.

Лигирование происходит при активности комплекса, состоящего из NHR-лигазы, 3'→5' экзонуклеазы, HRP-1 и RPA белков. Данный комплекс способен находить гомологичные участки ДНК, обладает 3'→5' экзонуклеазной и лигазной активностями. Таким образом, можно предположить следующую модель негомологичного объединения концов в клетках млекопитающих (рис. 16). Первоначально происходит процессирование концов разорванной ДНК с образованием одноцепочечного 5'-конца;

на следующем этапе за счет активности HRP-1 происходит гомологичное спаривание участвующих в процессе ДНК субстратов, после чего NHR-лигаза осуществляет ковалентное сшивание выступающего 5'-конца с 3'-концом на гомологичной нити ДНК, сохраняя при этом 5'-фосфат.

Другая работа (Akçari *et al.*, 2000) предлагает свое видение проблемы репарации МЦС. В проведенных экспериментах клетки были синхронизированы в каждом из клеточных циклов – G1, S, G2, где они были обработаны кросслинкирующим агентом псораленом, после чего клеткам давали возможность нормального перехода в митоз. В отличие от обработки ионизирующим облучением МЦС, введенные в G2-фазе, не вызывали ареста клеточного цикла, ареста в митозе и вообще хромосомных разрывов. Однако последовательный пассаж через S-фазу клеточного цикла вызывал как арест клеточного цикла, так и разрывы хромосом. Аналогично МЦС, введенные в G1-фазе, не вызывали ареста в G1/S, причем также не обнаруживалась и значимая эксцизионная активность. Авторы считают, что МЦС не определяются клеткой и не репарируются в G1- и G2-фазах клеточного цикла. Предполагается, что после индукции МЦС для активации систем, контролирующей прогрессию клеточного цикла, необходима ДНК репликация. Отсутствие задержки и ареста в G2-фазе предполагает, что в клетке в этой фазе

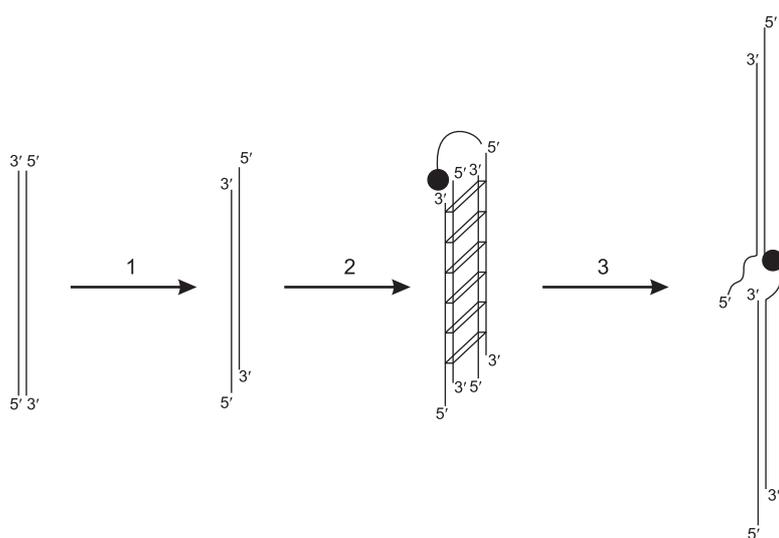


Рис. 16. Модель негомологичного объединения концов при участии NHR-лигазы.

1 – процессирование концов ДНК за счет 3'→5' экзонуклеазной активности комплекса; 2 – гомологичное спаривание нитей ДНК; 3 – лигирование концов с образованием одноцепочечного участка в молекуле ДНК (Derbyshire *et al.*, 1994).

клеточного цикла еще не сформировались ДЦР, которые являются сигналом для активности трансдуцирующих киназ и блокировки молекулярных синтетических процессов (рис. 17). В работе даны количественные оценки, демонстрирующие, что клетка может удалить 2500 МЦС на геном со скоростью 11 МЦС на геном в час.

Возможны два пути репарации МЦС. Удаление МЦС может происходить в результате лигирования двух двуцепочечных концов, как это предполагается для FA клеток (по-видимому, двух двуцепочечных концов, встретившихся в месте МЦС двух репликативных вилок). Этот процесс всегда будет приводить к потере генетической информации и, следовательно, всегда будет мутагеном и токсичен. Возможен второй вариант репарации МЦС, когда для репаративного процесса используется гомологичная последовательность той же самой хромосомы, а не последовательность сестринской хроматиды, как это показано в работе (Richardson *et al.*, 1998).

В заключение необходимо сказать о транзитных ДЦР, формирующихся в результате действия афидиколина. Афидиколин ингибирует

активность полимераз альфа, дельта и эpsilon в эукариотических клетках, но не влияет на синтез белков, РНК и нуклеотидов. Афидиколин образует комплекс с ДНК-полимеразой и действует только на стадии элонгации цепей. Это означает, что антибиотик блокирует прогрессию клеток в S-фазе. При остановке репликативной вилки в случае щадящего воздействия препарата формируются транзитные ДЦР, которые быстро репарируются, и при этом не запускается арест клеточного цикла. В процессе формирования и репарации таких разрывов принимают участие ATR, Mus81 нуклеаза, BLM геликаза и NHEJ-процесс (по-видимому, опосредуемый FA факторами). Если ДЦР индуцированы в клетках, дефектных по указанным факторам репарации, то восстановление повреждения осуществляется с привлечением механизма ГР. Предполагается, что три фермента участвуют в репарации случайных дефектов при репликации таким образом, что не происходит блокирование репликации и не активируется сигнал, индуцирующий арест клеточного цикла (Shimura *et al.*, 2008) (рис. 18).

Множество возможностей в репарации МЦС говорит о сложности данного процесса и его

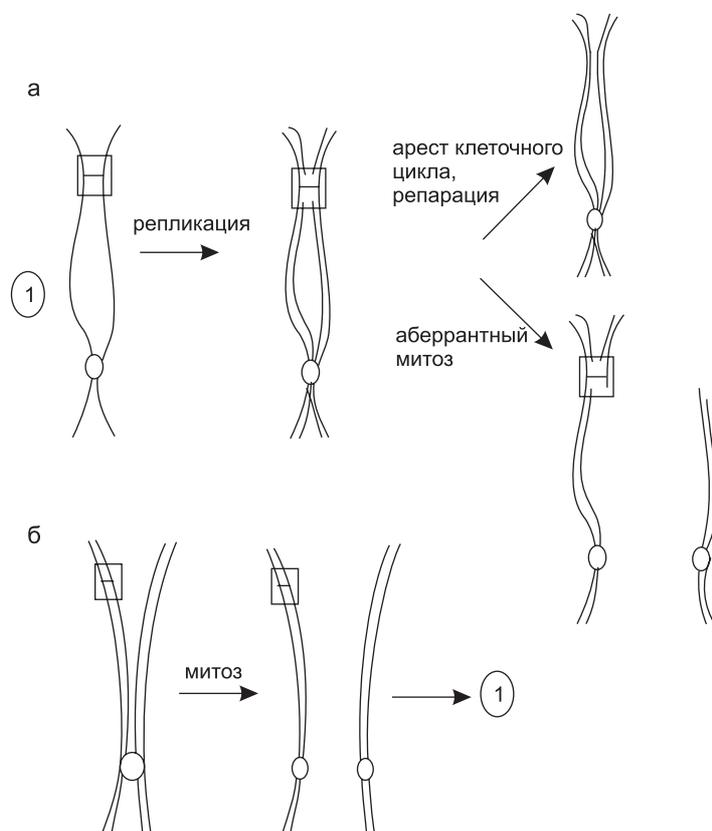


Рис. 17. Модель клеточного ответа на МЦС в зависимости от фазы клеточного цикла.

а – при возникновении МЦС непосредственно перед моментом репликации (конец G1-/начало S-фазы клеточного цикла) происходит остановка репликативной вилки в месте повреждения. Это вызывает арест клеточного цикла, так как клетка не может войти в митоз, пока не произойдет полная репликация хромосом. Невозможность нормального завершения процесса репарации приведет к аберрантному митозу, сопровождаемому разрывом хромосомы и гибелью клетки; б – пострепликативные МЦС, возникающие в G2-фазе, клеткой не опознаются, и клетка благополучно вступает в нормальный митоз. Арест клеточного цикла происходит только, когда дочерняя клетка, в которую попала хромосома с МЦС, войдет в стадию репликации (Akkari *et al.*, 2000).

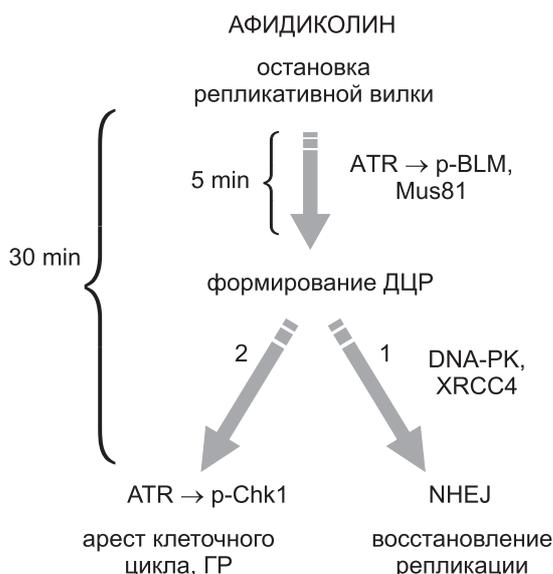


Рис. 18. Схема предполагаемых событий, возникающих в ответ на воздействие ингибитора репликации афидиколина.

Небольшие дозы ингибитора вызывают временную остановку репликативной вилки, в результате чего происходит фосфорилирование BLM геликазы ATR киназой, и совместно с Mus81 индуцируется образование ДЦР. Такое повреждение быстро репарируется негомологичным лигированием концов, что ведет к восстановлению репликации (1). При отсутствии компонентов NHEJ или при высокой дозе ингибитора (2) повреждение не репарируется, репликация не восстанавливается и происходит активация систем, арестующих прогрессию клеточного цикла (Shimura *et al.*, 2008).

зависимости от имманентного выбора клетки, который, по-видимому, непредсказуем. Тем не менее три принципиальных составляющих

процесса репарации МЦС у высших эукариот одинаковы для всех предложенных схем. Это NER, формирование ДЦР и ГР.

Факторы и их свойства

UvrABC – эксцизионный комплекс *E. coli*, делающий надрезы с 5'- и 3'-стороны от МЦС.

UvrD – геликаза *E. coli*.

PolII – полимеразы *E. coli*; при репарации МЦС проявляет 5'→3' экзонуклеазную активность и формирует брешь размером ~ 700 нуклеотидов.

RecA – белок рекомбинации *E. coli*, осуществляющий гомологичное спаривание с подходящей матрицей.

Rad1, Rad2, Rad3, Rad4, Rad9, Rad10, Rad14 – Rad3 эпистатическая группа белков, образующая NER-систему у *S. cerevisiae* и участвующая в репаративном процессе при репарации МЦС.

Rad2 – фактор, разрезающий нить ДНК с 3'-стороны от МЦС.

Rad10–Rad1 – гетеродимер, разрезающий нить ДНК с 5'-стороны от МЦС.

Rad3 и Rad9 – трансдуцирующие киназы, запускающие каскад событий, связанных с арестом клеточного цикла.

Rad1–Rad9–Hus1 – комплекс, представляющий собой «скользящую застежку»; является сенсором возникающих повреждений.

Rad17 – фактор, необходимый для ассоциации комплекса Rad1–Rad9–Hus1 с абберрантной ДНК.

Rad51, Rad52, Rad54 – Rad51 эпистатическая группа белков, отвечающая за репаративную ГР у *S. cerevisiae*.

Rad51 – белок рекомбинации, формирующий филамент с одноцепочечным участком конца разорванной молекулы ДНК, процессированного после возникновения ДЦР.

Rad54 – фактор, отвечающий за поиск гомологии по геному.

Rad52 – фактор, отвечающий за инвазию цепи и формирование гетеродуплекса.

Pso1/Rev3/Polζ – TLS полимеразы, осуществляющая синтез через МЦС.

Polδ – основная полимеразы эукариот.

PCNA (proliferating cell nuclear antigen) – белок, участвующий в репликации эукариот как процессивный фактор для Pol δ .

Pso2/Snm1 – фактор, который в комплексе с PIAS1 регулирует иммобилизацию и модификацию в сайте повреждения (фокусах репарации) других репаративных белков и действует как структурный белок, формирующий подходящий субстрат для ГР.

PIAS1 – короткий убиквитин-подобный модификатор (SUMO) E3 лигазы, первоначально определенный как репрессор транскрипции STAT1.

Rad6 и Rad18 – факторы, предположительно обладающие TLS полимеразной активностью, участвующие в репарации МЦС в G2-фазе клеточного цикла дрожжей.

ERCC1-XPF – гетеродимер, представляющий собой структурно-специфичную эндонуклеазу, которая делает надрез с 5'-конца от МЦС; обладает 3'→5' экзонуклеазной активностью и способностью проходить МЦС.

XPG – эндонуклеаза, которая делает надрез с 3'-конца от МЦС.

XPA – белок, связывающийся с местом повреждения и помогающий сборке репарирующего комплекса; взаимодействует с ERCC1.

RPA (replication protein A) – репликативный белок A; связывается с одноцепочечной ДНК и удерживает ее в таком состоянии.

Artemis/Snm1 – специфичная экзонуклеаза с активностью к одноцепочечной ДНК; проявляет гидролитическую активность в отношении свисающих 5'- и 3'- концев и эндонуклеазную активность, расщепляющую петли ДНК.

ATM (ataxia-telangiectasia mutated) – иерархическая протеинкиназа эукариот; индуцирует каскад событий в ответ на ДЦР, остановку репликативной вилки, общее изменение структуры хроматина высших порядков.

Mus81-Eme1 – комплекс, представляющий собой структурно-специфичную эндонуклеазу; отвечает за формирование ДЦР при репарации МЦС.

H2AX – гистон, который в фосфорилированном состоянии (γ -H2AX) является маркером появления ДЦР.

XRCC2 и XRCC3 (X-ray repair cross complementing) – факторы, которые в комплексе с Rad51 паралогами RAD51C и RAD51B участвуют в формировании фокуса репарации и ГР.

hMutS β – фактор, который образует комплекс с ERCC1-XPF при инцизии МЦС.

FA (Fanconi anemia) – анемия Фанкони, аутосомальное рецессивное генетическое заболевание, связанное с нарушениями в генах, кодирующих белки FANC.

FA/BRCA – метаболический путь в репарации МЦС.

MRN – комплекс белков, продуктов генов человека Rad50/Mre11/Nbs1; участвует в поддержании геномной стабильности, жизнеспособности клетки и активации сигналов контроля клеточного цикла.

BRCA (breast cancer) – семейство белковых факторов, контролирующих ГР ДЦР ДНК.

BRCA1 – фактор, который взаимодействует с MRN комплексом и гистоном γ -H2AX в сайте репарации; обеспечивает «рекрутирование» к сайту репарации других факторов репарации.

BRCA2 – фактор, регулирующий Rad51-рекомбинацию; в комплексе с RAD51 производит поиск гомологии; препятствует кроссинговеру между смещенными сестринскими хроматидами, что предполагает его роль в когезии сестринских хроматид.

FANCD2 – фактор, который в моноубиквитинированном состоянии (FANCD2-L) обеспечивает соединение BRCA2 с RAD51 и посадку комплекса на сайты повреждения ДНК.

ATR (ATM-related protein) – иерархическая протеинкиназа высших эукариот; активируется при нарушениях, связанных с остановкой репликативной вилки.

NHR-лигаза (nonhomologous repair-лигаза) – лигаза в клетках млекопитающих, не обладающая спецификой к структуре двухцепочечных концов; объединяет тупые концы ДНК, липкие негомолгичные концы с выступающей 5'-частью, тупой конец с липким (при выступающем 3'-конце лигирование идет намного хуже).

НРР-1 (homologous pairing protein) – фактор, опосредующий гомологичное спаривание ДНК субстратов.

Афидиколин – антибиотик, ингибирующий активность полимераз альфа, дельта и эpsilon в эукариотических клетках.

ВЛМ геликазы (Bloom's syndrome) – геликаза семейства RecQ, которая аккумулируется в сайте ДЦР; локализуется совместно с гистоном γ -H2AX, АТМ киназой, BRCA1 фактором.

Литература

- Чмуж Е.В., Шестакова Л.А., Волкова В.С., Захаров И.К. Разнообразие механизмов действия и функций ферментативных систем репарации повреждений ДНК у *Drosophila melanogaster* // Генетика. 2006. Т. 42. № 4. С. 363–375.
- Чмуж Е.В., Шестакова Л.А., Волкова В.С., Захаров И.К. Высококочувствительные экспериментальные системы инсерционного мутагенеза в репарационно-дефицитном генетическом окружении у *Drosophila melanogaster*: новые возможности для изучения пострепликационной репарации двуцепочечных разрывов ДНК и механизмов транспозиции мобильных генетических элементов // Генетика. 2007. Т. 43. № 1. С. 52–60.
- Adair G.M., Rolig R.L., Moore-Faver D. *et al.* Role of ERCC1 in removal of long non-homologous tails during targeted homologous recombination // EMBO J. 2000. V. 19. № 20. P. 5552–5561.
- Akkari Y.M., Bateman R.L., Reifsteck C.A. *et al.* DNA replication is required to elicit cellular responses to psoralen-induced DNA interstrand cross-links // Mol. Cell Biol. 2000. V. 20. № 21. P. 8283–8289.
- Akkari Y.M., Bateman R.L., Reifsteck C.A. *et al.* The 4N cell cycle delay in Fanconi anemia reflects growth arrest in late S phase // Mol. Genet. Metab. 2001. V. 74. № 4. P. 403–412.
- Barber L.J., Ward T.A., Hartley J.A., McHugh P.J. DNA interstrand cross-link repair in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle: overlapping roles for PSO2 (SNM1) with MutS factors and EXO1 during S phase // Mol. Cell Biol. 2005. V. 25. № 6. P. 2297–2309.
- Berardini M., Mackay W., Loechler E.L. Evidence for a recombination-independent pathway for the repair of DNA interstrand cross-links based on a site-specific study with nitrogen mustard // Biochemistry. 1997. V. 36. № 12. P. 3506–3513.
- Bhagwat N., Olsen A.L., Wang A.T. *et al.* XPF-ERCC1 participates in the Fanconi anemia pathway of cross-link repair // Mol. Cell Biol. 2009. V. 29. № 24. P. 6427–6437.
- Camensisch U., Dip R., Schumacher S.B. *et al.* Recognition of helical kinks by *xeroderma pigmentosum* group A protein triggers DNA excision repair // Nat. Struct. Mol. Biol. 2006. V. 13. P. 278–284.
- Cheng S., Van Houten B., Gamper H.B. *et al.* Use of psoralen-modified oligonucleotides to trap three-stranded RecA-DNA complexes and repair of these cross-linked complexes by ABC excinuclease // Biol. Chem. 1988. V. 263. № 29. P. 15110–15117.
- Dalbiès R., Payet D., Leng M. DNA double helix promotes a linkage isomerization reaction in trans-diamminedichloroplatinum(II)-modified DNA // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. № 17. P. 8147–8151.
- De Laat W.L., Appeldoorn E., Jaspers N.G., Hoeijmakers J.H. DNA structural elements required for ERCC1-XPF endonuclease activity // Biol. Chem. 1998. V. 273. № 14. P. 7835–7842.
- De Silva I.U., McHugh P.J., Clingen P.H., Hartley J.A. Defining the roles of nucleotide excision repair and recombination in the repair of DNA interstrand cross-links in mammalian cells // Mol. Cell Biol. 2000. V. 20. № 21. P. 7980–7990.
- De Silva I.U., McHugh P.J., Clingen P.H., Hartley J.A. Defects in interstrand cross-link uncoupling do not account for the extreme sensitivity of ERCC1 and XPF cells to cisplatin // Nucl. Acids Res. 2002. V. 30. № 17. P. 3848–3856.
- Derbyshire M.K., Epstein L.H., Young C.S.H. *et al.* Nonhomologous recombination in human cells // Mol. Cell Biol. 1994. V. 14. № 1. P. 156–169.
- Dronkert M.L., Kanaar R. Repair of DNA interstrand cross-links // Mutat. Res. 2001. V. 486. № 4. P. 217–247.
- Escarceller M., Buchwald M., Singleton B.K. *et al.* Fanconi anemia C gene product plays a role in the fidelity of blunt DNA end-joining // J. Mol. Biol. 1998. V. 279. № 2. P. 375–385.
- Evans J.W., Chernikova S.B., Kachnic L.A. *et al.* Homologous recombination is the principal pathway for the repair of DNA damage induced by tirapazamine in mammalian cells // Cancer Res. 2008. V. 68. № 1. P. 257–265.
- Evans E., Fellows J., Coffey A., Wood R.D. Open complex formation around a lesion during nucleotide excision repair provides a structure for cleavage by human XPG protein // EMBO J. 1997. V. 16. № 3. P. 625–638.
- Fishman-Lobell J., Haber J.E. Removal of nonhomologous DNA ends in double-strand break recombination: the role of the yeast ultraviolet repair gene RAD1 // Science. 1992. V. 258. № 5081. P. 480–484.

- Fishman-Lobell J., Rudin N., Haber J.E. Two alternative pathways of double-strand break repair that are kinetically separable and independently modulated // *Mol. Cell Biol.* 1992. V. 12. № 3. P. 1292–1303.
- Fleming R.A. An overview of cyclophosphamide and ifosfamide pharmacology // *Pharmacotherapy.* 1997. V. 17. P. 146–154.
- Guzder S.N., Habraken Y., Sung P. *et al.* Reconstitution of yeast nucleotide excision repair with purified Rad proteins, replication protein A, and transcription factor TFIIH // *Biol. Chem.* 1995. V. 270. № 22. P. 12973–12976.
- Hanada K., Budzowska M., Modesti M. *et al.* The structure-specific endonuclease Mus81-Eme1 promotes conversion of interstrand DNA crosslinks into double-strands breaks // *EMBO J.* 2006. V. 25. № 20. P. 4921–4932.
- Harrington J.J., Lieber M.R. Functional domains within FEN-1 and RAD2 define a family of structure specific endonucleases: implications for nucleotide excision repair // *Genes Dev.* 1994. V. 8. № 11. P. 1344–1355.
- Helleday T. Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells // *Mutat. Res.* 2003. V. 532. № 1/2. P. 103–115.
- Henriques J.A., Moustacchi E. Isolation and characterization of *psor* mutants sensitive to photo-addition of psoralen derivatives in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genetics.* 1980. V. 95. № 2. P. 273–288.
- Heyer W.D. Recombination: Holliday junction resolution and crossover formation // *Curr. Biol.* 2004. V. 14. № 2. P. 56–58.
- Ishiai M., Kimura M., Namikoshi K. *et al.* DNA cross-link repair protein SNM1A interacts with PIAS1 in nuclear focus formation // *Mol. Cell Biol.* 2004. V. 24. № 24. P. 10733–10741.
- Ivanov E.L., Haber J.E. RAD1 and RAD10, but not other excision repair genes, are required for double-strand break-induced recombination in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Cell Biol.* 1995. V. 15. № 4. P. 2245–2251.
- Jachymczyk W.J., von Borstel R.C., Mowat M.R., Hastings P.J. Repair of interstrand cross-links in DNA of *Saccharomyces cerevisiae* requires two systems for DNA repair: the RAD3 system and the RAD51 system // *Mol. Gen. Genet.* 1981. V. 182. № 2. P. 196–205.
- Jones C.J., Wood R.D. Preferential binding of the *xeroderma pigmentosum* group A complementing protein to damaged DNA // *Biochemistry.* 1993. V. 32. P. 12096–12104.
- Kannouche P.L., Wing J., Lehmann A.R. Interaction of human DNA polymerase η with monoubiquitinated PCNA: a possible mechanism for the polymerase switch in response to DNA damage // *Mol. Cell.* 2004. V. 14. № 4. P. 491–500.
- Karle P., Renner M., Salmons B., Günzburg W.H. Necrotic, rather than apoptotic, cell death caused by cytochrome P450-activated ifosfamide // *Cancer Gene Ther.* 2001. V. 8. № 3. P. 220–230.
- Kasparkova J., Zehnulova J., Farrell N., Brabec V. DNA interstrand cross-links of the novel antitumor trinuclear platinum complex BBR3464. Conformation, recognition by high mobility group domain proteins, and nucleotide excision repair // *Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 50. P. 48076–48086.
- Krasikova Y.S., Rechkunova N.I., Maltseva E.A. *et al.* Interaction of nucleotide excision repair factors XPC-HR23B, XPA, and RPA with damaged DNA // *Biochemistry (Mosc.)* 2008. V. 73. № 8. P. 886–896.
- Krasnoshtein F., Buchwald M. Developmental expression of the *Fac* gene correlates with congenital defects in Fanconi anemia patients // *Hum. Mol. Genet.* 1996. V. 5. № 1. P. 85–93.
- Kuraoka I., Kobertz W.R., Ariza R.R. *et al.* Repair of an interstrand DNA cross-link initiated by ERCC1-XPF repair/recombination nuclease // *Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 34. P. 26632–26636.
- Lambert S., Mason S.J., Barber L.J. *et al.* *Schizosaccharomyces pombe* checkpoint response to DNA interstrand cross-links // *Mol. Cell Biol.* 2003. V. 23. № 13. P. 4728–4737.
- Langston L.D., Symington L.S. Gene targeting in yeast is initiated by two independent strand invasions // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. № 43. P. 15392–15397.
- Larminat F., Germanier M., Papouli E., Defais M. Deficiency in BRCA2 leads to increase in non-conservative homologous recombination // *Oncogene.* 2002. V. 21. № 33. P. 5188–5192.
- Li L., Peterson C.A., Lu X., Legerski R.J. Mutations in XPA that prevent association with ERCC1 are defective in nucleotide excision repair // *Mol. Cell Biol.* 1995. V. 15. P. 1993–1998.
- Magaña-Schwencke N., Henriques J.A., Chanet R., Moustacchi E. The fate of 8-methoxypsoralen photoinduced crosslinks in nuclear and mitochondrial yeast DNA: comparison of wild-type and repair-deficient strains // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1982. V. 79. № 6. P. 1722–1726.
- Maltseva E.A., Rechkunova N.I., Petrusheva I.O. *et al.* Crosslinking of nucleotide excision repair proteins with DNA containing photoreactive damages // *Bioorgan. Chem.* 2008. V. 36. № 2. P. 77–84.
- McHugh P.J., Gill R.D., Waters R., Hartley J.A. Excision repair of nitrogen mustard-DNA adducts in *Saccharomyces cerevisiae* // *Nucl. Acids Res.* 1999. V. 27. № 16. P. 3259–3266.
- McHugh P.J., Sones W.R., Hartley J.A. Repair of intermediate structures produced at DNA interstrand cross-links in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Cell Biol.* 2000. V. 20. № 10. P. 3425–3433.
- McHugh P.J., Spanswick V.J., Hartley J.A. Repair of DNA interstrand crosslinks: molecular mechanisms

- and clinical relevance // *Lancet Oncol.* 2001. V. 2. № 8. P. 483–490.
- Miller R.D., Prakash L., Prakash S. Genetic control of excision of *Saccharomyces cerevisiae* interstrand DNA cross-links induced by psoralen plus near-UV light // *Mol. Cell Biol.* 1982. V. 2. № 8. P. 939–948.
- Morrison A., Christensen R.B., Alley J. *et al.* REV3, a *Saccharomyces cerevisiae* gene whose function is required for induced mutagenesis, is predicted to encode a nonessential DNA polymerase // *Bacteriology.* 1989. V. 171. № 10. P. 5659–5667.
- Mu D., Bessho T., Nechev L.V. *et al.* DNA interstrand cross-links induce futile repair synthesis in mammalian cell extracts // *Mol. Cell Biol.* 2000. V. 20. № 7. P. 2446–2454.
- Mu D., Hsu D.S., Sancar A. Reaction mechanism of human DNA repair excision nuclease // *Biol. Chem.* 1996. V. 271. № 14. P. 8285–8294.
- Mu D., Park C.H., Matsunaga T. *et al.* Reconstitution of human DNA repair excision nuclease in a highly defined system // *Biol. Chem.* 1995. V. 270. № 6. P. 2415–2418.
- Nelson J.R., Lawrence C.W., Hinkle D.C. Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA polymerase zeta // *Science.* 1996. V. 272. № 5268. P. 1646–1649.
- Niedernhofer L.J., Odijk H., Budzowska M. *et al.* The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks // *Mol. Cell Biol.* 2004. V. 24. № 13. P. 5776–5787.
- O'Donovan A., Davies A.A., Moggs J.G. *et al.* XPG endonuclease makes the 3' incision in human DNA nucleotide excision repair // *Nature.* 1994. V. 371. № 6496. P. 432–435.
- Pâques F., Haber J.E. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1999. V. 63. № 2. P. 349–404.
- Paques F., Leung W.Y., Haber J.E. Expansions and contractions in a tandem repeat induced by double-strand break repair // *Mol. Cell Biol.* 1998. V. 18. № 4. P. 2045–2054.
- Park C.H., Bessho T., Matsunaga T., Sancar A. Purification and characterization of the XPF-ERCC1 complex of human DNA repair excision nuclease // *Biol. Chem.* 1995. V. 270. № 39. P. 22657–22660.
- Park C.H., Sancar A. Formation of a ternary complex by human XPA, ERCC1, and ERCC4(XPF) excision repair proteins // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. P. 5017–5021.
- Reardon J.T., Spielmann P., Huang J.C. *et al.* Removal of psoralen monoadducts and crosslinks by human cell free extracts // *Nucl. Acids Res.* 1991. V. 19. № 17. P. 4623–4629.
- Richardson C., Moynahan M.E., Jasin M. Double-strand break repair by interchromosomal recombination: suppression of chromosomal translocations // *Genes Dev.* 1998. V. 12. № 24. P. 3831–3842.
- Rothfuss A., Grompe M. Repair kinetics of genomic interstrand DNA cross-links: evidence for DNA double-strand break-dependent activation of the Fanconi anemia/BRCA pathway // *Mol. Cell Biol.* 2004. V. 24. № 1. P. 123–134.
- Ruhland A., Haase E., Siede W., Brendel M. Isolation of yeast mutants sensitive to the bifunctional alkylating agent nitrogen mustard // *Mol. Gen. Genet.* 1981a. V. 181. № 3. P. 346–351.
- Ruhland A., Kircher M., Wilborn F., Brendel M. A yeast mutant specifically sensitive to bifunctional alkylation // *Mutat. Res.* 1981b. V. 91. № 6. P. 457–462.
- Saijo M., Kuraoka I., Masutani C. *et al.* Sequential binding of DNA repair proteins RPA and ERCC1 to XPA in vitro // *Nucl. Acids Res.* 1996. V. 24. P. 4719–4724.
- Sargent R.G., Rolig R.L., Kilburn A.E. *et al.* Recombination-dependent deletion formation in mammalian cells deficient in the nucleotide excision repair gene ERCC1 // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. № 24. P. 13122–13127.
- Sarkar S., Davies A.A., Ulrich H.D., McHugh P.J. DNA interstrand crosslink repair during G1 involves nucleotide excision repair and DNA polymerase zeta // *EMBO J.* 2006. V. 25. № 6. P. 1285–1294.
- Shimura T., Torres M.J., Martin M.M. *et al.* Bloom's syndrome helicase and Mus81 are required to induce transient double-strand DNA breaks in response to DNA replication stress // *Mol. Biol.* 2008. V. 375. № 4. P. 1152–1164.
- Simon J.A., Szankasi P., Nguyen D.K. *et al.* Differential toxicities of anticancer agents among DNA repair and checkpoint mutants of *Saccharomyces cerevisiae* // *Cancer Res.* 2000. V. 60. № 2. P. 328–333.
- Sinden R.R., Cole R.S. Repair of cross-linked DNA and survival of *Escherichia coli* treated with psoralen and light: effects of mutations influencing genetic recombination and DNA metabolism // *Bacteriol.* 1978. V. 136. № 2. P. 538–547.
- Sladek F.M., Munn M.M., Rupp W.D., Howard-Flanders P. *In vitro* repair of psoralen-DNA cross-links by RecA, UvrABC, and the 5'-exonuclease of DNA polymerase I // *Biol. Chem.* 1989. V. 264. № 12. P. 6755–6765.
- Smeaton M.B., Hlavin E.M., McGregor Mason T. *et al.* Distortion-dependent unhooking of interstrand cross-links in mammalian cell extracts // *Biochemistry.* 2008. V. 47. № 37. P. 9920–9930.
- Stelter P., Ulrich H.D. Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation // *Nature.* 2003. V. 425. № 6954. P. 188–191.

- Tsodikov O.V., Ivanov D., Orelli B. *et al.* Structural basis for the recruitment of ERCC1-XPF to nucleotide excision repair complexes by XPA // EMBO J. 2007. V. 26. № 22. P. 4768–4776.
- Van Houten B., Gamper H., Holbrook S.R. *et al.* Action mechanism of ABC excision nuclease on a DNA substrate containing a psoralen crosslink at a defined position // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 21. P. 8077–8081.
- Volker M., Mone M.J., Karmakar P. *et al.* Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors *in vivo* // Mol. Cell. 2001. V. 8. P. 213–224.
- Watanabe K., Tateishi S., Kawasuji M. *et al.* Rad18 guides poleta to replication stalling sites through physical interaction and PCNA monoubiquitination // EMBO J. 2004. V. 23. № 19. P. 3886–3896.
- Yu L.J., Drewes P., Gustafsson K. *et al.* *In vivo* modulation of alternative pathways of P-450-catalyzed cyclophosphamide metabolism: impact on pharmacokinetics and antitumor activity // Pharmacol. Exptl. Ther. 1999. V. 288. № 3. P. 928–937.
- Zhang N., Liu X., Li L., Legerski R. Double-strand breaks induce homologous recombinational repair of interstrand cross-links via cooperation of MSH2, ERCC1-XPF, REV3, and the Fanconi anemia pathway // DNA Repair. 2007. V. 6. № 11. P. 1670–1678.

REPAIR OF INTERSTRAND CROSSLINKS IN A DNA MOLECULE

E.V. Dolgova¹, A.S. Likhacheva², K.E. Orishchenko², E.A. Alyamkina¹,
S.S. Bogachev², M.A. Shurdov³

¹Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia;

²Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: gorbi@bionet.nsc.ru;

³LLC Panagen

Summary

This review combines the literature data about processes occurring during the repair of interstrand crosslinks induced by cytostatics. The pathways underlying interstrand crosslink repair in prokaryotes (*Escherichia coli*), yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), and higher eukaryotes are described. In addition, some experimentally proved pathways of interstrand crosslink repair described in the world literature for the last five years are presented. Key words: Cyclophosphamide, interstrand crosslink, FA/BRCA factor, homologous recombination, repair, ERCC1-XPF, double-strand break.

Key words: Cyclophosphamide, interstrand crosslink, FA/BRCA factor, homologous recombination, repair, ERCC1-XPF, double-strand break.

СИМБИОГЕНЕТИКА И СЕЛЕКЦИЯ МАКРОСИМБИОНТА НА ПОВЫШЕНИЕ АЗОТФИКСАЦИИ НА ПРИМЕРЕ ГОРОХА (*PISUM SATIVUM* L.)

К.К. Сидорова, В.К. Шумный, Е.Ю. Власова, М.Н. Глянченко,
Т.М. Мищенко, Г.Г. Майстренко

Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: sidорова@bionet.nsc.ru

В статье представлены результаты многолетних экспериментальных исследований по симбиогенетике и селекции макросимбионта в системе бобово-ризобиального симбиоза на примере гороха (*Pisum sativum* L.). Создана и генетически изучена коллекция симбиотических мутантов гороха. Идентифицированы и локализованы на хромосомной карте *Pisum* новые симбиотические гены. Впервые на горохе индуцированы доминантные симбиотические мутанты, характеризующиеся хорошей продуктивностью и активной азотфиксацией. Изучены физиологические особенности симбиотических мутантов по содержанию фитогормонов ауксина и гиббереллина. Выявлены различия по активности азотфиксации у разных мутантов в течение онтогенеза. Выделены формы с продолжительным периодом активной азотфиксации. Предложен новый способ определения эффективности бобово-ризобиального симбиоза. Впервые разработан метод использования симбиотических мутантов в селекции на повышение эффективности азотфиксации. Метод основан на взаимодействии в одном генотипе разных *symb* генов. Создана серия продуктивных константных рекуррентных линий седьмого поколения, превышающих по нодуляции и активности азотфиксации коммерческие сорта гороха. Линии отличаются накоплением большой биомассы корней с повышенным содержанием в них азота. Это позволит использовать их в сельскохозяйственном производстве вместо дорогостоящих органических и минеральных удобрений.

Ключевые слова: симбиогенетика, макросимбионт, горох, нодуляция, азотфиксация, селекция.

Бобово-ризобиальный симбиоз

Симбиоз был впервые определен как совместное существование организмов, принадлежащих к разным видам. Согласно более современному определению, симбиоз – это «ассоциация между особями разных видов, сохраняющаяся в течение значительной части жизненного цикла» (Маргелис, 1983. С. 144).

Симбиоз, полезный для обоих партнеров, называется мутуализмом; симбиоз, безвредный для обоих партнеров, получил наименование комменсализма, или форезии; в ассоциациях с вредными последствиями для компонентов симбиоза речь идет о паразитизме и патогенности.

Симбиогенез играет важную роль в эволюции. Согласно утверждению основоположника симбиогенеза К.С. Мережковского, только

единственное царство – прокариотов – не является результатом симбиоза, а представляет собой непосредственное развитие первоначально появившихся организмов в лице первичных бактерий. Остальные два царства, растительное и животное, являются результатом симбиоза; животное – результатом простого симбиоза, а растительное – двойного симбиоза. К настоящему времени доказано симбиотическое происхождение митохондрий и пластид (Захаров, 2009).

Наиболее важным для фундаментальных и прикладных исследований является бобово-ризобиальный симбиоз. В 1835 г. французский ученый Ж.-Б. Бусенго установил, что бобовые культуры способны усваивать азот из воздуха. Через полвека, в 1886 г., немецкий ученый Г. Гельригель выяснил, что усвоение азота воздуха у бобовых культур осуществляется только

в симбиозе с клубеньковыми бактериями. Зерновые бобовые культуры могут за один вегетационный период фиксировать азот из воздуха в среднем 70 кг/га, а бобовые травы – 120 кг/га (Вавилов, Посыпанов, 1983).

Природные запасы азота практически не ограничены, так как атмосфера на 78 % состоит из азота. Человеку и животным азот нужен в виде белков животного и растительного происхождения, растениям – в виде солей азотной кислоты или ионов аммония. Азот является первым из основных элементов питания растений. Однако селитра в виде залежей встречается в природе очень редко, и запасы ее невелики. Источником азота для азотных минеральных удобрений служит азот воздуха. Техническая фиксация его возможна при высоких температурах, 400–500 °С, и давлении в несколько десятков мегапаскалей. То есть производство азотных минеральных удобрений – очень дорогой энергоемкий процесс.

Биологическая фиксация азота воздуха в микроорганизмах происходит при естественных параметрах температуры и давления. Уникальной способностью фиксировать азот не обладают ни животные, ни высшие растения. При инфицировании бактерией корневой системы растения-хозяина принято рассматривать несколько стадий. Первая – приближение микробной клетки к растению в ответ на узнавание химических продуктов, выделяемых из корней растения. Этот процесс называется хемотаксисом. Вторая стадия – контактное взаимодействие микроорганизма с растением. В этот период происходит лектин-углеводное узнавание растения микроорганизмом. Лектин корневых волосков растений – углеводузнающий белок. Он узнает углевод поверхности бактерий и прочно связывается с ним.

Все микроорганизмы, в том числе и клубеньковые бактерии, которые способны фиксировать азот, обладают специфическим ферментным комплексом, который называется «нитрогеназа», восстанавливающим молекулярный азот. При бобово-ризобиальном симбиозе от растения-хозяина бактерии получают все необходимые элементы питания и в первую очередь углеводы, которые необходимы для роста и размножения бактерий, а также для фиксации ими азота атмосферы как источника энергии.

По данным Вавилова и Посыпанова (1983), для фиксации одной молекулы азота воздуха затрачивается 15 молекул аденозинтрифосфата – АТФ; по данным Игнатова (1998) – 25–35 молекул. На каждый миллиграмм фиксированного азота растение расходует 10,3 мг углеводов.

При активной азотфиксации около 30 % углеводов, синтезированных растением в процессе фотосинтеза, затрачивается клубеньками на связывание азота воздуха (Вавилов, Посыпанов, 1983).

Леггемоглобин – красный пигмент клубеньков, который аналогичен гемоглобину крови человека и животных по строению и функции, поскольку переносит кислород воздуха. Симбиотическая фиксация азота – аэробный процесс. Кислород связывается леггемоглобином и используется в процессе окисления углеводов с высвобождением энергии для фиксации азота. На 1 мл фиксированного азота воздуха потребляется 3 мл кислорода. Поэтому клубеньки на корнях растений образуются в наиболее аэрируемом слое почвы (0–10 см). Хорошим индикатором активности симбиоза служит красная окраска клубеньков, что свидетельствует о наличии в клубеньках леггемоглобина.

Наиболее интенсивно фиксация азота воздуха протекает при температуре 20 °С; 10 °С считаются нижним порогом азотфиксации, хотя клубеньки образуются и при более низкой температуре. Низкая температура влияет главным образом на развитие бобового растения, приводя к снижению обеспеченности клубеньков углеводами. Сами по себе клубеньковые бактерии в меньшей степени реагируют на колебания температуры.

Все клубеньковые бактерии, вступающие в симбиоз с бобовыми культурами, относятся к роду *Rhizobium*. По классификации Л.М. Доросинского (1970), этот род делится на 11 видов. Каждый вид способен инфицировать одну или несколько бобовых культур. Основные из них: *Rhizobium leguminosarum* – горох, вика, кормовые бобы, чина, чечевица; *Rh. phaseoli* – фасоль; *Rh. japonicum* – соя; *Rh. trifolii* – клевер; *Rh. meliloti* – люцерна, донник; *Rh. lupine* – люпин; *Rh. simplex* – эспарцет; *Rh. cicer* – нут.

Для обеспечения эффективного развития сельского хозяйства и сохранения окружающей среды необходимо проведение исследований,

целью которых является повышение фиксации биологического азота. В решении проблемы экологически чистого и дешевого биологического азота важная роль принадлежит бобово-ризобиальному симбиозу.

Основной зернобобовой культурой в России и других странах является горох (*Pisum sativum* L.), который используется как источник пищевого и кормового растительного белка. Общая площадь посевов гороха в Российской Федерации превышает 800 тыс. га, а собираемый урожай – 1,5 млн тонн в год. По производству гороха Россия занимает третье место в мире (<http://faostat.fao.org>).

Долгое время генетика и селекция гороха были ориентированы только на надземные признаки стебля, листьев, цветков, бобов, семян, вегетационного периода и др. Генетика симбиотических признаков макросимбионта стала приоритетным научным направлением только с 80-х годов прошлого столетия (Jacobsen, Nijdam, 1983; Kneen, La Rue, 1988; Duc, Messenger, 1989; Gresshoff, 1993; Sagan *et al.*, 1994). С этого же времени активные исследования по генетике симбиотической азотфиксации на горохе ведутся в Институте цитологии и генетики СО РАН в Новосибирске (Сидорова и др., 1987; Сидорова, Ужинцева, 1992, 1994; Sidorova, Uzhintseva, 1995; Сидорова, Шумный, 1998, 1999; Sidorova *et al.*, 1999; Сидорова и др., 2006, 2009).

Феногенетика симбиотических мутантов

Для выявления симбиотических генов была создана и генетически изучена коллекция симбиотических мутантов гороха (Сидорова, Шумный, 2003).

Результаты исследований показали, что в геноме *Pisum* достаточно много генов, контролирующих симбиотические признаки – нодуляцию и азотфиксацию. Выделено семь основных групп симбиотических мутантов: 1 – бесклубеньковые (*nod-*), т. е. устойчивые к симбиозу; 2 – клубеньков нет или они малочисленные (*nod+/-*); 3 – неэффективные клубеньки (*nod+fix-*); 4 – слабоэффективные клубеньки; 5 – число клубеньков и активность азотфиксации сильно варьируют; 6 – с повышенным количеством крупных клубеньков (гипернодуляция) и повышенной азотфиксацией; 7 – суперклубеньковые,

с огромным количеством мелких клубеньков, активной азотфиксацией и высокой устойчивостью к нитратам (*nod++fix++*).

Известные в настоящее время симбиотические гены у гороха установлены в основном с использованием индуцированных мутантов. В рамках программы по выявлению *sym* генов нами проведены обширные скрещивания симбиотических мутантов с исходными сортами, а также фенотипически сходных мутантов на аллелизм с привлечением в исследования симбиотических мутантов из американской коллекции, маркированных разными *sym* генами.

Большинство индуцированных симбиотических мутантов имеют рецессивный тип наследования. Нами впервые были получены симбиотические мутанты с доминантным наследованием. Все они входили в группу мутантов с гипернодуляцией (Sidorova *et al.*, 2001; Сидорова и др., 2009).

Бесклубеньковые мутанты *sym5* и *sym8* скрещивали с бесклубеньковыми мутантами нашей коллекции: K1005м, K14а, K20а. Установлено, что мутант K20а и мутант *sym5* аллельны. При скрещивании мутантов K287а, K19а с неэффективными клубеньками и *sym13* аллельные формы не выявлены. С использованием суперклубенькового мутанта K301, индуцированного из сорта Рамонский 77, нами идентифицирован и локализован на хромосомной карте гороха новый ген *Nod4-nod4*, рецессивный аллель которого контролирует супернодуляцию (Сидорова, Ужинцева, 1994).

При скрещивании трех суперклубеньковых мутантов K10а, K11а, K12а, индуцированных из сорта Рондо, установлено, что все они аллельны по мутантному гену, определяющему супернодуляцию. Эти же мутанты оказались аллельными с суперклубеньковым мутантом *nod3* из американской коллекции. Следует отметить, что наши суперклубеньковые мутанты были индуцированы на 4 года раньше, чем мы получили мутант *nod3* из США. Сделано заключение, что мутанты K10а, K11а, K12а представляют собой новый аллель гена *nod3*, контролирующего супернодуляцию.

Два других суперклубеньковых мутанта, K21а и K22а, аллельны между собой, но не аллельны с мутантами *nod3* и *nod4*. Мутация обозначена символом *nod6* (Sidorova *et al.*, 2003).

Кроме мутантов для идентификации симбиотических генов нами были использованы чистые линии, созданные на основе сортов гороха Торсдаг и Рамонский 77, которые контрастно различаются по нодуляции, азотфиксации и устойчивости к нитратам. В результате был идентифицирован и локализован на хромосомной карте новый ген *Nod5-nod5*, который в доминантном состоянии контролирует обильную нодуляцию, высокую азотфиксацию, устойчивость к нитратам и, что особенно важно, не вызывает снижения продуктивности растений (Сидорова, Шумный, 1997; Сидорова и др., 1999).

При изучении симбиотических мутантов определенным научным интересом представляют реципрокные прививки по типу «корень/стебель» и «стебель/корень». Опыты с прививками на суперклубеньковых мутантах гороха показали, что не у всех суперклубеньковых форм нодуляция контролируется стеблем. У трех мутантов, К301, К21а, К22а, нодуляция контролируется стеблем, у мутантов К10а, К11а, К12а – корнем. Контроль нодуляции со стороны корня установлен также у мутанта *nod3* из американской коллекции мутантов гороха (Postma *et al.*, 1988). Контроль нодуляции стеблем установлен также у созданной нами линии Торсдаг, маркированной доминантным геном *Nod5*.

У бесклубенькового мутанта К1005м и у мутанта К287а с неэффективными клубеньками симбиотические признаки контролируются корнем. Таким образом, факторы, изменяющие нодуляцию, могут быть продуцированы или в самих корнях, или в стеблях, из которых они могут транспортироваться в корни. Реципрокные прививки и скрещивания разных типов симбиотических мутантов позволяют выявлять характер взаимодействия разных симбиотических генов в одном генотипе.

Физиологические особенности симбиотических мутантов

Развитие и функционирование бобово-ризобиального симбиоза требуют высокой степени регуляции как со стороны макро-, так и микросимбионта. В связи с этим важную роль в интеграции физиологических процессов растения-хозяина и клубеньковых бактерий играют фитогормоны. Результаты многочис-

ленных исследований свидетельствуют о том, что фитогормоны участвуют в формировании и развитии клубеньков, а инокуляция бобовых клубеньковыми бактериями меняет их гормональный статус (Fang, Hirsch, 1998; Павлова, Лутова, 2000; Stougaard, 2000). Даже на ранних стадиях формирования симбиоза роль фитогормонов весьма существенна. Так, у растений белого клевера уже через 30 часов после инокуляции клубеньковыми бактериями обнаружена повышенная экспрессия ауксинстимулируемых генетических локусов, что отражает повышенную активность ауксина в корнях (Mathesius *et al.*, 1997). Другие авторы наблюдали повышение уровня ауксина в корнях гороха, достигающее максимума на 4–6-е сутки после инокуляции, с последующим снижением к 11-м суткам. В то же время в корнях неинфицированных растений уровень ауксина менялся незначительно.

У разных типов симбиотических мутантов гороха наблюдали неодинаковую чувствительность к синтетическому ауксину 2,4-D (Павлова и др., 2000).

Следует отметить, что до сих пор исследования гормонального баланса у макросимбионта проводились на начальных этапах нодуляции. В то же время представляло интерес выяснить влияние зрелых азотфиксирующих клубеньков на гормональный статус бобового растения.

В наших исследованиях стояла задача изучить гормональный статус у симбиотических мутантов гороха, различающихся по клубенькообразованию, а также выяснить влияние инфицирования *Rhizobium* на уровень фитогормонов у макросимбионта. В опытах использовали современные методы анализа фитогормонов, описанные в работах ряда авторов (Кудоярова и др., 1986; Гюли-Заде, 1990; Холодарь и др., 1995). В первом опыте определяли уровень ауксина у исходного сорта Рамонский 77 и трех симбиотических мутантов: бесклубенькового К20а, с неэффективными клубеньками К287 и суперклубенькового К301 в две фазы развития: «7–8-й узел стебля» и «цветение» (табл. 1).

В более позднюю фазу развития (цветение) содержание ауксина было существенно ниже как у исходного сорта, так и у мутантов. В корнях уровень ауксина был ниже, чем в листьях, за исключением суперклубенькового мутанта К301. В раннюю фазу развития у этого

Таблица 1

Содержание ауксина у симбиотических мутантов и исходного сорта гороха Рамонский 77 (нг/г сырой вегетативной массы)*

Сорт, мутант	Орган	Стадия развития	
		7–8-й узел стебля	цветение
Сорт Рамонский 77	Листья	635 ± 100	39,5 ± 5,0
	Корни	117 ± 37	15,0 ± 2,0
Мутанты:			
бесклубеньковый К20а	Листья	325 ± 71	42,5 ± 8,0
	Корни	130 ± 14	32,0 ± 2,5
с неэффективными клубеньками К287	Листья	483 ± 80,5	22,5 ± 4,0
	Корни	159 ± 22	30,0 ± 6,0
суперклубеньковый К301	Листья	269 ± 37	35,5 ± 6,5
	Корни	257 ± 11	154,5 ± 35,0

* Инокуляцию проводили штаммом 250а *Rhizobium leguminosarum*.

мутанта уровень ауксина в листьях и корнях был одинаковый, в то время как у сорта и двух других мутантов в листьях было существенно больше ауксина, чем в корнях. В фазу цветения по содержанию ауксина в корнях суперклубеньковый мутант превысил исходный сорт в 10 раз. У мутантов бесклубенькового и с неэффективными клубеньками в фазу цветения в корнях было в 2 раза больше ауксина, чем у исходного сорта.

Во втором опыте определяли содержание ауксина и гиббереллина в корнях в фазу цветения растений у сорта Рондо и 6 индуцированных симбиотических мутантов: суперклубеньковых (*nod3*, К9а, К10а, К21а) и с единичными клубеньками (К17а и К18а). В опыте было два варианта – с инфицированием штаммом 250а *Rhizobium leguminosarum* и контроль (без инокуляции). Данные по содержанию ауксина у симбиотических мутантов и исходного сорта представлены на рис. 1.

Установлено, что у всех мутантов количество ауксина в варианте с инфицированием было на уровне исходного сорта или ниже. В контрольном варианте у всех изученных форм содержание ауксина оказалось выше, чем при инфицировании.

При обсуждении полученных результатов следует учитывать то обстоятельство, что определение уровня ауксина проводили в позднюю фазу развития (цветение). Важно также отме-

тить, что все мутанты более низкорослые, чем исходный сорт, и менее продуктивные по вегетативной биомассе надземной части растения. Различия в содержании ауксина у суперклубенькового мутанта К301(*nod4*) в первом опыте и суперклубеньковых мутантов К9а(*nod3*) и К21а(*nod6*) во втором опыте можно объяснить прежде всего тем, что клубенькообразование у них контролируется разными генами.

При анализе результатов по содержанию гиббереллинов прежде всего обращает на себя внимание мутант К18а, превысивший исходный сорт по этому фитогормону в 6 раз в обоих вариантах опыта. У мутанта К10а увеличение

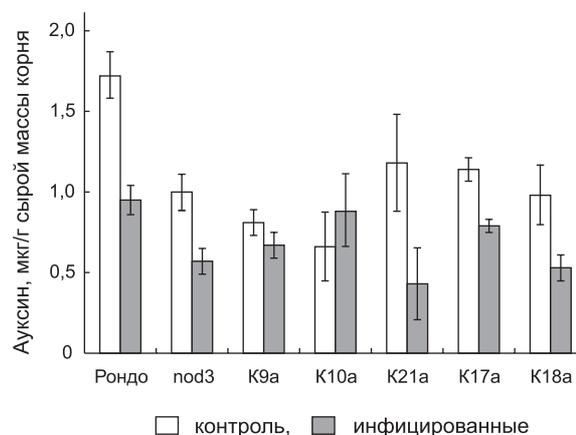


Рис. 1. Содержание ауксина в корнях симбиотических мутантов гороха и исходного сорта Рондо в фазу цветения.

уровня фитогормона, вызванное инокуляцией, было не столь разительным (рис. 2).

Таким образом, у всех изученных симбиотических мутантов гороха изменен гормональный статус по ауксину и гиббереллину в сравнении с исходным сортом. Выявлены различия по содержанию фитогормонов в зависимости от типа мутанта, а также от фазы развития растения. Инфицирование бактериями *Rhizobium* в основном снижало содержание ауксина в корнях как у сорта, так и мутантов.

Большой интерес представляют мутанты K17a и K18a, у которых изменены не только нодуляция, но и тип корня. Мутант K17a имеет сильно разветвленную корневую систему, а у мутанта K18a очень длинный корень. Результаты гибридологического анализа показали, что это две моногенные рецессивные мутации. Мутантный ген, контролирующей сильное ветвление корня у K17a, обозначен символом *brt*, мутантный ген, контролирующей длинный корень у K18a – символом *lrt* (Sidorova *et al.*, 2002) (рис. 3).

Динамика азотфиксации на разных стадиях онтогенеза. Определение эффективности бобово-ризобияльного симбиоза

При оценке эффективности симбиоза обычно используют показатели двух признаков – «число корневых клубеньков» и «активность нитрогеназы», определяемые в фазу цветения растений. Чтобы глубже понять взаимосвязь процессов роста растения, клубенькообразования и фиксации азота, а также установить продолжительность периода активной азотфиксации, нами были изучены морфологические и симбиотические признаки в разные сроки вегетации у исходного сорта гороха Рондо и шести симбиотических мутантов. Среди них один мутант K10a – суперклубеньковый, характеризующийся образованием огромного количества мелких клубеньков. Четыре мутанта – K1a, K2a, K5a, K27a – относятся к типу гиперклубеньковых, клубеньки у них средние и крупные по размеру. Все использованные в данном опыте мутанты отличаются способностью формировать нитратустойчивый симбиоз, особенно это свойство выражено у суперклубеньковых форм. Анализ признаков «высота растения», «коли-

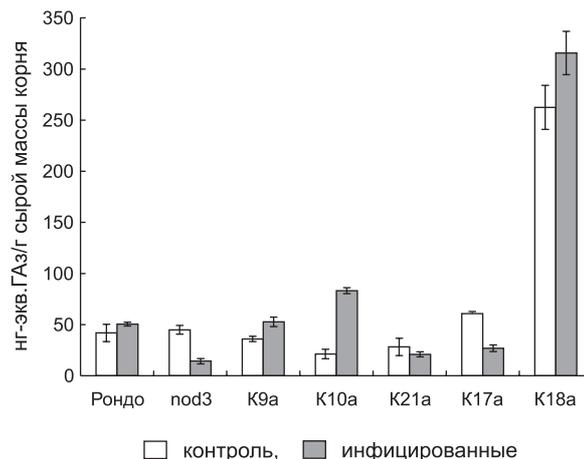


Рис. 2. Содержание гиббереллина в корнях симбиотических мутантов гороха и исходного сорта Рондо.



Рис. 3. Корни гороха.

1 – сорт Рондо; 2 – мутант K18a(ген *lrt*); 3 – мутант K17a(ген *brt*).

чество вегетативной надземной биомассы на одно растение», «число клубеньков» и «активность нитрогеназы» проводили в 5 календарных сроков с интервалом в 7 дней, отмечая фазу развития растений. Первый срок – через 21 день после посева в фазу «7–8-й узел стебля».

Результаты исследований показали, что суперклубеньковый мутант К10а по высоте растений и количеству надземной вегетативной биомассы уступал исходному сорту в течение всего периода вегетации (рис. 4). Для мутанта К10а так же, как и для других суперклубеньковых форм, характерно более быстрое обра-

зование клубеньков в ранние сроки вегетации. К фазе «начало плодообразования» количество клубеньков достигало максимума и существенно превышало по этому показателю исходный сорт. По активности нитрогеназы мутант также значительно превосходил сорт.

У гиперклубеньковых мутантов характер развития морфологических и симбиотических признаков существенно отличается от таковых у суперклубеньковых форм. Это видно на примере гиперклубенькового мутанта К1а, который по величине и динамике изменения признаков «высота растений» и «количество вегетативной

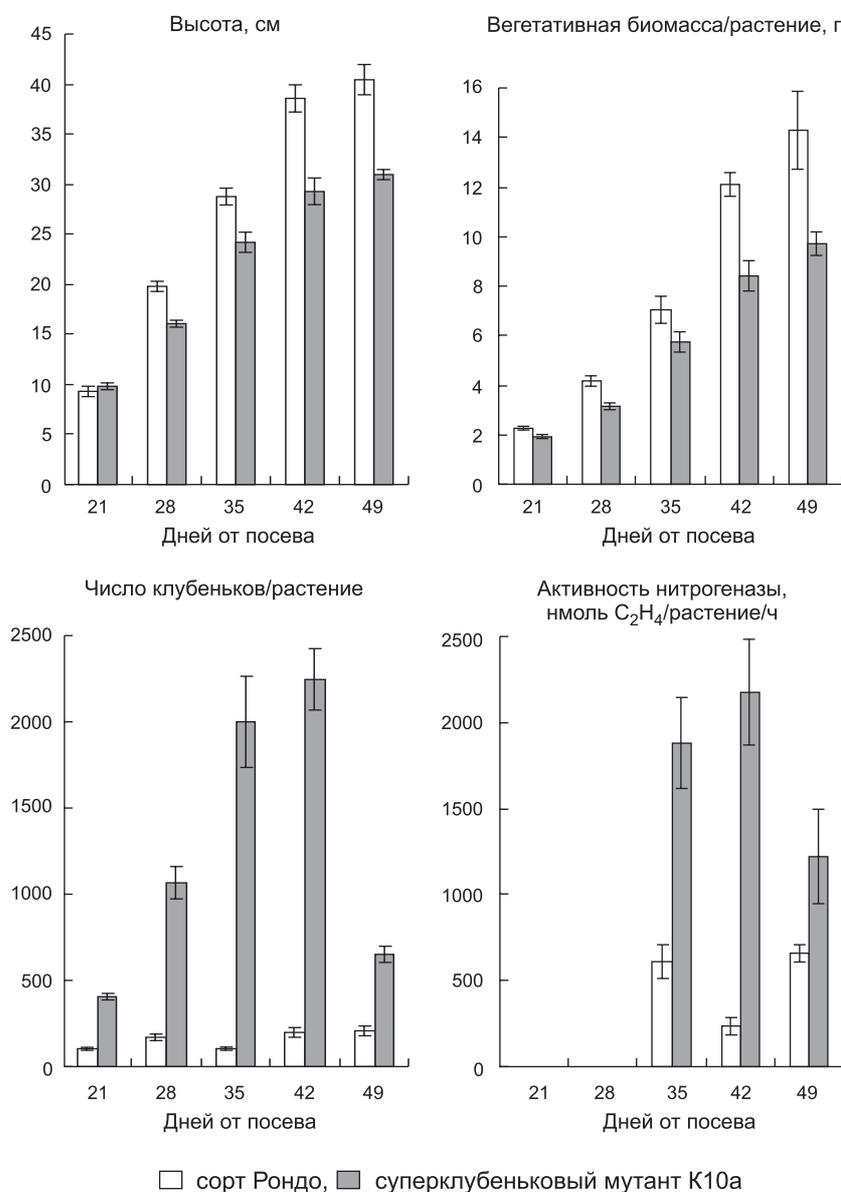


Рис. 4. Морфологические и симбиотические признаки в разные сроки вегетации у исходного сорта Рондо и суперклубенькового мутанта К10а.

надземной биомассы» почти не отличается от исходного сорта, однако по симбиотическим показателям явно его превосходит (рис. 5).

Количество клубеньков во все сроки наблюдений у мутанта было больше, клубеньки у него крупные, как у исходного сорта. Основная масса клубеньков у этого мутанта сформировалась в начале роста растений, и в течение вегетации их количество изменялось незначительно. У мутанта цветение наступает на 4–5 дней раньше, чем у сорта; активность азотфиксации в 3-й и 4-й сроки была в два раза выше, чем у сорта. Другие гиперклубеньковые мутанты, K2a, K7a,

K27a, по морфологическим и симбиотическим признакам, а также по характеру их изменения в процессе вегетации в основном похожи на мутант K1a, хотя и обладают некоторыми индивидуальными особенностями. Так, у мутанта K7a наблюдается небольшое отставание в росте и количестве надземной биомассы по сравнению с сортом в начальные сроки вегетации. К пятому сроку мутант не уступал по этим показателям исходному сорту.

Особого внимания заслуживает мутант K5a (*nod7*), у которого по сравнению с другими мутантами существенно изменены как морфо-

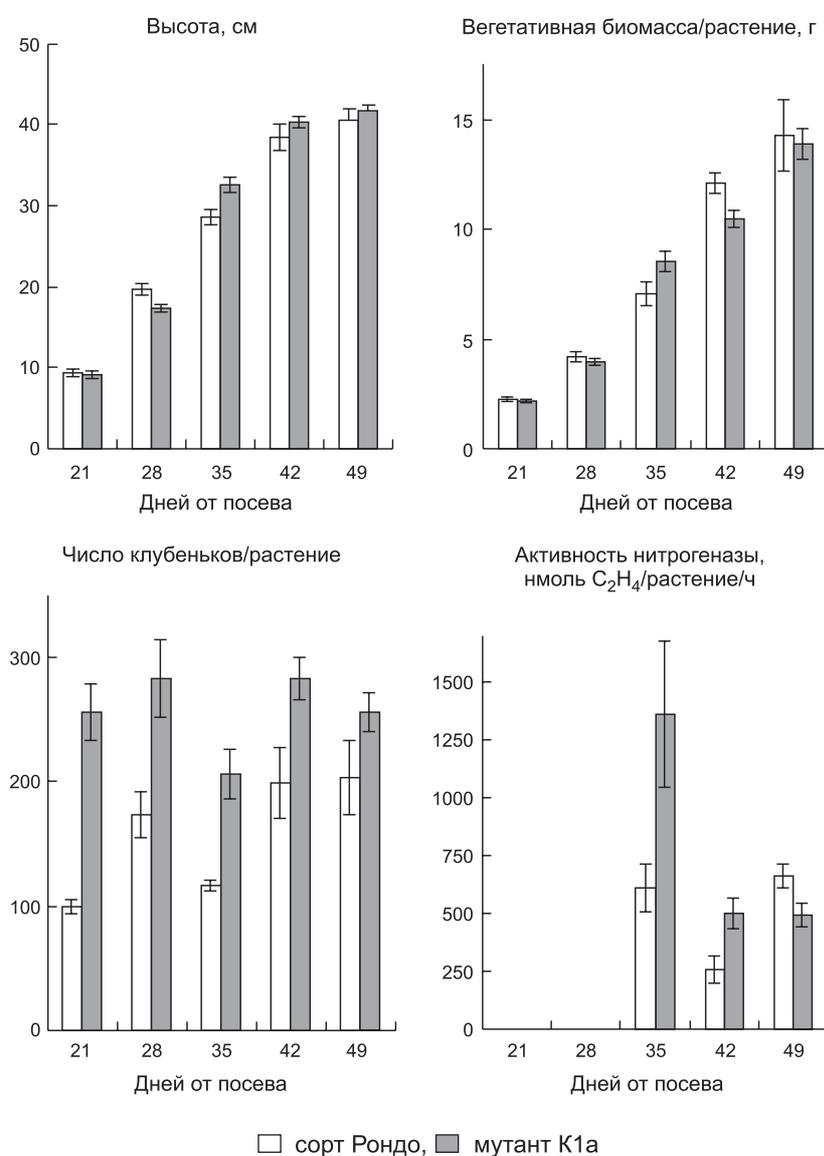


Рис. 5. Морфологические и симбиотические признаки в разные сроки вегетации у исходного сорта Рондо и гиперклубенькового мутанта K1a.

логические, так и симбиотические признаки (Sidorova *et al.*, 2005b). Мутант отличается небольшим накоплением вегетативной биомассы в течение вегетации, хотя по высоте растений он не уступает исходному сорту (рис. 6).

Это обусловлено, вероятно, тем, что мутантные растения имеют очень мелкий лист. Уменьшены размеры как листочков, так и прилистников (рис. 7). Другая особенность этого мутанта – позднее зацветание, на две недели позднее, чем у исходного сорта и описанных выше мутантов.

По количеству клубеньков мутант К5а превосходит как исходный сорт, так и другие мутанты, кроме суперклубенькового К10а. В фазу «начало цветения» у мутанта отмечено максимальное количество клубеньков – около 800 на одно растение. Клубеньки в основном мелкие. Выявлены различия в динамике клубенькообразования. У мутанта К5а отмечен очень резкий скачок в образовании клубеньков в фазу «начало цветения». Несмотря на большое количество клубеньков, активность азотфиксации у мутанта К5а довольно низкая. Можно предполагать, что

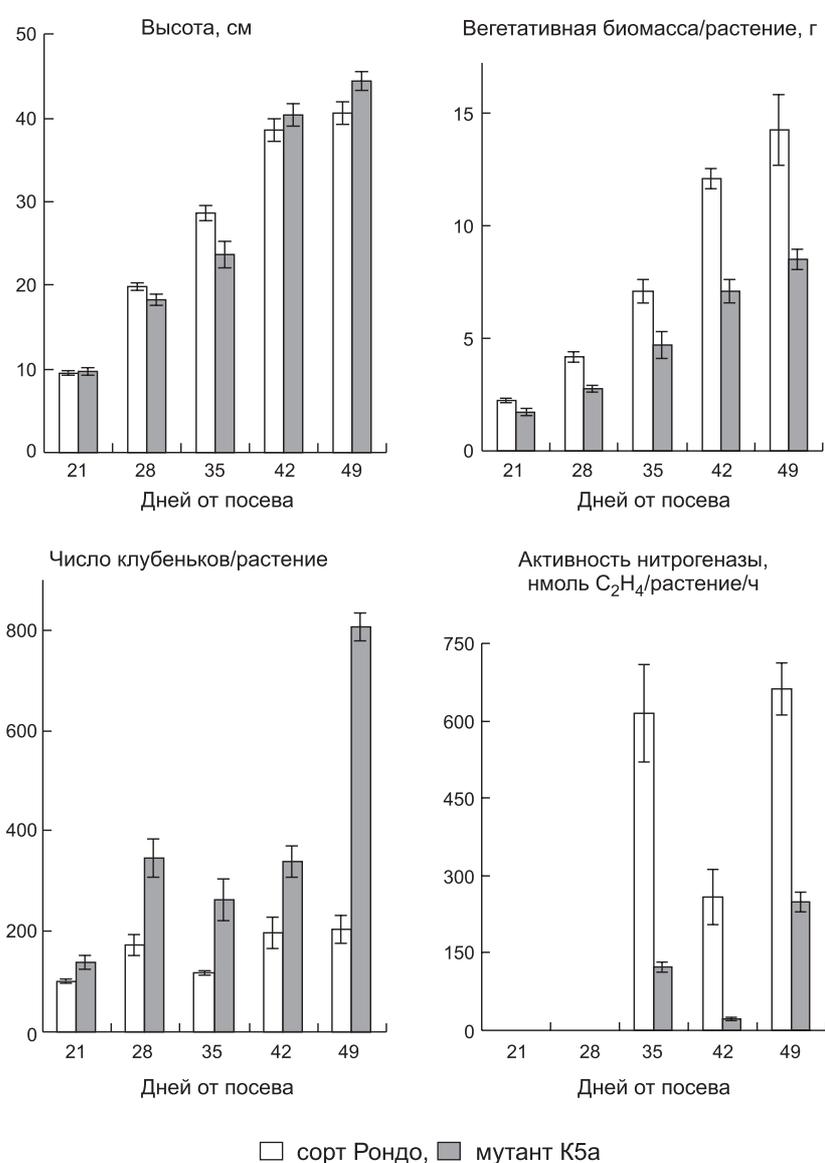


Рис. 6. Морфологические и симбиотические признаки в разные сроки вегетации у исходного сорта Рондо и мутанта К5а.



Рис. 7. Листья гороха.

1 – сорт Рондо; 2 – мутант К5а.

клубеньки оказались недоразвитыми, так как образовались очень поздно. Кроме того, мутант отличается мелколистностью и как результат имеет небольшую площадь листовой поверхности растений, где происходит фотосинтез. А продукты фотосинтеза, как известно, являются главным источником энергии для обеспечения процесса фиксации молекулярного азота из воздуха.

Результаты многолетних исследований симбиогенеза у гороха позволяют утверждать, что макросимбионт играет ключевую роль в генетическом контроле симбиотической азотфиксации в системе бобово-ризобияльного симбиоза и контролирует следующие признаки:

1. Способность растения к симбиозу с клубеньковыми бактериями *Rhizobium*;
2. Количество корневых клубеньков азотфиксирующих бактерий и их эффективность;
3. Активность азотфиксации, определяемую по активности фермента нитрогеназы;
4. Продолжительность периода активной азотфиксации;
5. Способность формировать азотустойчивый симбиоз;
6. Количество корневой биомассы, в том числе бактериальной.

В решении проблемы биологического азота сложным вопросом оказалось определение эффективности бобово-ризобияльного симбиоза. К настоящему времени было известно несколько методов ее оценки, определяемой по количеству фиксированного азота воздуха в полевых и вегетационных опытах (Посыпанов, 1991). Основные из них: метод баланса, меченых атомов, сравнение с небобовой культурой, сравнение с неинокулированной культурой, расчет азотфиксации по величине активного симбиотического потенциала и удельной активности симбиоза. Некоторые методы имеют существенные ограничения и не пригодны для определения эффективности бобово-ризобияльного симбиоза как в полевых, так и вегетационных опытах. Нами предложена принципиально новая модель для определения эффективности бобово-ризобияльного симбиоза как в полевых, так и вегетационных опытах. Модель предусматривает использование в агрохимических опытах симбиотических мутантов бобовых культур, отличающихся от исходных сортов с нормальной нодуляцией и активной азотфиксацией, неэффективными клубеньками или отсутствием таковых. Эти типы мутантов не способны фиксировать азот воздуха и используются как тест-культуры при разностном методе расчетов (Сидорова и др., 2001, 2002; Назарюк и др., 2003, 2004).

Использование симбиотических мутантов в селекции на повышение эффективности бобово-ризобияльного симбиоза

Для практической селекции на повышение у макросимбионта нодуляции и азотфиксации заслуживают внимания два типа мутантов – гиперклубеньковые и суперклубеньковые. Различие в нодуляции у этих двух типов видно на рис. 8. У суперклубеньковых мутантов формируется огромное количество мелких клубеньков, расположенных по всей корневой системе. У гиперклубеньковых клубеньков меньше, но они крупные и расположены в основном в верхней части корня.

Нами впервые получены и генетически изучены гиперклубеньковые мутанты гороха с доминантным наследованием. Мутанты индуцированы из овощного сорта Рондо при воздействии на семена химическим мутагеном



Рис. 8. Корни гороха.

1 – суперклубеньковый; 2 – гиперклубеньковый.

ЭМС. Результаты гибридологического анализа мутантов, представленные в табл. 2, подтверждают доминантный характер наследования.

Были проведены скрещивания доминантных гиперклубеньковых мутантов, индуцированных из сорта Рондо, с линией Торсдаг, маркированной геном *Nod5*, который контролирует гипернодуляцию. Гибриды изучали в F_1 и F_2 поколениях. Установлено, что доминантные мутанты из сорта Рондо и линии Торсдаг с геном *Nod5* аллельны по генетическому контролю гипернодуляции, т. е. по гену *Nod5*.

Симбиотические показатели гиперклубеньковых мутантов показаны на рис. 9.

По количеству корневых клубеньков и активности азотфиксации все мутанты превосходят исходный сорт. Три мутанта, К73а, К74а, К76а, более высокорослые по сравнению с исходным

Таблица 2

Анализ гибридов в F_2 по симбиотическим признакам при скрещивании мутантов с сортом Рондо*

Гибрид	Расщепление в F_2 при 3 : 1 (мутант – исходный сорт)		χ^2	<i>P</i>
К73а × Рондо	44 : 14	43,50 : 14,50	0,02	0,90–0,85
К74а × Рондо	37 : 12	36,75 : 12,25	0,01	0,95–0,90
К75а × Рондо	42 : 14	42,00 : 14,00	0,00	1,00–0,95
К76а × Рондо	42 : 10	39,00 : 13,00	0,92	0,35–0,30

* В F_1 во всех вариантах растения были мутантного типа.

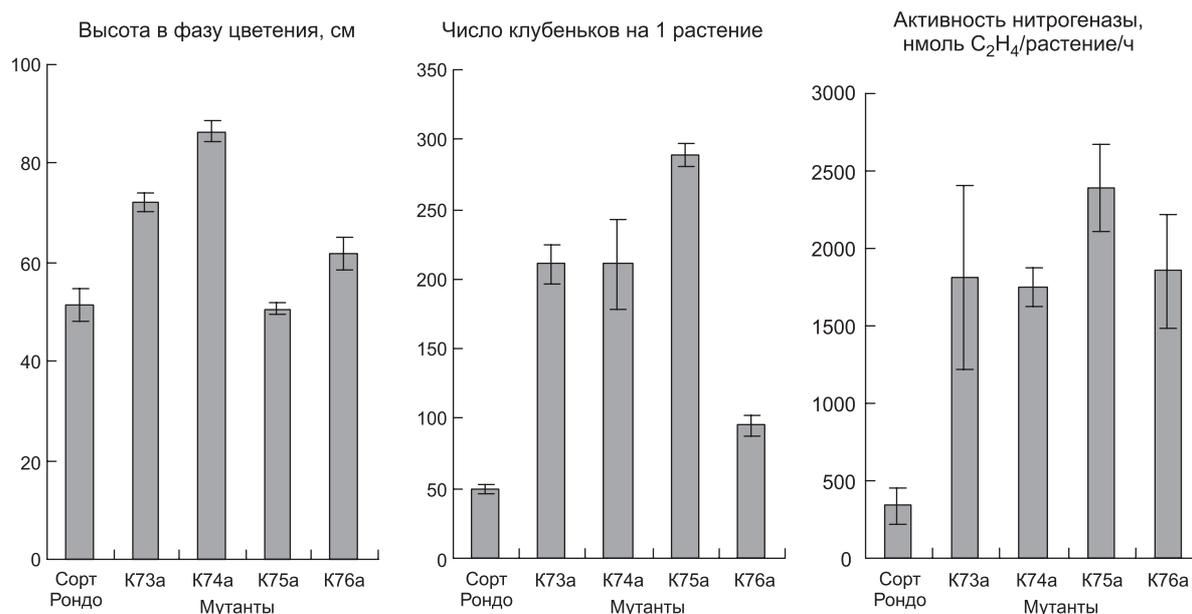


Рис. 9. Симбиотические показатели гиперклубеньковых мутантов гороха.

сортом. Высота растения K75a меньше, чем у сорта. Однако по числу клубеньков и активности азотфиксации он существенно превосходит как сорт, так и все другие мутанты.

Положительной особенностью гиперклубеньковых мутантов является то, что в основном они более продуктивны по сравнению с исходным сортом. Оценка гиперклубеньковых мутантов по признакам, определяющим продуктивность растения, была проведена при выращивании в разных условиях – в поле и теплице (рис. 10).

В условиях теплицы три мутанта, K73a, K74a, K76a, существенно превысили исходный сорт по всем показателям продуктивности. Особого внимания заслуживают два мутанта – K74a и K76a. По семенной продуктивности у них отмечено превышение в 2 и 2,5 раза. В полевых условиях эти мутанты также были наиболее продуктивными.

При проведении гибридологического анализа доминантных симбиотических мутантов с гипернодуляцией во втором поколении впервые на горохе были выделены продуктивные растения в трех гибридных популяциях – K73a, K74a, K75a. В четвертой популяции, K76a, таких растений не обнаружено. Выделенные растения были убраны индивидуально и в F₃ высеяны

отдельными семьями. Две линии, оказавшиеся с расщеплениями, были выбракованы. Оставшиеся 13 константных линий изучены до F₆ поколения в полевых и тепличных условиях.

Внимания заслуживают линии, которые показали высокую продуктивность при выращивании их как в полевых, так и в тепличных условиях. В табл. 3 дана характеристика таким линиям по признакам продуктивности.

Таким образом, гиперклубеньковые мутанты с доминантным наследованием обладают повышенной потенциальной урожайностью и высокой азотфиксацией. Появление в гибридах F₂ при скрещивании этих мутантов с исходными сортами высокорослых продуктивных растений делает возможным проведение отбора и создание новых высокопродуктивных линий с хорошими симбиотическими свойствами, представляющих ценный исходный материал для фундаментальных исследований и селекции на повышение эффективности бобово-ризобияльного симбиоза.

Как уже было отмечено, суперклубеньковые мутанты, характеризующиеся высокой нодуляцией и активной азотфиксацией, имеют серьезный недостаток – они существенно уступают сортам по продуктивности. Однако как предшественники для зерновых культур

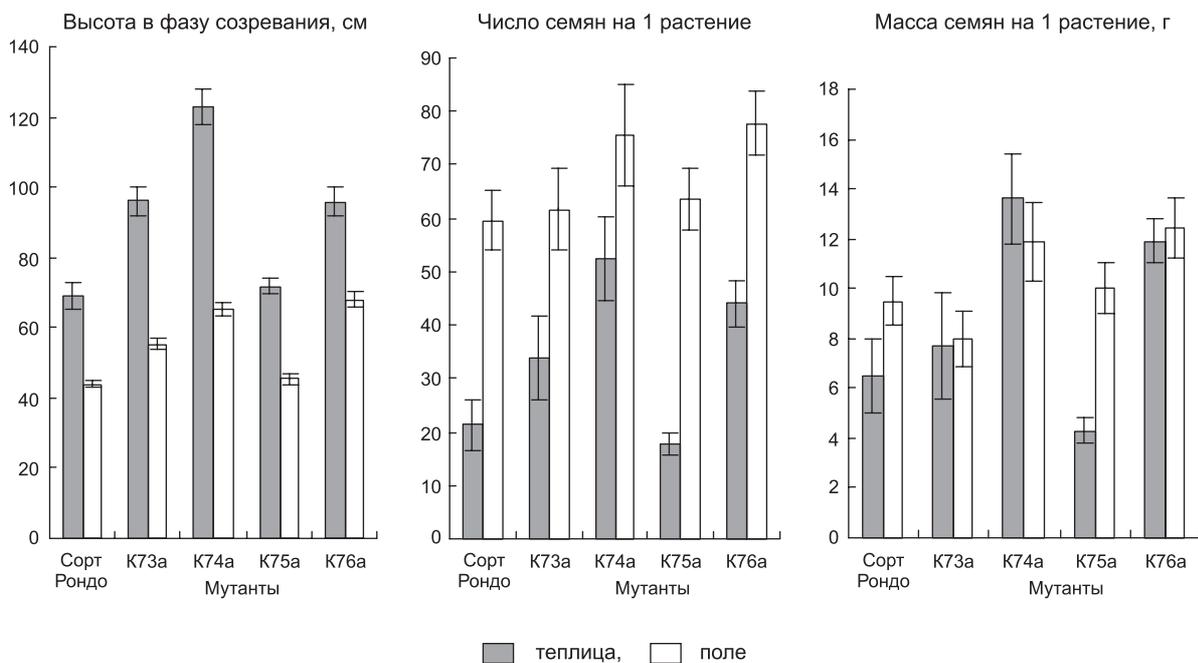


Рис. 10. Продуктивность гиперклубеньковых мутантов в разных условиях выращивания.

Таблица 3

Продуктивность линий, созданных на основе высокорослых продуктивных растений, выделенных в гибридах F₂ при скрещивании гиперклубеньковых мутантов с сортом Рондо*

Вариант	Поле			Теплица		
	Высота, см	На 1 растение		Высота, см	На 1 растение	
		Число семян	Масса семян		Число семян	Масса семян
Мутант К73а	55,4 ± 1,7	61,6 ± 5,8	8,0 ± 1,1	96,0 ± 3,9	34,0 ± 7,8	7,7 ± 2,1
Линии:						
К47а	60,6 ± 1,5	80,5 ± 6,2	11,3 ± 1,0	116,0 ± 3,9	63,5 ± 5,8	15,9 ± 1,5
К51а	70,3 ± 2,2	89,3 ± 7,0	18,2 ± 6,3	119,2 ± 4,3	43,9 ± 3,9	11,0 ± 1,1
Мутант К75а	45,3 ± 1,7	63,4 ± 5,8	10,1 ± 1,0	71,7 ± 2,2	17,9 ± 2,1	4,3 ± 0,5
Линии:						
К59а	59,7 ± 1,4	70,3 ± 8,2	10,2 ± 1,5	99,6 ± 7,3	42,2 ± 11,6	13,0 ± 3,7
К60а	52,3 ± 1,7	74,2 ± 7,5	12,2 ± 1,3	85,1 ± 2,7	30,2 ± 1,9	7,7 ± 0,6
К63а	49,7 ± 1,1	71,3 ± 6,0	11,6 ± 1,1	79,2 ± 2,3	21,3 ± 2,3	6,9 ± 0,7

* Продуктивность сорта Рондо см. на рис. 10.

они показали хорошие результаты в опытах на сое (Gresshoff, 1993; Song *et al.*, 1995) и на горохе (Сидорова и др., 2006б). Использование австралийскими учеными суперклубеньковых мутантов сои при скрещивании с разными сортами не дали положительных результатов (Bhatia *et al.*, 2001). На наш взгляд, это было обусловлено тем, что скрещивания носили случайный характер, т. е. без учета генетических особенностей сортов.

В наших первых опытах мы также провели скрещивания суперклубеньковых мутантов с разными сортами. Была поставлена задача выяснить, можно ли снизить отрицательное влияние супернодуляции на продуктивность растения при переносе гена супернодуляции в другую генотипическую среду. Было установлено, что растения с супернодуляцией, выращенные в гибридных популяциях F₂, в основном были более продуктивными по сравнению с исходными суперклубеньковыми мутантами, но по продуктивности в большинстве случаев уступали сортам. При более тщательном анализе гибридов было установлено, что все-таки есть возможность получить формы с супернодуляцией и хорошей продуктивностью при скрещивании рецессивных суперклубеньковых мутантов с сортами гороха, несущими доминантный ген *Nod5* (Sidorova *et al.*, 2005a, b; Сидорова и др., 2006б).

Был проведен специальный опыт по гибридологическому анализу реципрокных гибридов F₁ и F₂ поколений при скрещивании суперклубенькового мутанта К12а (*nod3*) с линией Торсдаг (*Nod5*). В обеих гибридных популяциях F₂ были выделены высокорослые растения с обильной нодуляцией и активной азотфиксацией. Результаты гибридологического анализа позволили сделать заключение, что такие растения имеют следующие комбинации генов: *Nod5 Nod5 nod3 nod3* или *Nod5 nod5 nod3nod3* (Сидорова и др., 2008).

Аналогичные результаты были получены в другом эксперименте. В качестве исходного материала был использован другой мутант, К10а, маркированный таким же геном супернодуляции *nod3*. При скрещивании с сортом Торсдаг в F₂ были выделены растения с супернодуляцией. На основе каждого растения с супернодуляцией были созданы индивидуальные линии. Проведен рекуррентный отбор до седьмого поколения. По высоте растений все рекуррентные линии существенно превысили суперклубеньковый мутант, но уступили по этому показателю сорту Торсдаг. По семенной продуктивности выделены линии, превысившие как мутант, так и сорт, или имевшие одинаковые показатели с родительскими формами. По симбиотическим признакам – «число клубеньков» и «активность нитрогеназы» – все рекуррентные линии имели

высокие показатели, превышающие таковые даже у суперклубенькового мутанта (рис. 11).

Полученные экспериментальные результаты по использованию суперклубеньковых мутантов в скрещиваниях были учтены в опыте, целью которого являлось повышение нодуляции и азотфиксации у двух коммерческих сортов гороха – Дружная и Новосибирская 1.

В селекционных опытах на повышение азотфиксации у этих сортов гороха кроме сотрудников ИЦиГ СО РАН участвовали сотрудники СибНИИРС РАСХН акад. РАСХН П.Л. Гончаров и чл.-корр. РАСХН А.В. Гончарова.

В генотипе обоих сортов есть доминантный ген *Nod5*. Сорта скрещивали с суперклубеньковым мутантом К301 (*nod4*), индуцированным из сорта Рамонский 77. В F₂ были выделены растения с супернодуляцией. На основе каждого растения создана индивидуальная линия. Изучение линий проведено до седьмого поколения с использованием рекуррентного отбора по продуктивности и симбиотическим показателям – «нодуляция» и «азотфиксация».

В результате по каждому сорту выделено по семь лучших линий, характеризующихся высокой продуктивностью, сильной нодуляцией и активной азотфиксацией. На рис. 12 дана ха-

рактеристика рекуррентных линий, созданных на основе сорта Дружная.

Выявлена закономерность – по высоте растений большинство линий не отличались от сорта. По семенной продуктивности, наоборот, все линии превосходили сорт. Выделены линии, у которых превышение по семенной продуктивности было весьма существенным.

По сорту Новосибирская 1 в общем наблюдалась такая же закономерность, но была менее ярко выражена.

У всех рекуррентных линий, созданных на основе обоих сортов, нодуляция была более сильной, чем у суперклубенькового мутанта. Количество клубеньков на одно растение превышало 1500–2000 шт. в опыте с сортом Дружная и 2500–3000 шт. в опыте по сорту Новосибирская 1. Такие линии получили название «ультрасуперы» (рис. 13).

Активность азотфиксации, измеряемая по активности нитрогеназы, у всех рекуррентных линий была существенно выше, чем у сортов. Наиболее высокие показатели по активности азотфиксации установлены у рекуррентных линий, при создании которых в качестве материнского растения использовали сорта Дружная и Новосибирская 1 (табл. 4).

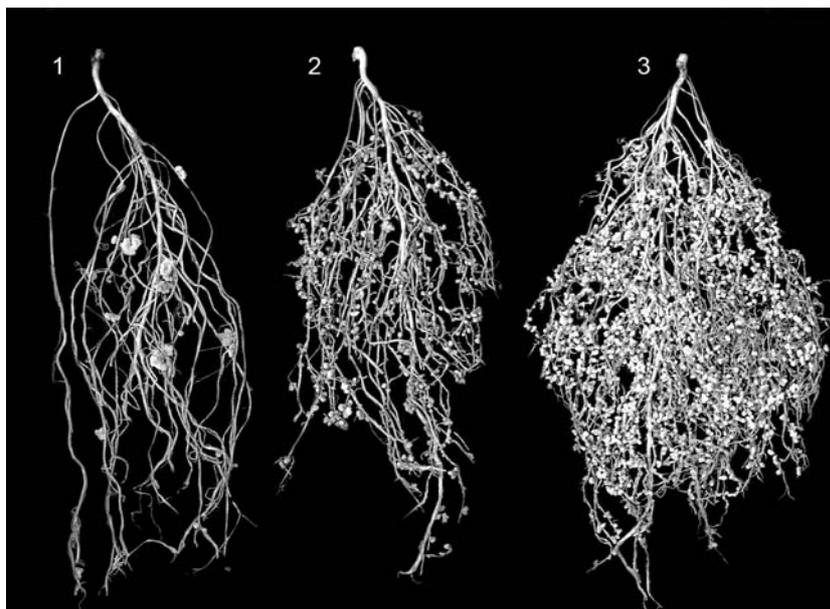


Рис. 11. Корни гороха.

1 – сорт Рондо, 2 – мутант К10а, 3 – рекуррентная линия, созданная при скрещивании К10а × Торсдаг.

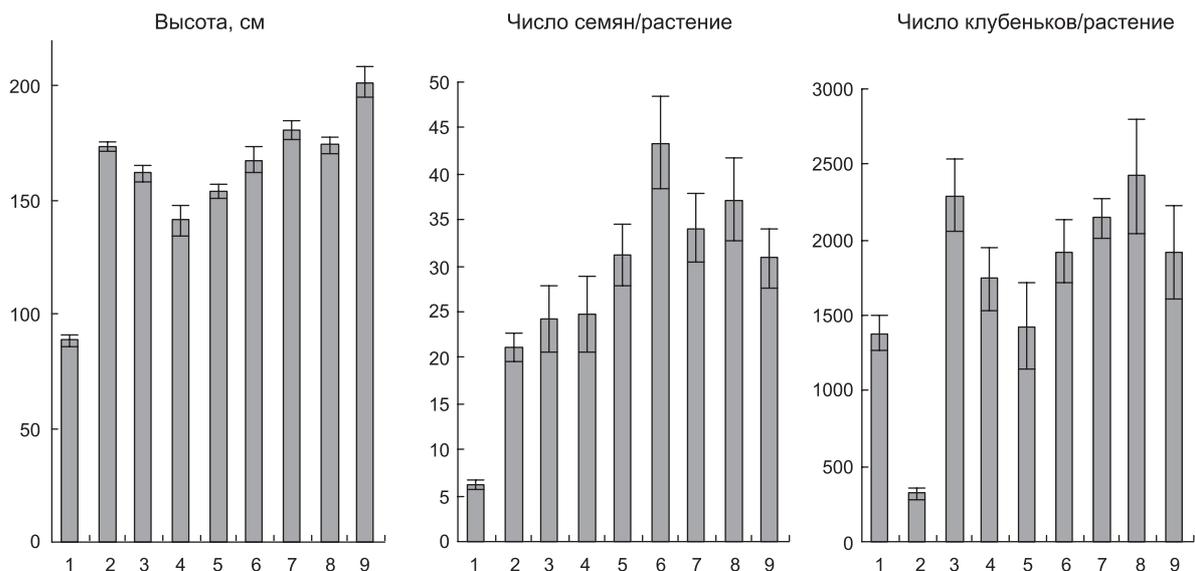


Рис. 12. Характеристика рекуррентных линий, полученных при скрещивании сорта Дружная с суперклубеньковым мутантом К301.

1 – мутант К301; 2 – сорт Дружная; 3–7 – рекуррентные линии К701а, К704а, К705а, К711а, К712а созданы при скрещивании Дружная × К301; 8, 9 – рекуррентные линии К720а, К723а созданы при скрещивании К301 × Дружная.

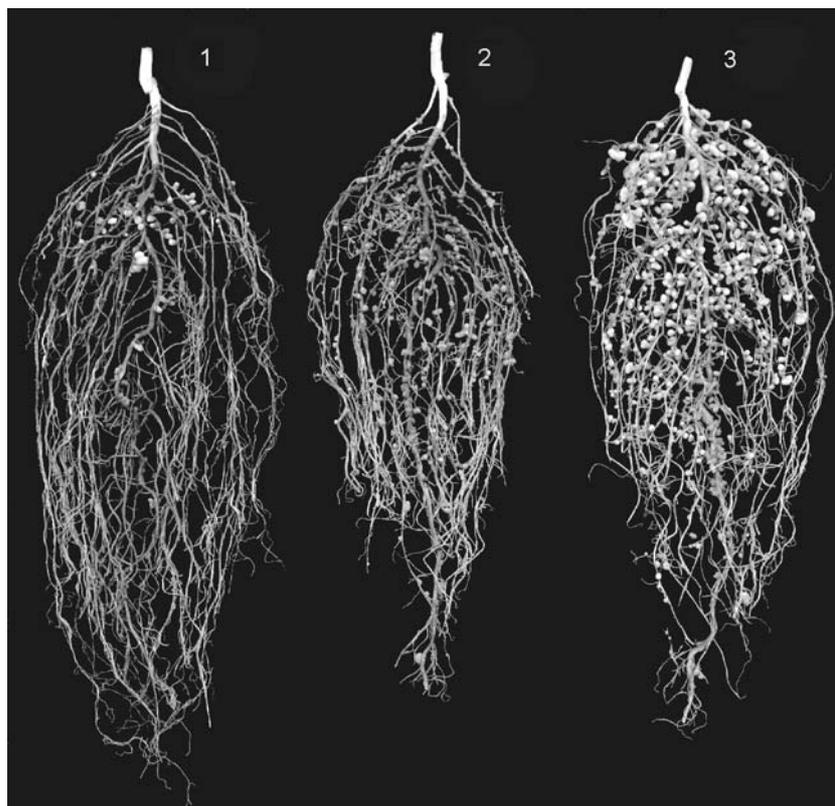


Рис. 13. Корни гороха.

1 – сорт Дружная (*Nod5*); 2 – суперклубеньковый мутант К301а, (*nod4*); 3 – рекуррентная линия К720а ультрасупер (*nod4 Nod5*).

Таблица 4

Активность азотфиксации у сортов и рекуррентных линий

Мутант, сорт	Активность нитрогеназы, нмольС ₂ Н ₄ /растение/ч	Рекуррентные линии	Активность нитрогеназы, нмольС ₂ Н ₄ /растение/ч
Суперклубеньковый мутант К301	1242	К301 × Дружная Дружная × К301	1123–1226 2312–2380
Сорт Дружная	424	К301 × Новосибирская 1	1235–2107
Сорт Новосибирская 1	463	Новосибирская 1 × К301	2399–2702

Бобовые культуры являются улучшателями почв и хорошими предшественниками для последующих культур. Созданные нами рекуррентные линии по показателям количества вегетативной биомассы корней и содержанию в них азота значительно превышают коммерческие сорта гороха (табл. 5).

Сильное разрастание корневой системы у рекуррентных линий и повышенное содержание в корнях азота можно объяснить присутствием в их генотипе гена супернодуляции *nod4* и благоприятной генотипической средой, в которую входит ген *Nod5*.

Таким образом, нами получены и генетически изучены симбиотические мутанты гороха, которые позволяют контролировать такие важные звенья азотфиксации, как количество

корневых клубеньков азотфиксирующих бактерий, их размеры, активность азотфиксации и ее продолжительность за период вегетации. Комбинации доминантных и рецессивных аллелей разных симбиотических генов позволяют получать формы, не уступающие промышленным сортам по продуктивности, но значительно превосходящие их по накоплению в почве большого количества корневой биомассы с высоким содержанием в ней азота. Это способствует улучшению плодородия почв и сокращению использования минеральных азотных удобрений, а также открывает перспективы новых генетико-селекционных технологий обеспечения растений азотом через симбиотический комплекс, что является важным с точки зрения экологии и энергосбережения.

Таблица 5

Накопление сырой и сухой биомассы корней и содержание в них азота у сортов и рекуррентных линий гороха*

Вариант	Количество сырой биомассы корней		Количество сухой биомассы корней		Содержание азота в сухих корнях	
	г/растение	кг/га	г/растение	кг/га	%	кг/га
Суперклубеньковый мутант К301	1,8 ± 0,1	2160	0,15 ± 0,01	180	4,48	8,06
Сорт Дружная	1,3 ± 0,1	1560	0,14 ± 0,00	168	3,19	5,36
Рекуррентные линии:						
К701а	2,6 ± 0,2	3120	0,23 ± 0,02	276	4,08	11,26
К714а	2,7 ± 0,2	3240	0,28 ± 0,00	336	4,64	15,59
Сорт Новосибирская 1	1,2 ± 0,1	1440	0,14 ± 0,00	168	3,04	5,11
Рекуррентные линии:						
К724а	3,3 ± 0,5	3960	0,25 ± 0,03	300	3,97	11,91
К727а	4,8 ± 0,6	5760	0,33 ± 0,06	396	4,64	18,37

* Расчеты выполнены по общепринятой методике 1,2 млн растений на 1 га.

Литература

- Вавилов П.П., Посыпанов Г.С. Бобовые культуры и проблема растительного белка. М.: Россельхозиздат, 1983. 255 с.
- Гюли-Заде В.З. Иммуноанализ и изучение росторегулирующей функции ауксинов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Казань: Казанский институт биологии АН СССР, 1990. 26 с.
- Доросинский Л.М. Клубеньковые бактерии и нитрогены. Л.: Колос, 1970. 191 с.
- Захаров И.А. 100 лет теории симбиоза // Информ. вестник ВОГиС. 2009. Т. 13. № 2. С. 355–361.
- Игнатов В.В. Биологическая фиксация азота и азотфиксаторы // Соросовский образоват. журнал. 1998. № 9. С. 28–33.
- Кудоярова Г.Р., Веселов С.Ю., Еркеев М.И., Гюли-Заде В.З. Иммуноферментное определение содержания индолилуксусной кислоты в семенах кукурузы с использованием меченых антител // Физиол. растений. 1986. Т. 33. № 6. С. 376–377.
- Маргелис Л. Роль симбиоза в эволюции клетки. М.: Мир, 1983. 351 с.
- Назарюк В.М., Сидорова К.К., Шумный В.К., Кленова М.И. Новый метод определения эффективности бобово-ризобиального симбиоза в полевых условиях // Агрехимия. 2003. № 1. С. 77–83.
- Назарюк В.М., Сидорова К.К., Шумный В.К., Кленова М.И. Роль генотипа макросимбионта в усвоении азота из почвы и воздуха // Докл. РАН. 2004. Т. 394. № 1. С. 139–141.
- Павлова З.Б., Добродумова В.В., Кравченко Л.В., Лутова Л.А. Характеристика некоторых симбиотических мутантов гороха по признакам, связанным с гормональным статусом // Генетика. 2000. Т. 36. № 9. С. 799–804.
- Павлова З.Б., Лутова Л.А. Клубенькообразование как модель для изучения дифференцировки у высших растений // Генетика. 2000. Т. 36. № 6. С. 1173–1188.
- Посыпанов Г.С. Методы изучения биологической фиксации азота воздуха. М.: Агропромиздат, 1991. 300 с.
- Сидорова К.К., Назарюк В.М., Кленова М.И. Способ оценки азотфиксирующей способности бобовых культур: Патент на изобретение. № 2195104. М. 27 декабря 2002.
- Сидорова К.К., Назарюк В.М., Шумный В.К., Кленова М.И. Новая модель для определения эффективности бобово-ризобиального симбиоза // Докл. РАН. 2001. Т. 380. № 2. С. 283–285.
- Сидорова К.К., Столярова С.Н., Катыхшева В.Б. Азотфиксирующая активность у мутантов гороха // Генетика. 1987. Т. 23. № 7. С. 1218–1221.
- Сидорова К.К., Ужинцева Л.П. Использование мутантов для выявления генов, контролируемых симбиотические признаки у гороха // Генетика. 1992. Т. 28. № 4. С. 144–151.
- Сидорова К.К., Ужинцева Л.П. Локализация мутантного гена *nod4*, контролирующего супернодуляцию у гороха // Докл. РАН. 1994. Т. 336. № 6. С. 847–849.
- Сидорова К.К., Шумный В.К. Новый ген гороха (*Pisum sativum* L.) *Nod5-nod5*, контролирующей нодуляцию // Докл. РАН. 1997. Т. 353. № 5. С. 703–704.
- Сидорова К.К., Шумный В.К. Исследование суперклубеньковых мутантов гороха (*Pisum sativum* L.) // Генетика. 1998. Т. 34. № 10. С. 1452–1454.
- Сидорова К.К., Шумный В.К. Генетика симбиотической азотфиксации и основы селекции для самоопыляющихся бобовых культур (на примере *Pisum sativum* L.) // Генетика. 1999. Т. 35. № 11. С. 1550–1557.
- Сидорова К.К., Шумный В.К. Создание и генетическое изучение коллекции симбиотических мутантов гороха (*Pisum sativum* L.) // Генетика. 2003. Т. 39. № 4. С. 501–509.
- Сидорова К.К., Шумный В.К., Власова Е.Ю. и др. Изучение морфологических и симбиотических признаков в динамике онтогенеза у суперклубенькового и гиперклубеньковых мутантов гороха // Генетика. 2006а. Т. 42. № 2. С. 219–225.
- Сидорова К.К., Шумный В.К., Власова Е.Ю. и др. Взаимодействие двух симбиотических генов *nod3* и *Nod5* в одном генотипе гороха *Pisum sativum* L. // Докл. РАН. 2008. Т. 419. № 4. С. 569–571.
- Сидорова К.К., Шумный В.К., Глянченко М.Н. и др. Исследование доминантных симбиотических мутантов гороха *Pisum sativum* L. // Генетика. 2009. Т. 45. № 7. С. 907–912.
- Сидорова К.К., Шумный В.К., Мищенко Т.М. Хромосомная локализация гена *Nod5*, контролирующего нодуляцию у гороха // Докл. РАН. 1999. Т. 367. № 6. С. 851–852.
- Сидорова К.К., Шумный В.К., Назарюк В.М. Симбиотическая азотфиксация: генетические, селекционные и эколого-агрехимические аспекты. Новосибирск: Акад. изд-во «Гео», 2006б. 134 с.
- Холодарь А.В., Швецов С.В., Чекуров В.М. Применение иммуноферментного анализа для изучения фоторегуляции уровня гиббереллинов в этиопластах из листьев мягкой пшеницы // Физиол. растений. 1995. Т. 42. № 4. С. 647–651.
- Bhatia C.R., Nichterlein K., Maluszynski M. Mutations affecting nodulation in grain legumes and their potential in sustainable cropping systems // Euphytica. 2001. V. 120. P. 415–432.
- Duc G., Messenger A. Mutagenesis of pea (*Pisum sativum* L.) and the isolation of mutants for nodulation and nitrogen fixation // Plant Sci. 1989. V. 60. P. 207–213.
- Fang Y., Hirsch A.M. Studying early nodulin gene ENOD40 expression and induction by nodulation factor and cytokinin in transgenic Alfalfa // Plant Physiol. 1998. V. 116. P. 53–68.

- Gresshoff P.M. Molecular genetic analyses of nodulation genes in soybean // *Plant Breed. Rev.* 1993. V. 11. P. 275–318.
- Herridge D., Rose J. Breeding for enhanced nitrogen fixation in crop legumes // *Field Crops Res.* 2000. V. 65. P. 229–248.
- Jacobsen E., Nijdam H.A. A mutant showing efficient nodulation in the presence of nitrate // *Pisum Newsl.* 1983. V. 15. P. 31–32.
- Kneen B.E., LaRue T.A. Induced symbiosis mutants of pea (*Pisum sativum*) and sweet clover (*Melilotus alba* annual) // *Plant Sci.* 1988. V. 58. P. 177–182.
- Mathesius U., Djordjevic M.A., Weinmann J.J. *et al.* Transient auxin transport inhibition and localised flavonoid induction occur during the earliest stages of nodulation in white clover // *Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century* / Eds C. Elmerich, A. Condorosi, W.E. Newton. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Acad. Publ., 1997. P. 311–312.
- Postma J.G., Jacobsen E., Feenstra W.J. Three pea mutants with an altered nodulation studied by genetic analysis and grafting // *J. Plant. Physiol.* 1988. V. 132. P. 424–430.
- Sagan M., Huguet T., Duc G. Phenotypic characterization and classification of nodulation mutants of pea (*Pisum sativum* L.) // *Plant Sci.* 1994. V. 100. P. 59–70.
- Sidorova K.K., Shumny V.K., Mischenko T.M., Vlasova E.Yu. A new gene for supernodulation in pea: *nod6* // *Pisum Genet.* 2003. V. 35. P. 28–29.
- Sidorova K.K., Shumny V.K., Vlasova E.Yu. *et al.* Interaction of two symbiotic genes within a single genotype // *Pisum Genet.* 2005a. V. 37. P. 34–36.
- Sidorova K.K., Shumny V.K., Vlasova E.Yu. *et al.* A new pea symbiotic mutant *nod7* // *Pisum Genet.* 2005b. V. 37. P. 37–38.
- Sidorova K.K., Shumny V.K., Vlasova E.Yu. *et al.* The *Brt* (Branch Roots) and *Lrt* (Long Roots) genes control the development of roots in peas (*Pisum sativum* L.) // *Pisum Genet.* 2002. V. 34. P. 23–24.
- Sidorova K.K., Shumny V.K., Vlasova E.Yu., Mischenko T.M. Dominant symbiotic pea mutants // *Pisum Genet.* 2001. V. 33. P. 35.
- Sidorova K.K., Uzhintseva L.P. Mapping of *nod-4*, a new hypernodulating mutant in pea // *Pisum Genet.* 1995. V. 27. P. 21.
- Sidorova K.K., Vlasova E.Yu., Mischenko T.M. *et al.* A study of supernodulation pea mutants // *Pisum Genet.* 1999. V. 31. P. 34.
- Song L., Carroll B.J., Gresshoff P.M., Herridge D.F. Field assessment of supernodulating genotypes of soybean for field, N₂ fixation and benefit to subsequent crops // *J. Soil Biol. Biochem.* 1995. V. 27. № 4/5. P. 563–569.
- Stougaard J. Regulators and regulation of legume root nodule development // *Plant Physiol.* 2000. V. 124. P. 531–540.

GENETICS OF SYMBIOSIS AND BREEDING OF A MACROSYMBIONT FOR INTENSE NITROGEN FIXATION BY THE EXAMPLE OF PEA

K.K. Sidorova, V.K. Shumny, E.Yu. Vlasova, M.N. Glyanenko,
T.M. Mischenko, G.G. Maystrenko

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: sidorova@bionet.nsc.ru

Summary

The article summarizes the results of long-term experimental studies on genetics of symbiosis and breeding of the macrosymbiont in the legume–rhizobium symbiosis by the example of pea (*Pisum sativum* L.). A collection of symbiotic pea mutants has been obtained, and its genetic analysis has been performed. New symbiotic genes have been identified and mapped on pea chromosomes. For the first time, dominant symbiotic mutations have been induced in pea. They show high productivity and intense nitrogen fixation. Physiological features of the symbiotic mutants associated with the contents of auxins and gibberellins have been studied. The mutants differ in nitrogen fixation rate at various developmental stages. Accessions with prolonged active nitrogen fixation have been obtained. A new method of determining the efficiency of legume–rhizobium symbiosis is proposed. We pioneer in the development of a method for using symbiotic mutants in breeding for intense nitrogen fixation. It is based on interaction of different *sym* genes in one genotype. A set of constant recurrent lines of generation 7 has been obtained. They overpower currently grown pea cultivars in nodulation and nitrogen fixation rates. They accumulate large root biomass rich in nitrogen. Owing to this feature, they are promising for use in agriculture instead of expensive organic and inorganic fertilizers.

Key words: genetic of symbiosis, macrosymbiont, pea, nodulation, nitrogen fixation, breeding.

ОТЧЕТ О ДЕЯТЕЛЬНОСТИ НОВОСИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ ВОГиС ЗА 2004–2009 гг.

И.Ф. Жимулев¹, Н.П. Гончаров², В.С. Коваль²

¹ Институт биоорганической химии и фундаментальной медицины СО РАН,
e-mail: zhimulev@mcb.nsc.ru;

² Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия,
e-mail: gonch@bionet.nsc.ru, kovalvs@bionet.nsc.ru

Работа Новосибирского отделения ВОГиС велась в соответствии с целями и задачами ВОГиС:

- Активное участие в развитии всех отраслей генетики и селекции, привлечение работников науки и практики к решению народнохозяйственных задач. Содействие в разработке программ исследований и определении приоритетных направлений генетики.

- Содействие членам организаций НО ВОГиС в повышении квалификации, организации исследований, реализации результатов научных работ, а также в установлении приоритета российских ученых в научных открытиях.

- Популяризация и пропаганда знаний и новейших научных и практических достижений в области генетики и селекции, а также в области истории отечественной и зарубежной генетики и селекции.

- Содействие разработке и реализации региональных, национальных и международных проектов и программ в области генетики и селекции, развитие и углубление сотрудничества, содействие интеграции российских ученых и специалистов в мировое научное сообщество.

- Организация и проведение международных, национальных и региональных научных конгрессов, научно-практических конференций, симпозиумов, семинаров, теоретических дискуссий, выставок по проблемам генетики и селекции.

Основными направлениями активности были: а) вовлечение новых членов в общество; б) организация филиальных отделений; в) про-

ведение семинаров; г) проведение конференций; д) публикации.

В 2004–2009 гг. Новосибирское отделение ВОГиС возглавлял руководящий комитет в составе: академик И.Ф. Жимулев – председатель, д.б.н. Н.П. Гончаров – заместитель, к.б.н. В.С. Коваль – ученый секретарь. Кроме того, членами бюро активно работающего семинара в Новосибирске являлись д.б.н. С.М. Закиян и д.б.н. Н.Н. Колесников.

Вовлечение новых членов в общество и организация филиальных отделений

В связи с тем что общественные организации не могут иметь границы своей деятельности, отличающиеся от административных границ РФ, Сибирское отделение ВОГиС было реорганизовано в Новосибирское отделение, в рамках которого было принято решение о создании филиальных отделений (рис. 1). К сожалению, не все территории, особенно Восточной Сибири, удалось вовлечь в деятельность общества. Однако так как ничто не мешает быть членом любой региональной организации общества независимо от места проживания или работы, надеемся, что большинство желающих активно работать в НО ВОГиС были вовлечены в эту деятельность.

За отчетный период были приняты в почетные члены НО ВОГиС:

1. Черешнев Валерий Александрович. Иммунолог, академик РАН (1997), доктор медицинских наук (1984), профессор (1990).

Структура Новосибирского отделения ВОГиС

ИЦиГ 247 человек	ИХБФМ 43 человека	НГУ 29 человек	Почетные члены 9 человек	Прочие организации в Новосибирске (ИМББ, ЦСБС, НГАУ, НГПУ, Президиум СО РАН) 29 человек		
Томский филиал 79 человек	Омский филиал 53 человека	Иркутский филиал 46 человек	Краснообский филиал 36 человек	Алтайский филиал 31 человек	Новокузнецкий филиал 15 человек	Сургутский филиал 9 человек

Итого: 626 человек

Рис. 1. Структура НО ВОГиС.

2. Prof. Juan Modolell. Licenciante in Biological Sciences, University of Barcelona, 1959. Licenciante in Chemical Sciences, University of La Laguna, 1962. Doctor of Philosophy (Biochemistry), the Ohio State University, USA, 1966. Doctor in Chemical Sciences, Universidad Complutense of Madrid.

3. Prof. Luis Serra Camo. Dept. of Genetics, University of Barcelona, The Head of Spanish Society of geneticists, Spain.

4. Prof. Adam Wilkins. Editor, BioEssays (1997–2009). Member of Genetics Society of America, Genetics Society (U.K.), the British Society of Developmental Biology (UK), and the Society for the Study of Evolution (SSE) (USA).

5. Свердлов Евгений Давидович. Академик РАН, лауреат Ленинской и Государственной премий. Действительный член Германской академии наук «Леопольдина», член Европейской Академии наук.

6. Глазьев Сергей Юрьевич. Директор Института новой экономики, доктор экономических наук, профессор, академик РАН.

7. Prof. Eric F. Wieschaus. Nobel Prize Winner. Howard Hughes Medical Institute, Research Laboratories. Professor, Department of Molecular Biology. Princeton University.

8. Prof. Antonio Garcia-Bellido. Director Laboratory of Developmental Genetics. Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Universidad Autónoma de Madrid.

9. Prof. Michael Ashburner. Professor of Biology, University of Cambridge. Visiting Group Leader, European Bioinformatics Institute. Fellow of Churchill College, Cambridge.

Проведение семинаров

Организаторами семинаров выступили: в Новосибирске – С.М. Закиян, Н.Н. Колесников, в Барнауле – О.В. Мочалова, в Иркутске – В.К. Войников, в Омске – В.П. Шаманин, в Сургуте – В.А. Соколов, в Томске – В.Н. Стегний. (Посещаемость семинаров НО ВОГиС дана в табл. 1.)

На семинарах были заслушаны доклады:

В.В. Власов (ИБХиФМ СО РАН, Новосибирск) «Ген-направленные биологически активные средства и современные методы генотерапии».

С.Л. Киселев (Институт биологии гена РАН, г. Москва) «Стволовые клетки – поиски истины».

Н.Н. Колесников «К вопросу о происхождении жизни и разума. Часть I. Жизнь».

Таблица 1

Посещаемость семинаров НО ВОГиС

Период	Число семинаров	Посетило, чел.
С сентября 2004 по август 2005 гг.	12	1519
С сентября 2005 по август 2006 гг.	12	1036
С сентября 2006 по август 2007 гг.	12	969
С сентября 2007 г. по конец 2009 гг.	16	1260
Итого	52	4784

С.И. Малецкий «Эпигенетика и наследственность».

Б.Ф. Чадов «От генетики внутривидовых отличий к генетике внутривидового сходства, или Что такое эпигенетика».

Douglas Wallace (США) «A Mitochondrial Paradigm of Metabolic and Degenerative Diseases, Aging, and Cancer: A Dawn for Evolutionary Medicine».

Г.П. Георгиев (Институт биологии гена РАН, г. Москва) «Новое в онкогенетике: семейство Tag7-генов и их биологические функции».

Péter Deák (Сегед, Венгрия) «The role of protein degradation in the regulation of eukaryotic cell cycle».

Л.Н. Трут «Еще раз о доместикации собак, лисиц и людей».

Л.А. Якубов «Новый механизм естественной изменчивости соматического генома».

И.В. Макунин (Университет Брисбена, Австралия) «Некодирующая РНК: новый старый мир».

Edward Louis (Университет Лейстера, Великобритания) «Lessons from natural variation in yeasts: telomeres and genome evolution, quantitative traits, and speciation mechanisms».

Л.А. Першина «Распространенность полиплоидов и отдаленных гибридов среди цветковых растений».

А.Л. Маркель «Артериальное давление и артериальная гипертензия как зеркало нашей жизни».

С.Я. Слободянюк «ДНК полимеразы Phi29: возможности использования в молекулярно-генетических исследованиях».

Р.А. Цильке «Моя генетика, или Некоторые итоги исследований по генетике, цитогенетике и селекции растений».

Н.М. Пасман «Иммунологическая концепция патогенеза и профилактики гестационных осложнений (невынашивание, фетоплацентарная недостаточность, гестоз)».

Adam Wilkins (Кембридж, Великобритания) «From single gene effects to gene networks: rethinking the genetic foundations of evolutionary change».

Н.В. Полосьмак «Феномен алтайских мушкетеров» и «Раскопки кургана Хунну».

И.В. Макунин (Университет Брисбена, Австралия) «Эволюция ультраконсервативных элементов в геномах позвоночных».

С.Е. Пельтек «Применение терагерцового излучения для биологических исследований. Проблемы и перспективы».

В.А. Гвоздев (Институт молекулярной генетики, г. Москва) «Короткие РНК в регуляции экспрессии повторяющихся элементов в геноме эукариот».

А.К. Гапоненко (Институт биологии гена РАН, г. Москва) «Мировые достижения и тенденции применения биотехнологий в сельском хозяйстве и промышленности и причины отставания Российской биотехнологии растений» и «Тотипотентные и стволовые клетки растений и перспективы их использования в биотехнологии».

В.К. Войников (СИФИБР, Иркутск) «Ядерно-митохондриальные взаимоотношения при редокс-регуляции экспрессии генов растений при стрессах».

Н.П. Гончаров «Н.И. Вавилов, агроном, ботаник, путешественник, генетик».

Л.А. Васильева «Вадим Александрович Ратнер (1932–2002)».

Е.В. Киселева «Ядерная оболочка: новые подходы».

О.И. Лаврик «Механизмы репарации ДНК».

Е.Д. Свердлов (Институт биоорганической химии, г. Москва) «Эмбриональный паттерн экспрессии генов в опухолях легких человека».

Э.Б. Дубровский (Университет Фордхэма, Бронкс, США) «Гормональная регуляция развития насекомых».

А.В. Куликов «Концепция генов-кандидатов в генетике поведения».

И.Ф. Жимулев, А.В. Вершинин «Насколько объективно решение Нобелевского комитета? О Нобелевской премии по биологии за 2009 г.»

На нескольких семинарах демонстрировались фильмы. Были просмотрены «Эволюция жизни» в 5 частях, фильм «Мичурин» и фильм «Герои и предатели» из серии фильмов Е. Саканян, посвященных Н.В. Тимофееву-Ресовскому.

В рамках семинара ВОГиС 6 августа 2009 г. прошли литературные чтения, на которых со своими стихами выступил поэт-биолог к.б.н. Виктор Фет.

Также был проведен ряд круглых столов:

1. Заседание по проблемам пространственной организации клеточного ядра: В.Н. Стегний «Ак-

тивность генов и пространственная организация интерфазного ядра». Соклады: д.б.н. Н.Б. Рубцов, к.б.н. Е.В. Киселева, к.б.н. В.В. Шлома, профессор Л.В. Высоцкая, д.б.н. Б.Ф. Чадов.

2. А.М. Мигранян «Наука и политика в России».

3. И.Ф. Жимулев, В.К. Шумный «Информация об общем собрании РАН. Обсуждение планов реорганизации РАН».

4. В.Т. Третьяков, А.М. Мигранян, С.А. Марков, М.Г. Делягин, А.В. Рябов, В.Д. Соловей «Современная Россия в контексте мировых и внутренних процессов».

5. В.И. Молодин «Археология и ее роль в изучении истории человечества» Соклад: «Анализ митохондриальной ДНК человека» – А.Г. Ромащенко.

6. В.А. Черешнев «Академия наук СССР в годы Великой Отечественной войны».

7. И.Ф. Жимулев «Экология, благоустройство и перспективы новой застройки Академгородка».

8. С.Ю. Глазьев «О стратегии экономического развития России».

В рамках семинара работала молодежная секция:

1. Ю.Б. Шварц «Репрессия генов белками Polysomb».

2. Д.Е. Коряков «Ремоделирование и модификация нуклеосом в регуляции генетических процессов».

3. А.В. Кочетов «Кодирующий потенциал эукариотических геномов».

4. А.В. Пиндюрин «Геномные исследования ДНК-белковых взаимодействий. Сочетание методов протеомики с технологией ДНК-микрочипов».

5. А.И. Шевченко «Хроматин неактивной X-хромосомы у самок млекопитающих».

6. Е.В. Дементьева «Дозовая компенсация генов X-хромосомы у млекопитающих».

Проведен ряд конкурсов среди молодых селекционеров и генетиков растений.

В ЦСБС СО РАН были проведены следующие семинары:

1. Л.А. Першина «Распространенность полиплоидов и отдаленных гибридов среди цветковых растений». Совместно с Новоси-

бирским отделением Русского ботанического общества.

2. В.В. Зуев, Р.А. Бадритдинов «Проблемы таксономии в ботанике».

3. В. Годин «О половой структуре популяций».

4. Е.В. Байкова «Определение индекса цитируемости: ресурсная база и методики».

5. Е.В. Байкова «Основные информационные ресурсы по естественным и технологическим наукам: общая характеристика и алгоритм поиска информации».

Мероприятия в филиалах НО ВОГиС

Сургутский филиал ВОГиС. Доклады:

1. В.А. Соколов «К 140 летию выхода работ Грегора Менделя. Биологический факультет СурГУ».

2. В.А. Соколов. Генетически модифицированные организмы как источник пищи. Общедоступная лекция в библиотеке СурГУ.

3. В.А. Соколов. К 150 летию выхода книги Ч. Дарвина «Происхождение видов».

4. В.А. Соколов. Курс лекций «Экологическая генетика».

Победа на конкурсе «Экологические проблемы зеленого строительства на Севере». Программа «Генетические ресурсы древесных и озеленение городов ХМАО» (В.А. Соколов, С.М. Полукеев).

Алтайское отделение НО ВОГиС за период 2008–2009 гг.

1. Конференция (ко дню науки 08.02.2008 г.): «Биография и научное наследие академика Н.И. Вавилова (к 120-летию со дня рождения)» (д.б.н. О.В. Мочалова, к.б.н. И.В. Ершова. Организатор – д.с.-х.н. В.И. Усенко).

2. Семинар (представление материалов сборника ВОГиС): «Последние генетические представления о происхождении человека» (д.б.н. О.В. Мочалова).

3. Семинар, посвященный 90-летию со дня рождения селекционера по косточковым культурам Путова В.С. (к.с.-х.н. И.А. Пучкин).

4. Семинар: «Экология внутренней среды человека» (член международной организации «Радар», к.м.н. Н.К. Дыбенко, организатор – Т.В. Плаксина).

5. Представление монографии А.Н. Куприянова «Арабески ботаники» (д.б.н. А.К. Куприянов, организатор – д.с.-х.н. З.В. Долганова).

6. Семинар, посвященный 100-летию со дня рождения д.б.н. З.И. Лучник и 85-летию со дня рождения к.б.н. И.В. Верещагиной (к.б.н. И.Е. Мерзлякова (ТГУ), д.с.-х.н. З.В. Долганова, организатор – д.с.-х.н. В.И. Усенко).

Иркутский филиал

1. Douglas Wallace. «A Mitochondrial Paradigm of Metabolic and Degenerative Diseases, Aging, and Cancer: A Dawn for Evolutionary Medicine».

2. Саяев Р.К. «Перспективы генетической инженерии».

3. Жимулев И.Ф. «Современные проблемы генетики» (популярная лекция).

Омский филиал

Семинар, посвященный 90-летию профессора С.И. Леонтьева, на тему «Идеи профессора Леонтьева в современных исследованиях по селекции яровой пшеницы в ОмГАУ». Докладчик д.с.-х.н., профессор В. П. Шаманин.

Проведены конференции

1. 22 апреля 2005 г. «Симпозиум по генетике развития – Л.И. Корочкину 70 лет» (Новосибирск).

2. 25–26 апреля 2005 г. выездная научная сессия в Томском государственном университете (Томск).

3. 18–20 июля 2005 г. 2-я Международная конференция «Актуальные проблемы генетики и селекции растений» (Омск).

4. 3–7 сентября 2006 г. в Иркутском филиале НО ВОГиС Всероссийская конференция с международным участием «Структура и экспрессия митохондриального генома растений», организованная Сибирским Институтом физиологии и биохимии растений СО РАН и Иркутским филиалом НО ВОГиС (Иркутск).

5. 25–28 сентября 2006 г. в Томском филиале НО ВОГиС IV Международная конференция «Проблема вида и видообразования» (Томск, ТГУ).

6. 9–12 мая 2007 г. Международная молодежная научно-методическая конференция

«Проблемы молекулярной и клеточной биологии» (Томск).

7. 9–13 апреля 2007 г. 10-я международная генетико-селекционная школа «Развитие идей Н.И. Вавилова на современном этапе развития генетики, селекции и семеноводства сельскохозяйственных культур» (Новосибирск, НАУ, куратор – проф. Р.А. Цильке).

8. 19 декабря 2007 г. Международная научная конференция, посвященная 120-летию со дня рождения академика Н.И. Вавилова (Новосибирск).

9. 22–23 июля 2008 г. АлтНИИСХ совместно с НО ВОГиС конференция «Селекция сельскохозяйственных культур на устойчивость к абиотическим и биотическим стрессам» (Барнаул).

10. 3–9 августа 2009 г. 2-е Международное совещание по сохранению лесных генетических ресурсов России (кураторы – В.В. Тараканов, И.Ф. Жимулев, Новосибирск).

11. 31 августа–6 сентября 2009 г. Международная конференция «Хромосома» («Chromosome 2009») (кураторы И.Ф. Жимулев, А.С. Графодатский, Новосибирск).

Организационная деятельность

В 2005 г., 2007 г., 2009 г. (январь), 2009 г. (декабрь) были проведены ежегодные собрания НО ВОГиС, на которых рассматривались текущие моменты работы отделения и были заслушаны отчеты о деятельности НО ВОГиС.

Ниже приведена выписка из постановления отчетно-перевыборной конференции НО ВОГиС (Новосибирск, 25 декабря 2009 г.):

1. Выбрать в Совет НО ВОГиС председателя НО ВОГиС, заместителя председателя НО ВОГиС, председателей региональных филиалов, ученого секретаря НО ВОГиС, бухгалтера НО ВОГиС, руководителей семинаров. Ввести в состав нового совета А.В. Вершинина, С.А. Демакова, Н.Н. Колесникова.

2. Избрать новый совет НО ВОГиС в следующем составе: И.Ф. Жимулев, Н.П. Гончаров, В.С. Коваль, О.И. Лисицина, А.А. Вершинин, С.А. Демаков, В.И. Усенко, В.А. Соколов, В.П. Шаманин, В.Н. Стегний, В.А. Войников, Р.И. Полюдина, Н.И. Гафаров, Н.Н. Колесников.

3. Выбрать председателем академика И.Ф. Жимулева, зам. председателя – д.б.н. Н.П. Гончарова, секретарем – В.С. Ковалья.

4. Выбрать в состав ревизионной комиссии А.В. Кочетова (председатель), О.В. Дорогину, Л.Ф. Гуляеву, Т.А. Пшеничникову.

А.В. Вершинин, д.б.н., председатель собрания
В.С. Коваль, к.б.н., секретарь собрания

В заключение заметим, что на сайте НО ВОГиС <http://vogissem.academ.org> за пять лет зарегистрировано 12 949 посещений. Новый сайт НО ВОГиС <http://vogissem.mcb.nsc.ru>

О ПРОВЕДЕНИИ ШКОЛЫ-СЕМИНАРА «СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ГЕНЕТИКИ В СЕЛЕКЦИИ И СЕМЕНОВОДСТВЕ РАСТЕНИЙ»

10–12 марта 2010 г., г. Москва

В Москве 10–12 марта на базе Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН при участии Российской академии наук, Российской академии сельскохозяйственных наук, Вавиловского общества генетиков и селекционеров и Научного совета РАН по генетике проведена школа-семинар «Современные методы генетики в селекции и семеноводстве растений». Актуальность этого научно-образовательного мероприятия продиктована острой необходимостью использования достижений современной фундаментальной генетики в системе селекционно-генетических и семеноводческих учреждений. Очевидно, что один из важнейших аспектов, позволяющих реально повысить эффективность современной селекции и семеноводства – это наличие высококвалифицированных молодых кадров, владеющих и использующих в повседневной практике новейшие молекулярно-генетические методы.

Главная задача школы-семинара состояла в демонстрации результатов фундаментальных исследований и возможности их применения в практике селекции и семеноводства в нашей стране сейчас. Школу открыл доклад академика А.А. Жученко по экологической генетике. В научную программу были включены доклады ведущих специалистов страны в области разработки и использования систем молекулярно-генетических маркеров в селекции и семеноводстве (идентификации и паспортизации) основных сельскохозяйственных культур. С докладами выступили д.б.н. А.М. Кудрявцев, д.б.н. А.Ю. Драгович, д.б.н. А.А. Поморцев, д.б.н. Д.В. Ребриков (ИОГен РАН) и проф. А.В. Конарев (ВИР РАСХН). После пленарных заседаний был организован «круглый стол», где слушатели участвовали в обсуждении докладов.

Теоретическая часть школы дополнялась двумя практикумами, которые продемонстрировали применение этих методов для решения практических задач. Это «Методы идентификации сортов пшеницы и ячменя по белковым маркерам» (к.б.н. В.П. Упелниек, д.б.н. А.А. Поморцев) и «ДНК-диагностика фитопатогенов сельскохозяйственных культур» (Д.В. Ребриков). Участники семинара ознакомились с современной лабораторией по генетике растений, основным приборным обеспечением и расходными материалами, приготовлением проб для анализа полиморфизма белков, наблюдали процесс электрофореза белков, учились анализировать электрофоретические спектры запасных белков пшеницы и ячменя. Им были продемонстрированы также методы выделения и анализа ДНК растений, анализ флуоресцентно меченных ДНК-зондов на приборах «ДТ-96», «Джин». Впервые в условиях практикума была продемонстрирована работа «Приборного комплекса для электрофоретической идентификации сортов сельскохозяйственных культур и генетического разнообразия растений». Участники школы посетили мемориальные музеи Н.И. Вавилова и Н.П. Дубинина при ИОГен РАН.

В семинаре участвовало 76 слушателей, в основном молодые научные сотрудники, из 28 институтов РАСХН – представители 15 городов России (ВНИИ риса, ВНИИМК; СКЗНИИиВ, КНИИСХ, г. Краснодар; ВНИИЦиСК, г. Сочи; НИИСХ Ю-В, г. Саратов; НИИСПК, ВНИИЗБК, Орловский ГАУ, г. Орел; ВНИИГиСПР, ВНИИсад, г. Мичуринск; ВНИИ льна, г. Торжок; Курский НИИАП; ВНИИЗК, г. Черноград; ВНИИВиВ, г. Новочеркасск; Ставропольский НИИСХ; ВНИИ люпина, г. Брянск; ВНИИ рапса, г. Липецк; Тат НИИСХ, г. Казань, ТамбНИИСХ,

г. Ржакса; Моск НИИСХ, ВНИИССОК, ВИЛАР, ВНИИКХ, ВНИИСБ, ВИК, г. Москва).

Проведенная школа-семинар не только позволила ознакомить участников школы с современными молекулярно-генетическими технологиями, но и в большой степени способствовала широкому и неформальному обмену научной информацией, позволила установить взаимно

полезные научные связи в системе РАН–РАСХН–Минсельхоз, скоординировать взаимодействие специалистов фундаментальной науки и наиболее активных специалистов селекционной и семеноводческой практики. Участники выразили пожелание, чтобы школа-семинар проходила в дальнейшем регулярно и была доступна для участников из всех регионов нашей страны.

Журнал «Информационный вестник ВОГиС» включен ВАК Минобрнауки России в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук (по биологическим наукам). (Редакция, апрель 2008 г.)
<http://vak.ed.gov.ru>

Журнал «Информационный вестник ВОГиС» включен в федеральный почтовый Объединенный каталог «ПРЕССА РОССИИ». Персональный подписной индекс № 42153.

Отредактировано и подготовлено к печати
в редакционно-издательском отделе ИЦиГ СО РАН

Редакторы: А.А. Ончукова, И.Ю. Ануфриева
Дизайн: А.В. Харкевич
Компьютерная графика: А.В. Харкевич, Т.Б. Коняхина
Компьютерная верстка: Т.Б. Коняхина, Н.С. Глазкова

Подписано в печать 7.06.2010 г.
Формат бумаги 60×84 1/8. Усл.-печ. л. 20,3. Уч.-изд. л. 19,2
Тираж 400. Заказ 202.

Отпечатано в типографии ГУ «Издательство СО РАН»
630090, Новосибирск, Морской проспект, 2