

Содержание

ЦИТОГЕНЕТИК, ДОКТОР БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК АНТОНИНА ИВАНОВНА ЩАПОВА: К 80-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ И К 60-ЛЕТИЮ НАЧАЛА ТРУДОВОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

И.К. Захаров, В.К. Шумный 603

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ХРОМОСОМ В КЛЕТОЧНОМ ЯДРЕ ЭУКАРИОТ И ЕЕ ОСОБЕННОСТИ У РАЗНЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ И ЖИВОТНЫХ

А.И. Щапова 612

ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ ЦЕНТРОМЕРНЫХ РАЙОНОВ ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ ХИРОНОМИД (DIPTERA, CHIRONOMIDAE)

В.В. Голыгина, И.И. Кикнадзе, А.Д. Брошков, Т.В. Карамышева, Н.Б. Рубцов 622

ОСОБЕННОСТИ ХОЗЯЙСТВЕННО ЦЕННЫХ ПРИЗНАКОВ ЛИНИЙ СОРТА ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ ОМСКАЯ 37, НЕСУЩИХ ПШЕНИЧНО-РЖАНУЮ ТРАНСЛОКАЦИЮ 1RS.1BL

И.А. Белан, Л.П. Россеева, Н.В. Трубачеева, Т.С. Осадчая, О.В. Дорогина, Е.В. Жмудь, Ю.В. Колмаков, Н.П. Блохина, Л.А. Кравцова, Л.А. Першина 632

СОДЕРЖАНИЕ И КАЧЕСТВО КЛЕЙКОВИНЫ У РЕКОМБИНАНТНЫХ ЛИНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ С ТРАНСЛОКАЦИЕЙ *Lr19(7D)* ОТ *AGROPYRON ELONGATUM* Host. И 6Ag¹(6D)-ХРОМОСОМОЙ ОТ *AGROPYRON INTERMEDIUM* Host.

О.В. Крупнова, А.Е. Дружин, С.А. Воронина, В.А. Крупнов 641

ИНТРОДУКЦИЯ КАРИОТИПИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА ($2n = 36, 37, 38$) В ГЕНОМ ДОМАШНИХ СВИНЕЙ *SUS SCROFA DOMESTICA*

В.Н. Тихонов, М.Л. Кочнева, В.Е. Бобович 647

ЛОКАЛИЗАЦИЯ И ЧАСТОТЫ ИНВЕРСИОННЫХ РАЗРЫВОВ В ГЕНОМАХ ВИДОВ *CHIRONOMUS* (DIPTERA, CHIRONOMIDAE)

А.Д. Брошков, Л.А. Мирошниченко, И.И. Кикнадзе, В.Д. Гусев 654

ИНГИБИРОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ БЕЛКИ РОМ152 И РОМ34 ЯДЕРНЫХ ПОР ДРОЖЖЕЙ, НАРУШАЕТ ПРОЦЕСС СБОРКИ ПОР И УВЕЛИЧИВАЕТ ИХ ВНУТРЕННИЙ ДИАМЕТР

А.А. Струнов, Е.А. Онищенко, Е.В. Киселева 663

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОДУКТОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ, НЕФЕРМЕНТАТИВНОЙ И ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В ВОЗРАСТНОЙ ДИНАМИКЕ САМЦОВ КРОЛИКОВ	
<i>Д.Д. Аджиев</i>	674
АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ЭКСПЕРИМЕНТА ПО МАССОВОЙ ИММУНОПРЕЦИПИТАЦИИ ХРОМАТИНА С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ РАСПОЗНАВАНИЯ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ	
<i>В.Г. Левицкий, Г.В. Васильев, Д.Ю. Ощепков, Н.И. Ершов, Т.И. Меркулова</i>	685
ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМОВ ТАТА-БОКСА ПРОМОТОРА ГЕНА β-ГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА, АССОЦИИРОВАННЫХ С β-ТАЛАССЕМИЕЙ, НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТАТА-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА	
<i>И.А. Драчкова, Т.В. Аршинова, П.М. Пономаренко, Т.И. Меркулова, Н.А. Колчанов, Л.К. Савинкова</i>	698
ОСТЕОПОРОЗ КАК ПРОЯВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ ДЕТЕРМИНИРОВАННОГО СИНДРОМА ПРЕЖДЕВРЕМЕННОГО СТАРЕНИЯ У КРЫС OXYS	
<i>Н.А. Муралева, А.А. Макеев, Н.Г. Колосова</i>	706
НАСЛЕДОВАНИЕ ПРИЗНАКА «УСТОЙЧИВОСТЬ К ВЫСОКИМ ТЕМПЕРАТУРАМ» У РИСА	
<i>Ю.К. Гончарова</i>	714
ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ФОРМИРОВАНИЯ ОКРАСКИ КОРНЕПЛОДА У КОРМОВОЙ СВЕКЛЫ	
<i>А.В. Мглинец, З.А. Осипова</i>	720
ФОТОПЕРИОДИЧЕСКИЙ СИГНАЛ, КАК КЛЮЧЕВОЙ ФАКТОР ВО ВЗАИМООТНОШЕНИЯХ ГЕНОТИП–СРЕДА	
<i>Д.В. Клочков, Р.Г. Гулевич, О.В. Трапезов</i>	729
КОНФЕРЕНЦИЯ «СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ГЕНЕТИКИ, РАДИОБИОЛОГИИ, РАДИОЭКОЛОГИИ И ЭВОЛЮЦИИ», ПОСВЯЩЕННАЯ ПАМЯТИ ВЫДАЮЩИХСЯ ГЕНЕТИКОВ И РАДИОБИОЛОГОВ Н.В. ТИМОФЕЕВА-РЕСОВСКОГО, В.И. КОРОГОДИНА, В.А. ШЕВЧЕНКО	
<i>В.Л. Корогодина</i>	747
ФЕНОМЕН ЖИЗНИ. АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОЛОГИИ В НАУЧНОМ НАСЛЕДИИ В.И. КОРОГОДИНА	
<i>В.Л. Корогодина</i>	753
ДЖЕК ХАРЛАН – ВЫДАЮЩИЙСЯ АМЕРИКАНСКИЙ УЧЕНИК Н.И. ВАВИЛОВА	
<i>В.А. Соколов</i>	761
ФЕНОТИПИЧЕСКОЕ И ГЕНОТИПИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ <i>LATHYRUS SATIVUS</i> L. ИЗ КОЛЛЕКЦИИ ВИР	
<i>М.О. Бурляева, М.А. Вишнякова</i>	769

Content

A CYTOGENETICIST ANTONINA IVANOVNA SHCHAPOVA. 80-YEARS BIRTH ANNIVERSARY AND 60-YEARS WORK CAREER	
<i>I.K. Zakharov, V.K. Shumny</i>	603
FEATURES OF SPATIAL ARRANGEMENT OF CHROMOSOMES IN EUKARYOTIC NUCLEI OF VARIOUS PLANT AND ANIMAL SPECIES	
<i>A.I. Shchapova</i>	612
STRUCTURAL FEATURES OF CENTROMERES IN POLETENE CHROMOSOMES OF CHIRONOMIDAE (DIPTERA) SPECIES	
<i>V.V. Golygina, I.I. Kiknadze, A.D. Broshkov, T.V. Karamysheva, N.B. Rubtsov</i>	622
SOME AGRONOMIC IMPORTANT FEATURES OF SPRING WHEAT CULTIVAR OMSKAYA 37 LINES CONTAINING WHEAT-RYE TRANSLOCATION 1RS.1BL	
<i>I.A. Belan, L.P. Rosseeva, N.V. Trubacheeva, T.S. Osadchaya, O.V. Dorogina, E.V. Zhmud, Y.V. Kolmakov, N.P. Blokhina, L.A. Kravtsova, L.A. Pershina</i>	632
GLUTEN CONTENT AND QUALITY IN COMMON WHEAT WITH TRANSLOCATIONS FROM <i>AGROPYRON ELONGATUM</i> NOST. AND <i>AGROPYRON INTERMEDIUM</i> NOST.	
<i>O.V. Krupnova, A.E. Druzhin, S.A. Voronina, V.A. Krupnov</i>	641
INTRODUCTION OF KARYOTYPE POLYMORPHISM ($2n = 36; 37; 38$) INTO THE GENOME OF DOMESTIC PIGS <i>SUS SCROFA DOMESTICA</i>	
<i>V.N. Tikhonov, M.L. Kochneva, V.E. Bobovich</i>	647
LOCATIONS AND FREQUENCY OF INVERSION BREAKPOINTS IN <i>CHIRONOMUS</i> GENOMES (DIPTERA, CHIRONOMIDAE)	
<i>A.D. Broshkov, L.A. Miroshnichenko, I.I. Kiknadze, V.D. Gusev</i>	654
INHIBITION OF POM152 AND POM34 EXPRESSION IN BUDDING YEAST ARRESTS THE ASSEMBLY OF THE NUCLEAR PORE COMPLEX AND INCREASES ITS INNER DIAMETER	
<i>A.A. Strunov, E.A. Onishchenko, E.V. Kiseleva</i>	663
LIPID PEROXIDATION PRODUCTS AND NONENZYMATIC AND ENZYMATIC ANTIOXIDANT SYSTEMS IN MALE RABBITS: AGE DYNAMICS	
<i>D.D. Adjiev</i>	674

ANALYSIS OF DATA OF LARGE-SCALE CHROMATIN IMMUNOPRECIPITATION BY METHODS OF PERCEPTION OF TRANSCRIPTION FACTOR BINDING SITES <i>V.G. Levitsky, G.V. Vasil'ev, D.Yu. Oshchepkov, N.I. Ershov, T.I. Merkulova</i>	685
EFFECT OF TATA BOX POLYMORPHISMS IN THE HUMAN β-GLOBIN GENE PROMOTER ASSOCIATED WITH β-THALASSEMIA ON THE INTERACTION OF THE TATA-BINDING PROTEIN <i>I.A. Drachkova, T.V. Arshinova, P.M. Ponomarenko, T.I. Merkulova, N.A. Kolchanov, L.K. Savinkova</i>	698
OSTEOPOROSIS AS A MANIFESTATION OF GENETICALLY DETERMINED SYNDROME OF SENESCENCE ACCELERATION IN OXYS RATS <i>N.A. Muraleva, A.A. Makeev, N.G. Kolosova</i>	706
INHERITANCE OF HEAT RESISTANCE IN RICE <i>Y.K. Goncharova</i>	714
FORMATION OF ROOT COLOR AND ITS GENETIC CONTROL IN FODDER BEET <i>A.V. Mglinets, Z.A. Osipova</i>	720
PHOTOPERIODIC SIGNALING AS A KEY FACTOR IN GENOTYPE-ENVIRONMENT INTERACTION <i>D.V. Klochkov, R.G. Gulevich, O.V. Trapezzov</i>	729
THE CONFERENCE «MODERN PROBLEMS IN GENETICS, RADIOBIOLOGY, RADIOECOLOGY AND EVOLUTION» MEMORIZING THE OUTSTANDING GENETICISTS AND RADIOBIOLOGISTS N.V. TIMOFEEFF-RESSOVSKY, B.I. KOROGODIN AND V.A. SHEVCHENKO <i>V.L. Korogodina</i>	747
THE PHENOMENON OF LIFE. ACTUAL PROBLEMS OF BIOLOGY IN THE SCIENTIFIC HERITAGE OF V.I. KOROGODIN <i>V.L. Korogodina</i>	753
JACK HARLAN, A PROMINENT AMERICAN N.I. VAVILOV'S DISCIPLE <i>V.A. Sokolov</i>	761
PHENOTYPIC AND GENOTYPIC DIVERSITY OF <i>LATHYRUS SATIVUS</i> L. (FABACEAE) FROM THE VAVILOV INSTITUTE COLLECTION <i>M.O. Burlyaeva, M. A. Vishnyakova</i>	769

**ЦИТОГЕНЕТИК, ДОКТОР БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК
АНТОНИНА ИВАНОВНА ЩАПОВА:
К 80-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ
И К 60-ЛЕТИЮ НАЧАЛА ТРУДОВОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ**



Доктор биологических наук Антонина Ивановна Щапова – известный специалист в области цитогенетики злаков.

Щапова (Негодяева) Антонина Ивановна родилась 1 ноября 1930 г. в селе Ново-Тырышкино Колыванского района Новосибирской области. Ее отец Иван Андреевич родился в 1907 г. в селе Ново-Тырышкино, куда его прадед Негодяев Порфирий Петрович приехал в 1890 г. из г. Грязи Липецкой области с пятью сыновьями и одной дочерью. Порфирий Петрович прожил очень долгую жизнь – 114 лет. Выбор данного места жительства был обоснован тем, что через это село проходил Московский тракт на город Томск, а в 20 километрах от этого села находилось крупное купеческое село Колывань. Большинство первых поселенцев с. Ново-Тырышкино были также из Липецкой области. Отец Антонины Ивановны вначале работал разнорабочим, а после окончания техникума механизации в с. Колывань был направлен заведующим мастерской на Ново-Тырышкин-

ской машино-тракторной станции (МТС). Мать Антонины Ивановны, Феоктиста Гавриловна, была домохозяйкой. В 1943 г. отец был призван в армию и направлен на фронт. Он погиб, защищая город Киев. Его родной брат и многие сродные братья (внуки Порфирия Петровича) и два брата Феоктисты Гавриловны также не вернулись с фронта.

Больная, нетрудоспособная мать одна воспитывала Антонину и ее младшего брата Александра. Материальной помощи было ждать не от кого. После окончания семилетней школы брат поступил учиться в железнодорожное училище г. Новосибирска, а Антонина – в Новосибирскую трехгодичную агрономическую школу в с. Колывань. После ее окончания в 1951 г. она продолжила учиться в Новосибирском сельскохозяйственном институте, в 1953 г. перешла на заочное отделение этого института и была направлена на работу в Кауракскую МТС Тогучинского района агрономом в одно из очень крупных хозяйств Новосибирской



Родители А.И. Щаповой: мать Феокиста Гавриловна, отец Иван Андреевич. Брат Александр Иванович.

области – колхоз «Гигант». В 1956 г. она окончила институт и была направлена на работу в Барывскую МТС Новосибирского сельского района агрономом колхоза им. Свердлова. Со строительством новосибирского Академгородка земли этого хозяйства были отданы под застройку Сибирского отделения АН СССР.

В 1958 г. Антонину Ивановну приняли на работу в Институт цитологии и генетики АН СССР в лабораторию экспериментального мутагенеза. Вначале она работала в должности рабочего, препаратора, младшего лаборанта. В 1965 г. Петр Климентьевич Шкварников, заведующий лабораторией экспериментального мутагенеза ИЦиГ СО АН СССР, посоветовал ей поступить на очное отделение аспирантуры

Института и согласился быть руководителем ее аспирантской работы, посвященной кариологии видов пшеницы. В 1966 г. П.К. Шкварников принимает приглашение Академии наук УССР и переезжает в Киев, и в этот же год из Москвы в Новосибирск переезжает Вера Вениаминовна Хвостова, которая по просьбе Петра Климентьевича дает согласие быть научным руководителем Антонины Ивановны. После окончания аспирантуры и защиты в 1969 г. кандидатской диссертации «Морфология хромосом некоторых видов пшеницы» Антонина Ивановна в 1970 г. была принята на должность младшего научного сотрудника в лабораторию цитогенетики ИЦиГ СО АН СССР, которой руководила В.В. Хвостова.

Формировалось основное направление исследований лаборатории цитогенетики: цитогенетика отдаленных гибридов злаков с целью разработки новых, более перспективных, методов передачи генетической информации в геном гексаплоидной мягкой пшеницы от близкородственных видов злаков. Антонине Ивановне было предложено изучить пшенично-ржаные гибриды для разработки метода замещения отдельных хромосом пшеницы хромосомами ржи. Для проведения исследования такого типа необходимо было разработать цитологический метод, позволяющий идентифицировать каждую хромосому ржи. Известные в тот период методы дифференциального окрашивания, разработанные для идентификации хромосом человека и разных видов животных, были не пригодны для растений. А.И. Щаповой впервые был разработан С-метод дифференциального окрашивания хромосом злаков, позволяющий по рисунку линейной исчерченности иденти-



Студенты агрошколы, с. Колывань, 1949 г.

Слева направо: 1-й ряд – Негодяева (Щапова) Тоня, Русакова Лена; 2-й ряд – Быковская Маша.



Защита кандидатской диссертации в ИЦиГ СО АН СССР, 1969 г.

фицировать хромосомы ржи. В последующие десятилетия многие сотрудники из разных научных организаций и вузов нашей страны прошли стажировку по освоению С-метода дифференциального окрашивания хромосом растений у А.И. Щаповой. За разработку данного цитологического метода идентификации хромосом ржи и исследования с помощью его всех видов рода *Secale* L. в 1979 г. Антонине Ивановне было

присвоено ученое звание старшего научного сотрудника. Результаты этого исследования были также высоко оценены научной общественностью и включены в материалы международного совещания по принятию единой номенклатуры хромосом ржи (Нидерланды, 1983 г.).

С помощью С-метода окрашивания А.И. Щаповой в соавторстве с сотрудниками руководимой ею группы Л.А. Кравцовой, Т.А. Потаповой (Баутиной), О.Г. Силковой и аспиранткой З. Зариповой был детально изучен процесс стабилизации кариотипов различных гибридных комбинаций пшенично-ржаных и пшенично-пырейных гибридов. Результаты проведенных исследований позволили решить ряд принципиальных задач, связанных с разработкой теории селекции пшеницы при использовании методов хромосомной инженерии, выяснить возможность более эффективного применения метода чужеродного замещения хромосом у важнейшей зерновой культуры – гексаплоидной мягкой пшеницы.

В процессе цитогенетических исследований были вскрыты закономерности становления кариотипов межродовых полиплоидных гибридов злаков, представляющие интерес для выяснения путей эволюционных преобразований геномных структур высших растений. Было показано, что ключевым этапом, определяющим процесс стабилизации кариотипов межродовых гибридов



Визит профессора L. Kimber (Англия) в ИЦиГ СО АН СССР, 1971 г.

1-й ряд: В.В. Хвостова, проф. Kimber L., О.И. Майстренко, В.К. Шумный; 2-й ряд: Ф.М. Шкутина, И.И. Кикнадзе, А.И. Щапова, Е.Б. Будашкина.

и характер межгеномного замещения их хромосом, является формирование гамет гибридов F_1 . Было установлено, что на этот важнейший этап стабилизации кариотипов гибридов оказывают существенное влияние структура генома исходного гибрида, а также тип деления и расхождения унивалентных хромосом в первом делении мейоза. На основании полученных результатов А.И. Щаповой были предложены схемы возможных преобразований геномных структур полиплоидных межродовых гибридов и различные схемы получения форм с замещением отдельных хромосом пшеницы хромосомами ржи и пырея. Благодаря этим работам в ИЦиГ СО АН СССР была создана уникальная коллекция пшенично-ржаных замещенных линий по разным хромосомам ржи и пшеницы.

Использование в цитогенетических исследованиях в качестве модельного объекта пшенично-ржаных замещенных линий позволило А.И. Щаповой в соавторстве с сотрудниками руководимой ею группы внести также существенный вклад в решение важной биологической проблемы – преодоления стерильности у межродовых гибридов. Были получены экспериментальные доказательства генетической обусловленности мейотической реституции, в результате которой образуются жизнеспособные гаметы с нередуцированным числом хромосом у полигаплоидов.

На основании полученных результатов Антониной Ивановной были сформулированы теоретические основы реконструкции генома пшеницы методом хромосомной инженерии, и в 1986 г. она защитила докторскую диссертацию «Закономерности межгеномного замещения хромосом пшенично-ржаных гибридов».

Пшенично-ржаные замещенные линии до сих пор широко и успешно используются в исследованиях по выяснению роли индивидуальных хромосом ржи и пшеницы в генетическом контроле мейоза и других признаков.

Следует отметить еще одно направление исследований А.И. Щаповой, которое внесло существенный вклад в решение проблемы пространственной организации клеточного ядра. Проблема изучения архитектоники клеточного ядра возникла еще в конце 19-го столетия. Литература по выяснению пространственной упорядоченности хромосом в ядре эукариот

весьма обширна и противоречива; на протяжении многих десятилетий господствовало представление о беспорядочном расположении хромосом в ядре, несмотря на многочисленные экспериментальные доказательства в пользу упорядоченного их расположения.

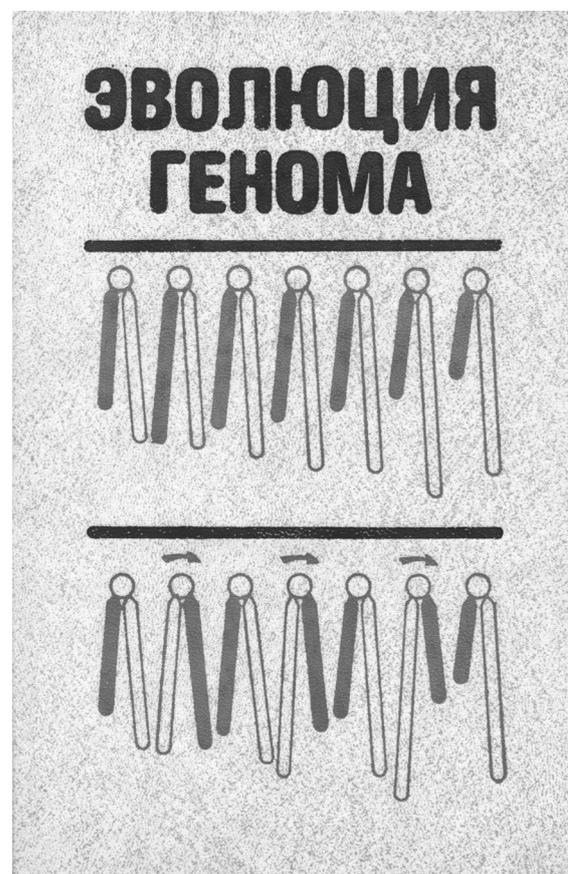
При кариологическом изучении видов пшеницы, различающихся по числу хромосом и геномной структуре, А.И. Щаповой было замечено, что суммарная длина коротких плеч по отношению к общей длине хромосом набора у всех исследованных ею видов одинакова и составляет около 42 %. На основании этих данных ею было сделано предположение о существовании фактора, с помощью которого поддерживается определенное соотношение длин плеч хромосом в пределах кариотипа. При более детальном анализе 5 разных видов пшеницы ею было обнаружено, что разнообразие длин плеч хромосом гаплоидного набора этих видов представляет собой равномерно убывающий ряд. Каждое последующее плечо отличается от предыдущего примерно на одну и ту же величину. Подобное разнообразие длин плеч хромосом было обнаружено ею и в кариотипах других видов злаков, которые так же, как и виды пшеницы, имеют только метацентрические и субметацентрические хромосомы с числом плеч хромосом гаплоидного генома, равным 14. Оказалось, что не только виды одного рода, но и виды разных родов злаков, содержащих одинаковое число плеч хромосом, имеют сходные относительные размеры плеч. Кроме этого было замечено, что разнообразие длин плеч индивидуальных хромосом их гаплоидных наборов неслучайно. Среди проанализированных видов не встречались такие случаи, чтобы самое длинное и самое короткое плечи принадлежали одной хромосоме.

Обнаруженные закономерности в разнообразии длин плеч хромосом указывали на то, что эволюционные преобразования размеров плеч индивидуальных хромосом гаплоидного генома находятся под контролем всего генома. А.И. Щаповой впервые было сделано заключение, что одним из факторов, определяющих эволюцию размеров плеч хромосом, является упорядоченное пространственное расположение их в ядре (Щапова, 1971). На основании имеющихся в то время результатов цитологических исследований пространственного расположения

хромосом в профазе митоза, а также обнаруженных закономерностей в разнообразии длин плеч хромосом гаплоидных наборов А.И. Щаповой был выдвинут постулат о том, что основной единицей пространственной организации интерфазного ядра является гаплоидный набор хромосом с упорядоченным последовательным расположением плеч хромосом. Также предполагалось, что хромосомы каждого гаплоидного генома образуют отдельную цепь посредством ассоциации плеч хромосом «теломер к теломеру». Гомологичные цепи в диплоидном ядре расположены параллельно друг другу, гомологичные хромосомы находятся рядом, «бок о бок». Хромосомы располагаются по внутренней оболочке ядра, центромеры всех хромосом локализованы на одном полюсе, а суммарная длина каждой пары рядом расположенных плеч хромосом одинакова. На примере диплоидного вида ржи *Secale cereale* L. была предложена схема последовательного расположения хромосом гаплоидного генома согласно комплементарности длин плеч.

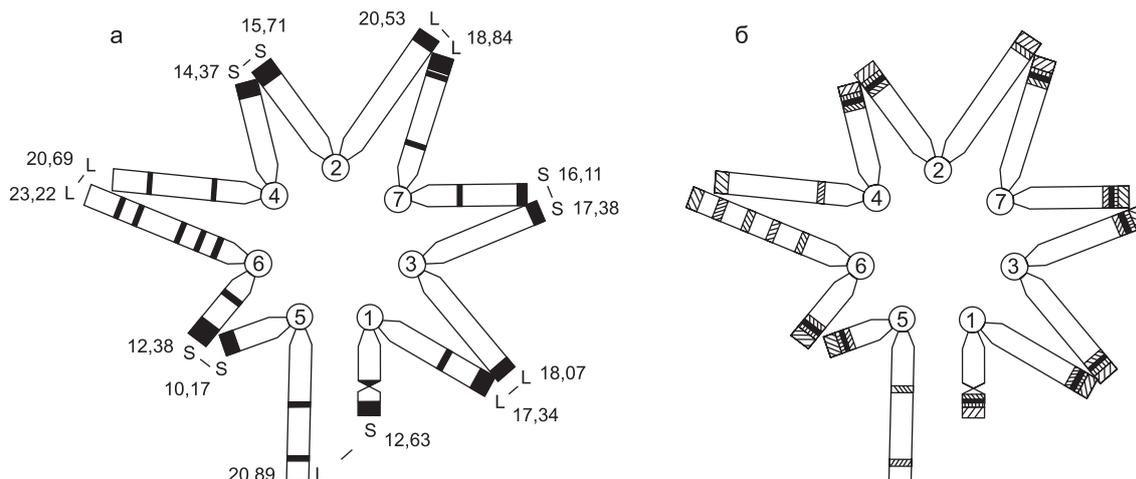
В 1982 г. профессор М.Д. Беннетт (Plant Breeding Institute, Cambridge, England) в докладе «Нуклеотипическая основа пространственной упорядоченности хромосом эукариот и ее значение для эволюции генома и фенотипической изменчивости» на симпозиуме по эволюции генома изложил результаты А.И. Щаповой по пространственному расположению хромосом и предложенную ею схему по расположению хромосом гаплоидного набора ржи, построенную согласно комплементарности плеч хромосом, а также результаты собственных исследований, полученных на основе компьютерной ранжировки хромосом по подобию длин плеч рядом расположенных хромосом в метафазах митоза ржи с использованием для идентификации С-метода дифференциального окрашивания. В основу компьютерной ранжировки первоначально была взята модель А.И. Щаповой. На основании полученных результатов М.Д. Беннетт пришел к заключению, что рядом расположенные плечи хромосом имеют сходную длину. Предложенная им схема последовательного расположения хромосом гаплоидного набора ржи была составлена по принципу подобия длин плеч. Обе эти схемы представлены на обложке книги «Genome Evolution», изданной в 1982 г., в которой описаны

материалы Симпозиума по эволюции генома и которая была в 1986 г. переведена на русский язык (Эволюция генома. М.: Мир, 1986. С. 234–256). Удивительным оказалось то, что порядок расположения хромосом гаплоидного генома ржи на этих двух разных моделях одинаков. На основании полученных результатов М.Д. Беннетт экспериментально подтвердил, что, во-первых, расположение хромосом в клеточном ядре высоко упорядочено и, во-вторых, основной структурной единицей упорядоченного пространственного расположения хромосом в клеточном ядре у диплоидов является гаплоидный геном, внутри которого индивидуальные хромосомы располагаются строго определенным образом относительно друг друга. Он так-



Обложка перевода книги «Genome Evolution» (Ed. G.A. Dover, R.B. Flavell). Academic Press, 1982, изданной на русском языке (Москва: Мир, 1986 г.).

На обложке: семь хромосом гаплоидного генома *S. cereale*, сорт UC 90, расположенных в соответствии с моделью Щаповой (вверху) и с моделью Беннетта (внизу)



Гаплоидный набор хромосом *S. cereale* (указаны основные С-полосы).

а – хромосомы расположены в соответствии с моделью Беннета; б – распределение основных сайтов для четырех семейств повторяющихся последовательностей ДНК (цит. по: Hutchinson *et al.*, 1981). Цифры около плеч хромосом (а) представляют собой их относительные длины в условных единицах (цит. по: J.P. Gustafson, личное сообщение).

же пришел к заключению, что предложенные модели с учетом длин плеч хромосом способны предсказывать архитектуру ядра. Эта история для Антонины Ивановны стала не только свидетельством признания приоритета ее модели в разработке пространственной упорядоченности хромосом, но и примером высокой научной этики профессора Беннета.

В дальнейшем благодаря применению С-метода дифференциальной окраски хромосом А.И. Щаповой было изучено пространственное расположение хромосом ржи у диплоидного вида *Secale cereale* L., тритикале, пшенично-ржаных полигаплоидов, а также у пшенично-ржаных замещенных и анеуплоидных форм. В результате этого цикла исследований были подтверждены ранее высказанные ею положения, что основной единицей пространственной организации хромосом в ядре является гаплоидный набор хромосом, гомологичные наборы хромосом разных гаплоидных наборов располагаются параллельно, центромеры всех хромосом у исследованных ею растений расположены на одном полюсе ядра, а теломеры ориентированы к противоположному полюсу.

А.И. Щапова полагает, что дальнейшее более детальное изучение пространственного расположения индивидуальных хромосом в интерфазном ядре у ржи и других видов растений позволит начать исследования по картографии и

эффекту генов в трехмерном пространстве ядра. На основании полученных и суммированных ею данных она также полагает, что упорядоченное последовательное пространственное расположение хромосом гаплоидных геномов является одним из существенных факторов не только в эволюционных преобразованиях размеров плеч хромосом, но и в стабилизации кариотипов отдаленных гибридов и эволюции гаплоидного числа хромосом.

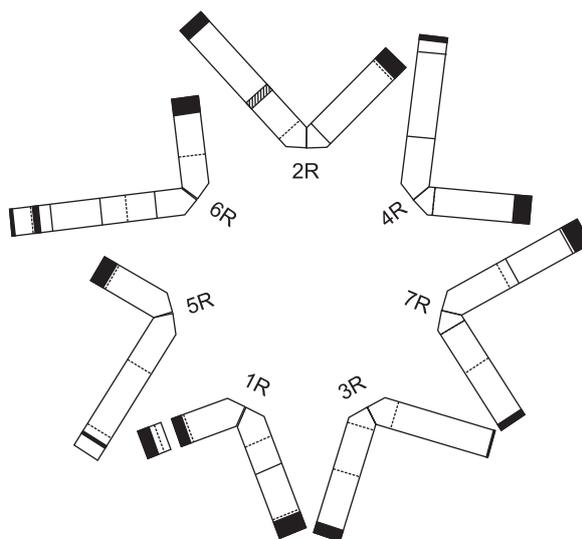


Схема расположения хромосом гаплоидного набора ржи *Secale cereale* L. в соответствии с моделью А.И. Щаповой.



А.И. Шапова с учениками, 2000 г.

Л.А. Кравцова, М.Ф. Санамьян (г. Ташкент), А.И. Шапова, М.Х. Коробейникова.

Под научным руководством Антонины Ивановны защищено 10 дипломных работ и 4 кандидатские диссертации. По итогам Всесоюзного конкурса 1975–1976 учебного года за успешную подготовку дипломных работ студентов НГУ Антонина Ивановна была награждена дипломом. С 1997 г. и по настоящее время она – член квалификационного совета по защите докторских диссертаций в ИЦиГ СО РАН.

В 1985 г. Антонине Ивановне присваивается звание «Заслуженный ветеран Сибирского отделения СО АН СССР» с вручением Почетного знака. За большой личный вклад в развитие научно-технического потенциала Новосибирской области, многолетний плодотворный труд и в связи с 50-летием со дня образования ИЦиГ СО РАН в 2007 г. Антонина Ивановна награждена Почетной грамотой, а в 2003 г. – Памятным зна-



Коллектив сектора цитогенетики злаков, 2010 г.

А. И. Шапова (в центре), 2-й ряд: О.Г. Силкова, Н.М. Красилова, Г.Г. Силкина, Л.Г. Барсук, Л.И. Сумина



Семья. 1-й ряд: А.И. Щапова, Н.С. Щапов (муж); 2-й ряд: Ирина (внучка), Евгений (сын), Мария (внучка).

ком в честь 110-летия со дня основания города Новосибирска. За большой вклад в развитие академической науки и производительных сил Сибири, достигнутые успехи в научной и производственной деятельности и в связи с 50-летием Сибирского отделения РАН в 2007 г. она награждена Почетной грамотой Российской академии наук и Профсоюза работников РАН.

За достигнутые успехи в исследовании межродовых гибридов злаков А.И. Щапова награждена серебряной медалью ВДНХ (1984 г.), а за создание солеустойчивой пшенично-ржаной замещенной формы ею получен патент. Она автор и соавтор 112 научных работ, в том числе 3 монографий.

Антонина Ивановна и ее супруг, Николай Семенович Щапов, имеют сына Евгения и двух внучек – Марию и Ирину. Николай Семенович многие десятилетия работал в лаборатории экспериментального мутагенеза в Институте цитологии и генетики СО РАН – прошел путь от лаборанта до старшего научного сотрудника. В результате проведенных им селекционных работ и цитогенетических исследований была создана уникальная коллекция сортов облепихи.

В настоящее время Антонина Ивановна Щапова работает в должности главного научного сотрудника-консультанта ИЦиГ СО РАН. Как всегда, она спокойна и доброжелательна, полна сил и энергии.

Избранные научные труды А.И. Щаповой

- Щапова А.И. О структуре кариотипа и порядке расположения хромосом в интерфазном ядре // Цитология. 1971. Т. 13. № 9. С. 1157–1164.
- Щапова А.И. Кариотипы пшеницы // Цитогенетика пшеницы и ее гибридов. М.: Наука, 1971. С. 30–56.
- Щапова А.И. Дифференциальная окраска хромосом растений. I. *Secale cereale* // Цитология. 1974. Т. 16. № 3. С. 370–372.
- Хвостова В.В., Щапова А.И. Дифференциальная окраска хромосом ржи и ее значение в цитогенетике тритикале // Изв. СО АН СССР. Сер. биол. наук. 1974. Вып. 3. № 15. С. 70–74.
- Щапова А.И. Дифференциальная окраска хромосом по Гимза и перспективы использования этого метода в цитогенетике растений // Цитогенетика гибридов, мутаций и эволюция кариотипа. Новосибирск: Наука, 1977. С. 213–231.
- Зарипова З., Щапова А.И. Характеристика гибридов первого и второго поколений гексаплоидного тритикале с гексаплоидной пшеницей // Изв. СО АН СССР. Сер. биол. наук. 1979. Вып. 3. С. 40–44.
- Щапова А.И., Кравцова Л.А. Создание пшенично-ржаных замещенных линий с использованием метода дифференциальной окраски хромосом // Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. биол. наук. 1981. Вып. 2. С. 82–87.
- Shchapova A.I., Potapova T.A., Kravtsova L.A., Numerova O.M. Karyotype stabilization in intergenetic hybrids of the subtribe Triticinae. I. The effect of genome structure // Theor. Appl. Genet. 1984. № 68. P. 289–296.
- Щапова А.И., Кравцова Л.А., Потапова Т.А. Закономерности преобразований геномной структуры

- пшенично-ржаных полигаплоидов ABDR // Генетика. 1987. Т. 23. № 2. С. 295–302.
- Щапова А.И., Потапова Т.А., Кравцова Л.А. Генетическая обусловленность нерасхождения хромосом в мейозе пшенично-ржаных полигаплоидов // Генетика. 1987. Т. 23. № 3. С. 473–481.
- Щапова А.И., Кравцова Л.А. Цитогенетика пшенично-ржаных гибридов. Новосибирск: Наука, 1990. 162 с.
- Щапова А.И., Силкова О.Г., Кравцова Л.А. Роль хромосом пятой гомеологичной группы пшеницы и ржи в регуляции эквационного деления унивалентов // Генетика. 1995. Т. 31. № 3. С. 390–395.
- Силкова О.Г., Щапова А.И., Кравцова Л.А. Механизмы мейотической реституции и их генетическая регуляция у пшенично-ржаных полигаплоидов // Генетика. 2003. Т. 38. № 11. С. 1514–1523.
- Силкова О.Г., Щапова А.И., Шумный В.К. Роль хромосомы ржи 2R пшенично-ржаной замещенной линии 2R(2D)₁ (*T. aestivum* L. сорт Саратовская 29/*S. cereale* L., сорт Онохойская) в генетической регуляции мейотической реституции у пшенично-ржаных полигаплоидов // Генетика. 2007. Т. 43. № 7. С. 971–981.
- Силкова О.Г., Добровольская О.Б., Щапова А.И., Шумный В.К. Особенности регуляции мейотической реституции у андрогенных гаплоидов пшенично-ржаных замещенных линий 2R(2D)₁, 2R(2D)₃, 6R(6A) (*Triticum aestivum* L., сорт Саратовская 29/*Secale cereale* L., сорт Онохойская) // Генетика. 2009. Т. 45. № 9. С. 1211–1216.
- Пат. № 2138156 Способ создания солеустойчивых форм мягкой пшеницы 27.09.1999 г. Щапова А.И., Кравцова Л.А.

И.К. Захаров, В.К. Шумный

Учреждение Российской академии наук
Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ХРОМОСОМ В КЛЕТОЧНОМ ЯДРЕ ЭУКАРИОТ И ЕЕ ОСОБЕННОСТИ У РАЗНЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ И ЖИВОТНЫХ

А.И. Щапова

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

В данной статье приведены результаты исследований, подтверждающие наличие в интерфазном ядре эукариот упорядоченной пространственной организации хромосом и особенностей ее у разных видов. Показано, что между видами растений и животных имеются различия по локализации центромер хромосом в пространстве клеточного ядра. Среди исследованных видов выявлено два разных типа: а) тип I – центромеры всех хромосом локализованы на одном полюсе ядра; б) тип II – центромеры хромосом рассредоточены в пространстве ядра. Установлена зависимость между пространственной локализацией центромер в интерфазном ядре и размерами хромосом. Установлено также, что родственные по происхождению виды имеют подобный тип структурной организации хромосом в клеточном ядре. Результаты проведенных исследований указывают на то, что эволюционные преобразования структуры хромосом и пространственной локализации их в клеточном ядре эукариот – взаимозависимые процессы. Наиболее консервативным из них является архитектура ядра. Предполагается, что регуляция пространственного расположения хромосом в клеточном ядре направлена на поддержание не только упорядоченного их расположения относительно друг друга, но и определенной пространственной разобщенности их в ядре.

Ключевые слова: архитектура клеточного ядра, кариотип, хромосома, виды растений и животных.

Еще в конце 19-го столетия австрийским зоологом К. Раблем с помощью светового микроскопа была обнаружена полярность в расположении хромосом в ядрах саламандры (Глушакова, 1983). Показано, что в ранней профазе митоза центромеры сосредоточены на одном полюсе ядра, а теломеры – на другом. Данный тип ориентации хромосом в клеточном ядре вошел в литературу под термином «Rabl orientation». В дальнейшем в результате цитологических исследований были не только получены подтверждения полярности хромосом у ряда видов животных и растений, но и приведены экспериментальные доказательства упорядоченного пространственного расположения хромосом в трехмерной структуре клеточного ядра эукариот.

Более ранние исследования пространственного расположения хромосом проведены у видов растений, имеющих малое число хромосом:

Crepis capillaries L. ($2n = 6$) (Wagenaar, 1969) и *Ornithogalum virens* Lind. ($2n = 6$) (Ashley, Wagenaar, 1972). В кариотипе вида *C. capillaries* L. все три пары гомологичных хромосом субметацентрические, а средняя длина хромосомы равна 5,4 мкм. Из них две пары крупные и одна малого размера. На коротком плече одной из крупных пар локализован ядрышкообразующий район. Исследования пространственного расположения хромосом у данного вида проведены на давленных препаратах, приготовленных из кончиков корешков без предварительной обработки колхицином и окрашенных по Фельгену. При анализе ядер, находящихся на стадии ранней профазы митоза меристематических клеток, была обнаружена ассоциация хромосом теломерами (Wagenaar, 1969). В результате такой ассоциации хромосомы каждого гаплоидного набора образовывали цепь, в которой теломер короткого плеча самой крупной по размеру хро-

мосомы ассоциировал с теломером короткого плеча самой малой по размеру хромосомы, а теломер длинного плеча этой же хромосомы – с теломером длинного плеча ядрышкообразующей. Гаплоидные цепи располагались в ядре параллельно напротив друг друга.

У вида *Or. virens* Lind. ($2n = 6$) изучено пространственное расположение хромосом в ядрах меристематических клеток на давленных препаратах, окрашенных ацетокармином (Ashley, Wagenaar, 1972). В кариотипе этого вида все три гомологичные пары хромосом (А, В, С) крупные и акроцентрические. Средний размер хромосомы у этого вида равен 4,8 мкм. В ранней профазе митоза также была обнаружена ассоциация хромосом теломерами. Хромосомы каждого гаплоидного генома образовывали цепь, в которой теломер короткого плеча хромосомы А ассоциировал с теломером короткого плеча самой крупной хромосомы В, а теломером длинного плеча – с теломером длинного плеча самой малой хромосомы С. Гаплоидные цепи располагались параллельно. Показано также, что в профазе митоза пыльца хромосомы гаплоидного набора этого вида растений ассоциируют теломерами в той же последовательности, что и в ранней профазе митоза меристематических клеток. В дальнейшем порядок последовательного расположения хромосом гаплоидного генома в профазе митоза пыльца подтвержден с помощью С-метода дифференциального окрашивания (Ashley, 1979).

В результате этих исследований установлено, что у *C. capillaries* L. и *Or. virens* Lind. центромеры хромосом располагаются на одном полюсе ядра, а теломеры ориентированы к противоположному.

В дальнейшем центромерно-теломерная ориентация хромосом относительно полюсов ядра была изучена у многих видов покрытосеменных растений. Исследования в основном проведены на ядрах меристематических клеток корешков и на разных стадиях мейотического деления. В качестве красителей использовались окраски ацетоорсеин, ацетокармин и окраска по Фельгену. При исследовании отдельных видов применялся С-метод дифференциального окрашивания.

В результате исследования 33 видов, принадлежащих к 25 родам 8 разных семейств, были обнаружены существенные различия между ви-

дами по характеру локализации центромер хромосом в пространстве ядра (Tanaka, 1981a, b). Показано, что у одних видов в интерфазном ядре центромеры располагаются на центромерном полюсе (тип I), у других центромеры рассредоточены по периферии ядра (тип II). При этом автором было установлено, что виды с разным характером локализации центромер, существенно различаются по размерам хромосом. Средняя длина хромосом у видов типа I оказалась равной 7,2 мкм (3,1–15,4), у видов типа II – менее 2,6 мкм. Оказалось, что виды типа I имеют крупные хромосомы, а виды типа II – хромосомы небольшого размера.

В результате этих исследований обнаружена зависимость между размерами хромосом и характером локализации их центромер в интерфазном ядре. Кроме этого было установлено, что увеличение плоидности у видов типа I не приводит к изменению архитектоники ядра, в то время как у видов типа II при увеличении уровня плоидности происходит значительное увеличение площади ядра, занимаемой центромерами.

С помощью флюоресцентной *in situ* гибридизации были изучены интерфазные ядра незрелых паренхимных клеток у *Arabidopsis thaliana* (Fransz *et al.*, 2002). В результате этого исследования установлено, что хромосомы этого вида рассредоточены по периферии ядра и не имеют рабльского типа центромерно-теломерной ориентации.

Центромерно-теломерная ориентация хромосом относительно полюсов ядра была изучена у диплоидного *Triticum monococcum* L. ($2n = 14$) и гексаплоидного *Triticum aestivum* L. ($2n = 42$) видов пшеницы (Щапова, 1971a, б; Щапова, Кравцова, 1990). Хромосомы этих видов пшеницы довольно крупные: мета- и субметацентрические. Средняя длина хромосом у диплоидного вида 5,2–7,1 мкм, а у гексаплоидного 4,6–7,9 мкм (Левитский и др., 1939). В результате проведенных исследований установлено, что в ранней профазе митоза меристематических клеток центромеры всех хромосом у данных видов ориентированы к одному полюсу ядра, а теломеры – к противоположному (рис. 1). Плечи хромосом располагаются по периферии ядра, а теломеры большинства плеч достигают противоположного полюса.

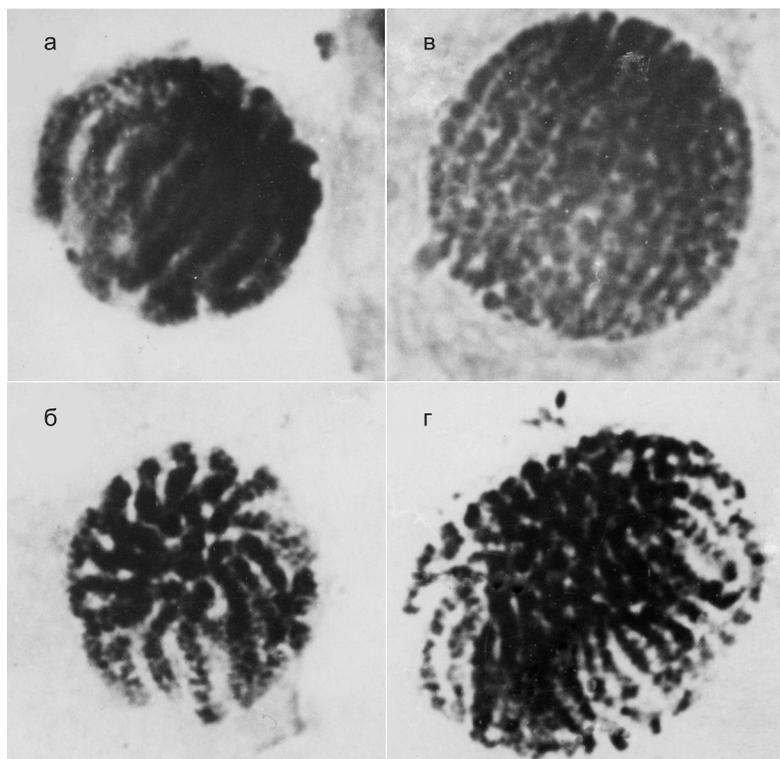


Рис. 1. Центромерно-теломерная ориентация хромосом в профазе митоза двух видов пшеницы.

а, б – *Triticum monococcum* L. ($2n = 14$); в, г – *Triticum aestivum* L. ($2n = 42$) (Щапова, Кравцова, 1990).

С помощью С-метода дифференциального окрашивания изучена локализация центромер в интерфазном ядре меристематических клеток у *Lathyrus tingitanus* L. ($2n = 14$) (Щапова, Баутина, 1975). Все 7 пар хромосом у этого вида чины имеют очень крупные прицентромерные блоки гетерохроматина (рис. 2, а, б). Установлено, что в интерфазном ядре гетерохроматиновые блоки прицентромерных районов всех 7 пар хромосом располагаются на одном полюсе ядра, ассоциируя друг с другом, они формируют кольцо (рис. 2, в, г). Результаты этого исследования показали, что хромосомы данного вида чины так же, как и у изученных видов пшеницы, имеют рабльский тип центромерно-теломерной ориентации в интерфазном ядре (тип I).

С помощью С-метода изучена структура интерфазных ядер у диплоидного вида ржи *Secale cereale* L. RR ($2n = 14$), пшенично-ржаного гибрида F₁ ABDR ($4x = 28$), тритикале AABBRR ($2n = 42$) и пшенично-ржаных замещенных линий (Щапова, Кравцова, 1990). В кариотипе диплоидного вида ржи все 7 пар гомологичных

хромосом имеют крупные гетерохроматиновые блоки на теломерах коротких плеч и на теломерах длинных плеч трех гомологичных пар (рис. 3, а). В результате анализа дифференциально окрашенных интерфазных ядер было установлено, что теломерные блоки гетерохроматина локализованы на одной половине ядра у ржи (рис. 3, б), а также у пшенично-ржаного гибрида и тритикале. Анализ ассоциаций теломерных блоков гетерохроматина показал, что у пшенично-ржаного гибрида F₁ ABDR, содержащего только гаплоидный набор хромосом ржи, размах изменчивости по количеству блоков варьировал в проанализированных интерфазных ядрах от 7 до 10, а среднее их число было равно 8,48 (табл. 1). Оказалось, что в отдельных ядрах из 10 теломерных блоков ассоциировали друг с другом от 1 до 3 блоков, в среднем 1,52 на ядро. У диплоидного вида ржи размах изменчивости по числу блоков составил 10–20 (12,87 на ядро). Подобные результаты были получены при анализе интерфазных ядер гексаплоидного тритикале, у которого в среднем в ассоциацию вступало 6,06 блоков из 20 при размахе изменчивости 8–20.

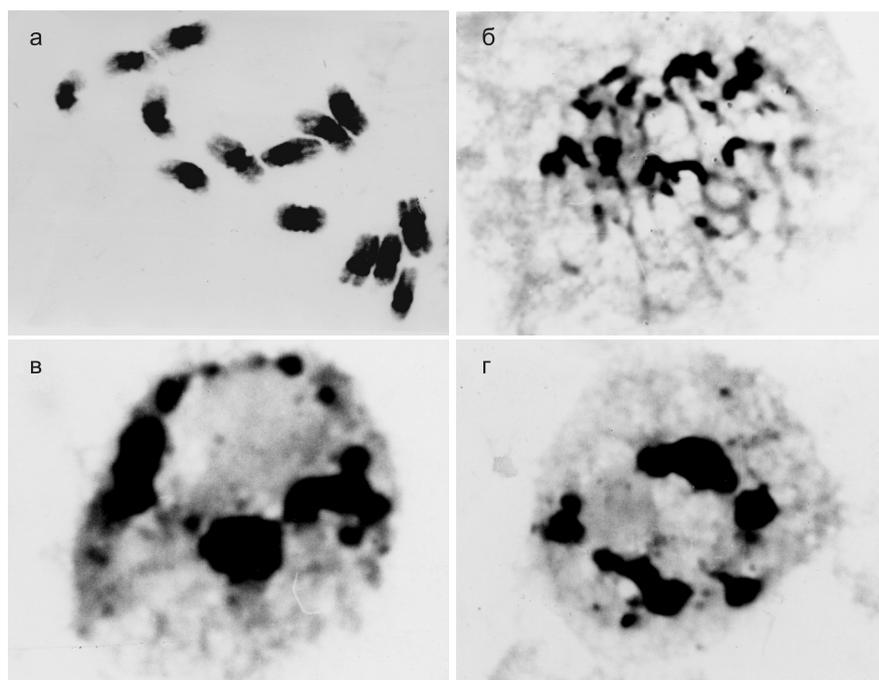


Рис. 2. С-окрашивание митоза вида чины *Lathyrus tingitanus* L. ($2n = 14$).

а – метафазные хромосомы; б – ядро на стадии профазы; в, г – ядро на стадии интерфазы (Щапова, Баутина, 1975).

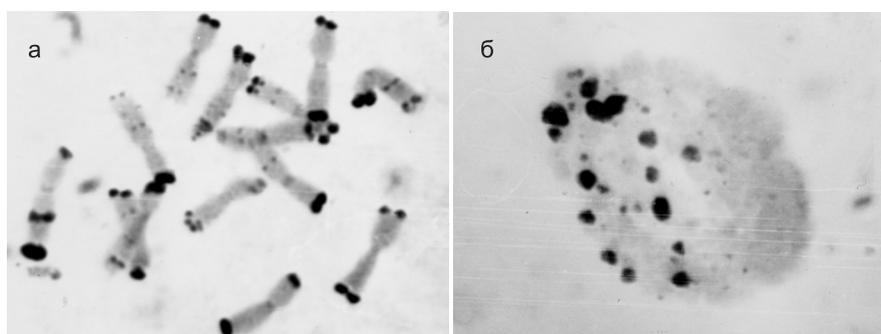


Рис. 3. С-окрашивание митоза ржи *Secale cereale* L. ($2n = 14$).

а – метафазные хромосомы; б – ядро на стадии интерфазы (Щапова, Кравцова, 1990).

Таблица 1

Ассоциация теломерных гетерохроматиновых блоков хромосом ржи в интерфазных ядрах тритикале и пшенично-ржаных гибридов F₁

Наименование	Количество теломерных блоков гетерохроматина	Изучено ядер	Среднее количество блоков на ядро	Размах изменчивости
<i>Secale cereale</i> L. (RR)	20	54	12,87 ± 0,19	10–20
Тритикале (AABBRR)	20	283	13,94 ± 0,19	8–20
Пшенично-ржаные гибриды F ₁ ABDR	10	68	8,48 ± 0,14	7–10

Анализ ассоциаций теломерных блоков гетерохроматина гомологичных плеч хромосом ржи в интерфазных ядрах пшенично-ржаных замещенных линий показал, что ядра с ассоциацией теломерных блоков короткого плеча хромосомы ржи 1R встречались с частотой 20,97 %, а длинного плеча – 38,71 % (табл. 2).

Таблица 2

Ассоциация теломерных блоков гетерохроматина гомологичных плеч хромосом ржи в интерфазных ядрах пшенично-ржаных замещенных линий

Хромосомы ржи пшенично-ржаных замещенных линий	Наименование плеч хромосом	Количество изученных ядер	Доля ядер с ассоциацией теломерных блоков гетерохроматина хромосом ржи, %
1R	S	62	20,87
	L	62	38,71
2R	S	58	20,69
	L	58	22,41
5R	S	81	34,37
			20,69–34,37

У замещенной линии по 2R количество ядер с ассоциациями теломерных блоков короткого и длинного плеч было одинаковым 20,69–22,41 %, а частота ассоциаций теломерных блоков короткого плеча 5R – 34,37 %. В итоге частота ассоциаций теломерных блоков гетерохроматина коротких и длинных плеч гомологичных хромосом оказалась равной 20,69–34,37 %. У диманосомных пшенично-ржаных линий, полученных от скрещивания замещенных линий, различающихся по хромосомам ржи 5R–6R, 5R–2R и 5R–3R, ассоциаций их теломерных блоков не обнаружено.

В результате проведенного исследования было установлено, что в интерфазных ядрах меристематических клеток теломеры хромосом ржи у *S. cereale* L., тритикале и пшенично-ржаных гибридов локализованы на противоположной стороне ядра относительно центромерного полюса. Характер их пространственной локализации в интерфазном ядре у пшенично-ржаных

гибридов и тритикале подобен диплоидной ржи, т. е. они имеют рабльский тип ориентации хромосом относительно полюсов ядра. Результаты проведенных исследований указывают также на то, что гаплоидные наборы хромосом в диплоидном ядре ржи и тритикале располагаются параллельно, гомологичные хромосомы рядом, а негомологичные в определенной последовательности.

Близкое расположение гомологичных хромосом у ржи и пшеницы подтверждено результатами других исследователей. Так, например, в результате использования *in situ* гибридизации GISH и FISH установлено, что у пшенично-ржаной дополненной телоцентрической линии гомологи ржи 5RL на предмейотической стадии и в ранней профазе мейоза расположены рядом (Mikhailova *et al.*, 1998; Maestra *et al.*, 2002). Исследования характера локализации центромер у гексаплоидной пшеницы *T. aestivum* L. с помощью *in situ* гибридизации FISH показали, что в ранней лептотене обнаруживается кластеризация 7 групп центромер (Martinez-Perez *et al.*, 2003). Предполагается, что каждый кластер включает центромеры гомологичных хромосом трех разных геномов гексаплоидной пшеницы. На примере телоцентрической линии ржи было показано, что два телоцентрических бивалента по короткому и длинному плечу одной и той же исходной хромосомы в MI мейоза располагаются рядом (Hoppe, Zeller, 1982; Yacobi *et al.*, 1982, 1983).

У межродовых ячменно-ржаных гибридов *F₁ Hordeum vulgare* L. × *Secale africanum* L. в метафазах митоза было обнаружено разобщение хромосом разных геномов (Finch *et al.*, 1981; Беннетт, 1986). Хромосомы ячменя располагались в центре метафазной пластинки, а хромосомы ржи – на периферии. Результаты этого исследования указывают не только на то, что гаплоидные наборы хромосом разных геномов у межродовых гибридов в ядре пространственно разобщены, но и на то, что хромосомы материнского генома располагаются ближе к центру метафазной пластинки, и что расположение хромосом разных геномов, возможно, определяется направлением скрещивания.

Архитектоника ядра у насекомых наиболее детально изучена у *Drosophila melanogaster* и разных видов *Anopheles*. В результате цитоло-

гического исследования политенных хромосом в ядрах слюнных желез *D. melanogaster* было установлено, что центромерные районы всех хромосом этого вида объединены в общий хромоцентр. Хромоцентральная структура у этого вида обнаружена и в мейозе, высказано предположение о ее роли в поддержании неслучайного последовательного расположения в ней негомологичных хромосом (Кожевников, 1939).

Кариотип *D. melanogaster* состоит из двух пар крупных метацентрических хромосом (2 и 3), одной равноплечей пары (4) и половых хромосом X и Y. Пространственное расположение хромосом в ядре на разных стадиях клеточного цикла у данного вида детально изучено В.Л. Чубыкиным (1988, 2001а, б). Им приведены экспериментальные доказательства роли хромоцентра в поддержании упорядоченного взаимного расположения хромосом, а также установлен не только порядок расположения хромосом гаплоидного генома в кольцевой структуре хромоцентра, но и упорядоченное расположение их плеч в пространстве ядра (= X = 2L.2R = 3L.3R = 4 =). Показано также, что хромоцентр имеет двухкольцевую структуру, сформированную связями гетероэктопической природы между каждым негомологом в асинхронизированных околоцентромерных районах гаплоидного генома (Чубыкин, 1988, 2001б; Чубыкин, Омелянчук, 1989). Результатами этих исследований подтверждены наличие в ядре упорядоченного последовательного расположения хромосом гаплоидного набора и роль центромерных районов в поддержании взаимного расположения хромосом, а обнаруженная двухкольцевая структура хромоцентра указывает на разобщенность в ядре гаплоидных наборов хромосом.

В результате исследований архитектоники ядер у 7 разных видов *Anopheles* В.Н. Стегний (1993) показал, что пространственное расположение хромосом в ядрах слюнных желез у всех изученных видов сходно и характеризуется объединением центромер хромосом в единый центромерный узел, который локализуется по периферии ядра вблизи оболочки. Подобная пространственная организация политенных хромосом обнаружена им в клетках мальпигиевых сосудов. Однако в клетках трофоцитов у изученных видов хромоцентральная организа-

ция отсутствует. Кроме этого, в клетках трофоцитов выявлена видоспецифичная трехмерная организация хромосом, выраженная в наличии или отсутствии связей отдельных хромосом с ядерной оболочкой, а также участков прикрепления их на мембране ядра. На основе полученных результатов высказано предположение, что в процессе видообразования может происходить пространственная реорганизация клеточного ядра.

Связь отдельных участков политенных хромосом с ядерной оболочкой была обнаружена у *Chironomus dorsalis* (Груздев, Кикнадзе, 1970). Показано также, что политенные хромосомы *D. melanogaster* образуют связь не только с ядерной оболочкой, но и между отдельными участками негомологичных хромосом (Куличков, Жимулев, 1976).

В последние годы благодаря методу флюоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) в комбинации с конфокальным микроскопом, позволяющим анализировать расположение индивидуальных хромосом или отдельных их локусов в пространстве ядра, получены доказательства наличия упорядоченной пространственной организации хромосом в интерфазном ядре различных видов млекопитающих и птиц. Показано, что каждая хромосома в ядре занимает свою территорию (Cremer *et al.*, 1988; Zink *et al.*, 1988; Sun *et al.*, 2000; Cremer *et al.*, 2001, 2003; Habermann *et al.*, 2001; Tanabe *et al.*, 2002; Alexandrova *et al.*, 2003; Rens *et al.*, 2003; Foster, Bridger, 2005; Schneider, Grosschedl, 2007).

Наиболее детально изучена архитектура клеточного ядра у человека, кариотип которого состоит из 23 пар хромосом: 22 пар аутосом и одной половой пары X и Y. Среди аутосом 12 пар макрохромосом (1–12) и 10 пар микрохромосом (13–22). Еще в ранних работах было замечено, что в метафазах митоза микрохромосомы занимают центральное положение, а макрохромосомы – периферическое. В результате применения различных вариантов *in situ* гибридизации (FISH) установлено, что в интерфазном ядре человека микрохромосомы занимают центральную позицию, а макрохромосомы локализованы на периферии (Cremer *et al.*, 1988; Zink *et al.*, 1988; Sun *et al.*, 2000; Cremer *et al.*, 2001).

В результате исследования пространственного расположения индивидуальных хромосом

в клеточном ядре лимфоцитов, фибробластов и нейробластов было обнаружено, что ранореплицирующиеся микрохромосомы 17, 19 и 20 располагаются в центре ядра, а позднореплицирующиеся 18 и Y – на периферии (Croft *et al.*, 1999; Boyle *et al.*, 2001; Cremer *et al.*, 2001, 2003). При этом было установлено, что микрохромосомы 18 и 19, подобные по размеру, но различающиеся по плотности генов (по количеству генов на длину хромосомы), занимают разные позиции в ядре (Croft *et al.*, 1999; Boyle *et al.*, 2001; Cremer *et al.*, 2003). Хромосома 19, как gene-rich, занимала центральную позицию, а хромосома 18 (gene-poor) – периферическую.

Изучение локализации теломер длинных плеч 9 разных хромосом в интерфазных ядрах клеток фибробластов показало, что теломеры q плеч крупных хромосом занимают более периферическую позицию, чем теломеры q плеч микрохромосом (Sun *et al.*, 2000). Исследование локализации p и q плеч хромосом в ядрах клеток лимфоцитов с помощью *in situ* гибридизации показало различия в их местоположении (Dietzel *et al.*, 1998). Вариабильность позиций некоторых локусов была обнаружена в S-фазе ядер живых клеток (Zink *et al.*, 1988). Вариабильность позиций гомологичных и негомологичных хромосом отмечена как в эллипсоидных ядрах клеток фибробластов, так и в сферических ядрах клеток лимфоцитов (Cremer *et al.*, 2001). Показано также, что перенос небольшого локуса от одной хромосомы на другую не изменяет их позиций в ядре (Croft *et al.*, 1999; Mahy *et al.*, 2002).

С помощью флюоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) и конфокального микроскопа изучено также пространственное расположение хромосом у 7 видов высших приматов: *Pan troglodytes*, *Gorilla gorilla*, *Pongo pygmaeus*, *Hylobates lor*, *Saguinus vedipus*, *Callithrix jacehus* и *Saimiri sciurens* (Tanabe *et al.*, 2002). В результате проведенных исследований установлено, что у этих видов приматов хромосомы, гомологичные 19-й хромосоме человека, расположены в центре ядра, а гомологичные хромосоме 18 – на периферии.

Исследования пространственного расположения хромосом у *Gallus gallus domesticus* ($2n = 78$) с помощью флюоресцентной гибридизации (FISH) показали, что у данного вида птиц

макро- и микрохромосомы в пространстве ядра разобщены, как и у человека (Haberthmann *et al.*, 2001). В кариотипе этого вида присутствуют 8 пар макрохромосом, 30 пар микрохромосом и две половые хромосомы Z и W. В результате проведенных исследований установлено, что в ядрах клеток фибробластов и нейронов микрохромосомы расположены в центре ядра, а макрохромосомы – на периферии. Радиальное расположение макро- и микрохромосом обнаружено и в метафазах митоза. В период репликации расположение микро- и макрохромосом у птиц было подобно наблюдаемому у человека: ранореплицирующиеся хромосомы расположены в центре ядра, а позднореплицирующиеся – на периферии. Микрохромосомы птиц составляют 23 % генома и содержат около 50 % генов. Предполагают, что птицы и млекопитающие дивергировали от общего предка 300–350 млн лет назад (Foster, Bridger, 2005).

Анализ сегрегации меченых хроматид в ряде клеточных делений у *Hydra*, вида, принадлежащего к самым ранним ветвям эволюции, отделившимся от млекопитающих около 600 млн лет назад, показал наличие у этого вида высокоупорядоченной пространственной организации хроматина в клеточном ядре (Alexandrova *et al.*, 2003). Ранореплицирующиеся локусы хромосом локализованы у *Hydra* в центре ядра, а позднореплицирующиеся – вблизи периферии.

Заключение

Анализ результатов исследования пространственного расположения хромосом в клеточном ядре эукариот показал наличие различий по архитектонике ядра между видами как растений, так и животных. Исследованные в настоящее время виды растений по локализации хромосом в интерфазном ядре характеризуются двумя разными типами (Tanaka, 1981a, b; Щапова, Кравцова, 1990); установлена определенная зависимость между пространственной организацией хромосом в интерфазном ядре, их размерами и уровнем пloidности. На примере видов пшеницы, ржи, пшенично-ржаных гибридов и замещенных линий показано, что родственные по происхождению виды имеют одинаковую архитектонику ядра (Щапова, Кравцова, 1990).

У изученных видов животных по локализации центромер в пространстве ядра также выявлены различия. Архитектоника ядра *D. melanogaster* и разных видов *Anopheles*, кариотипы которых содержат малое число хромосом, имеет рабльский тип центромерно-теломерной ориентации их относительно полюсов ядра. У плацентарных млекопитающих и птиц, кариотипы которых содержат большое число макро- и микрохромосом, хромосомы, различающиеся по размерам, в пространстве ядра разобщены (Cremer *et al.*, 1988; Zink *et al.*, 1988; Habermann *et al.*, 2001). Макрохромосомы у этих видов располагаются по периферии ядра, а микрохромосомы – в центре. Установлено также, что теломеры крупных хромосом занимают более периферическое положение в интерфазном ядре, чем теломеры хромосом меньшего размера (Sun *et al.*, 2000). Центромеры хромосом у этих видов рассредоточены по ядру.

Среди плацентарных видов млекопитающих, дивергировавших от общего предка 30 млн лет назад (Tanabe *et al.*, 2002), обнаружены сходство их архитектур и определенная зависимость между структурой кариотипа и пространственной локализацией хромосом в ядре. Плацентарные млекопитающие и птицы, дивергировавшие от общего предка 300–350 млн лет назад, но имеющие сходные кариотипы, также характеризуются одинаковой пространственной организацией ядра (Habermann *et al.*, 2001).

Исследования интерфазных ядер у *D. melanogaster* и малохромосомных видов растений показали, что основной единицей пространственной организации хромосом в интерфазном ядре является гаплоидный геном с упорядоченным последовательным расположением негомологичных хромосом набора (Wagenaar, 1969; Ashley, Wagenaar, 1972; Чубыкин, 2001а, б). Характер последовательного упорядоченного расположения хромосом гаплоидных геномов с числом хромосом, равным 7 и более, остается пока не выясненным. В интерфазных ядрах разных клеток у изученных видов млекопитающих и человека наблюдается вариабильность позиций гомологичных и негомологичных хромосом.

Исследования, проведенные у видов насекомых, показали, что в их интерфазных ядрах все хромосомы ассоциируют с ядерной мембраной

не только центромерами и теломерами, но и многими другими участками хромосом, а также и межхромосомными связями (Груздев, Кикнадзе, 1970; Куличков, Жимулев, 1976; Стегний, 1993). У изученных видов растений все хромосомы набора располагаются в интерфазном ядре по периферии, ассоциируя с ядерной мембраной центромерами и теломерами, возможно, и многими другими участками хромосом. Исследования структуры интерфазных ядер у человека показали, что с ядерной мембраной в основном ассоциируют макрохромосомы и *gene-roof* микрохромосомы, содержащие значительное количество повторяющихся последовательностей ДНК (Cremer *et al.*, 2003). А хромосомы *gene-rich* и микрохромосомы ориентированы к центру ядра. Таким образом, обнаружена связь архитектуры ядра не только с размерами хромосом, но и со структурой индивидуальных хромосом.

Анализ пространственного расположения хромосом в клеточном ядре у разных видов растений и животных показал наличие определенной зависимости между размерами хромосом и локализацией их центромер в пространстве ядра. Результаты этих исследований указывают на то, что эволюция структуры хромосом и упорядоченного пространственного расположения их в клеточном ядре являются взаимозависимыми процессами. Наиболее консервативным из этих двух важнейших процессов в эволюции ядра является его архитектура. Результаты проведенных исследований указывают также на то, что регуляция пространственной организации ядра заключается в поддержании не только упорядоченного расположения хромосом, но и определенного уровня их разобщенности.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН «Интеграционные проекты» № 129.

Литература

- Беннетт М.Д. Нуклеотическая основа пространственной упорядоченности хромосом эукариот и ее значение для эволюции генома и фенотипической изменчивости. М.: Мир, 1986. С. 234–256.
- ГлушакOVA Т.И. Развитие представлений об индивидуальности хромосом. М.: Наука, 1983. 120 с.
- Груздев А.Д., Кикнадзе И.И. О связи политенных

- хромосом с мембраной ядра // Цитология. 1970. Т. 12. С. 919–921.
- Кожевников Б.Ф. Экспериментальный анализ неслучайного расположения негомологичных хромосом // Докл. АН СССР. 1939. Т. 25. С. 155–160.
- Куличков В.А., Жимулев И.Ф. Анализ пространственной организации геномов *Drosophila melanogaster* на основе данных по эктопической конъюгации политенных хромосом // Генетика. 1976. Т. 12. № 5. С. 81–89.
- Левитский Г.А., Сизова М.А., Поддубная-Арнольди В.А. Сравнительная морфология хромосом пшеницы // Докл. АН СССР. 1939. Т. 25. С. 144–147.
- Стегний В.Н. Архитектоника генома, системные мутации и эволюция. Новосибирск: Изд-во Новосибир. ун-та, 1993. 110 с.
- Чубыкин В.Л. Пространственная организация генома дрозофилы. II. Взаимное расположение негомологичных хромосом в клетках яичников самок с aberrантными генотипами // Цитология. 1988. Т. 30. С. 875–881.
- Чубыкин В.Л. Генетический контроль формирования и реорганизации хромоцентра у дрозофилы // Генетика. 2001а. Т. 37. С. 1068–1074.
- Чубыкин В.Л. Роль хромоцентра в неслучайном расположении негомологичных хромосом в мейозе самок *Drosophila melanogaster* // Генетика. 2001б. Т. 37. С. 277–285.
- Чубыкин В.Л., Омельячук Л.В. Взаимное расположение негомологичных хромосом по данным межхромосомных обменов у дрозофилы // Генетика. 1989. Т. 25. С. 292–300.
- Щапова А.И. Кариотипы пшеницы // Цитогенетика пшеницы и ее гибридов. М.: Наука, 1971а. С. 30–56.
- Щапова А.И. О структуре кариотипа и порядке расположения хромосом в интерфазном ядре // Цитология. 1971б. Т. 13. С. 1157–1164.
- Щапова А.И., Баутина Т.А. Ориентация и пространственное расположение центромер двух видов чины // Изв. СО АН СССР. Сер. биол. наук. 1975. Вып. 3. С. 84–89.
- Щапова А.И., Кравцова Л.А. Цитогенетика пшенично-ржаных гибридов. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1990. 164 с.
- Alexandrova O., Solovei I., Cremer T., David C. Replication labeling patterns and chromosome territories typical of mammalian nuclei are conserved in the early metazoan *Hydra* // Chromosoma. 2003. V. 112. P. 190–200.
- Ashley T. Specific end-to-end attachment of chromosomes in *Ornithogalum virens* // J. Cell Sci. 1979. V. 38. P. 357–367.
- Ashley T., Wagenaar E.B. End-to-end attachment of haploid chromosomes of *Ornithogalum virens* // Canad. J. Genet. Cytol. 1972. V. 14. P. 716–717.
- Boyle S., Gilchrist S., Bridger J.M. *et al.* The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cell // Hum. Mol. Genet. 2001. V. 10. P. 211–219.
- Cremer T., Lichter P., Ward D.C., Manuelidis L. Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cell by *in situ* hybridization using chromosome-specific library probes // Hum. Genet. 1988. V. 80. P. 235–246.
- Cremer M.J., von Hase J., Volm T. *et al.* Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells // Chromosome Res. 2001. V. 9. P. 541–567.
- Cremer M., Kupper K., Wagler B. *et al.* Inheritance of gene density-related higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei // J. Cell Biol. 2003. V. 162. P. 809–820.
- Croft J.A., Bridger J.M., Boyle S. *et al.* Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus // J. Cell Biol. 1999. V. 145. P. 1119–1131.
- Dietzel S., Jauch A., Kienle D. *et al.* Separate and variably shaped chromosome arm domains are disclosed by chromosome arm painting in human cell nuclei // Chromosome Res. 1998. V. 6. P. 25–33.
- Finch R.A., Smith J.B., Bennett M.D. Hordeum and Secale mitotic genomes lie apart in a hybrid // J. Cell Sci. 1981. V. 52. P. 391–403.
- Foster H.A., Bridger J.M. The genome and the nucleus: a marriage made by evolution. Genome organization and nuclear architecture // Chromosoma. 2005. V. 114. P. 212–229.
- Fransz P., de Jong J.H., Lysak M. *et al.* Interphase chromosomes in Arabidopsis are organized as well defined chromocenters from which euchromatin loops emanate // PNAS. 2002. V. 99. P. 14584–14589.
- Habermann F.A., Cremer M., Walter J. *et al.* Arrangements of macro- and microchromosomes in chicken cell // Chromosome Res. 2001. V. 9. P. 569–584.
- Hoppe J., Zeller F.J. Assoziation doppel di-telozentrischer Chromosomen in der metaphase I der meiose von *Secale cereale* L. // Z. Pflanzenzuchtg. 1982. Bd. 89. S. 307–311.
- Maestra B., de Jong J.H., Shepherd K., Naranjo T. Chromosome arrangement and behaviour of two rye homologous telosomes at the onset of meiosis in disomic wheat 5RL addition lines with and without the *Ph1* locus // Chromosome Res. 2002. V. 10. P. 655–667.
- Mahy N.L., Perry P.E., Bickmore W.A. Gene density and transcription influence the localization of chromatin outside of chromosome territories detectable by FISH // J. Cell Biol. 2002. V. 159. P. 753–763.
- Martinez-Perez E., Shaw P., Aragon-Alcaide L., Moore G. Chromosomes form into seven groups

- in hexaploid and tetraploid wheat as a prelude of meiosis // *Plant. J.* 2003. V. 36. P. 21–29.
- Mikhailova E., Naranjo T., Shepherd K. *et al.* The effect of the wheat *Ph1* locus on chromatin organization and meiotic chromosome pairing analysed by genome painting // *Chromosoma*. 1998. V. 107. P. 339–350.
- Rens W., O'Brien P.C.M., Graves J.A.M., Ferguson-Smith M.A. Localization of chromosome regions in potoroo nuclei (*Potorous tridactylus* Marsupialia: Potoroinae) // *Chromosoma*. 2003. V. 112. P. 66–76.
- Schneider R., Grosschedl R. Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression // *Genes Dev.* 2007. V. 21. P. 3027–3049.
- Sun H.B., Shen J., Hikota H. Size-dependent positioning of human chromosomes in interphase nuclei // *Biophys. J.* 2000. V. 79. P. 184–190.
- Tanabe H., Muller S., Neusser M. *et al.* Evolutionary conservation of chromosome territory arrangements in cell nuclei from higher primates // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. P. 4424–4429.
- Tanaka N. Studies of chromosome arrangement in some higher plants. 1. Interphase chromosomes in three Liliaceous plants // *Cytologia*. 1981a. V. 46. P. 343–357.
- Tanaka N. Studies on chromosome arrangement in some higher plants. 2. The determining factor of the distribution of centromeric regions in the nucleus // *Cytologia*. 1981b. V. 46. P. 531–544.
- Yacobi Y.Z., Levanony H., Feldman M. Association of telocentric bivalents representing the two different arms of one chromosome in rye // *Canad. J. Genet. Cytol.* 1983. V. 25. P. 675–677.
- Yacobi Y.Z., Mello-Sampayo T., Feldman M. Genetic induction of bivalent interlocking in common wheat // *Chromosoma*. 1982. V. 87. P. 167–175.
- Wagenaar E.B. End-to-end chromosome attachment in mitotic interphase and their possible significance to mitotic chromosome pairing // *Chromosoma*. 1969. V. 26. P. 410–426.
- Zink D., Cremer T., Saffrich R. *et al.* Structure and dynamics of human interphase chromosome territories *in vivo* // *Hum. Genet.* 1988. V. 102. P. 241–251.

FEATURES OF SPATIAL ARRANGEMENT OF CHROMOSOMES IN EUKARYOTIC NUCLEI OF VARIOUS PLANT AND ANIMAL SPECIES

A.I. Shchapova

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

Summary

The reported results confirm the presence of ordered spatial arrangement of chromosomes in eukaryotic interphase nuclei. This arrangement varies from species to species. Cells of plants and animals differ in the location of chromosome centromeres in the nucleus. Two arrangement types were found. In type I, centromeres of all chromosomes are located on one pole of the nucleus. In type II, chromosome centromeres are scattered over the nucleus. The location of centromeres in the interphase nucleus correlates with chromosome sizes. It was also found that related species had similar types of chromosome arrangement in the nuclei. The results indicate that evolutionary transformations of chromosome structure and of chromosome arrangement in the nucleus are interdependent processes. Nuclear architecture is the most conservative. It is suggested that the regulation of chromosome arrangement in the nucleus supports not only their spatial order but also their separateness.

Key words: cell nucleus architecture, chromosome set, karyotype, plant and animal species.

ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ ЦЕНТРОМЕРНЫХ РАЙОНОВ ПОЛИТЕННЫХ ХРОСОМ ХИРОНОМИД (DIPTERA, CHIRONOMIDAE)

В.В. Голыгина^{1,2}, И.И. Кикнадзе¹, А.Д. Брошков^{1,2}, Т.В. Карамышева¹, Н.Б. Рубцов¹

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

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Для изучения молекулярной организации и закономерностей дивергенции последовательностей ДНК в центромерных районах хирономид было создано четыре ДНК-библиотеки центромерного района хромосомы III (EF) 3 видов-близнецов группы *plumosus*: *C. entis*, *C. muratensis* и *C. agilis2*, относящихся к цитоккомплексу *thummi*, с комбинацией хромосомных плеч АВ CD EF G. Кроме того, получено 6 ДНК-библиотек из С-положительных дисков политенных хромосом вида *C. dorsalis*, являющегося представителем цитоккомплекса *pseudothummi* (комбинация плеч АЕ, CD, BF, G). Проведено сравнение локализации полученных ДНК-проб на хромосомы шести видов группы *plumosus*: *C. agilis*, *C. agilis2*, *C. borokensis*, *C. entis*, *C. muratensis*, *C. plumosus*. Показано, что у большинства изученных видов группы *C. plumosus* все центромерные диски хромосом кариотипа имеют сходный состав, однако у двух видов, *C. entis* и *C. muratensis*, выявлены различия в составе ДНК метацентрических и телоцентрической хромосом. Кроме центромерных районов также обнаружена слабая гибридизация ДНК-пробы с отдельными дисками политенных хромосом. FISH ДНК-проб из центромерного района хромосомы II (CD) и четырех С-положительных дисков хромосом I (AE) и III (BF) *C. dorsalis* с политенными хромосомами показала, что у данного вида на хромосомах I (AE) и III (BF) все четыре крупных С-положительных диска содержат последовательности, гомологичные центромерной ДНК из хромосомы II (CD). Кроме гибридизации в центромерных районах выявлено большое число мест локализации ДНК-пробы в хромосомных плечах. Сравнение полученных результатов с данными по строению центромерных районов другого представителя хирономид, *Prosilocerus akamusi* (Ortocladiina), позволяет заключить, что разные виды из сем. Chironomidae значительно отличаются по молекулярной организации центромерной ДНК.

Ключевые слова: центромера, центромерная ДНК, *Chironomus*, политенные хромосомы, FISH, эволюция, дивергенция.

Введение

Центромеры являются одним из важнейших компонентов генома, играя ключевую роль в процессе расхождения хромосом. Хотя в настоящее время благодаря проведенному секвенированию последовательностей из центромерных районов хромосом нескольких видов животных и растений стали понятны общие принципы организации центромерных районов, детальное строение центромер остается недостаточно изученным. Еще меньше известно о путях дивергенции центромерной

ДНК в ходе эволюции. В то же время сейчас уже совершенно очевидно, что центромерные районы являются одним из самых вариабельных и быстро эволюционирующих компонентов генома, поскольку наблюдаются различия в строении центромерной ДНК не только у разных, в том числе близкородственных, видов, но даже в разных хромосомах одного вида.

Хирономиды представляют собой уникальный объект для изучения закономерностей эволюции центромерной ДНК. В политенных хромосомах хирономид отсутствует недорепликация центромерного гетерохроматина, как

это происходит, например, у дрозофил, поэтому имеется возможность изучать локализацию отдельных центромерных последовательностей с высоким уровнем разрешения и выделять центромерные районы с помощью таких методов, как микродиссекция. Важно, что в этом семействе имеется много групп видов-близнецов, кариотипы которых различаются в основном по размеру центромерного гетерохроматина, а также есть виды, у которых наблюдаются значительные внутри- и межпопуляционные вариации по размеру центромерного гетерохроматина. Многие виды хирономид обладают огромными ареалами, что позволяет изучать закономерности дивергенции генома в популяциях с различной степенью географической изоляции даже на отдельных континентах. Кроме того, значительную роль в эволюции кариотипов видов рода *Chironomus* сыграли реципрокные транслокации целых хромосомных плеч, т. е. хромосомные перестройки, непосредственно затрагивающие центромерные районы и меняющие комбинации групп сцепления генов.

Однако к настоящему времени имеются лишь отдельные данные о строении центромерной ДНК у хирономид (Schmidt *et al.*, 1980; Schmidt, Keyl, 1981; Schmidt, 1984; Hankeln *et al.*, 1989; 1994; Rovira *et al.*, 1993; He *et al.*, 1998; Lopez, Edstrom, 1998; Rosen *et al.*, 2002; Сиирин и др., 2003; Golygina *et al.*, 2008). У нескольких видов из рода *Chironomus* (подсемейство Chironominae) были выделены и отсекарованы мономеры tandemных повторов, характерных для центромерных районов этих видов, изучены их локализация и распространенность у близкородственных видов (Schmidt *et al.*, 1980; Schmidt, Keyl, 1981; Schmidt, 1984; Rovira *et al.*, 1993; Hankeln *et al.*, 1994; He *et al.*, 1998).

Исследования видов-близнецов группы *plumosus* (Hankeln *et al.*, 1994; Сиирин и др., 2003), в которой имеется несколько пар видов, отличающихся в основном по массе центромерного гетерохроматина, показали, что в этой группе увеличение размера центромерного диска происходит в основном за счет амплификации одного типа tandemных повторов – Sau-ДНК, причем этот повтор обнаруживался в центромерных районах всех хромосом кариотипа. Однако данный повтор был выявлен только у 6 из 9 исследованных видов, т. е. у части видов

группы *C. plumosus* произошли значительные изменения в составе повторов центромерной ДНК. Также остается неизвестной степень дивергенции Sau-ДНК у тех видов, у которых она присутствует.

Вместе с тем, мы показали, что в роде *Propillocerus* (подсемейство Orthoclaadiina) состав ДНК центромерных районов различается не только у близких видов, но и в разных хромосомах одного вида (Golygina *et al.*, 2008).

Таким образом, хотя имеются отдельные сведения о структуре центромерной ДНК у хирономид, практически ничего не известно ни о закономерностях ее дивергенции в ходе видообразования, ни о детальном составе ДНК центромерных районов. В настоящей работе мы представляем первые результаты начатого нами исследования закономерностей дивергенции центромерной ДНК в роде *Chironomus* на примере видов из двух наиболее крупных цитоконкомплексов, *thummi* и *pseudothummi*, отличающихся реципрокными транслокациями хромосомных плеч.

Материалы и методы

В работе использованы личинки 4-го личиночного возраста 7 видов рода *Chironomus*, собранные в палеарктических природных популяциях: *C. borokensis* (Россия, Новосибирская область, пруд в р-не г. Бердска; Кемеровская область, пруд на р. Новоказанка), *C. agilis* (Россия, Новосибирская область, пруд на р. Тарсьма), *C. sp. prope agilis* (*C. agilis*2) (Казахстан, оз. Тундык), *C. entis* (Россия, водоем в Новосибирской области), *C. muratensis* (Россия, Новосибирская область, пруд на р. Сокур), *C. plumosus* (Россия, Новосибирская область), *C. dorsalis* (Россия, г. Новосибирск, окрестности новосибирского Академгородка). У *C. entis* была изучена также неарктическая популяция (США, Миннесота, оз. Кабетогамма).

Личинок фиксировали по стандартной методике (Кикнадзе и др., 1991) в смеси 96°-го этилового спирта и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3 : 1. Давленные препараты политенных хромосом слюнных желез для кариологического анализа готовили по стандартной ацет-орсеиновой методике (Keyl H.G., Keyl I., 1959; Кикнадзе и др., 1991). Давленные

препараты политенных хромосом для проведения микродиссекции и флюоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) готовили по методике, описанной в работе Сиирин и соавт. (2003).

Получение микродиссекционных библиотек и приготовление ДНК-проб. Микродиссекцию выбранных для исследования районов и создание ДНК-проб проводили так же, как описано в работе Сиирин и соавт. (2003).

На первом этапе работы была проведена микродиссекция центромерных дисков у трех видов рода *Chironomus* из цитокомплекса thummi (комбинация плеч АВ CD EF G) и одного вида из цитокомплекса pseudothummi (комбинация плеч АЕ CD BF G). С помощью проведенного на выделенном материале DOP-ПЦР получены 4 ДНК-библиотеки из центромерного района хромосомы III (EF) для 3 видов-близнецов группы *plumosus* (цитокомплекс thummi): по одной для *C. agilis2* и *C. muratensis* и 2 для *C. entis* (из неарктической и палеарктической популяций); 6 микродиссекционных ДНК-библиотек для вида *C. dorsalis* (цитокомплекс pseudothummi): 2 из центромерного района хромосомы II (CD) и по одной из 4 С-положительных дисков хромосом I (AE) и III (BF) (рис. 1, табл. 1). Также была использована полученная ранее ДНК-библиотека из центромерного района хромосомы III (EF) вида *C. borokensis*, входящего в группу *plumosus* (Сиирин и др., 2003).

Для получения ДНК-проб использовали модифицированные нуклеотиды биотин-11-dUTP или дигоксигенин-11-dUTP.

Флюоресцентная *in situ* гибридизация (FISH). Флюоресцентная *in situ* гибридизация проводилась согласно стандартному протоколу, описанному в работе М.Т. Сиирин и соавт. (2003). Визуализация ДНК-проб, модифицированных биотином и дигоксигенином, проводилась с помощью антител, меченных флюорохромами AlexaFluor488 и Cy3 соответственно. Хромосомы были окрашены красителем DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид). Анализ препаратов проводили на эпифлюоресцентном микроскопе Axioskop 2 plus (Карл Цейс, Германия), оснащенном CCD камерой, набором фильтров CHROMA и пакетом программ для обработки изображений ISIS4 (MetaSystems-Group, Inc., USA).

Результаты и обсуждение

Локализация ДНК-проб из центромерного района хромосомы III у видов группы *C. plumosus*. Гибридизация всех пяти ДНК-проб была проведена как на хромосомы видов, из которых были получены ДНК-пробы (гомологичная гибридизация), так и на хромосомы других видов группы, изучаемых в данной работе (гетерологичная гибридизация): *C. agilis*, *C. agilis2*, *C. borokensis*, *C. entis* (из палеарктических и неарктических популяций), *C. muratensis* и *C. plumosus*.

Гомологичная гибридизация ДНК-проб. У вида *C. borokensis* при гибридизации ДНК-пробы sbcen (табл. 1) яркий сигнал наблюдался в центромерных районах всех четырех хромосом кариотипа. Очень слабая гибридизация также наблюдалась в нескольких дисках на разных хромосомах (рис. 2, а).

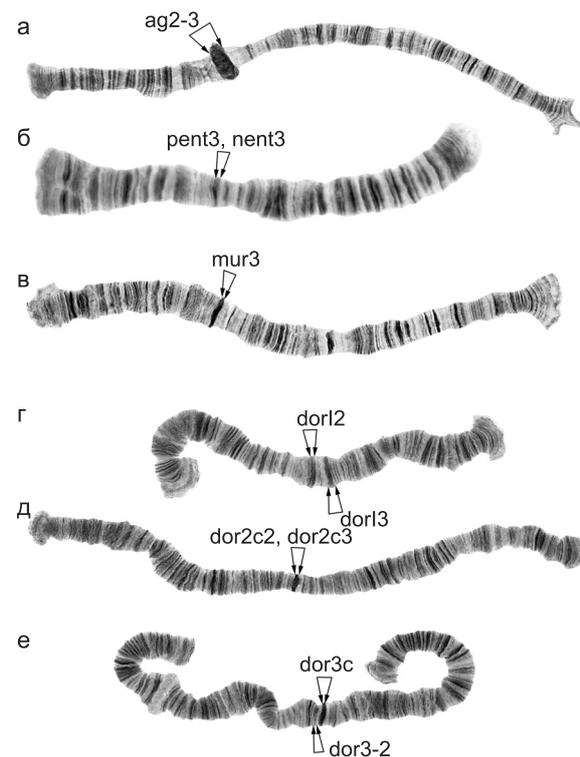


Рис. 1. Районы микродиссекции.

а – хромосома III (EF) вида *C. agilis2*; б – хромосома III (EF) вида *C. entis*; в – хромосома III (EF) вида *C. muratensis*; г – хромосома I (AE) вида *C. dorsalis*; д – хромосома II (CD) вида *C. dorsalis*; е – хромосома III (BF) вида *C. dorsalis*. Скобками указаны границы диссектированных районов.

Таблица 1

Список использованных в исследовании микродиссекционных ДНК-библиотек

Обозначение библиотеки	Вид	Хромосома	Сайт микродиссекции	Получена
cbcen	<i>C. borokensis</i>	III (EF)	центромера	Сиирин и соавторы, 2003
ag2-3	<i>C. sp. prope agilis</i> (<i>C. agilis2</i>)	III (EF)	центромера	наст. работа
pent3	<i>C. entis</i> (Палеарктика)	III (EF)	центромера	наст. работа
nent3	<i>C. entis</i> (Неарктика)	III (EF)	центромера	наст. работа
mur3	<i>C. muratensis</i>	III (EF)	центромера	наст. работа
dor12	<i>C. dorsalis</i>	I (AE)	крупный С-положительный диск 19ef, прилегающий к плечу А	наст. работа
dor13	<i>C. dorsalis</i>	I (AE)	крупный С-положительный диск, предположительно центромерный, прилегающий к плечу Е	наст. работа
dor2c2	<i>C. dorsalis</i>	II (CD)	центромера	наст. работа
dor2c3	<i>C. dorsalis</i>	II (CD)	центромера	наст. работа
dor3c	<i>C. dorsalis</i>	III (BF)	крупный С-положительный диск, прилегающий к плечу F	наст. работа
dor3-2	<i>C. dorsalis</i>	III (BF)	тонкий С-положительный диск, находящийся между крупными С-положительными дисками	наст. работа

У вида *C. agilis2* ДНК-проба ag2-3 (табл. 1) также гибридизовалась преимущественно в центромерных районах всех четырех хромосом.

Картина гибридизации зонда mur3 (табл. 1) на хромосомы *C. muratensis* оказалась иной: четкий сигнал обнаружен только в центромерных районах трех больших хромосом кариотипа, тогда как центромерный район хромосомы IV (G) практически не метился.

У *C. entis* характер гибридизации ДНК-проб, полученных из палеарктических и неарктических популяций, оказался различен. ДНК-проба pent3 (табл. 1), полученная из неарктической популяции *C. entis*, при гибридизации на хромосомы *C. entis* из неарктической популяции давала яркий сигнал на всех центромерных районах хромосом кариотипа. В то же время ДНК-проба pent3, полученная из палеарктической популяции *C. entis*, при гибридизации на хромосомы *C. entis* из палеарктической популяции давала четкий сигнал только в центромерных районах трех больших хромосом, в то время как в цен-

тромерном районе короткой хромосомы IV (G) гибридизация была очень слабой или отсутствовала вовсе (рис. 2, б).

Таким образом, по характеру гибридизации ДНК-проб на кариотипы исходных видов их можно разбить на 2 группы: в первую попадают *C. borokensis*, *C. agilis2* и неарктический *C. entis*, у которых центромерные районы всех хромосом метятся одинаково ярко ДНК-пробой из хромосомы III (EF), что свидетельствует о высокой гомологии последовательностей во всех центромерных районах у каждого из этих видов; во 2-й группе оказываются палеарктический *C. entis* и *C. muratensis*, у которых гомологичные последовательности обнаруживаются только в центромерных районах трех больших хромосом, а центромерный район хромосомы IV, по-видимому, содержит преимущественно другие последовательности ДНК. Следует также особо отметить тот факт, что в палеарктических и неарктических популяциях *C. entis* обнаружены разные типы гибридизации,

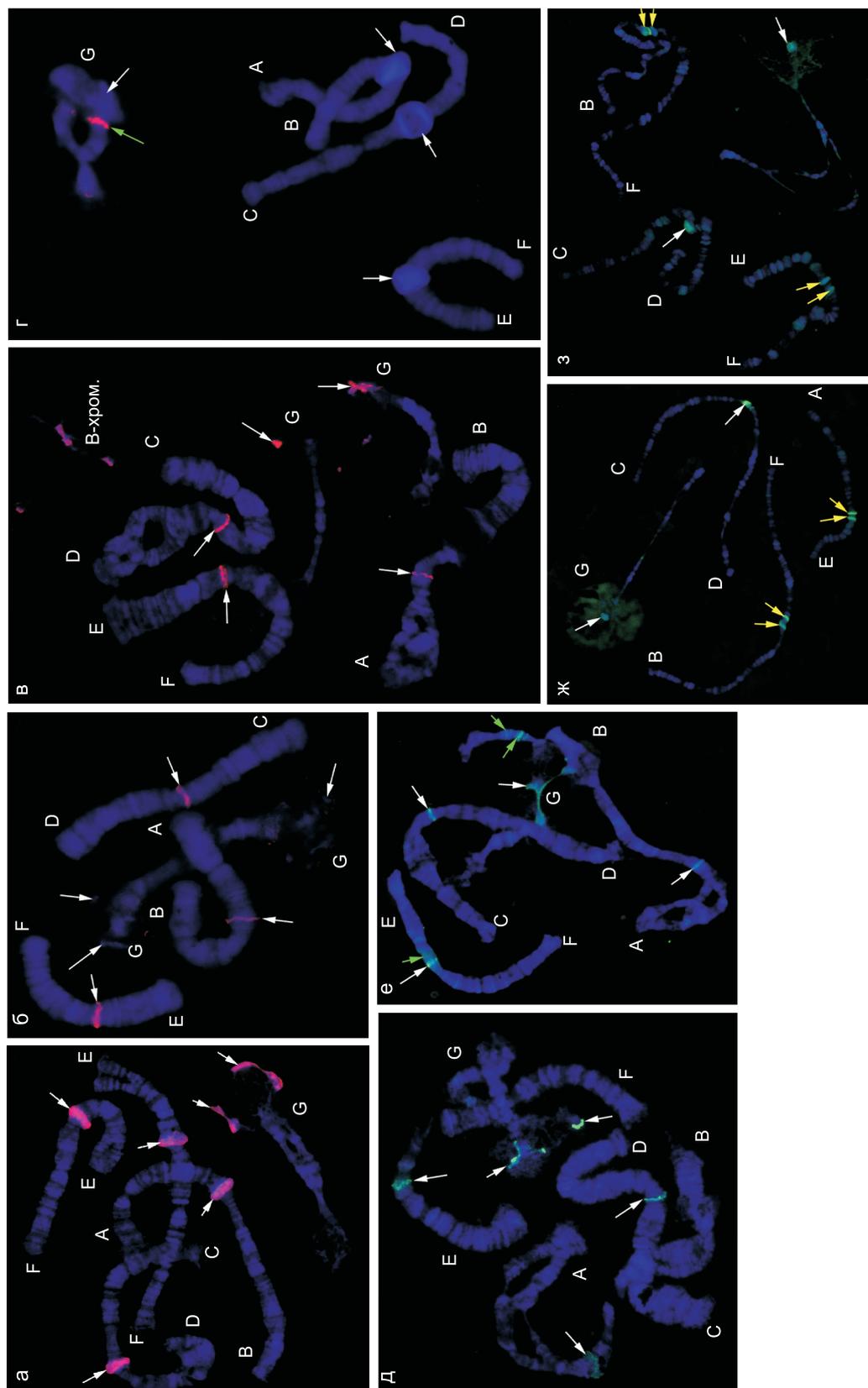


Рис. 2. FISH ДНК-проб на политенные хромосомы изучаемых видов.

а – ДНК-проба sbsep, кариотип *C. borokensis*; б – ДНК-проба pent3, кариотип *C. entis* из палеарктической популяции; в – ДНК-проба sbsep, кариотип *C. plimosis*; г – ДНК-проба pent3, кариотип *C. agilis* 2; д – ДНК-проба pent3, кариотип *C. entis* из палеарктической популяции; е – ДНК-проба ag2-3, кариотип *C. plimosis*; ж – ДНК-проба dot2с2, кариотип *C. dorsalis*; з – ДНК-проба dot3-2, кариотип *C. dorsalis*. Белыми стрелками обозначены центромерные районы, желтыми стрелками обозначены С-положительные диски в хромосомах I (AE) и III (CD) *C. dorsalis*; зелеными стрелками обозначены места локализации проб в дисках на хромосомных плечах. Буквами обозначены плечи хромосом.

поскольку это свидетельствует о значительном уровне дивергенции популяций этого вида с разных континентов, что хорошо согласуется с полученными ранее цитогенетическими данными (Kiknadze *et al.*, 2000).

Гетерологичная гибридизация ДНК-проб (на хромосомы близкородственных видов). ДНК-проба *cbsep* гибридизовалась со всеми центромерными районами хромосом *C. plumosus* с примерно одинаковой интенсивностью, кроме того, на препарате с В-хромосомами сигнал также был обнаружен в более плотных районах В-хромосом (рис. 2, в). При гибридизации с хромосомами *C. entis* из палеарктических популяций яркий сигнал наблюдался только в центромерном районе хромосомы IV (G), а в центромерных районах трех больших хромосом интенсивность гибридизации была слабой. В то же время в неарктической популяции *C. entis* сигнал практически отсутствовал во всех хромосомах. У *C. muratensis* ДНК-проба *cbsep* гибридизовалась только с центромерным районом хромосомы IV (G). Также слабый сигнал наблюдался в центромерном и прилегающих к нему дисках хромосомы III (EF). У видов *C. agilis* и *C. agilis2* сигналов выявлено не было.

ДНК-проба *ag2-3* давала яркий сигнал в центромерных районах всех четырех хромосом *C. agilis* и очень слабый сигнал в центромерных районах *C. borokensis* и *C. plumosus*, причем у последнего гибридизация в хромосоме IV (G) была несколько ярче, чем в остальных хромосомах. Гибридизации с хромосомами видов *C. entis* и *C. muratensis* выявлено не было.

При гибридизации ДНК-пробы *pent3* с хромосомами изученных видов относительно яркий сигнал наблюдался только в центромерных районах больших хромосом *C. entis* из неарктических популяций. Кроме того, очень яркий сигнал был обнаружен в одном из дисков хромосомы IV (G) *C. agilis2*, в то время как в центромерных районах этого вида гибридизация практически отсутствовала (рис. 2, г).

ДНК-проба *pent3* гибридизовалась с центромерными районами всех четырех хромосом *C. entis* из палеарктической популяции, однако интенсивность гибридизации в хромосоме IV была значительно выше (рис. 2, д). Слабая гибридизация в центромерном и прилегающем к нему дисках обнаружена в хромосоме III (EF)

у видов *C. borokensis*, *C. agilis*, *C. muratensis*, *C. plumosus*. Кроме того, у *C. plumosus* относительно яркий сигнал также наблюдался в центромерном районе хромосомы IV (G).

При гибридизации ДНК-пробы *mur3* относительно интенсивная гибридизация была обнаружена только в центромерных районах трех больших хромосом *C. entis* из палеарктических популяций. Кроме того, слабая гибридизация наблюдалась с центромерными районами всех хромосом *C. plumosus* и *C. entis* из неарктической популяции. На хромосомах *C. agilis*, *C. agilis2* и *C. borokensis* сигналов обнаружено не было.

Таким образом, из полученных данных можно заключить, что среди изученных видов-близнецов группы *C. plumosus* наибольшая степень гомологии между последовательностями ДНК центромерных районов наблюдается в парах видов *C. borokensis*–*C. plumosus* и *C. agilis*–*C. agilis2*, у которых результаты гибридизации ДНК-проб *cbsep* и *ag2-3* соответственно совпадают при гомо- и гетерологичной гибридизации. У этих четырех видов также наблюдается наибольшее сходство между центромерными районами всех хромосом кариотипа. Все это хорошо согласуется с полученными ранее данными (Hankeln *et al.*, 1994).

Большая степень дивергенции центромерных районов наблюдается между палеарктическими и неарктическими популяциями вида *C. entis*, а также между *C. entis* и *C. muratensis*, поскольку интенсивность сигналов при гетерологичной гибридизации была значительно ниже, чем в экспериментах с гомологичной гибридизацией ДНК-проб, причем не все центромерные районы метились с одинаковой интенсивностью. Более значительные различия в составе ДНК центромерных районов обнаружены между *C. entis* и видами *C. plumosus* и *C. borokensis*, так как при гетерологичной гибридизации ДНК-проб заметный сигнал наблюдался, в основном, только в центромерных районах хромосомы IV (G). Еще более глубокая дивергенция в составе центромерной ДНК, по-видимому, произошла между видами *C. agilis* и *C. agilis2*, с одной стороны, и *C. plumosus* и *C. borokensis*, с другой, так как интенсивность гетерологичной гибридизации ДНК-проб у этих пар видов очень незначительна в центромерных районах всех

хромосом. Наконец, гомология между центромерными районами видов *C. agilis* и *C. agilis2*, с одной стороны, и *C. muratensis* и *C. entis* (как палеарктического, так и неарктического), с другой, по-видимому, практически отсутствует. Полученные данные хорошо согласуются с относительным положением изученных видов на филогенетическом дереве (Golygina *et al.*, 2007), где пары видов *C. borokensis*–*C. plumosus* и *C. agilis*–*C. agilis2* являются наиболее близкими, а *C. entis* и *C. muratensis* наиболее удалены от *C. agilis* и *C. agilis2*.

В то же время следует отметить, что Sau-ДНК, выделенная из генома *C. plumosus* (Hankeln *et al.*, 1994), интенсивно гибридизовалась не только с центромерными районами *C. plumosus* и *C. borokensis*, но также и с центромерными районами *C. entis*, *C. agilis* и *C. agilis2*, тогда как в наших экспериментах ДНК-пробы, полученные из ДНК-библиотек *C. agilis2*, *C. borokensis* и *C. entis*, показывают намного более низкую степень межвидовой гомологии. Поскольку Sau-ДНК представлена только одним тандемным повтором, в то время как микродиссекционные ДНК-библиотеки, как правило, содержат большое количество различных последовательностей ДНК, можно предположить, что хотя у видов *C. entis*, *C. agilis* и *C. agilis2* в центромерных районах присутствуют последовательности ДНК, гомологичные Sau-ДНК, в целом состав центромерной ДНК значительно отличается от такового у *C. plumosus* и *C. borokensis*.

Также нужно отметить, что в большинстве экспериментов по межвидовой гибридизации сигнал в хромосоме III (EF) наблюдался не только в самом центромерном районе, но также и в нескольких расположенных рядом дисках по обе стороны от центромерного (рис. 2, е), при этом в остальных хромосомах в прицентромерной области сигналов обнаружено не было. В экспериментах по гомологичной гибридизации ДНК-проб подобной особенности локализации зондов в хромосоме III также не обнаружено – гибридизация наблюдалась только в центромерном диске. В то же время практически во всех проведенных экспериментах наблюдалось лишь незначительное количество слабых сигналов в остальных районах хромосом, т. е. все полученные ДНК-библиотеки обладают высокой специфичностью к центромерным районам.

Локализация ДНК-проб из центромерного района хромосомы II (CD) и С-положительных дисков из хромосом I (AE) и III (BF) у вида *C. dorsalis*. Кариотип *C. dorsalis* характеризуется очень необычной для рода *Chironomus* морфологией хромосом: в хромосомах I (AE) и III (BF) в районах, где должны быть расположены центромеры, вместо одного С-положительного диска (центромерного), как у всех остальных исследованных видов рода, выявляется по 2 крупных С-положительных диска, между которыми расположены еще по 2–3 тонких С-положительных диска (Kiknadze *et al.*, 2008). Таким образом, ни цитологическое картирование, ни С-окрашивание не дают ответа на вопрос, какой из дисков является истинно центромерным. Этот вопрос тем более интересен, что эти две хромосомы отличаются в цитоккомплексах *thummi* и *pseudothummi* реципрокными транслокациями хромосомных плеч (AB и EF у видов цитоккомплекса *thummi*, AE и BF у видов цитоккомплекса *pseudothummi*), т. е. возможно, что в случае с *C. dorsalis* имеет место возникновение нецентромер.

Для изучения данного вопроса с помощью микродиссекции были вырезаны ДНК-библиотеки из центромерного района хромосомы II (CD), в которой локализация центромеры не вызывает сомнений (один С-положительный диск, порядок дисков в районе центромеры в точности совпадает с порядком дисков в этом районе у остальных видов рода), и С-положительные диски из хромосом I (AE) и III (BF): два больших диска из хромосомы I (диск, являющийся центромерным, согласно цитогенетическому картированию, и диск 19ef), один большой (прилегающий к плечу F диск, являющийся центромерным, согласно цитогенетическому картированию) и один тонкий С-положительный диск из хромосомы III (BF) (рис. 1, г–е, табл. 1).

Все полученные ДНК-пробы были гибридизованы на хромосомы *C. dorsalis*. Оказалось, что ДНК-пробы *dog2c2* и *dog2c3* из центромерного района хромосомы II (CD) наиболее интенсивно гибридизуются с центромерными районами хромосом II (CD) и VI (G), двумя крупными С-положительными дисками хромосом I (AE) и двумя крупными С-положительными дисками хромосомы III (BF). Кроме того, имеется много сайтов локализации данных проб в отдельных

дисках на хромосомных плечах, хотя интенсивность гибридизации в этих сайтах ниже, чем в центромерных и С-положительных дисках (рис. 2, ж).

ДНК-проба *dog13* из С-положительного диска хромосомы I – центромерного, согласно цитогенетическому картированию, – также давала похожую картину гибридизации. В то же время ДНК-проба *dog12* из второго крупного С-положительного диска хромосомы I (район 19ef) наиболее интенсивно гибридизовалась только на сайт, из которого была получена, а интенсивность гибридизации в остальных С-положительных и центромерных дисках была ниже и сравнима с уровнем гибридизации в других дисках в плечах хромосом. Сходная картина наблюдалась при гибридизации пробы *dog3c*.

Проба *dog3-2*, полученная из тонкого С-положительного диска хромосомы III, расположенного между двумя крупными С-положительными дисками, давала наиболее интенсивный сигнал в этом же диске; также довольно интенсивная гибридизация обнаружена в центромерных и крупных С-положительных дисках всех хромосом, но не в тонких С-положительных дисках хромосомы I (AE) (рис. 2, з). Кроме того, относительно слабые сигналы обнаружены во многих дисках на хромосомных плечах.

Также была проведена гибридизация ДНК-пробы *dog2c3* с хромосомами *C. riparius* (цитоккомплекс *thummi*) и *C. melanescens* (цитоккомплекс *pseudothummi*), однако на хромосомах этих видов сигналов не выявлено.

Таким образом, можно заключить, что в составе всех четырех крупных С-положительных дисков на хромосомах I (AE) и III (BF) *C. dorsalis* имеются последовательности, гомологичные тем, что присутствуют в центромерном диске хромосомы II (CD), т. е. помимо центромерных дисков последовательности ДНК, характерные для центромерного района хромосомы II (CD), присутствуют также в дисках 19ef плеча А и 28de плеча В. Следует также отметить тот факт, что все ДНК-пробы *C. dorsalis* имели много сайтов локализации вне центромерных или С-положительных районов, что, по-видимому, свидетельствует о наличии значительного числа повторов в геноме *C. dorsalis*, как это наблюдается, например, у *C. riparius*, у которого сайты локализации центромерного повтора *ClA*

обнаружены не только в центромерных дисках, но и во многих других дисках на хромосомных плечах (Schmidt, 1984).

Обобщая полученные результаты, можно отметить, что изученные нами виды из двух цитоккомплексов рода *Chironomus* имеют как общие, так и отличительные черты в характере гибридизации ДНК-проб из центромерных районов. Характерной особенностью всех изученных видов является то, что последовательности ДНК, представленные в центромерном районе одной хромосомы, также присутствуют в центромерных районах остальных хромосом, хотя степень их представленности в других хромосомах может быть различной. В то же время виды могут различаться по степени распространенности последовательности ДНК из центромерных районов в остальной части генома. Однако к настоящему времени изучено слишком мало видов, чтобы можно было оценить, имеются ли отличия по этому признаку между видами из разных цитоккомплексов.

Сравнение распределения последовательностей центромерной ДНК по хромосомам у видов рода *Chironomus*, принадлежащих к подроду *Chironomus*, в который входят все виды, изученные в данной работе, и видов подрода *Camptochironomus* из этого же рода, для которых имеются подобные сведения, показало, что строение центромерных районов у них сходно (Rovira *et al.*, 1993; Lopez, Edstrom, 1998). В то же время в роде *Prosilocerus*, который относится к подсемейству Orthoclaadiinae, степень дивергенции центромерных районов как между видами, так и между хромосомами одного вида значительно выше, поскольку у изученного вида *P. akamusi* ДНК-пробы из центромерного района одной хромосомы показывали лишь слабую гомологию с центромерными районами других хромосом, а гибридизация с хромосомами вида-близнеца, *P. jacuticus*, цитогенетическая дивергенция которого от *P. akamusi* не превышает ту, что наблюдается между видами группы *C. plumosus*, вовсе отсутствовала (Golygina *et al.*, 2007). Таким образом, можно заключить, что организация и степень дивергенции центромерной ДНК в разных таксонах семейства Chironomidae может значительно отличаться, причем эти отличия увеличиваются по мере увеличения ранга сравниваемых таксонов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 09-04-01440ф, программы РАН «Генофонды и генетическое разнообразие природных и экспериментальных популяций» и госконтракта № 60/2010.

Литература

- Кикнадзе И.И., Шилова А.И., Керкис И.Е. и др. Кариотипы и морфология личинок трибы Chironomini. Атлас. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1991. 114 с.
- Сиирин М.Т., Рубцов Н.Б., Карамышева Т.В. и др. Молекулярно-генетическая характеристика В-хромосом у хирономид (Diptera, Chironomidae) // Цитология. 2003. Т. 45. № 6. С. 582–589.
- Golygina V.V., Kiknadze I.I., Istomina A.G. *et al.* Cytogenetic divergence of genomes in *Chironomus plumosus* group (Diptera: Chironomidae) // Comp. Cytogen. 2007. V. 1. № 1. P. 17–32.
- Golygina V.V., Rubzov N.B., Karamisheva T.V., Kiknadze I.I. Divergence of centromeric heterochromatin is an important way of evolution in the genus *Prop-silocerus* (Diptera, Chironomidae) // Contemporary Aquatic Entomological Study in East Asia: Proc. of the 3rd Intern. Symp. on Aquatic Entomology in East Asia / Ed. X. Wang. Tianjin, China: Nankai University Press, 2008. P. 21–31.
- Hankeln T., Keyl H.-G., Schmidt E.R. DNA-probes for the investigation of chromosome evolution in *Chironomus*. II. Repetitive sequences // Acta Zool. Acad. Sci. Hungaricae. 1989. V. 2. P. 219–227.
- Hankeln T., Filippova M.A., Kiknadze I.I. *et al.* Centromeric heterochromatin and satellite DNA in the *Chironomus plumosus* group // Genome. 1994. V. 37. № 6. P. 925–934.
- He H., Liao C., Edstrom J.E. Centromere 3 specific tandem repeat from *Chironomus pallidivittatus* // Chromosoma. 1998. V. 107. № 5. P. 304–310.
- Keyl H.G., Keyl I. Die Cytologische Diagnostik der Chironomiden. I. Bestimmungstabelle für die Gattung *Chironomus* auf Grund der Speicheldrüsenchromosomen // Arch. Hydrobiol. 1959. Bd. 59. S. 43–57.
- Kiknadze I.I., Butler M.G., Golygina V.V. *et al.* Intercontinental karyotypic differentiation of *Chironomus entis* Shobanov, a Holarctic member of the *C. plumosus* group (Diptera, Chironomidae) // Genome. 2000. V. 43. № 5. P. 857–873.
- Kiknadze I.I., Golygina V.V., Broshkov A.D. *et al.* Mystery of *Chironomus dorsalis* Meigen karyotype (Diptera, Chironomidae) // Comp. Cytogen. 2008. V. 2. № 1. P. 21–35.
- Lopez C.C., Edstrom J.E. Interspersed centromeric element with a CENP-B box-like motif in *Chironomus pallidivittatus* // Nucl. Acids Res. 1998. V. 26. № 18. P. 4168–4172.
- Rosen M., Castillejo-Lopez C., Edström J.E. Telomere terminating with centromere-specific repeats is closely associated with a transposon derived gene in *Chironomus pallidivittatus* // Chromosoma. 2002. V. 110. № 8. P. 532–541.
- Rovira C., Beermann W., Edström J.E. A repetitive DNA sequence associated with the centromeres of *Chironomus pallidivittatus* // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. № 8. P. 1775–1781.
- Schmidt E.R. Clustered and interspersed repetitive DNA family in *Chironomus* // J. Mol. Biol. 1984. V. 178. P. 1–15.
- Schmidt E.R., Keyl H.G. *In situ* binding of AT-rich repetitive DNA to the centromeric heterochromatin in polytene chromosomes of chironomids // Chromosoma. 1981. V. 82. № 2. P. 197–204.
- Schmidt E.R., Vistorin G., Keyl H.-G. An AT-rich DNA component in the genomes of *Chironomus thummi thummi* and *Chironomus thummi piger* // Chromosoma. 1980. V. 76. P. 35–45.

STRUCTURAL FEATURES OF CENTROMERES IN POLETENE CHROMOSOMES OF CHIRONOMIDAE (DIPTERA) SPECIES

V.V. Golygina^{1,2}, I.I. Kiknadze¹, A.D. Broshkov^{1,2}, T.V. Karamysheva¹, N.B. Rubtsov¹

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

²Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Summary

The goal of this study was to investigate the molecular organization and divergence features of DNA sequences in centromeric regions of Chironomidae. For this purpose, four DNA libraries of chromosome III centromeres were created for three sibling species of the *plumosus* group: *C. entis*, *C. muratensis*, and *C. agilis*², belonging to the cytochrome complex thummi with arm combinations AB, CD, EF, G. In addition, six DNA libraries were obtained from centromeric and C-positive bands of polytene chromosomes of *C. dorsalis*, which belongs to the pseudothummi cytochrome complex and has a centromere structure unusual for the genus *Chironomus*. All DNA libraries were localized on polytene chromosomes of the corresponding species. It was found that all centromere disks in most species of the *plumosus* group considered in this study had similar compositions, but two species displayed differences in DNA composition in the metacentric and telocentric chromosomes. In addition to the centromeric regions, weak hybridization of DNA probes was recorded in some disks on chromosome arms. Fluorescence *in situ* hybridization of DNA probes from the centromeric region of chromosome II (CD) and C-positive bands of chromosomes I (AE) and III (BF) of *C. dorsalis* to polytene chromosomes showed that all of the four major C-positive bands of this species on chromosomes I (AE) and III (EF) contained sites homologous to the centromeric DNA of chromosome II (CD), and many hybridization sites were observed outside the centromeres. Comparison of our results with data on the centromere structure of another Chironomidae species, *Prosilocerus akamusi* (Ortocladiina), indicates that Chironomidae species broadly vary in the molecular organization of centromeric DNA.

Key words: centromere, centromeric DNA, *Chironomus*, polytene chromosomes, FISH, evolution, divergence.

ОСОБЕННОСТИ ХОЗЯЙСТВЕННО ЦЕННЫХ ПРИЗНАКОВ ЛИНИЙ СОРТА ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ ОМСКАЯ 37, НЕСУЩИХ ПШЕНИЧНО-РЖАНУЮ ТРАНСЛОКАЦИЮ 1RS.1BL

И.А. Белан¹, Л.П. Россеева¹, Н.В. Трубачеева², Т.С. Осадчая², О.В. Дорогина³,
Е.В. Жмудь³, Ю.В. Колмаков¹, Н.П. Блохина¹, Л.А. Кравцова², Л.А. Першина^{2,4}

¹ Сибирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства
Сибирского отделения РАСХН, Омск, Россия;

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

³ Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, Новосибирск, Россия;

⁴ Новосибирский государственный университет, кафедра цитологии и генетики,
Новосибирск, Россия

Изучены особенности линий сорта яровой мягкой пшеницы Омская 37, у которых на основе геномной *in situ* гибридизации выявлено присутствие пшенично-ржаной транслокации 1RS.1BL. Эта транслокация передана сорту Омская 37 от сорта пшеницы Кавказ. В полевых условиях проведена оценка урожайности, качества зерна и устойчивости к листовым патогенам выделенных линий по сравнению с сортом Омская 37. Все линии характеризовались высокой устойчивостью к бурой ржавчине. Из 20 изученных линий выделено 5 линий, характеризующихся комплексной устойчивостью к листовым патогенам, урожайностью и высоким качеством зерна. Эти линии рассматриваются как наиболее перспективные для дальнейшего использования в селекции. Проведено сравнительное изучение содержания активного ингибитора трипсина в зерне линий сортов Омская 37, Омская 29 и Омская 38, несущих пшенично-ржаную транслокацию, и линий яровой мягкой пшеницы, полученных с участием сорта пшеницы Кавказ, но не имеющих пшенично-ржаной транслокации. Показано, что присутствие пшенично-ржаной транслокации в кариотипе изученных линий яровой мягкой пшеницы не оказывает влияния на увеличение содержания активного ингибитора трипсина в зерне. Таким образом, короткое плечо хромосомы ржи 1RS сорта Petkus, входящее в состав пшенично-ржаной транслокации, не снижает питательной ценности зерна, охарактеризованной по показателю содержания активного ингибитора трипсина.

Ключевые слова: мягкая пшеница, GISH, пшенично-ржаная транслокация, хозяйственно ценные признаки.

Введение

Один из подходов к увеличению генетического разнообразия мягкой пшеницы основан на интрогрессивной гибридизации, обеспечивающей перенос новых генов в геном пшеницы от ее дикорастущих сородичей или других культурных видов Triticeae (Jiang *et al.*, 1994). В этом отношении интерес представляет рожь посевная *Secale cereale* L., которая, являясь ценной продовольственной культурой (Попов, 2009), используется в скрещиваниях с пшеницей для создания как тритикале, так и пшенично-ржа-

ных замещенных и транслоцированных линий (Lukaszewski *et al.*, 1982; Щапова, Кравцова, 1990). К настоящему времени широкое распространение получили сорта мягкой пшеницы, несущие пшенично-ржаную транслокацию 1RS.1BL и в меньшей степени транслокацию 1RS.1AL и пшенично-ржаное замещение 1R(1B) (Lukaszewski, 1990; Rabinovich, 1998; Landjeva *et al.*, 2006; Shlegel, 2010).

Компенсационная способность хромосомы ржи 1R по отношению к гомеологичным хромосомам мягкой пшеницы обусловлена тем, что в процессе эволюции эта хромосома в отличие

от большинства других хромосом *S. cereale* не была вовлечена в межхромосомные перестройки (Naranjo, Fernandez-Rueda, 1991; Devos *et al.*, 1993). В результате таких гомеологичных замещений целой хромосомы пшеницы или ее короткого плеча происходит образование цитологически стабильных и фертильных растений (Friebe *et al.*, 1996).

Кроме того, селекционная ценность сортов мягкой пшеницы, несущих транслокации 1RS.1BL и 1RS.1AL, обусловлена устойчивостью растений к биотическим стрессам, что определяется влиянием короткого плеча хромосомы ржи 1RS (McIntosh *et al.*, 1993). Плечо хромосомы ржи в составе транслокации 1RS.1BL, распространенной в более чем 650 сортах мягкой пшеницы, привнесено от ржи сорта Petkus (Schlegel, Korzun, 1997), а в транслокации 1RS.1AL, присутствующей в ее исходном источнике, американском сорте пшеницы Amigo, – от ржи сорта Insave (Graybosch *et al.*, 1999). Из отечественных сортов пшеницы, несущих пшенично-ржаную транслокацию 1RS.1BL, наиболее известны сорта Кавказ и Аврора, поскольку они использованы в качестве родительских форм при создании большого числа сортов пшеницы в разных регионах мира (Rabinovich, 1998; Shlegel, 2010). Короткое плечо хромосомы ржи 1RS, входящее в состав транслокации 1RS.1BL, содержит гены, контролирующие устойчивость растений к грибным патогенам: бурой ржавчине (*Lr26*), стеблевой ржавчине (*Sr31*), желтой ржавчине (*Yr9*) и мучнистой росе (*Pm8*) (Singh *et al.*, 1990; McIntosh *et al.*, 1993).

Накоплено достаточно доказательств тому, что экспрессия генов, локализованных на коротком плече хромосомы ржи 1RS, зависит от генотипической среды сортов пшеницы (Kim *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2007). Так, в разных регионах с неодинаковой частотой распространены сорта мягкой пшеницы, у которых хромосома 7D несет доминантный ген, супрессирующий экспрессию гена *Pm8* (Hanusova *et al.*, 1996; Zeller, Hsam, 1996; McIntosh *et al.*, 2003). Кроме того, в зависимости от генотипической среды сортов мягкой пшеницы, несущих пшенично-ржаную транслокацию, у растений проявляется засухоустойчивость (Zhou *et al.*, 2007; Hoffmann, 2008), высокая урожайность и повышенное со-

держание белка в зерне (McKendry *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2004).

Вместе с тем известно, что рожь не только является источником ценных качеств, но характеризуется с точки зрения ее хозяйственного использования и негативными свойствами. Так, в зерне ржи накапливаются антиметаболиты, снижающие его питательную ценность и отрицательно влияющие на метаболизм животных организмов (Попов, 2009). Среди таких веществ – ингибиторы трипсина, содержание которых в зерне ржи значительно превосходит содержание этих веществ у пшеницы (Мадл, Цен, 1978; Tanner, Reinbergs, 1982). При этом в зерне тритикале (Tanner, Reinbergs, 1982) и у сортов пшеницы, несущих пшенично-ржаную транслокацию 1RS.1BL, содержание активных ингибиторов трипсина относительно пшеницы может быть повышено (Литвиненко и др., 2002), что связывают с влиянием хромосом ржи. Кроме того, эти результаты привели авторов к заключению, что по активности ингибиторов трипсина в эндосперме зерна можно судить о наличии чужеродного генетического материала в геноме пшеницы (Литвиненко и др., 2002).

Исходя из рассмотренных данных, следует отметить, что потенциал пшенично-ржаной транслокации, в том числе и 1RS.1BL, для создания новых сортов не исчерпан, поскольку его проявление во многом определяется генотипической средой сорта пшеницы. Между тем недостаточно ясно, насколько сильно может оказывать влияние короткое плечо хромосомы 1R ржи посевной на питательную ценность зерна, определяемую по содержанию активного ингибитора трипсина в зерне.

Ранее при изучении сортов яровой мягкой пшеницы, созданных в Западной Сибири (СИБНИИСХ, г. Омск) с участием пшеницы сорта Кавказ, были выявлены сорта, несущие пшенично-ржаную транслокацию 1RS.1BL (Трубачева и др., 2011). Некоторые из этих сортов характеризуются проявлением комплекса хозяйственно ценных и адаптивных признаков, которые могут определяться и присутствием пшенично-ржаной транслокации. Такие сорта представляют интерес для дальнейшего использования в селекционном процессе в качестве доноров ценных признаков. Однако ввиду своего происхождения эти сорта характеризуют поли-

морфизм по проявлению ряда морфологических признаков. В связи с этим представляется актуальным выделить из них отдельные линии и в результате их оценки определить наиболее перспективные для селекции.

Настоящая работа посвящена изучению особенностей линий сорта яровой мягкой пшеницы Омская 37, у которых обнаружено присутствие пшенично-ржаной транслокации 1RS.1BL, по проявлению ряда хозяйственно ценных признаков, в том числе и по содержанию активного ингибитора трипсина в зерне.

Материалы и методы

На разных этапах выполнения в работу были включены линии, выделенные из сортов яровой мягкой пшеницы Омская 20, Омская 30, Омская 33, Омская 35, Омская 29, Омская 37, Омская 38 и Казанская юбилейная, в родословной которых участвовал сорт пшеницы Кавказ, несущий пшенично-ржаную транслокацию 1RS.1BL. В работу была также включена линия сорта яровой мягкой пшеницы Омская 9, созданного без участия сорта пшеницы Кавказ. В процессе работы на основании результатов проведенной геномной *in situ* гибридизации (GISH) линии были охарактеризованы на наличие или отсутствие пшенично-ржаной транслокации. GISH-анализ выполнен согласно ранее опубликованной методике (Mukai, Gill, 1991). В качестве зонда для геномной *in situ* гибридизации использовали меченную биотином тотальную ДНК, выделенную из растений ржи посевной *S. cereale*. Для каждой линии яровой мягкой пшеницы было проанализировано от 3 до 10 растений.

При изучении особенностей линий, выделенных из сорта яровой мягкой пшеницы Омская 37, растения выращивали на полях СибНИИСХ (южная лесостепь) в 2008–2009 гг. согласно рекомендациям (Методика ..., 1985). Площадь делянок 10 м², повторность четырехкратная. На естественном фоне изучена устойчивость линий к бурой ржавчине (*Puccinia recondite* f. sp. *tritici*) и мучнистой росе (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) в соответствии с ранее опубликованными методами (Захаренко и др., 2000). Проведена оценка урожайности, массы 1000 зерен, содержания белка и сырой клейковины в зерне, силы муки и объема хлеба (Колмаков, 2007). В

качестве контроля при оценке всех показателей у линий использовали исходный сорт яровой мягкой пшеницы Омская 37.

Для определения содержания активного ингибитора трипсина и белка в зерне линии, выделенные из всех сортов яровой мягкой пшеницы, включенных в работу, выращивали в гидропонной теплице в трехкратной повторности. Содержание активного ингибитора трипсина определяли по методу, при котором в качестве субстрата использовали БАПА (N^a-бензоил-DL-аргинин-п-нитроанилид) (Гофман, Вайсблай, 1975; Методы ..., 1987), а белка в зерне по методу Колмакова (2007). Полученные данные обработаны статистически (Доспехов, 1985).

Результаты и их обсуждение

Выделение линий из сорта яровой мягкой пшеницы Омская 37. Сорт Омская 37 (селекционный номер Лютесценс 242/97-2) включен в Государственный реестр селекционных достижений Российской Федерации в 2009 г. Его коммерческая ценность определяется высокой и стабильной урожайностью, устойчивостью к бурой ржавчине и мучнистой росе, высоким качеством зерна (Бойко и др., 2009). Благодаря этим свойствам сорт может быть использован в качестве донора хозяйственно ценных и адаптивных признаков в селекционных программах при создании новых сортов пшеницы.

Однако для сорта Омская 37 характерен полиморфизм по проявлению ряда признаков, в том числе высоте растения, времени колошения, окраске листьев, устойчивости к патогенам. Это может быть обусловлено высоким уровнем межсортовой рекомбинации генома, поскольку сорт Омская 37 получен в результате ступенчатой гибридизации с привлечением экологически отдаленных родительских форм разного происхождения. Так, в родословную сорта Омская 37 входят отечественные сорта пшеницы – озимый сорт Кавказ, яровые сорта Грекум 114, Венец, Омская 20, Омская 24, а также сорта мягкой пшеницы Бургас и Тайфун из Западной Европы. Наличие различных биотипов в сорте Омская 37 предполагает как необходимость, так и возможность выделения из него отдельных линий, характеризующихся комплексом хозяйственно ценных и адаптивных признаков.

Первоначально в результате индивидуального отбора по ряду признаков, определяющих продуктивность растений (форме и длине колоса, числу колосков и зерен в колосе, массе 1000 зерен), из исходного сорта Омская 37 в 2004 г. было выделено свыше 500 линий, включенных в дальнейший селекционный процесс. Среди них на основании результатов изучения продуктивности колоса отобрано 320 линий, из которых было выделено 22 линии, включенные в настоящую работу. По данным предварительной оценки эти линии близки по проявлению морфологических признаков и характеризуются устойчивостью к бурой ржавчине и мучнистой росе.

Для проверки наличия в кариотипе линий пшенично-ржаной транслокации, выявленной в исходном сорте Омская 37 (Трубачеева и др., 2011), был выполнен GISH-анализ. Установлено, что короткое плечо хромосомы ржи посевной присутствует в составе пары транслоцированных хромосом (рис. 1) у 20 из 22 изученных линий. В кариотипе 2 линий наличия хромосом ржи или их сегментов не обнаружено. Возможно, одна из причин гетерогенности сорта мягкой пшеницы Омская 37 связана с наличием в его составе отдельных биотипов, у которых пшенично-ржаная транслокация отсутствует.

Характеристика линий сорта яровой мягкой пшеницы Омская 37. В табл. 1 представлены результаты изучения линий, выращенных

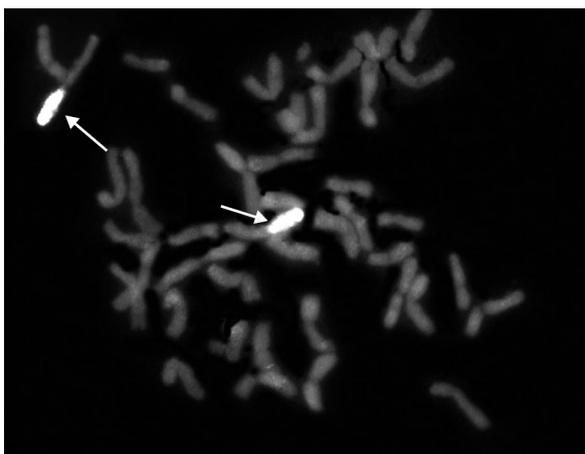


Рис. 1. Пример геномной *in situ* гибридизации для линии Лютесценс 10, выделенной из сорта яровой мягкой пшеницы Омская 37.

Стрелками указана пшенично-ржаная транслокация.

в полевых условиях 2008 и 2009 гг. По ряду показателей между изученными линиями и исходным сортом пшеницы Омская 37 обнаружены различия. Так, линию Лютесценс 10 (Лют. 10), несущую пшенично-ржаную транслокацию, характеризовала более высокая и стабильная урожайность по сравнению с сортом Омская 37. Средний показатель урожайности у этой линии был достоверно выше, чем у исходного сорта, на 0,35 т/га. Урожайность у линий с пшенично-ржаной транслокацией (Лют. 2, Лют. 9, Лют. 13, Лют. 23, Лют. 34 и Лют. 42) была ниже по сравнению с сортом Омская 37. У остальных линий независимо от наличия пшенично-ржаной транслокации или ее отсутствия урожайность была на уровне исходного сорта Омская 37.

Анализ качества зерна, проведенный по полной схеме технологического анализа, также выявил ряд линий, которые по некоторым показателям отличались от исходного сорта мягкой пшеницы Омская 37, характеризующегося высоким качеством зерна (Колмаков, 2007).

Например, среднее значение массы 1000 зерен у линии Лют. 16, имеющей пшенично-ржаную транслокацию, достоверно ниже, чем у исходного сорта, и составило 32,2 г по сравнению с 37,6 г у сорта Омская 37. Остальные линии имели значения этого показателя на уровне сорта Омская 37. Варьирование массы 1000 зерен у этих линий – от 33,1 г (Лют. 33) до 38,8 г (Лют. 10).

Линия Лют. 16 по сравнению с сортом Омская 37 имела более низкое содержание белка (15,53 %) и сырой клейковины (30,2 %) в зерне. У сорта Омская 37 значения этих показателей зерна были 17,21 % и 33,7 % соответственно. Линия Лют. 27, несущая пшенично-ржаную транслокацию, напротив, характеризовалась достоверно более высоким по сравнению с сортом Омская 37 содержанием белка в зерне (18,48 %) и несколько более высоким содержанием сырой клейковины в зерне (35,7 %). У остальных линий независимо от наличия или отсутствия пшенично-ржаной транслокации содержание белка и сырой клейковины в зерне достоверно не отличалось от соответствующих значений этих показателей качества зерна у сорта Омская 37 (табл. 1).

При сравнении средних значений силы муки и объема хлеба достоверных разли-

Таблица 1

Характеристика линий, выделенных из сорта яровой мягкой пшеницы Омская 37, по урожайности, качеству зерна и устойчивости к листовым патогенам (2008, 2009 гг.)

Сорт, линия	Урожайность, т/га	Устойчивость, балл		Масса 1000 зерен, г	Содержание в зерне, %		Сила муки, е.а.	Объем хлеба, см ³
		к бурой ржавчине	к мучнистой росе		белка	сырой клейковины		
Омская 37	3,31	9	6	37,6	17,21	33,7	519	1020
Лют. 1	3,14	9	7	35,5	16,31	31,4	470	828
Лют. 2	3,00	9	8	34,6	17,13	32,55	495	935
Лют. 9	2,89	9	7	33,8	16,28	31,4	435	800
Лют. 10	3,66	9	8	38,8	16,90	32,1	578	1035
Лют. 13	2,94	9	6	36,0	17,68	34,75	416	1040
Лют. 16	3,05	9	7	32,2	15,53	30,2	416	945
Лют. 8	3,28	8	6	34,1	17,02	32,6	450	835
Лют. 21	3,07	8	7	35,3	16,91	32,65	616	955
Лют. 22	3,08	8	8	33,5	16,32	32,35	572	1000
Лют. 23	2,76	9	8	34,9	17,36	33,5	610	865
Лют. 27	3,37	9	8	37,1	18,48	35,7	635	1005
Лют. 31	3,29	8	9	34,9	17,17	32,65	557	985
Лют. 32	3,17	9	8	37,1	17,77	33,05	621	960
Лют. 33	3,15	9	9	33,1	16,38	34,35	451	950
Лют. 34	3,02	9	7	36,0	16,67	32,2	469	870
Лют. 35	3,21	9	8	35,2	17,21	34,75	504	1030
Лют. 40	3,33	9	8	34,6	17,25	34,45	412	908
Лют. 42	2,78	9	8	33,3	18,13	35,65	605	1013
Лют. 44	3,16	9	8	36,0	17,68	35,7	533	935
Лют. 45	3,49	9	7	33,2	17,26	33	607	1045
Лют. 41*	3,16	9	6	36,2	16,57	33,15	468	985
Лют. 43*	3,13	9	5	38,5	16,62	33,15	530	975
НСР ₀₅	0,27			4,6	1,03	3,07	177	224

Примечание. * Линии, у которых пшенично-ржаная транслокация не выявлена. Соответствие баллов по устойчивости к бурой ржавчине: 9 – иммунные (очень высокая устойчивость); 8 – высокоустойчивые. Соответствие баллов по устойчивости к мучнистой росе: (9–8) – устойчивые; (7–6) – среднеустойчивые, 5 – средневосприимчивые.

чий между сортом пшеницы Омская 37 и выделенными из него линиями обнаружено не было (табл. 1). Вместе с тем следует отметить, что если у сорта пшеницы Омская 37 значение силы муки составило 519 е.а., то у 6 линий, имеющих пшенично-ржаную транслокацию (Лют. 23, Лют. 27, Лют. 32, Лют. 42 и Лют. 45), сила муки была более 600 е.а. Объем хлеба у 7 линий с пшенично-ржаной транслокацией (Лют. 10, Лют. 13, Лют. 22, Лют. 27, Лют. 35, Лют. 42 и Лют. 45) был, как и у исходного сорта, выше 1000 см³.

Проведенная оценка растений на устойчивость к листовым патогенам показала, что все изученные линии, в том числе и линии без пшенично-ржаной транслокации (Лют. 41 и Лют. 43), характеризовались высокой полевой устойчивостью к бурой ржавчине (оценка 8 или 9 баллов).

По устойчивости к мучнистой росе большая часть линий превосходила исходный сорт пшеницы Омская 37, который проявил среднюю устойчивость (6 баллов). Так, 12 линий, несущих пшенично-ржаную транслокацию, характери-

зовались высокой устойчивостью к этому патогену (8 и 9 баллов). Это линии Лют. 2, Лют. 10, Лют. 22, Лют. 23, Лют. 27, Лют. 31, Лют. 32, Лют. 33, Лют. 35, Лют. 40, Лют. 42 и Лют. 44. Остальные 8 линий, имеющие пшенично-ржаную транслокацию, оказались среднеустойчивыми к мучнистой росе (6 и 7 баллов). Что касается линий, у которых пшенично-ржаная транслокация не выявлена, то у одной из них, линии Лют. 41, проявилась средняя устойчивость к мучнистой росе, а другая линия, Лют. 43, оказалась средневосприимчивой (5 баллов).

Обобщая полученные данные по оценке изученных линий по устойчивости к листовым патогенам, урожайности и качеству зерна, можно выделить как наиболее перспективные для дальнейшего селекционного процесса в качестве ценного исходного материала линии, несущие пшенично-ржаную транслокацию, – Лют. 10, Лют. 27, Лют. 32, Лют. 35 и Лют. 45.

Таким образом, изучение линий с пшенично-ржаной транслокацией показало, что и после проведенного отбора их разнообразие по проявлению ряда признаков еще сохраняется, что предполагает различие их генотипической среды. И, как уже подчеркивалось выше, особенности проявления хозяйственно ценных признаков (McKendry *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2004), как и устойчивость к мучнистой росе (Zeller, Hsam, 1996), у сортов мягкой пшеницы, имеющих пшенично-ржаную транслокацию 1RS.1BL, в сильной степени зависит от влияния генотипической среды сортов.

Наличие разных биотипов у сорта пшеницы Омская 37, обуславливающих его гетерогенность, может быть не только результатом межсортовой рекомбинации геномов, но и следствием интрогрессивной гибридизации. Так, сорт яровой мягкой пшеницы Грекум 114, входящий в родословную сорта Омская 37, создавался с привлечением дикого сородича пшеницы – *Agropyron glaucum* (Desf) (Махалин, 1992). При создании сорта Омская 37 источником генетического материала ржи посевной, помимо сорта Кавказ, мог быть и сорт мягкой пшеницы Бургас. Это предположение основано на том, что отдельные сорта из серии сортов Бургас имеют в кариотипе или целую хромосому ржи 1R в замещении 1R(1B) или ее короткое плечо в составе пшенично-ржаной

транслокации 1RS.1BL, как и у сорта пшеницы Кавказ (Schlegel, 2010). Кроме того, сорт мягкой пшеницы Тайфун, присутствующий в родословной сорта Омская 37, относят к сортам, устойчивость которых к мучнистой росе определяется локусами, интрогрессированными от *T. timopheevii* (Sharma, Gill, 1983).

Очевидно, что для сортов мягкой пшеницы, характеризующихся высоким уровнем рекомбинации генов и несущих чужеродный генетический материал, к которым относится и сорт Омская 37, необходимо использовать методы ускоренного создания гомозиготных линий, основанные на культивировании пыльников (Muranty *et al.*, 2002) или скрещивании с гаплопродюсерами (Inagaki, Mujeeb-Kazi, 1998).

Содержание активного ингибитора трипсина в зерне линий яровой мягкой пшеницы.

При выполнении данного раздела исследования проведено изучение трех линий, выделенных из сорта яровой мягкой пшеницы Омская 37 (Лют. 10, Лют. 16, Лют. 27), и по одной линии сортов пшеницы Омская 9 (Л-9-1), Омская 20 (Л-20-1), Омская 29 (Л-29-1), Омская 30 (Л-30-1), Омская 33 (Л-33-1) Омская 35 (Л-35-1), Омская 38 (Л-38-1) и Казанская юбилейная (Л-КЮ-1). По данным GISH-анализа, линии Л-29-1, Л-38-1, как и линии Лют. 10, Лют. 16, Лют. 27, содержали в своем кариотипе пшенично-ржаную транслокацию 1RS.1BL.

В табл. 2 приведены данные изучения содержания активного ингибитора трипсина и белка в зерне. Как следует из этих данных, содержание активного ингибитора трипсина у всех изученных линий мягкой пшеницы было одного порядка и варьировало от $0,1 \pm 0,01$ у линии Лют. 242/97-2-16, несущей пшенично-ржаную транслокацию, до $0,23 \pm 0,02$ линии, выделенной из сорта пшеницы Казанская Юбилейная и характеризующейся отсутствием пшенично-ржаной транслокации.

Сравнение средних значений содержания активного ингибитора трипсина в зерне показывает, что присутствие пшенично-ржаной транслокации в геноме мягкой пшеницы не приводит к повышению активного ингибитора трипсина в зерне изученных линий по сравнению с линиями без пшенично-ржаной транслокации.

Таким образом, полученные в нашей работе результаты не согласуются с данными

Таблица 2

Средние значения содержания активного ингибитора трипсина и белка в зерне линий яровых сортов мягкой пшеницы, несущих пшенично-ржаную транслокацию 1RS.1BL, и сортов мягкой пшеницы без пшенично-ржаной транслокации

Сорта пшеницы	Линии	Содержание активного ингибитора трипсина, мг/г веса воздушносухой муки	Содержание белка в зерне, %
Омская 29	Л - 29 - 1*	0,18 ± 0,02	18,75
Омская 37	Лют. 10*	0,15 ± 0,02	18,04
	Лют. 16*	0,10 ± 0,01	17,16
	Лют. 27*	0,12 ± 0,01	19,04
Омская 38	Л - 38 - 1*	0,18 ± 0,02	19,40
Омская 9	Л - 9 - 1	0,18 ± 0,02	16,76
Омская 20	Л - 20 - 1	0,18 ± 0,02	18,38
Омская 30	Л - 30 - 1	0,12 ± 0,01	19,55
Омская 33	Л - 33 - 1	0,17 ± 0,02	16,36
Омская 35	Л - 35 - 1	0,13 ± 0,01	17,16
Казанская юбилейная	Л - КЮ - 1	0,23 ± 0,02	17,56

Примечание. * Линии, несущие пшенично-ржаную транслокацию 1RS.1BL.

других авторов, обнаруживших более высокие значения содержания ингибиторов трипсина в зерне генотипов мягкой пшеницы, несущих пшенично-ржаную транслокацию 1RS.1BL, по сравнению с генотипами мягкой пшеницы без транслокации (Литвиненко и др., 2002). Кроме того, в нашей работе не обнаружено корреляции между содержанием белка и содержанием ингибиторов трипсина в зерне ($r = -0,04$), что противоречит данным одних авторов (Литвиненко и др., 1999, 2002), но согласуется с результатами других авторов, также не обнаруживших тесной связи между этими признаками (Tanner, 1982).

Известно, что среди культурных растений наибольшим содержанием ингибиторов трипсина в семенах характеризуются бобовые (Соловьева, 2003). В связи с этим в селекцию в качестве исходного материала вовлекают генотипы с относительно низкой активностью ингибиторов трипсина в семенах. Например, у распространенного сорта гороха посевного Орловчанин, допущенного к использованию в ряде регионов Российской Федерации и Украины, содержание активного ингибитора трипсина составляет 1,45 мг/г (Амелин и др., 2007). В тех же случа-

ях, когда содержание ингибиторов трипсина в семенах на порядок выше, как, например, у многих сортов сои, продукты переработки семян подвергают специальной обработке для снижения активности ингибиторов трипсина. При этом подчеркивается, что допустимый уровень содержания активного ингибитора трипсина в готовых к употреблению пищевых продуктах для детского и диетического питания не должен превышать 5,0 г/кг активного ингибитора трипсина (Соловьева, 2003).

Таким образом, из полученных в нашей работе данных следует, что короткое плечо хромосомы 1R ржи посевной не оказывает отрицательного влияния на питательную ценность зерна мягкой пшеницы, определяемую по содержанию активного ингибитора трипсина.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 08-00-00598), Комплексного интеграционного проекта СО РАН (№ 28), Программы Президиума РАН «Биоразнообразие и динамика генофондов», грантом Министерства образования и науки РФ (г/к 02.740.11.0277).

Литература

- Амелин А.В., Кондыков И.В., Монахова Н.А. и др. Перспективы селекции гороха полевого на высокую урожайность и качество зерна // Селекция и семеноводство полевых культур: Юбилейный сборник науч. тр. Ч. 1. Воронеж: ФГОУ ВПО ВГАУ, 2007. С. 43–46.
- Бойко В.Д., Курдюкова Т.А., Черемисина С.П. и др. Рекомендации по возделыванию сортов сельскохозяйственных культур и результаты сортоиспытания в Омской области за 2009 год. Инспектура по Ом. обл. Ом. филиал ФГУ «Гос. комиссия РФ по испытанию и охране селекционных достижений». Омск, 2009. 140 с.
- Гофман Ю.Я., Вайсблай И.М. Прикладная биохимия и микробиология. 1975. Т. 11. Вып. 5. С. 777–783.
- Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. М.: Агропромиздат, 1985. 353 с.
- Захаренко В.А., Медведев А.М., Ерохина С.А. и др. Методика по оценке устойчивости сортов полевых культур к болезням на инфекционном и провакцинном фонах. М.: Россельхозакадемия, 2000. 88 с.
- Колмаков Ю.В. Оценка материала пшеницы в селекции и повышение потенциала его качества в зернопроизводстве и хлебопечении. Омск: Изд-во ФГОУ ВПО Ом ГАУ, 2007. 268 с.
- Литвиненко Н.А., Адамовская В.Г., Вовчук С.В., Бирюкова С.В. Анализ содержания ингибиторов трипсина гибридов F_2 – F_3 и его связь с белковостью зерна озимой мягкой пшеницы // Цитология и генетика. 1999. № 33. С. 33–38.
- Литвиненко Н.А., Адамовская В.Г., Молодченкова О.О., Моцный И.И. Генетическая устойчивость пшеницы к фузариозу и ее связь с активностью ингибитора трипсина в зерне // Цитология и генетика. 2002. № 2. С. 30–34.
- Мадл Р.Л., Цен Х.Л. Ингибиторы трипсина и хитотрипсина из тритикале // Тритикале – первая зерновая культура, созданная человеком / Под ред. Ю.Л. Гужова. М.: Колос, 1978. С. 177–188.
- Махалин М.А. Межродовая гибридизация зерновых колосовых культур. М.: Наука, 1992. 237 с.
- Методика государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур. Общая часть. Вып. 1. М.: Колос, 1985. 269 с.
- Методы биохимического исследования растений / Под ред. А.И. Ермакова. Л.: Агропромиздат, Ленингр. отд-ние, 1987. 430 с.
- Попов В.А. Рожь зернофуражная: дефекты и эффекты // Аграрный эксперт. 2009. № 2. С. 68–71.
- Соловьева В.Ф. Содержание ингибиторов трипсина в семенах и продуктах переработки зернобобовых // Проблемы харчування. 2003. № 1. С. 34–37.
- Трубачеева Н.В., Россеева Л.П., Белан И.А. и др. Особенности сортов яровой мягкой пшеницы Западной Сибири, несущих пшенично-ржаную транслокацию 1RS.1BL // Генетика. 2011. Т. 47. № 1. (Принята в печать).
- Щапова А.И., Кравцова Л.А. Цитогенетика пшенично-ржаных гибридов. Новосибирск: Наука, 1990. 161 с.
- Devos K.M., Atkinson M.D., Chinoy C.N. *et al.* Chromosomal rearrangements in the rye genome relative to that wheat // Theor. Appl. Genet. 1993. V. 85. P. 673–680.
- Friebe B., Jiang J., Raupp W.J. *et al.* Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status // Euphytica. 1996. V. 91. P. 59–87.
- Graybosch R.A., Lee J.-H., Peterson C.J. *et al.* Genetic, agronomic and quality comparisons of two 1AL.1RS wheat-rye chromosomal translocations // Plant Breeding. 1999. V. 118. P. 125–130.
- Hanusova R., Hsam S.L.K., Bartos P., Zeller F.J. Suppression of powdery mildew resistance gene *Pm8* in *Triticum aestivum* L. (common wheat) cultivars carrying wheat-rye translocation T1BL.1RS // Heredity. 1996. V. 77. P. 383–387.
- Hoffmann B. Alteration of drought tolerance of winter wheat caused by translocation of rye chromosome segment 1R // Cereal Res. Commun. 2008. V. 36. P. 269–278.
- Inagaki M.N., Mujeeb-Kazi A. Production of polyploid of hexaploid wheat using stored pearl millet pollen // Euphytica. 1998. V. 100. P. 253–259.
- Jiang J., Friebe B., Gill B.S. Recent advances in alien gene transfer in wheat // Euphytica. 1994. V. 73. P. 199–212.
- Kim W., Jonson P.S., Baenziger P.S. *et al.* Agronomic effect of wheat-rye translocation carrying rye chromatin (1R) from different sources // Crop Sci. 2004. V. 44. P. 1254–1258.
- Landjeva S., Korzun V., Tsanev V. *et al.* Distribution of wheat-rye translocation 1RS.1BL among bread wheat varieties of Bulgaria // Plant Breeding. 2006. V. 125. P. 102–104.
- Lukaszewski A.J., Gustafson J.P., Apolinarska B. Transmission of chromosomes through the eggs and pollen of triticale × wheat F_1 hybrids // Theor. Appl. Genet. 1982. V. 63. P. 49–55.
- Lukaszewski A. Frequency of 1RS.1AL and 1RS.1BL translocations in United States wheat // Crop Sci. 1990. V. 30. P. 1151–1153.
- McIntosh R.A., Hart G., Gale M. Catalogue of gene symbols for wheat // Proc. of the 8th Intern. Wheat Genet. Symp. / Eds Z.S. Li, Z.Y. Xin. Beijing, China, 1993. P. 1333–1500.
- McIntosh R.A., Yamazaki Y., Devos K.M. *et al.* Catalogue of gene symbols for wheat / Proc. of the 10th

- Intern. Wheat Genet. Symp. / Eds N.E. Pogna, M. Romano, G. Galterio. Paestum, Italy, 2003. P. 1–6.
- McKendry A.L., Tague D.N., Ross K. Comparative effects of 1BL.1RS and 1AL.1RS on soft red winter wheat milling and baking quality // *Crop Sci.* 2001. V. 41. P. 712–720.
- Mukai Y., Gill B.S. Detection of barley chromatin added to wheat by genomic in situ hybridization // *Genome.* 1991. V. 34. P. 448–452.
- Muranty H., Sourdille P., Bernard S., Bernard M. Genetic characterization of spontaneous diploid androgenetic wheat and triticale plants // *Plant Breeding.* 2002. V. 121. P. 470–474.
- Naranjo T., Fernandez-Rueda P. Homoeology of rye chromosome arms to wheat // *Theor. Appl. Genet.* 1991. V. 82. P. 577–586.
- Rabinovich S.V. Importance of wheat-rye translocations for breeding modern cultivars of *Triticum aestivum* L. // *Euphytica.* 1998. V. 100. P. 323–340.
- Schlegel R. Current list of wheats with rye and alien introgression. 2010. V05-08, 1-14. [http://www.desicca.de/Wheat-rye introgression](http://www.desicca.de/Wheat-rye%20introgression).
- Schlegel R., Korzun V. About the origin of 1RS.1BL wheat-rye chromosome translocations from Germany // *Plant Breeding.* 1997. V. 116. P. 537–540.
- Sharma H.C., Gill B.S. Current status of wide hybridization in wheat // *Euphytica.* 1983. V. 32. P. 17–31.
- Singh N.K., Shepherd K. W., McIntosh R.A. Linkage mapping of genes for resistance to leaf, stem and stripe rust and ω -secalins on the short arm of rye chromosome 1R // *Theor. Appl. Genet.* 1990. V. 80. P. 609–616.
- Tanner D.G., Reinbergs E. Genetic analysis of the trypsin inhibitor activity of triticale and rye // *Z. Pflanzenzuchtg.* 1982. Bd. 88. S. 177–184.
- Zeller F.J., Hsam S.L.K. Chromosomal location of a gene suppressing powdery mildew resistance genes *Pm8* and *Pm17* in common wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell.) // *Theor. Appl. Genet.* 1996. V. 93. P. 38–40.
- Zhou Y., He Z.H., Sui X.X. *et al.* Genetic improvement of grain yield and associated traits in the Northern China winter wheat region from 1960 to 2000 // *Crop Sci.* 2007. V. 47. P. 245–253.

SOME AGRONOMIC IMPORTANT FEATURES OF SPRING WHEAT CULTIVAR OMSKAYA 37 LINES CONTAINING WHEAT-RYE TRANSLOCATION 1RS.1BL

I.A. Belan¹, L.P. Rosseeva¹, N.V. Trubacheeva², T.S. Osadchaya², O.V. Dorogina³, E.V. Zhmud¹, Y.V. Kolmakov¹, N.P. Blokhina¹, L.A. Kravtsova², L.A. Pershina^{2,4}

¹ Siberian Agricultural Research Institute, SB RAAS, Omsk, Russia;

² Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: pershina@bionet.nsc.ru;

³ Central Siberian Botanical Garden, SB RAS, Novosibirsk, Russia;

⁴ Novosibirsk State University, Cytology and Genetics Department, Novosibirsk, Russia

Summary

Lines of spring common wheat Omskaya 37 were studied and wheat-rye translocations were detected by genomic in situ hybridization. This translocation had been transferred to Omskaya 37 from wheat cultivar Kavkaz. The assessment of productivity, grain quality, and resistance to leaf pathogens in these lines was carried out in comparison with cv. Omskaya 37. All lines were highly resistant to leaf rust. Five lines of twenty demonstrate multiple resistance to leaf pathogens, productivity, and high grain quality. These lines are considered to be the most promising for further use in breeding. Comparative study of active trypsin inhibitor content in grain was carried out in lines of cvs. Omskaya 37, Omskaya 29, and Omskaya 38, which contain wheat-rye translocation, and in spring common wheat lines without wheat-rye translocations. It was shown that the presence of the wheat-rye translocation in the karyotypes of the lines under study did not influence the increase of active trypsin inhibitor content in grain. Thus, the short arm of rye chromosome 1RS of cv. Petkus, which is a part of the wheat-rye translocation, does not impair the nutritive quality of grain assessed from active trypsin content.

Key words: common wheat, GISH, wheat-rye translocation, commercially valuable traits.

СОДЕРЖАНИЕ И КАЧЕСТВО КЛЕЙКОВИНЫ У РЕКОМБИНАНТНЫХ ЛИНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ С ТРАНСЛОКАЦИЕЙ *Lr19(7D)* ОТ *AGROPYRON ELONGATUM* Host. И 6Agⁱ(6D)-ХРОМОСОМОЙ ОТ *AGROPYRON INTERMEDIUM* Host.

О.В. Крупнова, А.Е. Дружин, С.А. Воронина, В.А. Крупнов

ГНУ Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Юго-Востока,
Саратов, Россия, e-mail: raiser_saratov@mail.ru

В сеялочных посевах по черному пару в течение 6 лет изучались рекомбинантные инбредные линии яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum*), отобранные из популяций от скрещивания генотипов, содержащих *Lr19(7D)*-транслокацию от *Agropyron elongatum* и 6Agⁱ(6D)-хромосому от *Agropyron intermedium*. Установлено, что эти линии по показателям ИДК-1 и SDS-объему существенно не отличаются от родительских генотипов. Однако у двух из четырех линий проявилась тенденция к снижению содержания сырой клейковины.

Ключевые слова: мягкая пшеница, почти изогенные линии, рекомбинантные инбредные линии, транслокации, содержание клейковины в муке, показатель прибора ИДК-1, SDS-объем.

Введение

Ценность пшеничного зерна в значительной степени определяется наличием в нем белков, которые называются клейковинными белками. Почти три века продолжается изучение состава клейковины, ее физических и химических свойств, влияния на нее различных факторов. В начале 20-го века было установлено, что в семенах некоторых дикорастущих злаков клейковины больше, чем в пшенице. Так, у пырея промежуточного (*Agropyron intermedium* Host.) содержание клейковины достигает 52,5 %, а пырея удлиненного (*Agropyron elongatum* Host.) – 68,8 % (Козьмина, Кретович, 1950), и оба они используются в качестве доноров для расширения генетической изменчивости в зародышевой плазме мягкой пшеницы (*Triticum aestivum*) по устойчивости к бурой листовой ржавчине, мучнистой росе и другим патогенам, а также по содержанию белка в зерне и другим признакам качества (Sharma, Knott, 1966; Синиговец, 1988; Крупнов, Сибикеев, 2005; Cao *et al.*, 2007; Garg *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009).

В настоящее время широкое распространение получили сорта мягкой пшеницы, содержа-

щие *1BL.1RS*-транслокацию от озимой ржи, а также *Lr19*-транслокацию от пырея удлиненного. В целях защиты от паразитов и повышения адаптивности к непрерывно изменяющимся условиям внешней среды создаются принципиально новые генотипы мягкой пшеницы, которые содержат транслокации не от одного, а от двух разных видов сородичей. В связи с этим большое теоретическое и практическое значение имеет изучение эффектов воздействий этих транслокаций на самые различные признаки мягкой пшеницы, включая качество зерна. Ранее нами были опубликованы результаты изучения влияния взаимодействия *Lr19*-транслокации (в хромосоме 7D) от пырея удлиненного (*Agropyron elongatum* Host.) и 6Agⁱ(6D)-хромосомы от пырея промежуточного (*Agropyron intermedium* Host. *Elymus tsukushiensis* Honda) на урожайность зерна и содержание в нем белка у мягкой пшеницы (Крупнов и др., 2010). Учитывая, что гены, кодирующие клейковинные белки, локализованы в гомеологичных хромосомах группы 1 (в 1A, 1B, 1D – глиадины и глютенины) и в хромосомах группы 6 (в 6A, 6B, 6D – глиадины) (McIntosh *et al.*, 2008), интересно изучить эффекты названных пырейных

транслокаций в отдельности и в сочетании на содержание клейковины и качество зерна яровой мягкой пшеницы.

В нашей стране требованиями ГОСТ предусматривается обязательная оценка зерна по содержанию клейковины и ее упруго-вязким свойствам на приборе ИДК-1, параметры этих признаков являются одними из главных критериев цены на зерно пшеницы (Мелешкина, 2009).

В настоящей работе сообщаются результаты изучения эффектов взаимодействия *Lr19*-транслокации от *Agropyron elongatum* Host. и 6Agⁱ(6D)-хромосомы от *Agropyron intermedium* Host. на содержание клейковины и ее качество у яровой мягкой пшеницы.

Материал и методы

Материал включает 10 генотипов (табл. 1). Линии Л1089 и Л2032 содержат *Lr19*-транслокацию от *Ag. elongatum* (в хромосоме 7D). Л359S и Л359R – почти изогенные линии, различающиеся по *Lr19*-транслокации, а Л400S и Л400R – почти изогенные линии, различающиеся по 6Agⁱ(6D)-хромосоме от *Ag. intermedium*. Л204 и Л205 происходят от скрещивания линий Л400R/Л1089. Линии Л204 и Л205 – почти изогенные линии, различающиеся по окраске зерна, у первой оно красное, у второй – белое, обе они содержат *Lr19*-транслокацию от *Ag. elongatum* и 6Agⁱ(6D)-хромосому от *Ag. intermedium*. Л204 и Л205 устойчивы к местной популяции листовой ржавчины (*Puccinia triticina* Eriksson (прежнее название *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*). Устойчивость к этому патогену они унаследовали от линии Л400R. Мука у Л204 и Л205 так же, как и у Л1089, желтая (результат сцепления гена *Yf* с геном *Lr19*). Рекомбинантные линии Л396 и Л108 происходят от скрещивания Л2032/Л400R и содержат 6Agⁱ(6D)-хромосому от *Ag. intermedium*. Мука у Л396 и Л108 так же, как у Л400R, белая. Обе они также устойчивы к саратовской популяции листовой ржавчины, тогда как Л1089, Л2032 и Л400S – восприимчивы (Сибикеев, Крупнов, 2007).

Материал высевали сеялкой ССФК-7, деланки семирядковые, площадь 7 м². Повторность четырехкратная. Норма высева семян из расчета 400 шт. на 1 м². Уход за посевом включал

опрыскивание растений гербицидами против сорняков и рыхление дорожек между деланками. Предшественник яровой мягкой пшеницы – черный пар, позволяющий без внесения удобрений обеспечивать получение относительно высокого уровня содержания белка в зерне.

Содержание сырой клейковины определяли в соответствии с руководством (Методические рекомендации ..., 1977). Определение качества сырой клейковины производили на приборе ИДК-1, анализ SDS-объема – в модификации по методике Бебякина и Бунтиной (1991).

Условия произрастания яровой мягкой пшеницы отражены в публикации (Крупнов и др., 2010). Для формирования урожая зерна наиболее благоприятным был 2003 год. В 2004 г. засушливой была первая половина вегетации (до колошения), а в 2005 г., наоборот, вторая половина вегетации, тем не менее, в оба сезона восприимчивые генотипы пострадали от эпифитотии листовой ржавчины. 2006 год характеризуется как среднезасушливый, в период от колошения до созревания температурный режим был повышенным, в отдельные дни температура достигала 30 °С. В 2007 г. сумма температур была выше, а количество осадков ниже многолетней нормы. В 2008 г. первая половина вегетации протекала в условиях сильной засухи, и у многих растений кушение практически отсутствовало. В начале колошения (23 июня) выпало осадков 50,3 мм, что выше нормы, в результате создались условия для образования новых продуктивных побегов. Таким образом, годы исследований являются контрастными как по водному и температурному режимам, так и по влиянию биострессоров, прежде всего, листовой ржавчины.

Полученные данные подвергли дисперсионному анализу с последующим множественным сравнением по тесту Дункана с использованием программы «AGROS-10,2».

Результаты

Ранее нами (Крупнов и др., 2010) было показано значимое влияние *Lr*-транслокаций и их сочетаний на урожайность зерна, содержание белка в муке и валовой сбор белка с единицы площади у вышеперечисленных линий. При этом было установлено, что у рекомбинантов

Таблица 1

Содержание сырой клейковины, показатель ИДК-1 и SDS-объем
у линий яровой мягкой пшеницы в период 2003–2008 гг.

Линия	Годы						Среднее
	2003	2004	2005	2006	2007	2008	
Содержание сырой клейковины, %							
Л359S	37	37	36	41	50	43	40,67b
Л359R <i>Lr19</i>	38	38	38	41	44	46	40,83b
Л400S	34	35	34	41	47	38	38,17ab
Л400R, 6Ag ⁱ (6D)	36	36	40	41	49	39	40,17b
Л2032, <i>Lr19</i>	35	36	36	41	45	48	40,17b
Л1089, <i>Lr19</i>	38	36	38	42	50	45	41,50b
Л204, <i>Lr19</i> + 6Ag ⁱ (6D)	30	40	38	42	51	37	39,67b
Л205, <i>Lr19</i> + 6Ag ⁱ (6D)	35	37	37	42	52	38	40,17b
Л396, 6Ag ⁱ (6D)	34	36	37	41	41	39	38,00ab
Л108, 6Ag ⁱ (6D)	34	38	35	36	39	35	36,17a
F _{факт.}	1,76*	3,12*	18,08*	1,90	3,00*	11,48*	2,148*
НСР ₀₅	3,37	2,54	1,38	NS	4,03	3,5	3,14
Показатель ИДК-1, ед. п.							
Л359S	82	76	79	77	90	103	84,50cd
Л359R <i>Lr19</i>	81	72	75	77	83	97	80,83abcd
Л400S	83	81	79	82	89	101	85,83d
Л400R, 6Ag ⁱ (6D)	83	74	76	80	87	97	82,83bcd
Л2032, <i>Lr19</i>	81	70	60	74	81	92	76,33ab
Л1089, <i>Lr19</i>	68	69	68	74	85	91	75,83a
Л204, <i>Lr19</i> + 6Ag ⁱ (6D)	73	79	68	83	95	84	80,33abcd
Л205, <i>Lr19</i> + 6Ag ⁱ (6D)	77	72	64	82	93	85	78,83abc
Л396, 6Ag ⁱ (6D)	86	79	75	85	78	88	81,83abcd
Л108, 6Ag ⁱ (6D)	80	65	80	83	80	95	80,50abcd
F _{факт.}	4,89*	3,45*	10,9*	3,69*	5,17*	3,85*	2,381*
НСР ₀₅	3,9	6,5	3,6	5,9	5,1	7,30	5,91
SDS-объем, мл							
Л359S	89	83	92	94	84	79	86,83b
Л359R <i>Lr19</i>	89	90	90	94	86	83	88,67b
Л400S	88	84	87	93	77	77	84,33ab
Л400R, 6Ag ⁱ (6D)	93	90	94	93	87	77	89,00b
Л2032, <i>Lr19</i>	93	90	80	90	82	92	87,83b
Л1089, <i>Lr19</i>	92	92	90	89	90	89	90,33b
Л204, <i>Lr19</i> + 6Ag ⁱ (6D)	88	92	90	88	84	75	86,17b
Л205, <i>Lr19</i> + 6Ag ⁱ (6D)	90	90	90	88	80	75	85,50ab
Л396, 6Ag ⁱ (6D)	67	90	90	78	80	71	79,33a
Л108, 6Ag ⁱ (6D)	93	90	88	80	90	71	85,33ab
F _{факт.}	2,78*	6,76*	8,62*	6,43*	26,21*	2,83*	2,25*
НСР ₀₅	8,02	6,69	4,83	7,68	4,09	10,12	5,84

* Цифры в колонке, сопровождаемые разными буквами, значимо различаются при вероятности 95 % множественных сравнений по тесту Дункана.

в среднем за 5 лет содержание белка в муке значимо ниже, чем у родительских генотипов, без значимого снижения урожая белка (Крупнов и др., 2010).

Результаты изучения содержания клейковины и ее качества у этих линий приведены в табл. 1. Данные табл. 1 свидетельствуют о достоверном влиянии как генотипа, так и года на величины всех трех признаков качества зерна.

Содержание клейковины. В среднем по набору генотипов во все годы исследований оно отвечало самым высоким требованиям российского рынка. Этот показатель в 2007 г. находился на первом месте, в 2006 и 2008 гг. – на втором и 2004, 2005 и 2003 гг. – на третьем. В среднем за 6 лет самое высокое содержание клейковины показали линии Л1089, Л400R и Л2032, а самое низкое – линии Л396 и Л108. У Л204 и Л205, полученных от скрещивания Л400R/Л1089, содержание клейковины было выше, чем у Л396 и Л108, выделенных из популяции от скрещивания Л2032/Л400R. Следует отметить, что линии Л204 и Л205 выделяются также среди других генотипов по варьированию содержания клейковины по годам. В конечном результате по содержанию клейковины в среднем за 6 лет линия Л108 достоверно уступила своим родителям, а у Л396 проявилась тенденция к этому. В условиях эпифитотии листовой ржавчины в 2004 и 2005 гг. сезоны линии Л359R и Л400R, содержащие *Lr*-транслокации, значимо превысили своих почти изогенных сибов. Однако сочетание *Lr19*-транслокации и 6Agⁱ(6D)-хромосомы в линиях Л204 и Л205 не показало значимого аддитивного эффекта на содержание клейковины. Еще слабее эффект Lr6Agⁱ(6D)-хромосомы проявился в линиях Л396 и Л108 по сравнению с линией Л400R.

Показатели качества клейковины, полученные с использованием прибора ИДК-1. Прежде чем оценивать качества клейковины по данным прибора ИДК-1 и SDS-анализа, необходимо отметить следующее. По современным рекомендациям ГНУ ВНИИЗ, оптимальным качеством клейковины для хлебопечения считается показатель 70–90 единиц (прибор ИДК-1) (Мелешкина, 2009). Как видно из табл. 1 во все годы исследований за исключением 2008 г. все сорта и линии отвечали этому требованию (табл. 1). Однако наилучшие показатели

по упругости клейковины наблюдались в 2004 и 2005 гг., затем в 2003 и 2006 гг., а самые низкие показатели упругости – в 2007 и 2008 гг. В 2008 г. лишь у двух генотипов Л359S и Л400S, показатели качества клейковины (прибор ИДК-1) значимо превысили 100 ед. Таким образом, изучение реологических свойств зерна с помощью прибора ИДК-1 свидетельствует о том, что сочетание в генофоне яровой мягкой пшеницы *Lr19*-транслокации от пырея удлиненного и 6Agⁱ(6D)-хромосомы от пырея промежуточного не оказывает отрицательного влияния на такой признак, как упругость теста.

SDS-объем. В отличие от показателей качества клейковины, определяемого прибором ИДК-1, в методе SDS-седиментации лучшими считаются самые высокие показатели, т. е. чем выше SDS-объем, тем выше качество зерна для хлебопечения и изготовления лапши, макарон и других продуктов. По величине седиментационного осадка наивысшие показатели наблюдались у изучаемых линий в 2003, 2004, 2005, 2006 гг., а наименьшие – в 2008 г. Все линии имели высокие показатели SDS-объема и могут быть охарактеризованы как высококачественные по этому признаку. Самое высокое варьирование признака по годам наблюдается у линии Л396, а самое низкое – у Л2032 и Л1089. В среднем за 6 лет самый высокий SDS-объем отмечен у линии Л1089, а самый низкий – у Л396, все остальные линии занимают промежуточное положение.

Обсуждение

В литературе нам не удалось найти информации о влиянии сочетания пырейных транслокаций на содержание клейковины и ее реологические свойства, хотя известно, что различные виды пырея являются донорами новых аллелей глютенина, значимо влияющих на качество зерна пшеницы (Сао *et al.*, 2007; Garg *et al.*, 2009) и что пырейные транслокации могут влиять на фракционный состав запасных белков (Филатова и др., 2010). Наши данные по «эффекту года» и *Lr*-транслокаций от *Agropyron intermedium* в генофонде яровой мягкой пшеницы на SDS-объем согласуются с результатами, полученными в Самарском НИИСХ, где, как и в Саратове, в 2004 г. SDS-объем был выше, чем в 2008 г. (Филатова и др., 2010).

Известно, что в большинстве случаев прослеживается отрицательная корреляция между показателями прибора ИДК-1 и взятым в анализ SDS-объемом (Бебякин, Бунтина, 1991; Крупнова, 1997; Бебякин и др., 2005). Аналогичная картина наблюдается и у использованного нами набора из 10 генотипов, что особенно четко проявилось в 2004, 2005 и 2008 гг. Эти данные указывают на то, что в совокупности эти два метода (анализ ИДК-1 и SDS-объема) с разных сторон характеризуют реологические свойства клейковины. Установлено, что SDS-объем коррелирует с содержанием высокомолекулярных глютенинов, в особенности с 5-й и 10-й субъединицами в локусе Glu-D1 (Yahata *et al.*, 2006).

Заключение

Изучены в сеялочных посевах по черному пару в течение 6 лет почти изогенные линии и рекомбинантные инбредные линии яровой мягкой пшеницы, отобранные из популяций от скрещивания генотипов, содержащих *Lr19*-транслокацию от *Agropyron elongatum* и 6Agⁱ(6D)-хромосому от *Agropyron intermedium*. Установлено, что эти линии по показателям ИДК-1 и SDS-объему существенно не отличаются от родительских генотипов. Однако у 2 из 4 рекомбинантных линий проявилась тенденция к снижению содержания клейковины.

Литература

- Бебякин В.М., Бунтина М.В. Эффективность оценки качества зерна яровой мягкой пшеницы по SDS-тесту // Вестн. с.-х. наук. 1991. № 1. С. 66–70.
- Бебякин В.М., Крупнова О.В., Сергеева А.И. Сбалансированность показателей качества зерна озимой пшеницы и их информативность // Матер. науч.-практ. конф., посвящ. 100-летию Вятской с.-х. опытной станции (Зональной НИИСХ Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого). Киров, 2005. Т. 1. С. 193–196.
- Козьмина Н.П., Кретович В.Л. Биохимия зерна и продуктов его переработки. М.: Заготиздат, 1950. 359 с.
- Крупнов В.А., Сибикеев С.Н. Чужеродные гены для улучшения мягкой пшеницы // Идентифицированный генофонд растений и селекция / Под ред. Б.В. Ригина, Е.И. Гаевской. СПб: ВИР, 2005. С. 740–758.
- Крупнов В.А., Сибикеев С.Н., Крупнова О.В. и др. Эффекты взаимодействия транслокаций от пырея удлиненного и пырея промежуточного в генофоне мягкой пшеницы // Аграрный вестн. Юго-Востока. 2010. № 1(4). С. 11–14.
- Крупнова О.В. Методические аспекты седиментационной оценки и отбора высококачественных генотипов яровой мягкой пшеницы в Поволжье: Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. Саратов, 1997. 19 с.
- Методические рекомендации по оценке качества зерна. М., 1977.
- Мелешкина Е.П. Современные аспекты качества зерна пшеницы // Аграрный вестн. Юго-Востока. 2009. № 3. С. 4–7.
- Сибикеев С.Н., Крупнов В.А. Эволюция листовой ржавчины и защита от нее пшеницы в Поволжье // Вестн. госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. 2007. Спецвыпуск. С. 92–94.
- Синиговец М.Е. Цитогенетические основы использования пырея в селекции пшеницы: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Киев, 1988. 49 с.
- Филатова Е.В., Сюков В.В., Анискина Н.В. Влияние пырейной транслокации T-5 на фракционный состав белка яровой мягкой пшеницы // Аграрный вестн. Юго-Востока. 2010. № 1 (4). С. 15–17.
- Cao S., Xu H., Li Z. *et al.* Identification and characterization of a novel *Ag. intermedium* HMW-GS gene from *T. aestivum*-*Ag. intermedium* addition lines TAI-I series // J. Cereal Sci. 2007. V. 45. P. 293–301.
- Garg M., Tanaka H., Ishikawa N. *et al.* *Agropyron elongatum* HMW-glutenins have a potential to improve wheat end-product quality through targeted chromosome introgression // J. Cereal Sci. 2009. V. 50. P. 358–363.
- McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J. *et al.* Catalogue of gene symbols for wheat. 2008. <http://www.grs.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/>.
- Sharma D., Knott D.R. The transfer of leaf rust resistance from *Agropyron* to *Triticum* by irradiation // Can. J. Genet. Cytol. 1966. V. 8. P. 137–143.
- Yahata E., Wakako M.F., Zenta N. *et al.* Relationship between the dough quality and content of specific glutenin proteins in wheat mill streams, and its application to making flour suitable for instant Chinese noodles // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2006. V. 70. P. 788–797.
- Zhang Z., Lin Z., Xin Z. Research progress in BYDV resistance genes derived from wheat and its wild relatives // J. Genet. Genomics. 2009. V. 36. P. 567–573.

**GLUTEN CONTENT AND QUALITY IN COMMON WHEAT
WITH TRANSLOCATIONS FROM *AGROPYRON ELONGATUM* HOST.
AND *AGROPYRON INTERMEDIUM* HOST.**

O.V. Krupnova, A.E. Druzhin, S.A. Voronina, V.A. Krupnov

Agricultural Research Institute for South-East Regions, Saratov, Russia,
e-mail: raiser_saratov@mail.ru

Summary

Recombinant inbred lines of common wheat (*Triticum aestivum*) selected from crosses between genotypes carrying *Lr19*-translocation from *Agropyron elongatum* and *6Agi(6D)*-chromosome from *Agropyron intermedium* were studied in drill sowing on black fallow for 6 years. It was found that these lines did not differ significantly from the parental genotypes in gluten deformation index or SDS-volume. However, gluten content tended to decrease in two of four lines.

Key words: common wheat, near-isolines, recombinant inbred lines, translocation, gluten content, gluten deformation index, SDS-volume.

ИНТРОДУКЦИЯ КАРИОТИПИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА ($2n = 36, 37, 38$) В ГЕНОМ ДОМАШНИХ СВИНЕЙ *SUS SCROFA DOMESTICA*

В.Н. Тихонов^{1, 2}, М.Л. Кочнева², В.Е. Бобович¹

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

² Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия, e-mail: mlkochneva@rambler.ru

На начальной стадии (40 лет назад) выведения миниатюрных лабораторных сибирских свиней (минисибс) методами отдаленной гибридизации домашних ландрасских и вьетнамских пород с дикими среднеазиатскими кабаном (*Sus scrofa nigripes*) были получены животные с кариотипом $2n = 36$, не встречающимся ни в одной породе домашних свиней. Изменения по числу хромосом в популяции минисибсов явились результатом ассоциации хромосом 16 и 17 в Робертсоновскую транслокацию Rb 16; 17.

В настоящее время после 20 поколений разведения лабораторных минисибсов устойчиво сохраняется интродуцированная «дикая» транслокация. Таким образом, популяция минисибсов характеризуется кариотипическим полиморфизмом, не известным у пород домашних свиней, что может быть использовано как генетический маркер для изучения функциональной значимости отдельных структурных локусов.

Ключевые слова: свиньи домашние и дикие, кариотипический полиморфизм, Робертсоновская транслокация, минисибсы.

Робертсоновская транслокация Rb 16; 17 в кариотипе свиней была впервые обнаружена в начале 1970-х гг. при выведении лабораторных свиней (минисибс) в результате скрещивания кабана среднеазиатского подвида *Sus scrofa nigripes* со свиньями пород шведский ландрас и вьетнамская масковая (рис. 1). Тогда же были изучены и описаны нами цитогенетические особенности этой транслокации (Тихонов и др., 1972, 1975). В дальнейшем были установлены отсутствие негативных последствий этой транслокации для репродуктивности свиней (Тихонов, Трошина, 1977) и возможность одновременного присутствия этой транслокации в другой сходной структурной перестройке Rb 15; 17, которая была обнаружена и изучена позднее (Tikhonov, Troshina, 1978). Транслокация Rb 16; 17 была обнаружена также в популяции скороспелой мясной породы СМ-1, куда она попала при выведении ландрас-кабаньих гибридов (Тихонов, Жучаев, 2008). Транслокация

Rb 16; 17 была обнаружена и в популяции лабораторных отечественных свиней, называемых «светлогорские», создание которых было достигнуто на основе племенной группы минисибсов, переданных из ИЦиГ СО АН СССР в АМН СССР в 1972 г. (Капанадзе, Юшкова, 2009; Тихонов, 2010).

В настоящее время лабораторные свиньи с маркерной транслокацией Rb 16; 17 составляют значительную группу племенных животных, разводимых на территории России. В 2010 г. после 20-летнего перерыва при цитогенетическом изучении было обнаружено большое число животных с этой транслокацией в питомнике ИЦиГ СО РАН.

Кариотипические особенности диких предковых форм лабораторных мини-свиней, как и всех других домашних свиней, изучены недостаточно. В наиболее авторитетном учебном пособии для университетов России В.Е. Соколова «Систематика млекопитающих» (1979) указыва-



Рис. 1. Кабан среднеазиатского подвида *Sus scrofa nigripes*, использованный в качестве одной из родительских форм минисибсов и микросибсов для укрепления конституции и интродукции кариотипического полиморфизма по транслокации Rb 16; 17 (фото В.Н. Тихонова).

ется только, что «диплоидное число хромосом у кабана 36» (С. 340). В монографии «Свиные» А.А. Данилкина (2002) приводится очень сомнительная, заведомо завышенная, численность 36-хромосомных кабанов Белоруссии – 66,6 % и одновременно утверждается, что у «среднеазиатских кабанов (в Киргизии) кариотип $2n = 38$ не найден» (С. 41). При этом автор цитирует несколько работ (Тихонов, Трошина, 1971, 1972, 1974, 1978), где показано, что у подавляющего большинства кабанов кариотип одинаков и по характеру дифференциальной окраски полностью соответствует кариотипу домашних свиней ($2n = 38$). В действительности же только у очень редких кабанов полиморфизм обусловлен робертсоновским слиянием акроцентрических хромосом 15-й и 17-й – у европейских и 16-й и 17-й – у азиатских форм.

Гибринологическое исследование диких и домашних свиней позволило впервые обнаружить и изучить наследование робертсоновской транслокации хромосомы Rb 16; 17 (рис. 2). Она была найдена у *S. s. nigripes* и изучена разными методами окрашивания при участии А.И. Трошиной (Тихонов и др., 1972; Tikhnov, Troshina, 1978), а в дальнейшем – и совместно с И. Густавссоном (Troshina *et al.*, 1985). Оказалось, что найденная aberrантная субметацентрическая хромосома

является функциональным генетическим аналогом двух акроцентрических хромосом диких и домашних свиней: 16-й и 17-й. При этом было установлено, что найденная ранее у европейского кабана робертсоновская транслокация в действительности является Rb 15; 17, т. е. образовалась центрическим слиянием акроцентрических хромосом 15 и 17, с которыми она является генетическим и функциональным гомологом.

Путем межподвидовой гибридизации впервые при разведении сельскохозяйственных животных были целенаправленно изменены обычно жестко стабилизированные параметры кариотипа по числу и форме хромосом. В кариотипе новых лабораторных свиней оказалось по 36 хромосом, в том числе 4 пары акроцентрических, тогда как у всех домашних свиней диплоидное число составляет 38 хромосом, включая 6 пар акроцентрических.

Некоторые трудности в получении жизнеспособного потомства наблюдали только в первых поколениях. Всего в первых 8 поколениях были изучены более 2 тыс. гибридов домашних свиней с дикими кабанями, имеющими транслоцированные мутантные хромосомы. Цитогенетически было исследовано более 1,5 тыс. потомков, полученных при гибридизации среднеазиатского и центральноевропейского

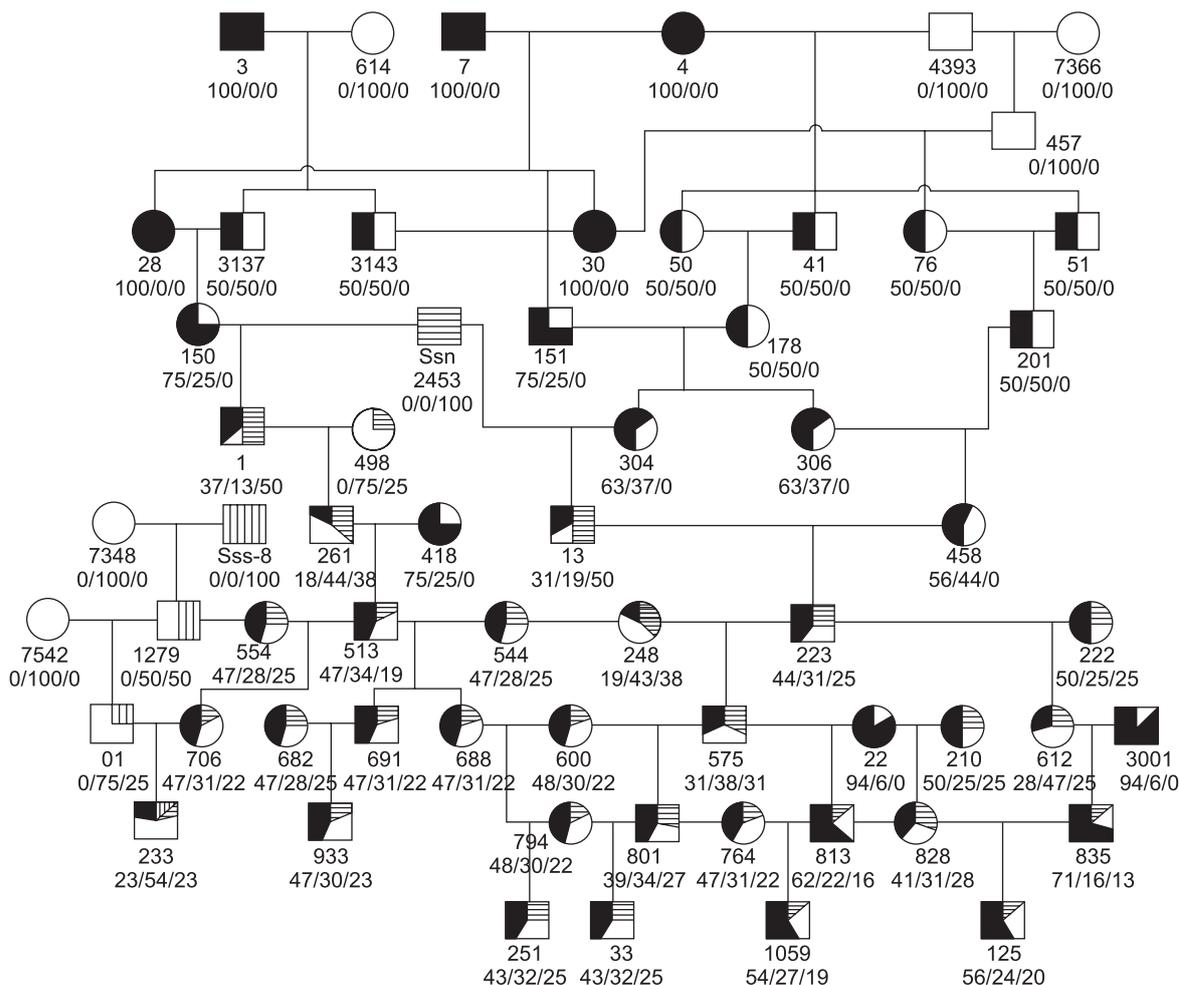


Рис. 2. Генеалогическая схема выведения первых поколений минисисгов с хромосомным полиморфизмом (Rb 15; 17 и Rb 16; 17).

Обозначения: белые квадрат и кружок обозначают соответственно хряков и маток с обычным кариотипом $2n = 38$; горизонтальной штриховкой обозначены животные с робертсоновской транслокацией Rb 16; 17 (из генома *Sus scrofa nigripes* – среднеазиатский кабан); вертикальной штриховкой – Rb 15; 17 (из генома *Sus scrofa scrofa* – центральноевропейский кабан). Квадраты и кружки, заштрихованные наполовину, обозначают гетерозиготность по соответствующей транслокации. Черные квадраты и кружки – исходные вьетнамская порода и дикие кабаны; три цифры под номером животного, показанные дробью, обозначают долю (в процентах) генома предков: вьетнамской и ландрасской пород и диких кабанов.

кабана с домашними свиньями европейского и азиатского происхождения. Жизнеспособность в пренатальный период была высокой: в среднем от каждой матки родилось 12,4 поросенка, в том числе 0,8 мертворожденных. Однако постнатальная жизнеспособность помесей F_1 с кариотипом $2n = 37$ (матки породы ландрас) резко снизилась: 77 % гибридов погибли в первые два месяца жизни. При возвратном скрещивании гибридных хряков F_1 и F_2 , имеющих кариотип $2n = 37$, с матками этой же породы наблюдалась нормальная жизнеспособность гибридов $F_{1в}$ и $F_{2в}$ как в пренатальный период, так и после

рождения, независимо от того, имели ли они 38 или 37 хромосом.

При разведении «в себе» свиней с кариотипом $2n = 37$ были получены гибриды с $2n = 38$, 37 и 36, которые фактически имели одинаковую жизнеспособность. В дальнейшем при получении гибридов F_2 – F_8 от последовательного скрещивания домашних свиней с двумя подвидами кабана и этих гибридов между собой было получено большое число животных, имевших одновременно два вида транслоцированных хромосом.

Цитологическое изучение мейоза у гибридов показало, что конъюгация хромосом протекает

нормально благодаря образованию тривалента из субметацентрической хромосомы Rb 16; 17 кабана и двух акроцентрических хромосом 16 или Rb 15; 17 домашних свиней.

Процедуру замещения хромосом у свиней проводили следующим образом. Для замещения хромосом 16 и 17 сначала скрещивали домашних свиней со среднеазиатским кабаном, гомозиготным по хромосомам Rb 16; 17, которые являются генетическим эквивалентом указанных двух хромосом (рис. 3). Затем возвратным скрещиванием «адаптировали» донорскую хромосому к экологическому фону генома реципиента. После этого полностью вытесняли оставшиеся гомологи хромосом 16 и 17 из генома реципиента. Полное замещение этих двух пар хромосом донорскими хромосомами Rb 16; 17 осуществляли путем скрещивания гетерозиготных по соответствующим транслокациям гибридов между собой. Присутствие донорской транслоцированной хромосомы в кариотипе реципиента легко распознается цитологически даже без дифференциальной окраски по числу хромосом ($2n = 37$ или 36). Реципиенты с кариотипом $2n = 36$ оказываются носителями одной гомологичной пары новых для них субметацентрических хромосом, заменяющих сразу 4 хромосомы.

В цитогенетическом аспекте кариотипический полиморфизм по диплоидному числу хромосом у минисибсов, обусловленный робертсоновскими транслокациями, – это уникальная особенность, которая отличает их не только от

всех других лабораторных мини-свиней, но и от всех других породных популяций. В разных странах мира сейчас разводят более 500 культурных и аборигенных популяций, у которых независимо от породной принадлежности диплоидное число хромосом $2n = 38$. Однако у минисибсов спустя 35 лет после их выведения в результате особенностей их происхождения и селекции на первом этапе их выведения, который проводили под цитогенетическим мониторингом, возник кариотипический полиморфизм, и число хромосом варьирует от 38 до 36 (табл. 1). Подобный внутривидовой кариотипический полиморфизм по числу хромосом остается малоизученным и очень редким явлением у сельскохозяйственных животных.

Относительное число животных с аномальными кариотипами $2n = 37$ и $2n = 36$ к началу разведения популяции минисибсов «в себе» значительно увеличилось и достигло соответственно 48 и 31 %. При этом следует учитывать то, что уменьшение числа хромосом в кариотипе мини-свиней обусловлено двумя центрическими робертсоновскими транслокациями: слиянием в одних случаях 17-й хромосомы с 15-й, а в других – с 16-й хромосомой. А у некоторых животных с кариотипом $2n = 36$ оказалось одновременное присутствие обеих транслокаций (Rb 15; 17 и Rb 16; 17).

Описанная цитогенетическая особенность позволила начать разработку на минисибсах методов селекции с учетом маркерных хромосом, в частности направленных на получение

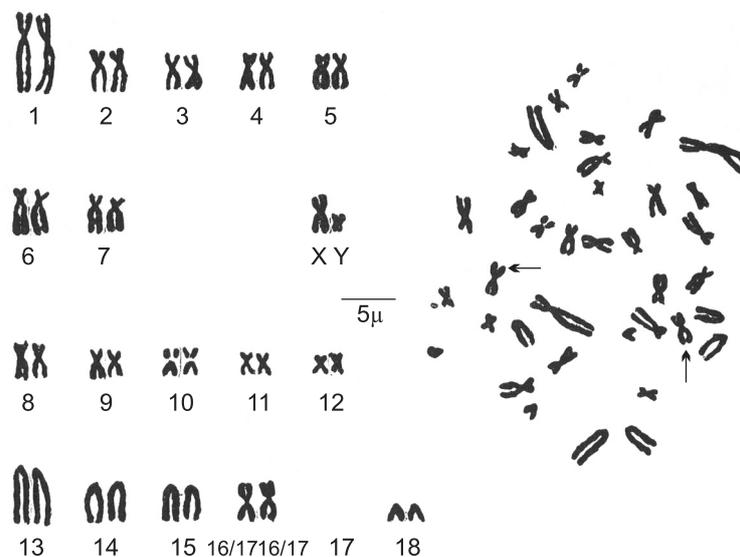


Рис. 3. Метафазные хромосомы и кариотип гибридного хряка минисибса, гомозиготного по хромосоме Rb 16; 17 (в отличие от домашних свиней он имеет не 38, а 36 хромосом).

Стрелками указана робертсоновская транслокация (слияние хромосом Rb 16 и Rb 17).

Таблица 1

Наследование числа хромосом при разных типах скрещивания в популяции минисибсов

Тип скрещивания (кариотипы отца × матери)	n	Количество потомков с числом хромосом:					
		2n = 38		2n = 37		2n = 36	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%
38 × 38	64	64	100	–	–	–	–
38 × 37	243	130	53,5	113	46,5	–	–
38 × 36	344	–	–	344	100	–	–
37 × 37	67	20	29,8	30	44,8	17	25,6
37 × 36	57	–	–	31	54,4	26	45,6
36 × 36	119	–	–	–	–	119	100

моноспецифических антител, а также ди- и полихромосомного гетерозиса. Кроме того, это дает возможность изучить генетическую функцию идентифицированных отдельных хромосом в формировании животных реципиентов с теми или другими полезными признаками. Все основные племенные самцы к концу первого десятилетия после выведения уже имели кариотип $2n = 36$, а большинство маток – кариотипы $2n = 37$ и $2n = 36$. Следует отметить, что, несмотря на интродукцию и поддержание кариотипического полиморфизма многоплодие животных не понизилось, а постепенно повышалось. Кариотипический полиморфизм позволил провести первые картирования идентифицированных локусов на 15-й и 17-й хромосомах свиней и начать разработку

селекционных методов с использованием хромосомных маркеров.

При изучении хромосомного полиморфизма популяции минисибсов спустя 30 лет после начала их выведения и селекции, когда было исследовано 512 животных, число животных с кариотипом $2n = 38$ было только 104 (20,4%), с кариотипом $2n = 36$ – 160 голов (31,2%), а гетерозиготных с кариотипом $2n = 37$ почти половина: 248 голов (48,4%). При переходе к разведению нового поколения микросибсов в июле 2010 г. число животных с робертсоновской транслокацией во всех 4 линиях в популяции сохраняется на этом же уровне, т. е. значительно превышает число особей с нормальным для обычных домашних свиней кариотипом $2n = 38$ (рис. 4, 5).



Рис. 4. Микросибс № 19 с 36-хромосомным гомозиготным кариотипом по транслокации Rb 16; 17. Родился от хряка № 143 и матки № 212. Живая масса в возрасте 7 мес. – 10 кг, в 12 мес. – 28 кг.

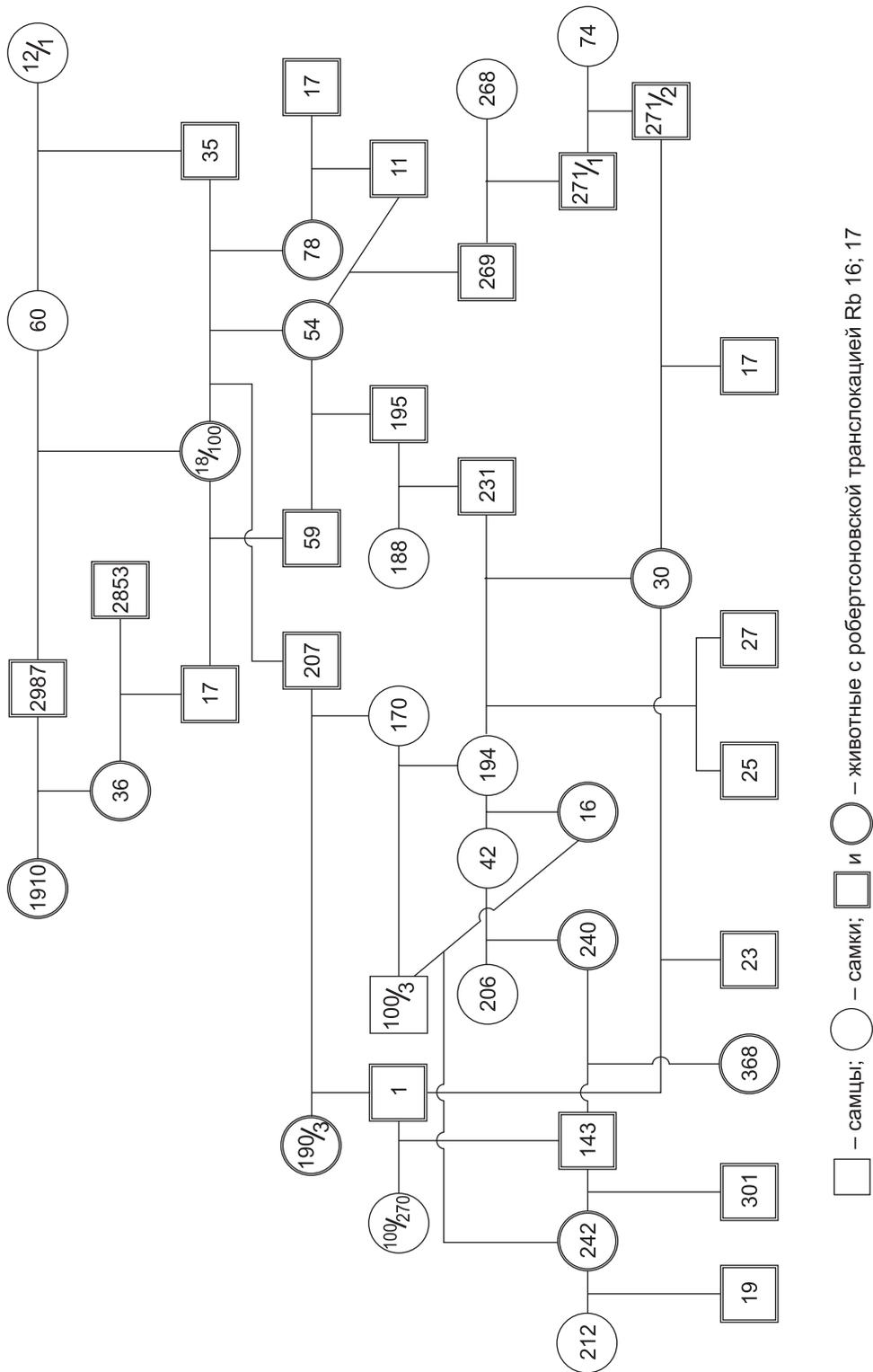


Рис. 5. Генеалогическая схема наследования робертсоновской транслокации Rb 16; 17 у микросибсов, родившихся в 1990–2009 гг.

Литература

- Данилкин А.А. Свиные (Suidae). Млекопитающие России и сопредельных регионов. М.: ГЕОС, 2002. 309 с.
- Капаназде Г.Д., Юшкова Л.Г. Цитогенетические параметры мини-свиней светлогорской популяции // Тез. докл. междунар. науч.-практ. конф., посвященной 60-летию зоотехнической науки Беларуси (22–23 октября 2009 г.). Жодино, 2009. С. 68–69.
- Соколов В.Е. Систематика млекопитающих. М.: Высш. шк., 1979. 528 с.
- Тихонов В.Н. Лабораторные мини-свиньи, генетика и медико-биологическое использование. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2010. 304 с.
- Тихонов В.Н., Жучаев К.В. Микроэволюционная теория и практика породообразования свиней. Новосибирск: СП «Наука» РАН, 2008. 394 с.
- Тихонов В.Н., Трошина А.И. Кариотип некоторых пород свиней в связи с их филогенезом // С.-х. биология. 1971. № 6. С. 874–881.
- Тихонов В.Н., Трошина А.И. Идентификация хромосом и их перестроек в кариотипах подвидов дикого кабана *Sus scrofa scrofa* методом дифференциальной окраски // Докл. АН СССР. 1974. Т. 214. № 4. С. 932–935.
- Тихонов В.Н., Трошина А.И. Плодовитость и жизнеспособность трех поколений гибридов, полученных при скрещивании домашних и диких свиней с разным числом хромосом // Генетика. 1977. № 4. С. 627–636.
- Тихонов В.Н., Трошина А.И. Получение гибридов диких и домашних свиней с двумя хромосомными транслокациями // Докл. АН СССР. 1978. Т. 219. № 3. С. 713–716.
- Тихонов В.Н., Трошина А.И., Горелов И.Г. Цитогенетическое исследование дальневосточных и среднеазиатских диких кабанов и домашних свиней // Изв. СО АН СССР. 1972. № 10. Вып. 2. С. 87–93.
- Troshina A., Gustavsson I., Tikhonov V. Investigation of two centric fusion translocations of wild pigs by different banding techniques // Hereditas. 1985. V. 102. № 1. P. 155–158.
- Tikhonov V.N., Troshina A.I. Chromosome translocation in the karyotypes of wild boar *Sus scrofa* L. of the European and the Asian Areas of USSR // Theor. Appl. Genet. 1975. V. 45. P. 304–308.
- Tikhonov V.N., Troshina A.I. Introduction of two chromosomal translocations of *Sus scrofa nigripes* and *S. s. scrofa* into genome of *S. s. domestica* // Theor. Appl. Genet. 1978. V. 53. P. 261–264.

INTRODUCTION OF KARYOTYPE POLYMORPHISM ($2n = 36; 37; 38$) INTO THE GENOME OF DOMESTIC PIGS *SUS SCROFA DOMESTICA*

V.N. Tikhonov^{1,2}, M.L. Kochneva², V.E. Bobovich¹

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

² Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia, e-mail: mlkochneva@rambler.ru

Summary

At the initial stage (40 years ago) of the origination of Siberian laboratory pigs (Minisibs) by distant hybridization of Landraces and Vietnamese pigs with wild Mid-Asian pigs (*Sus scrofa nigripes*) animals with the $2n = 36$ karyotype not known in any *Sus scrofa domestica* variety were obtained. The change in the number of chromosomes in this pigs population resulted from the association of two pairs of the chromosomes 16 and 17 involved into translocation rob(16; 17).

At present, stable maintenance of the introduced «wild pig» translocation has been observed since Minisibs generation 20. The Minisibs population is characterized by karyotypic polymorphism unknown in domestic pigs. About half of the miniature pig population (48,4 % and 31,2 %) possess the «wild» translocation ($2n = 37$ and 36, respectively), and the rest of the population (20,4 %) are «domestic» homozygous animals ($2n = 38$). The animals possessing the introduced translocation are similar to those with the normal karyotype in reproductive indices. The karyotypic polymorphism can be a genetic marker. It can also be used in studies of the functional roles of particular loci.

Key words: domestic and wild pigs, karyotypic polymorphism, Rob translocation, Minisibs.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ И ЧАСТОТЫ ИНВЕРСИОННЫХ РАЗРЫВОВ В ГЕНОМАХ ВИДОВ *CHIRONOMUS* (DIPTERA, CHIRONOMIDAE)

А.Д. Брошков^{1,2}, Л.А. Мирошниченко³, И.И. Кикнадзе¹, В.Д. Гусев³

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

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия;

³ Учреждение Российской академии наук Институт математики
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия

Проведена оценка локализации и частот инверсионных разрывов в геномах 115 видов рода *Chironomus* из двух цитоконплексов (*pseudothummi* и *thummi*), отличающихся наличием реципрокных транслокаций целых плеч в двух хромосомах (**AE CD BF G** и **AB CD EF G** соответственно). Определены частоты и общее количество инверсионных разрывов, накопленных в геномах видов этих цитоконплексов за всю историю их цитогенетической эволюции. Всего выявлено 288 точек инверсионных разрывов: 55 в плече А, 34 в плече Е, 61 в плече F, 55 в плече С, 83 в плече D. Выявлены четыре категории точек разрывов по частоте их встречаемости: 1) 15 точек с максимальной частотой, отражающих локализацию границ наиболее древних космополитных инверсий; 2) многочисленные общие для обоих цитоконплексов точки разрывов; 3) специфические для каждого из цитоконплексов точки разрывов; 4) консервативные участки, в которых не выявляются инверсионные разрывы. Показано, что различные комбинации хромосомных плеч в двух транслоцированных хромосомах влияют на распределение точек инверсионных разрывов во всем геноме.

Ключевые слова: *Chironomus*, политенные хромосомы, последовательности дисков, инверсионные разрывы, хромосомная эволюция.

Введение

Итоги сравнительной геномики животных, основывавшейся на молекулярном анализе геномов и протеомов, свидетельствуют о том, что дивергенция геномов в процессе видообразования происходит в основном за счет хромосомных перестроек, менявших порядок генов в группах сцепления. Оказалось, что геномы таких эволюционно далеких видов, как человек, мышь, дрозофила, малярийный комар, различаются прежде всего молекулярными инверсиями, дубликациями, перемещением и др., а не числом и спектром генов (Kumar *et al.*, 2001; Zdobnov *et al.*, 2002; Marques-Bonet *et al.*, 2004; Severson *et al.*, 2004; Ayala, Coluzzi, 2005; Bhutkar *et al.*, 2008; Kirkpatrick, 2010). Сходные заключения были сделаны и цитогенетиками, изучающими хромосомную эволюцию (Dobzhansky, 1970; White, 1977; King, 1993; Eichler, Sankoff, 2003;

Kiknadze *et al.*, 2003, 2008; Navarro, Barton, 2003; Severson *et al.*, 2004; Гундерина и др., 2005в). Ими было продемонстрировано, что дивергенция кариотипов животных обусловлена такими перестройками, как пара- и перичентрические инверсии, изменяющие порядки генов. Визуально изменение порядка генов в хромосомах при видообразовании можно проследить у видов двукрылых насекомых, обладающих политенными хромосомами с четкими последовательностями дисков, специфическими для каждого вида (Bridges, 1935; Muller, 1936; Beermann, 1972). Эти диски могут быть использованы как структурные маркеры порядков генов в хромосомах двукрылых насекомых.

Ранее мы провели сравнительный анализ последовательностей дисков политенных хромосом у видов рода *Chironomus* и оценили степень их видовой дивергенции на основании определения числа инверсионных точек разры-

вов (Kiknadze *et al.*, 2003, 2008). Для этого был специально модифицирован разработанный нами метод попарного сравнения последовательностей дисков (Гусев и др., 2001; Kiknadze *et al.*, 2003). На основании оценки числа точек инверсионных разрывов в кариотипах хирономид были построены филогенетические деревья и реконструирована хромосомная эволюция рода *Chironomus* (Kiknadze *et al.*, 2003; Гундерина и др., 2005а, б; Кикнадзе и др., 2007).

Поскольку эволюция кариотипов в роде *Chironomus* была связана прежде всего с реципрокными транслокациями целых хромосомных плеч, было важно выяснить, влияет ли объединение разных плеч (групп сцепления генов) в одну хромосому на процесс хромосомных перестроек (частоту разрывов и точки разрывов) в эволюции. Для этой цели в данной работе было проведено детальное сравнение инверсионных разрывов в двух крупнейших цитоконкомплексах *pseudothummi* и *thummi*. Эти цитоконкомплексы различаются разной комбинацией хромосомных плеч (рис. 1). В цитоконкомплексе *pseudothummi* комбинация плеч АЕ CD ВF G, тогда как в цитоконкомплексе *thummi* она другая – АВ CD EF G.

В настоящей работе проведена оценка локализации и частот инверсионных разрывов по длине пяти хромосомных плеч в геноме видов *Chironomus* из двух цитоконкомплексов (*pseudothummi* и *thummi*). Были определены частоты и общее количество инверсионных разрывов, накопленных в геномах видов за всю историю их цитогенетической эволюции. Также были оценены размеры консервативных участков, в которых не выявляются инверсионные разрывы.

Материалы и методы

Для анализа использовались последовательности дисков политенных хромосом 54 видов рода *Chironomus* из цитоконкомплекса *pseudothummi* и 61 вида из цитоконкомплекса *thummi* (табл. 1). Последовательности хромосом остальных видов взяты нами из работ других исследователей (Martin, 1971; Wulker *et al.*, 1989; Шобанов, Зоотов, 2001).

Необходимо отметить, что к настоящему времени удалось получить сведения о последо-

вательностях дисков у одних видов только для 3 хромосомных плеч (А, Е, F), у других – для 5 хромосомных плеч (А, С, D, Е, F). Для компьютерного анализа в данной работе были использованы лишь основные видоспецифические последовательности дисков для каждого вида, так как эти последовательности сформированы фиксированными в эволюции инверсиями (Kiknadze *et al.*, 2003, 2004; Кикнадзе и др., 2007). Альтернативные, редкие и уникальные последовательности не были включены в анализ, поскольку они чаще всего встречаются в гетерозиготе и являются флукутирующими.

В работе использован быстрый метод выявления взаимосвязей в подборках функционально и/или эволюционно близких биологических тестов (Гусев и др., 2001; Kiknadze *et al.*, 2003).

Результаты

Анализ локализации и частот инверсионных разрывов лучше всего рассматривать на примере каждого из изученных хромосомных плеч.

Плечо А. Выявлено 55 сайтов локализации точек инверсионных разрывов (рис. 2). Среди них четко выявляются по максимальной частоте (около 90 %) 4 сайта. Частоты разрывов в этих сайтах практически одинаковы в обоих цитоконкомплексах. Указанные сайты выявляются как точки разрывов в космополитных базовых последовательностях дисков, наиболее древних в роде *Chironomus*, обнаруженных ранее на 4–5 континентах (Кикнадзе и др., 2007).

Помимо того, встречаются сайты инверсионных точек разрывов, одинаковые для обоих цитоконкомплексов, но различающиеся по частоте.

Кроме того, важно отметить, что в плече А найдены сайты, специфические либо для

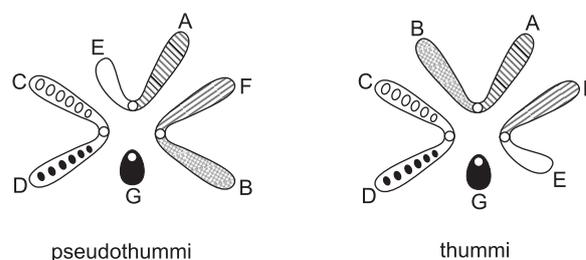


Рис. 1. Транслокационные различия в цитоконкомплексах *pseudothummi* и *thummi* (по: Keyl, 1962).

Таблица 1

Список исследованных видов рода *Chironomus**

Цитоккомплекс pseudothummi	Цитоккомплекс thummi
<i>C. acidophilus</i> , <i>C. alluaudi</i> , <i>C. analis</i> , <i>C. anonymus</i> , <i>C. aprilius</i> , <i>C. australis</i> , <i>C. calipterus</i> , <i>C. cloacalis</i> , <i>C. circumdatus</i> , <i>C. crassiforceps</i> , <i>C. crassimanus</i> , <i>C. sp. CA3</i> , <i>C. sp. CoyoteCreek</i> , <i>C. dorsalis</i> , <i>C. duplex</i> , <i>C. februaris</i> , <i>C. forsythi</i> , <i>C. sp. Gali</i> , <i>C. holomelas</i> , <i>C. incertipenis</i> , <i>C. jacksoni</i> , <i>C. luridus</i> , <i>C. sp. LasBrisas</i> , <i>C. maddeni</i> , <i>C. melanescence</i> , <i>C. sp. MeerenbergA</i> , <i>C. sp. MeerenbergB</i> , <i>C. nepeanensis</i> , <i>C. sp. NZ1</i> , <i>C. sp. NZ5</i> , <i>C. sp. NZ6</i> , <i>C. sp. NZ8</i> , <i>C. occidentalis</i> , <i>C. oppositus</i> , <i>C. pankratovae</i> , <i>C. plumatisetigerus</i> , <i>C. pseudooppositus</i> , <i>C. pseudothummi</i> , <i>C. sp. RiodeJaneiroA</i> , <i>C. sp. RiodeJaneiroB</i> , <i>C. samoensis</i> , <i>C. saxatilis</i> , <i>C. striatipennis</i> , <i>C. sp. SS</i> , <i>C. tepperi</i> , <i>C. timmsi</i> , <i>C. transvaalensis</i> , <i>C. uliginosus</i> , <i>C. uliginosus2</i> , <i>C. yoshimatsui</i> , <i>C. sp. VillaPaz</i> , <i>C. sp. WOC</i> , <i>C. sp. X</i> , <i>C. zealandicus</i>	<i>C. aberratus</i> , <i>C. acutiventris</i> , <i>C. agilis</i> , <i>C. agilis2</i> , <i>C. albimaculatus</i> , <i>C. annularius</i> , <i>C. anthracinus</i> , <i>C. sp. AppleValley</i> , <i>C. arcustylus</i> , <i>C. atrella</i> , <i>C. behningi</i> , <i>C. beljaninae</i> , <i>C. bifurcatus</i> , <i>C. blaylocki</i> , <i>C. bonus</i> , <i>C. borokensis</i> , <i>C. cingulatus</i> , <i>C. commutatus</i> , <i>C. crassicaudatus</i> , <i>C. cucini</i> , <i>C. entis</i> , <i>C. esai</i> , <i>C. fraternus</i> , <i>C. frequentatus</i> , <i>C. fundatus</i> , <i>C. harpi</i> , <i>C. heterodontatus</i> , <i>C. heteropilicornis</i> , <i>C. hyperboreus</i> , <i>C. sp. Is</i> , <i>C. jonmartini</i> , <i>C. sp. J</i> , <i>C. longistylus</i> , <i>C. sp. Le</i> , <i>C. melanotus</i> , <i>C. mozleyi</i> , <i>C. muratensis</i> , <i>C. nigrifrons</i> , <i>C. novosibiricus</i> , <i>C. nuditarsis</i> , <i>C. nudiventris</i> , <i>C. obtusidens</i> , <i>C. pilicornis</i> , <i>C. piger</i> , <i>C. plumosus</i> , <i>C. riihimakiensis</i> , <i>C. riparius</i> , <i>C. salinarius</i> , <i>C. sinicus</i> , <i>C. sokolovae</i> , <i>C. sororius</i> , <i>C. staegeri</i> , <i>C. stigmaterus</i> , <i>C. suwai</i> , <i>C. tenuistylus</i> , <i>C. trabicola</i> , <i>C. tuvanicus</i> , <i>C. utahensis</i> , <i>C. whitseii</i> , <i>C. sp. W</i> , <i>C. winnelli</i>

* Выделены виды, последовательности которых изучены в секторе эволюционной геномики хирономид ИЦиГ СО РАН.

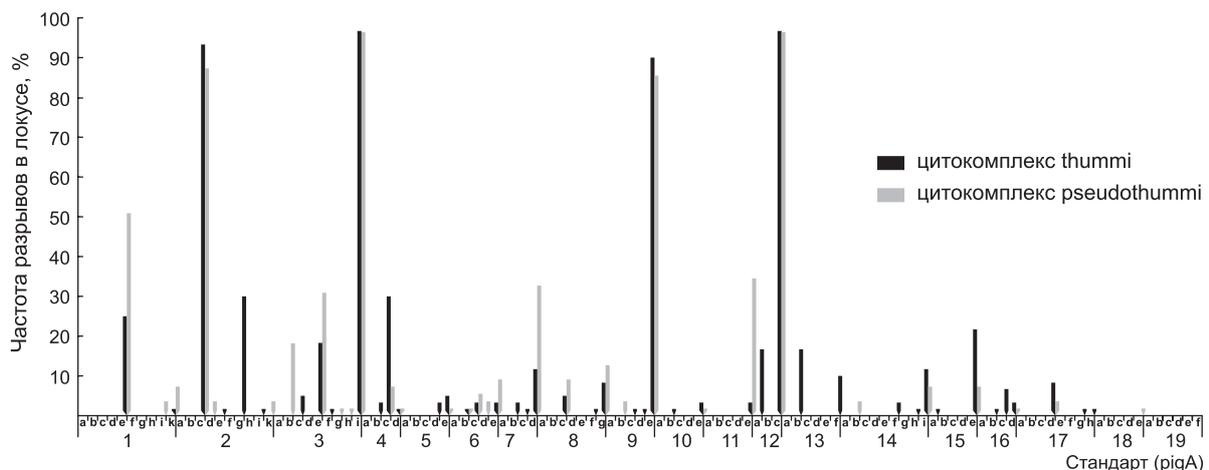


Рис. 2. Локализация и частоты разрывов в плече А.

цитоккомплекса *pseudothummi*, либо для цитоккомплекса *thummi*. Причем частота таких точек разрывов варьирует от умеренной (30 %) до низкой (2 %), их можно рассматривать как уникальные для цитоккомплексов районы.

Участки, не затронутые инверсионными разрывами (консервативные районы) в плече А, довольно малы: разрывы распределены равномерно по хромосоме, при этом остаются свободными от 2 до 4 дисков. Единственными областями, почти не затронутыми инверсиями, являются районы 18 и 19. В цитоккомплексе *pseudothummi* на границе 18-го и 19-го районов

находится одна точка разрыва с малой частотой, а в цитоккомплексе *thummi* на границе 17-го и 18-го районов обнаружены две точки разрыва.

Плечо Е. Для плеча Е выявлены 34 сайта локализации точек инверсионных разрывов (рис. 3). Характерной особенностью этого плеча является наличие только двух космополитных базовых точек разрывов с максимальной частотой в обоих цитоккомплексах (3e-f и 10b-c). Кроме того, имеется один сайт в районе 4h-5a, где максимальная частота обнаружена только в цитоккомплексе *thummi* (85 %), в цитоккомплексе *pseudothummi* частота разрывов едва достигает

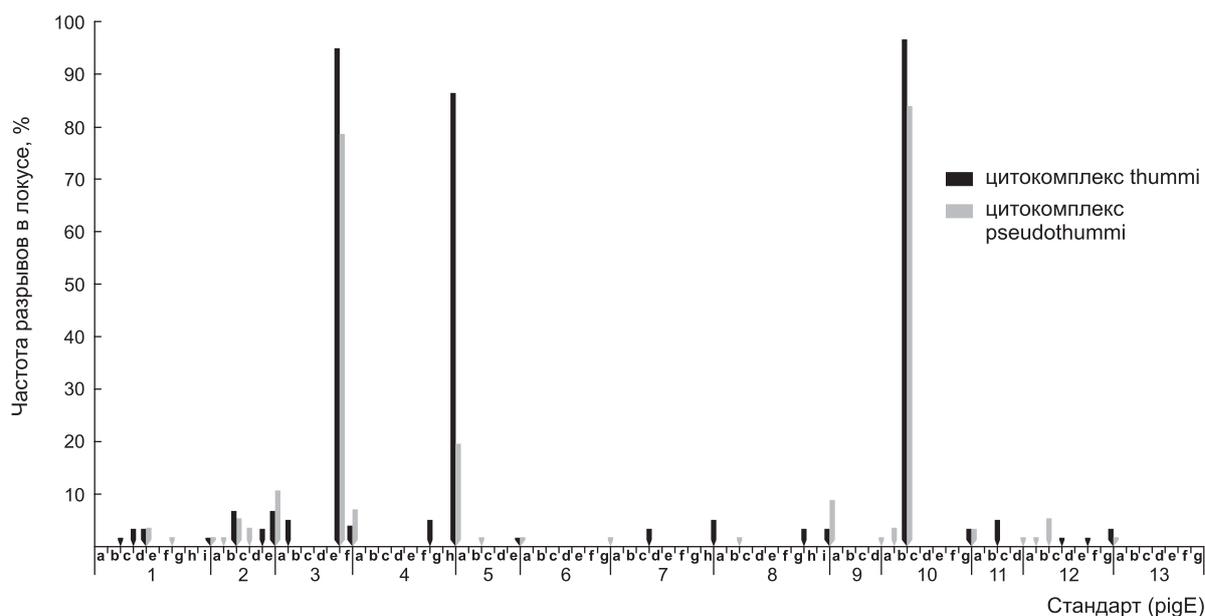


Рис. 3. Локализация и частоты разрывов в плече E.

20%. Остальные точки инверсионных разрывов встречаются с очень малой частотой.

Общими для обоих цитоконплексов являются 9 точек инверсионных разрывов, они незначительно различаются по частоте между цитоконплексами и, как уже говорилось, встречаются с очень малой частотой.

Специфическими для цитоконплекса *pseudothummi* являются 11 сайтов инверсионных разрывов, для цитоконплекса *thummi* также найдено 11 сайтов.

Консервативные районы в плече E малы (2–4 диска), за исключением в центральной части плеча и в районе 13 у центромеры.

Плечо F. В данном плече найден 61 сайт локализации точек инверсионных разрывов (рис. 4). Из них наибольший интерес представляют три района: 10d–11a – район разрыва, встречающегося в базовой последовательности с максимальной частотой в обоих цитоконплексах, 2a–b – район с максимальной частотой для цитоконплекса *pseudothummi* и 17d–18a – район с максимальной частотой для цитоконплекса *thummi*. В этом плече присутствуют общие точки разрывов, одинаковые для обоих цитоконплексов, но различающиеся по частоте.

Кроме того, встречается и несколько специфических для каждого из цитоконплексов точек инверсионных разрывов: 15 для цитоконплекса *pseudothummi* и 26 для цитоконплекса *thummi*.

Консервативные участки плеча в основном малы (2–4 диска), но в отличие от остальных плеч в плече F есть большой участок, не затронутый инверсионными разрывами, – прицентромерный район 20c–23f.

Плечо C. Так же, как и в других плечах, точки инверсионных разрывов равномерно распределены по всей длине плеча C (рис. 5). Насчитывается 55 сайтов локализации инверсионных разрывов. Базовыми точками с максимальной частотой в обоих цитоконплексах являются три сайта в районах 6h–7a, 15e–16a, 17a–b. Кроме того, для цитоконплекса *thummi* выявлены дополнительные сайты с максимальной частотой разрывов 6b–c, 6f–g, 7d–8a, 11c–d. В цитоконплексе *pseudothummi* в этих районах также встречены разрывы, но с гораздо меньшей частотой.

Так же, как и для других плеч, в плече C присутствуют точки разрывов, одинаковые для обоих цитоконплексов, однако они очень сильно различаются по частоте.

Специфическими для каждого из цитоконплексов точками являются 10 сайтов для цитоконплекса *pseudothummi* и 30 сайтов для цитоконплекса *thummi*.

В данном плече участки, не затронутые инверсиями, также малы (2–5 дисков), исключение – прицентромерный район 19–22 с единичными сайтами разрывов.

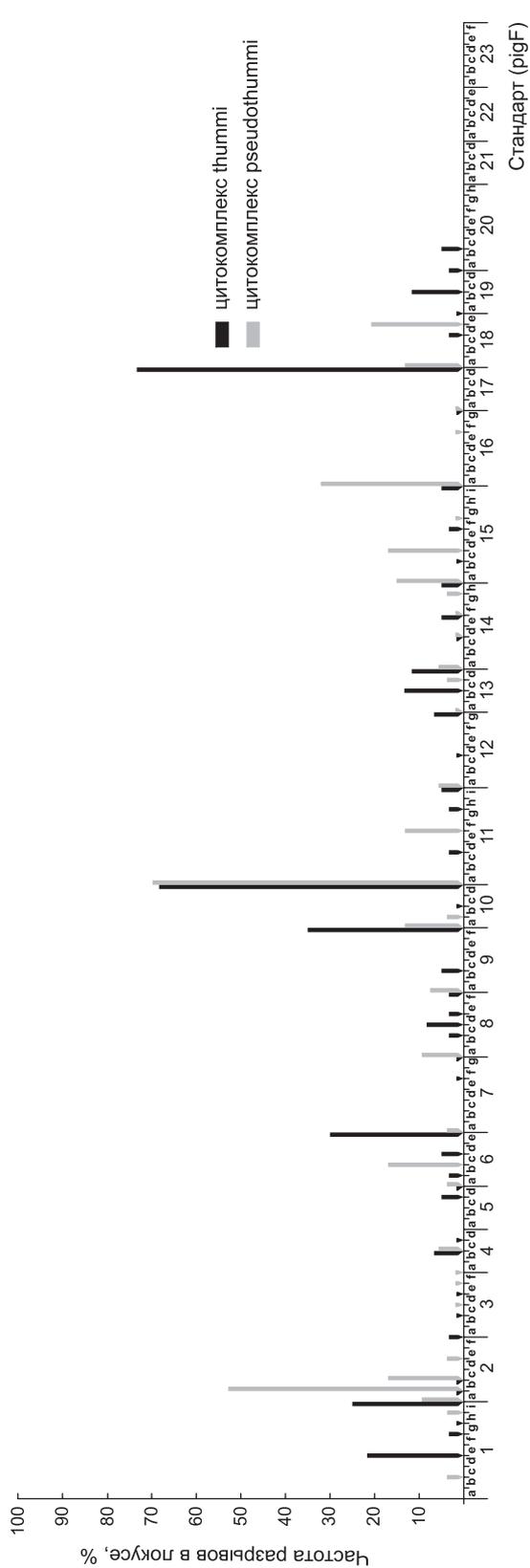


Рис. 4. Локализация и частоты разрывов в плече F.

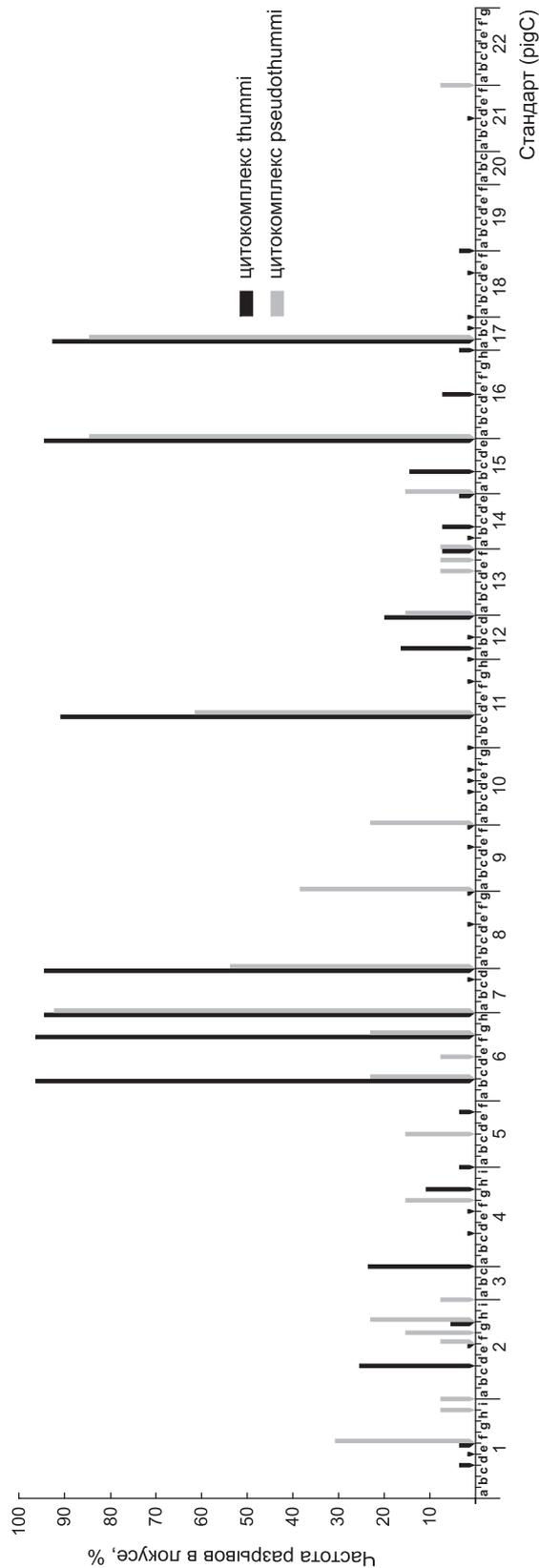


Рис. 5. Локализация и частоты разрывов в плече С.

Плечо D. Для данного плеча характерно наибольшее число сайтов локализации точек инверсионных разрывов – 83 (рис. 6). Особенностью данного плеча можно назвать отсутствие базовых точек с максимальной частотой, идентичной в обоих цитоконкомплексах. Однако в каждом из цитоконкомплексов найдены сайты с довольно высокой частотой встречаемости: 2h–3a для цитоконкомплекса *pseudothummi* и 3g–4a, 7g–8a, 10e–11a, 18de для цитоконкомплекса *thummi*.

Так же, как и в плече С, в данном плече сходные точки разрывов очень отличаются по частоте у разных цитоконкомплексов.

Сайты 2h–3a и 18d–e являются специфическими для цитоконкомплексов *pseudothummi* и *thummi* соответственно. В общей сложности найден 21 сайт локализации уникальных точек разрывов для цитоконкомплекса *pseudothummi* и 37 сайтов, характерных только для цитоконкомплекса *thummi*.

Для плеча D характерно отсутствие целых районов плеча без точек инверсионных разрывов, консервативные участки малы (2–4 диска).

Обсуждение

Анализ локализации и частот инверсионных разрывов у 115 видов рода *Chironomus* показал, что общая картина хромосомных разрывов в процессе видообразования оказывается в основном сходной во всех изученных хромосомных плечах (А, Е, F, С и D).

Многочисленные сайты инверсионных разрывов, накопленные за всю цитогенетическую историю цитоконкомплексов, были обнаружены во всех изученных хромосомных плечах. Они распределены практически по всей длине плеч.

В каждом из плеч четко выявляются несколько сайтов (2–4) с максимальной частотой разрывов (70–90%). Их локализация идентична у обоих цитоконкомплексов. Нами было выявлено, что данные точки разрывов являются границами инверсий в космополитных базовых последовательностях дисков в роде *Chironomus*. Данные последовательности – наиболее примитивные, древние, они встречаются на 4–5 континентах во всех плечах (Кикнадзе и др., 2007).

Точки разрывов с меньшей частотой встречаются в базовых последовательностях, найденных на 2–3 континентах.

Обнаруженные нами разрывы с малой частотой являются границами инверсий в последовательностях, встречающихся на отдельных континентах.

Консервативные участки, как правило, очень малы (2–4 диска). Исключение составляют лишь прицентромерные районы плеч, где плотность разрывов мала, а консервативные участки крупнее (до 20 дисков).

Кроме вышесказанного, в ходе анализа были установлены и различия между отдельными плечами (табл. 2). Наиболее изменчивым оказалось плечо D, наименее – плечо Е. Различными оказались число и частота базовых точек разрывов. Наиболее четко общая картина локализации и частот выражена в плечах А, Е и F, наименее четко это прослеживается в плечах С и D. Последнее связано с тем, что эти плечи очень изменчивы, особенно плечо D. Немаловажно и то, что плечи С и D изучены у меньшего числа видов.

Несмотря на то что основное число точек инверсионных разрывов является сходным в гомологичных плечах обоих цитоконкомплексов, в них обнаруживаются и четкие различия по локализации и частотам отдельных точек (табл. 2). Во-первых, обнаружено различное количество космополитных точек разрывов в изученных цитоконкомплексах. Во-вторых, выявлено наличие большого числа специфических для каждого из цитоконкомплексов точек разрывов, что свидетельствует о разных путях дивергенции этих цитоконкомплексов после их разделения. В-третьих, в изученных цитоконкомплексах наибольшие различия затрагивают плечи А, Е и F, что связано с тем, что эти плечи участвуют в реципрокных транслокациях. Однако наличие подобных специфических различий в плечах С и D (не вовлеченных в транслокационные изменения) говорит о влиянии сочетания различных плеч на распределение точек инверсионных разрывов во всем геноме.

Полученные нами результаты вполне согласуются с имеющимися в литературе данными о высокой частоте точек инверсионных разрывов в геномах большинства изученных видов. Конечно, молекулярный анализ позволяет обнаружить значительно большее число инвертированных участков в геномах, чем цитогенетический анализ (Kirkpatrick, 2010), однако оба подхода представляют взаимодополняющий материал

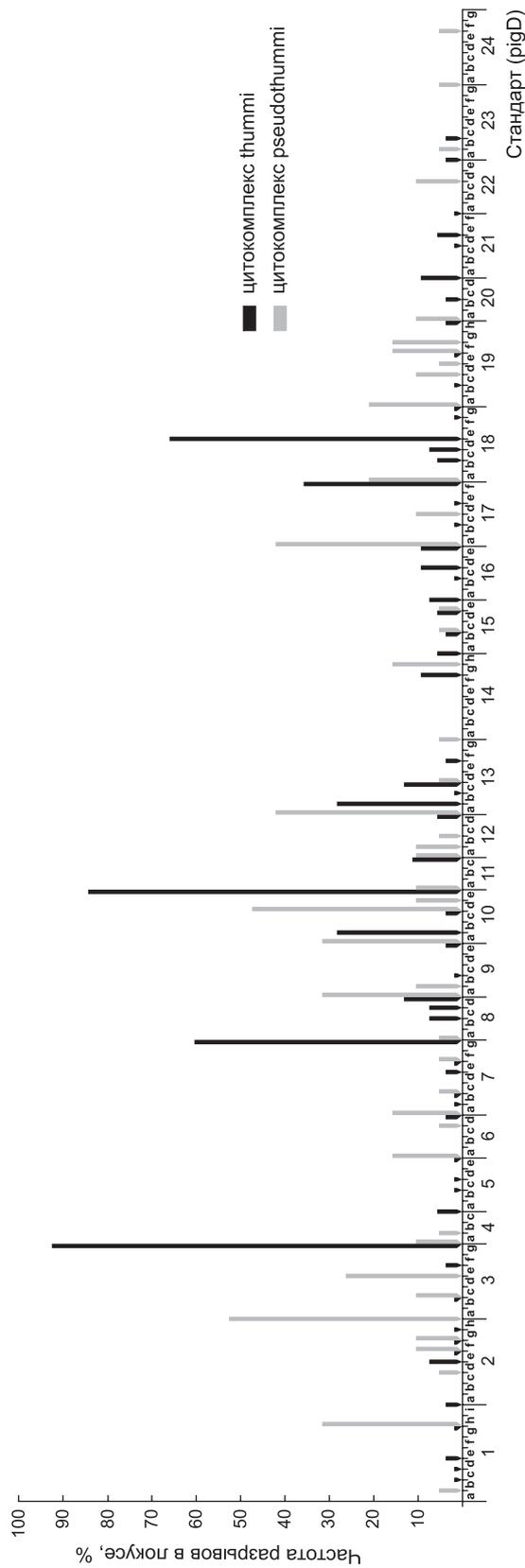


Рис. 6. Локализация и частоты разрывов в плече D.

Таблица 2
Сравнение частот точек разрыва в плечах хромосом цитокмпллексов pseudothummi и thummi

Плечо	Общее число инверсионных разрывов	Число разрывов с максимальной частотой	Число разрывов с максимальной частотой в отдельном цитокмпллексе	Специфические инверсионные разрывы цитокмпллекса	
				pseudothummi	thummi
A	55	4	-	11	23
E	34	2	+1-thu	11	11
F	61	1	+1-pst / +1-thu	15	27
C	55	3	+4-thu	10	30
D	83	1	2-thu	21	37

для развития инверсионной геномики. Сочетание обоих подходов было продемонстрировано при анализе инверсионных перестроек у 12 видов *Drosophila* (Bhutkar, 2008), показавшем, что изучение инверсий позволяет достаточно точно восстановить цитогенетическую историю видов.

Литература

- Гундерина Л.И., Кикнадзе И.И., Истомина А.Г. и др. Дивергенция последовательностей дисков политенных хромосом как отражение эволюционных преобразований линейной структуры генома // Генетика. 2005а. Т. 41. № 2. С. 187–195.
- Гундерина Л.И., Кикнадзе И.И., Истомина А.Г. и др. Особенности дивергенции последовательностей дисков в разных плечах политенных хромосом отражают относительную независимость эволюции отдельных компонентов генома // Генетика. 2005б. Т. 41. № 4. С. 549–558.
- Гундерина Л.И., Кикнадзе И.И., Истомина А.Г., Голыгина В.В. Изменчивость и дивергенция мультилокусных маркеров генома у видов рода *Chironomus* (Diptera, Chironomidae) // Генетика. 2005в. Т. 41. № 12. С. 1634–1643.
- Гусев В.Д., Немыткова Л.А., Чужанова Н.А. Быстрый метод выявления взаимосвязей в подборках функционально и/или эволюционно близких биологических тестов // Молекуляр. биология. 2001. Т. 35. С. 1015–1022.
- Кикнадзе И.И., Гундерина Л.И., Батлер М.Дж. и др. Хромосомы и континенты // Информ. вестник ВОГиС. 2007. Т. 11. № 2. С. 322–352.
- Кикнадзе И.И., Гундерина Л.И., Истомина А.Г. и др. Реконструкция хромосомной эволюции в роде *Chironomus* // Евразият. энтомол. журнал. 2004. Т. 3. С. 265–273.
- Шобанов Н.А., Зотов С.Д. Цитогенетические аспекты филогении рода *Chironomus* Meigen (Diptera, Chironomidae) // Энтомол. обозрение. 2001. Т. 80. С. 180–193.
- Ayala F.J., Coluzzi M. Chromosome speciation: human, *Drosophila* and mosquitoes // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 6535–6542.
- Beermann W. Chromosomes and genes // Results and Problems in Cell Differentiation. 1972. V. 4. P. 1–33.
- Bhutkar A., Schaeffer S.W., Russo S.M. *et al.* Chromosomal rearrangement inferred from comparisons of 12 *Drosophila* genomes // Genetics. 2008. V. 179. P. 1657–1680.
- Bridges C.B. Salivary gland chromosome maps, with key to the banding of chromosomes of *Drosophila melanogaster* // J. Heredity. 1935. V. 26. P. 60–64.
- Dobzhansky Th. Genetics of Evolutionary Process. N.Y.: Columbia Univ. Press, 1970. 505 p.
- Eichler E., Sankoff D. Structural dynamics of eukaryotic chromosome evolution // Science. 2003. V. 301. P. 793–797.
- Keyl H.-G. Chromosomenevolution bei *Chironomus*. II. Chromosomenbauten und Phylogenetische Beziehungen der Arten // Chromosoma. 1962. Bd. 13. S. 464–514.
- Kiknadze I.I., Gunderina L.I., Butler M.G. *et al.* Chromosomes and Continents // Biosphere Origin and Evolution / Eds N. Dobretsov, N. Kolchanov, A. Rozanov, G. Zavarzin. Springer, 2008. P. 349–369.
- Kiknadze I.I., Gunderina L.I., Istomina A.G. *et al.* Similarity analysis of inversion banding sequences of *Chironomus* species (breakpoint phylogeny) // Bioinformatics of genome regulation and structure / Eds N. Kolchanov, R. Hofstaedt. Kluwer Acad. Press, 2003. P. 245–253.
- King M. Species Evolution: The Role of Chromosome Change. N.Y., 1993. 336 p.
- Kirkpatrick M. How and why chromosome inversions evolve // PLoS Biol. 2010. V. 8. (9). P. 1–5.
- Kumar S., Tamura K., Kakobsen I.B., Nei M. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. Tempe, Arizona, USA: Arizona State Univ., 2001.
- Marques-Bonet T., Caceres M., Bertranpetit A. *et al.* Chromosomal rearrangements and the genomic distribution of gene-expression divergence in humans and chimpanzees // Trends Genet. 2004. V. 20. P. 524–529.
- Martin J. A review of genus *Chironomus* (Diptera, Chironomidae). IY. The karyosystematics of australis group in Australia // Chromosoma. 1971. V. 35. P. 418–430.
- Muller H.J. Bar duplication // Science. 1936. V. 83. P. 528–530.
- Navarro A., Barton N.H. Accumulating postzygotic isolation genes in parapatry: a new twist on chromosomal speciation // Evolution. 2003. V. 57. P. 447–459.
- Severson D.W., de Bruyn B., Lovin D.D. *et al.* Comparative genome analysis of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* with *Drosophila melanogaster* and malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* // J. Heredity. 2004. V. 95. P. 103–113.
- White M.J. Animal Cytology and Evolution. L.; N.Y.; Malburn: Cambridge Univ. Press, 1977. 961 p.
- Wulker W., Sublette J.E., Morath E., Martin J. *Chironomus columbiensis* n. sp. in South America and *C. anonymus* Williston in North America – Closely related species // Stud. Neotr. Fauna and Environment. 1989. V. 24. P. 121–136.
- Zdobnov E.M., von Mering C., Lutenic I. *et al.* Comparative genome and proteome analysis of *Anopheles gambiae* and *Drosophila melanogaster* // Science. 2002. V. 298. P. 149–159.

LOCATIONS AND FREQUENCY OF INVERSION BREAKPOINTS IN *CHIRONOMUS* GENOMES (DIPTERA, CHIRONOMIDAE)

A.D. Broshkov^{1,2}, L.A. Miroshnichenko³, I.I. Kiknadze¹, V.D. Gusev³

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia;

³ Institute of Mathematics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

Summary

The locations and frequency of inversion breaks were analyzed in the genomes of 115 *Chironomus* species of two cytocomplexes (pseudothummi and thummi), differing in reciprocal translocations of whole chromosome arms in two chromosomes (**AE CD BF G** and **AB CD EF G**, respectively). The frequencies and total number of inversion breaks accumulated in the genomes of these cytocomplex in the history of their cytogenetic evolution were determined. A total of 288 inversion breakpoints were found: 55 on arm A, 34 on arm E, 61 on arm F, 55 on arm C, 83 on arm D. Four types of inversion breakpoints were identified by their frequencies: 1) 15 points with a maximum frequency, reflecting the locations of boundaries of the oldest cosmopolitan inversions; 2) numerous breakpoints common to both cytocomplexes; 3) breakpoints specific for each of cytocomplex; and 4) conservative sites, where inversion breakpoints were not detected. It is shown that various combinations of chromosome arms in the two translocated chromosomes affect the distribution of breakpoints and the frequency of inversion breaks throughout the genome.

Key words: *Chironomus*, polytene chromosomes, banding sequences, inversion breakpoints, chromosomal evolution.

ИНГИБИРОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ БЕЛКИ POM152 И POM34 ЯДЕРНЫХ ПОР ДРОЖЖЕЙ, НАРУШАЕТ ПРОЦЕСС СБОРКИ ПОР И УВЕЛИЧИВАЕТ ИХ ВНУТРЕННИЙ ДИАМЕТР

А.А. Струнов¹, Е.А. Онищенко², Е.В. Киселева¹

¹ Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: strunov@bionet.nsc.ru; elena_kiseleva@ngs.ru;

² Лаборатория молекулярной и клеточной биологии, Калифорнийский университет, Беркли, Калифорния, США

Центральный компартмент ядерной поры, обеспечивающей ядерно-цитоплазматический транспорт молекул, содержит в своем составе трансмембранные белки, закрепляющие пору в ядерной оболочке. В работе проведены морфологический и морфометрический анализы организации ядерных поровых комплексов в ядерной оболочке дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, мутантных по трансмембранным белкам Pom152 и Pom34. Показано, что при подавлении экспрессии генов *POM152* или *POM34* происходит нарушение процесса сборки ядерных пор, что ведет к уменьшению их количества в ядерной оболочке. Согласно данным электронно-микроскопического анализа, нарушение экспрессии гена *POM152* сопровождается также увеличением внутреннего диаметра ЯПК, чего не наблюдается в клетках, мутантных по белку Pom34. Обсуждается взаимодействие трансмембранных белков с другими белками ядерной поры, а также их роль в обновлении пор в процессе деления дрожжевой клетки.

Ключевые слова: *Saccharomyces cerevisiae*, электронная микроскопия, ядерные поры, нуклеопорины, ультраструктура.

Введение

Отличительной чертой эукариотической клетки является ядро, ограниченное оболочкой, состоящей из наружной и внутренней мембран (Adelberg, 1971; Губанова, Киселева, 2007; Hetzer, 2010). Обмен макромолекулами между ядром и цитоплазмой происходит через специальные транспортные каналы – ядерные поровые комплексы (ЯПК), представляющие собой сложную, состоящую из множества белков структуру (Kiseleva *et al.*, 2004; Губанова и др., 2006). ЯПК встроены в ядерную оболочку в участках слияния внутренней и внешней мембран и представляют собой один из самых больших комплексов в эукариотических клетках с молекулярной массой > 50 МДа (Hetzer *et al.*, 2005; Tran, Wente, 2006). Высшие и низшие эукариоты имеют сходные по строению ядерные

поры, однако внешний диаметр пор у низших, например дрожжей, меньше (~ 100 нм), чем у высших эукариот (~ 120 нм) (Kiseleva *et al.*, 2004). Кроме того, ядерная оболочка у низших эукариот не имеет ламины, закрепляющей поры в оболочке ядра, поэтому ядерные поры у этих организмов могут перемещаться вдоль ядерной оболочки (Belgareh, Doye, 1997). ЯПК имеют симметричную октагональную организацию во фронтальной плоскости и содержат три основных компартмента: центральный и два асимметричных периферических – цитоплазматический и внутриядерный.

Ядерная пора имеет в своей структуре около 1 тыс. белков у высших и около 500 белков у низших эукариот (Alber *et al.*, 2002). В их состав как у высших, так и у низших эукариот входят 30 отличающихся друг от друга белков – нуклеопоринов (nuclear proteins – Nups). Нуклео-

порины представлены 8, 16 или 32 копиями на каждую пору (рис. 1) (Rout *et al.*, 2000; Cronshaw *et al.*, 2002; Alber *et al.*, 2007a, b).

Цитоплазматический компартмент поры находится немного над и непосредственно в плоскости наружной ядерной мембраны. В нем различают тонкое и звездчатое горизонтальные кольца, а также 8 цитоплазматических фибрилл, которые прикреплены к субъединицам, расположенным на тонком кольце (рис. 2). Центральный компартмент является самой массивной частью ЯПК, состоящей из кольца спиц, внутреннего и трансмембранного колец, и пронизывает ядерную оболочку в том ее участке, где соединяются наружная и внутренняя мембраны. Внутриядерный компартмент расположен под и непосредственно в плоскости внутренней мем-

браны ядра и включает в себя внутриядерное кольцо с 8 отходящими филаментами, которые формируют basket-структуру (рис. 2).

Сборка ядерных поровых комплексов в клетках эукариот регистрируется на двух стадиях клеточного цикла. Во-первых, она происходит в период восстановления ядерной оболочки в конце открытого митоза, когда с деконденсирующимся хроматином контактируют пузырьки гладкого и шероховатого ЭПР, в составе мембран которых присутствуют субкомплексы нуклеопоринов (Kiseleva *et al.*, 2001; Antonin *et al.*, 2008). На начальном этапе с хроматином связываются мембраны, содержащие субкомплекс белков Nup107-160. Затем идет присоединение к хроматину мембранных пузырьков, содержащих трансмембранные нуклеопорины Pom121 и

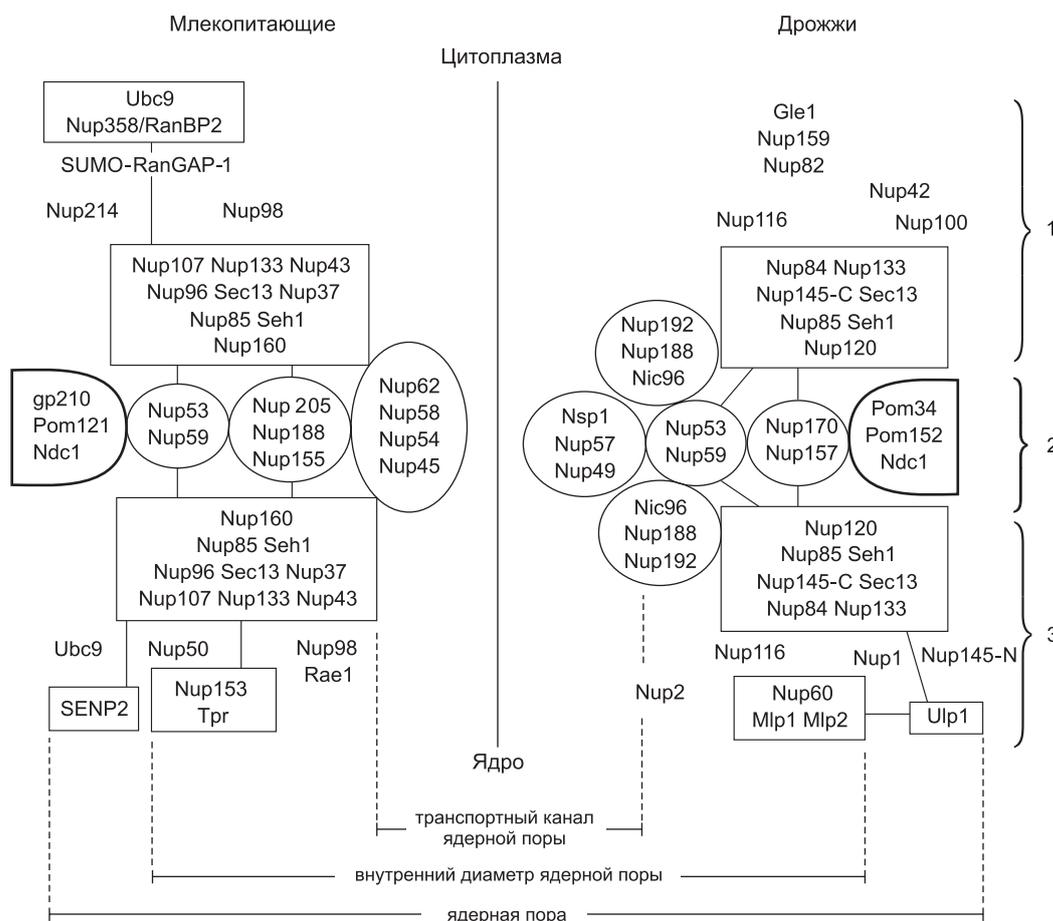


Рис. 1. Расположение белков-нуклеопоринов в разных участках ядерных пор у высших (слева) и низших (справа) эукариот.

1 – цитоплазматический компартмент поры, 2 – центральный компартмент поры, 3 – внутриядерный компартмент поры (модифицировано из: Rout *et al.*, 2000).

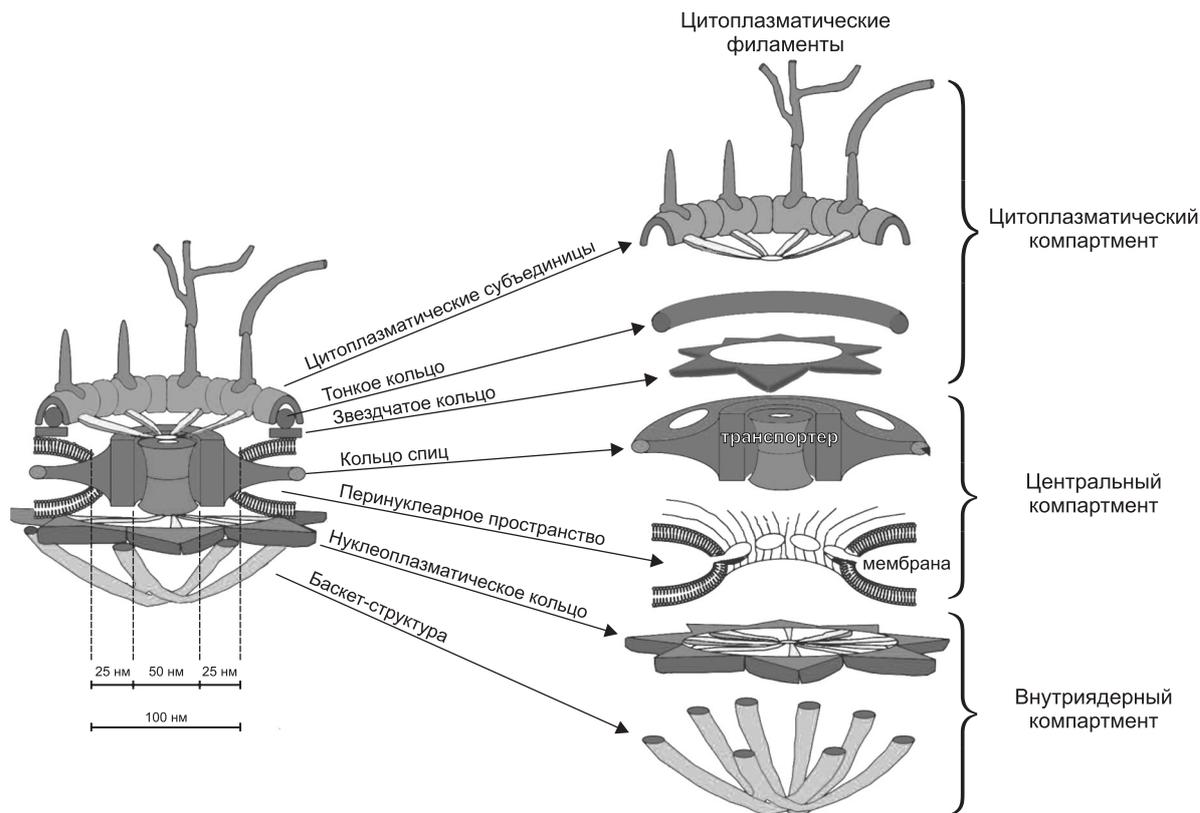


Рис. 2. Схема структурной организации индивидуальных компартментов ядерной поры (модифицировано из: Allen *et al.*, 2000).

Ndc1, которые, в свою очередь, объединяются с белками Nup155 и Nup53. После этого последовательно собираются центральные, затем периферические компартменты и, наконец, формируется функционально активная пора (Goldberg *et al.*, 1997; Kiseleva *et al.*, 2001; Antonin *et al.*, 2008). Помимо митоза сборка ядерных пор происходит также в период интерфазы, когда дочерние ядра растут, их оболочка увеличивается в размере. При этом дополнительные ядерные поры должны собираться в новых фрагментах оболочки ядра и закрепляться в ней (D'Angelo, Hetzer, 2006). До сих пор не ясно, каким образом и в какой последовательности индивидуальные компоненты ЯПК при этом формируются в ядерной оболочке. Многие одноклеточные, в том числе и дрожжи, делятся путем закрытого митоза без разрушения оболочки ядра. Предполагается, что сборка новых ядерных пор в этих клетках должна происходить так же, как и в растущих интерфазных ядрах, хотя прямых доказательств этого пока не получено.

Трансмембранные белки и белки центрального канала поры играют большую роль в закреплении поры в ядерной оболочке и транспорте молекул через ЯПК (Antonin *et al.*, 2008). В дрожжевых клетках три трансмембранных белка (Ndc1, Pom152 и Pom34) и четыре нуклеопорина центрального канала поры (Nup59, Nup53, Nup157 и Nup170) входят в состав центрального компартмента ЯПК дрожжей (рис. 1) (Alber, 2007a). Белки Pom152 и Pom34 взаимодействуют с другими нуклеопоринами центрального канала поры через белок Ndc1 (Onischenko *et al.*, 2009). Ndc1 является жизненно важным белком, благодаря которому происходит правильная сборка ядерных пор в процессе их обновления (Stavgu *et al.*, 2006). Этот белок трижды пересекает ядерную мембрану, образуя три белковых петли, лежащие в перинуклеарном пространстве, и две петли, выходящие в цитозоль. Шесть трансмембранных сегментов позволяют Ndc1 формировать множество контактов с другими нуклеопоринами (Stavgu *et al.*, 2006). Белки Pom152 и

Pom34 взаимодействуют с другими нуклеопоринами центрального канала поры через белок Ndc1 (Onischenko *et al.*, 2009). Белок Pom152 расположен в основном в перинуклеарном пространстве, за исключением единственного трансмембранного сегмента, закрепляющего белок в ядерной оболочке (Tchereregine *et al.*, 1999). Именно этим сегментом Pom152 напрямую связан с Ndc1. У белка Pom34 N- и C-концы направлены в цитозоль, что способствует его взаимодействию с белками центрального канала поры (Miao *et al.*, 2006), а трансмембранные сегменты Pom34 обеспечивают его связь с Pom152 и через него с Ndc1. Высказано предположение, что Pom152 и Pom34 отвечают за поддержание нормальной структуры ЯПК и функционирование поры при транспорте молекул между ядром и цитоплазмой (Miao *et al.*, 2006). Теми же авторами показано, что одиночные делеции генов *POM152* и *POM34*, а также делеция их обоих не приводят к снижению жизнеспособности клеток дрожжей и не сказываются на структуре ЯПК.

Несмотря на то что к настоящему времени получена детальная информация о составе белков ядерных пор эукариот, функциональная значимость многих из них, в частности белков центрального компартмента ЯПК, для сборки новых пор, особенно на стадии интерфазы, пока не выяснена. Одним из подходов к изучению данного вопроса является исследование морфологии и динамики ядерных пор в клетках дрожжей, мутантных по генам, кодирующим эти белки. Электронная микроскопия позволяет фиксировать различные нарушения в структурной организации ядерных пор, происходящие при ингибировании экспрессии генов, кодирующих белки ЯПК (Madrid *et al.*, 2006), что обеспечивает получение новых данных о функциональной роли этих белков. Ранее было показано, что сокращение количества растворимых белков ЯПК Nup53 и Nup59 не вызывает изменения морфологии ядерных пор у дрожжей и не влияет на выживаемость дрожжей. При полном отсутствии белка Nup59 происходит расширение внутреннего диаметра пор и наблюдаются большие разрывы в оболочке ядра. Отсутствие белка Nup53 никак не сказывается на жизнеспособности клеток (Onischenko *et al.*, 2009). В то же время уменьшение количества трансмембранных белков Pom152 или Pom34 в клетках дрожжей, несущих делеции по генам

NUP53 и *NUP59*, приводило к снижению жизнеспособности дрожжевых клеток (Onischenko *et al.*, 2009). Таким образом, совместный вклад трансмембранных белков Pom152 и Pom34 и белка центрального канала поры Nup59 имеет большое значение для организации структуры и сборки ЯПК.

Целью настоящей работы было исследовать функциональную роль трансмембранных белков Pom152 и Pom34 в организации центрального компартмента ЯПК. Для этого был проведен сравнительный электронно-микроскопический анализ структурной организации и динамики ядерных пор до и после подавления экспрессии генов, кодирующих эти белки, в клетках двух мутантных линий *S. cerevisiae* с делецией генов *NUP53* и *NUP59*.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования были использованы мутантные линии дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* kw2 (*nup53Δ nup59Δ GAL-pom152*) и kw4 (*nup53Δ nup59Δ GAL-pom34*) из коллекции Калифорнийского университета, Беркли, США (схемы получения этих мутантных линий описаны в статье А.С. Мадрид с соавт. (Madrid *et al.*, 2006)). В обеих линиях полностью отсутствовали белки Nup53 и Nup59 центрального канала поры и под контролем галактозного промотора осуществлялась экспрессия генов, кодирующих трансмембранные белки Pom152 (линия kw2) и Pom34 (линия kw4). На селективной среде с галактозой эти гены экспрессировались, в то время как на среде без галактозы происходило подавление их экспрессии.

Клетки дрожжей культивировали и наращивали в жидкой стандартной среде с использованием агара и дрожжевого экстракта. После вакуумной фильтрации через фильтр Milipore клетки дрожжей переносили в специальные камеры и резко замораживали под высоким давлением (устройство EM PACT2, Leica, Австрия). Затем замороженные образцы помещали в жидкий азот и переносили в камеру для замораживания-замещения (устройство AFS2, Leica, Австрия), где их фиксировали смесью 0,2 %-го тетраоксида осмия (OsO₄) и 0,05 %-го уранилацетата. После этого образцы пропитывали и заливали в смолу (Epon812).

Ультратонкие срезы 60 нм толщиной получали на ультратоме Leica Ultracut (Австрия). Затем срезы помещали на сеточки с формварной пленкой и контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу (Reynolds, 1963). Объект исследовали на электронном микроскопе JEM 100-SX (Jeol, Япония) при напряжении 60 кВ.

Для каждой линии клеток, содержащихся при пермиссивных (на среде с галактозой) или непермиссивных условиях, было проанализировано по 50 ядерных пор (всего исследовано 200 ЯПК), у которых измерялся внутренний диаметр поры (расстояние между мембранами ядерной оболочки). Для электронно-микроскопического исследования выбирались срезы клеток, имеющие достоверно не отличающуюся длину ядерной оболочки, составляющую около 5 мкм, что позволяло более точно проводить морфологический анализ. Обработку полученных данных проводили с помощью стандартных статистических методов (Васильева, 2007).

Результаты

Для электронно-микроскопического анализа было выбрано два критерия, по которым оценивалась морфология ядерных пор в оболочке ядра исследуемых мутантных линий: размер (линейный диаметр) внутреннего диаметра ЯПК и их количество на срезе ядерной оболочки, проходящем через середину ядра (см. Материалы и методы).

В наших предыдущих публикациях, а также работах других авторов было показано, что внешний диаметр ядерной поры дрожжей в нормальных клетках составляет около 100 нм, а внутренний диаметр – 60 нм (Rout, 2000; Kiseleva *et al.*, 2004). В настоящей работе исследована ультраструктура ядерных пор в двух мутантных линиях, kw2 и kw4, в которых ингибируется экспрессия генов *POM152* и *POM34* соответственно. Параллельно подсчитывали количество пор в ядерной оболочке. Проведенный электронно-микроскопический анализ срезов ядерной оболочки в клетках мутантной линии kw2 при ее содержании на селективной среде с галактозой (нормальная экспрессия гена *POM152* – контроль) показал, что в среднем внутренний диаметр поры в оболочке ядра составляет $59,3 \pm 0,9$ нм, что согласуется с раз-

мером пор нормальных линий дрожжей. При инкубации клеток на неселективной среде без галактозы (эксперимент) происходило увеличение размера ядерных пор, среднее значение которых составило $90,4 \pm 2,3$ нм (рис. 3, а, б; рис. 4, а). Количество ЯПК на срезе ядерной оболочки клеток дрожжей, содержащихся на среде с галактозой, составило $2,9 \pm 0,2$, а при инкубации клеток на среде без галактозы их количество уменьшилось более чем в два раза и составило $1,2 \pm 0,1$ (рис. 5, а).

Для мутантной линии kw4 при содержании ее на селективной среде с галактозой (контроль, нормальная экспрессия гена *POM34*) внутренний диаметр пор в среднем составил $67,7 \pm 2,0$ нм. При содержании клеток в отсутствии галактозы было выявлено лишь небольшое увеличение размеров ядерных пор, среднее значение кото-

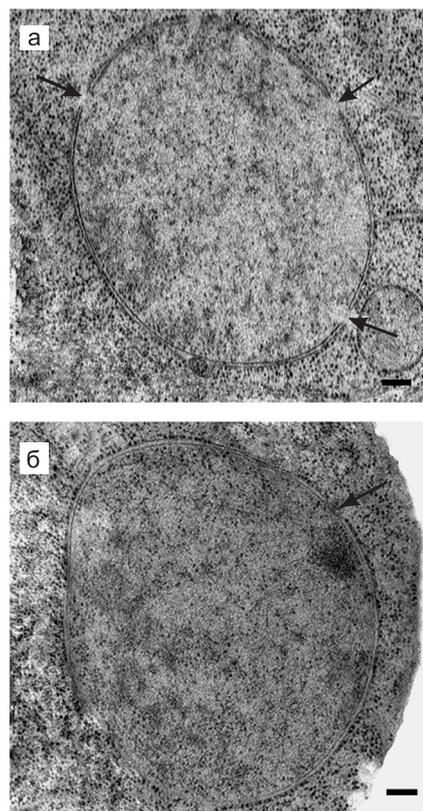


Рис. 3. Ультраструктурная организация ядерной оболочки и ядерных пор *Saccharomyces cerevisiae* до и после ингибирования экспрессии *POM152*.

а, б – ядро дрожжевой клетки до ингибирования экспрессии *POM152* (а) и после него (б). Стрелками обозначены ядерные поровые комплексы. Масштаб: 100 нм.

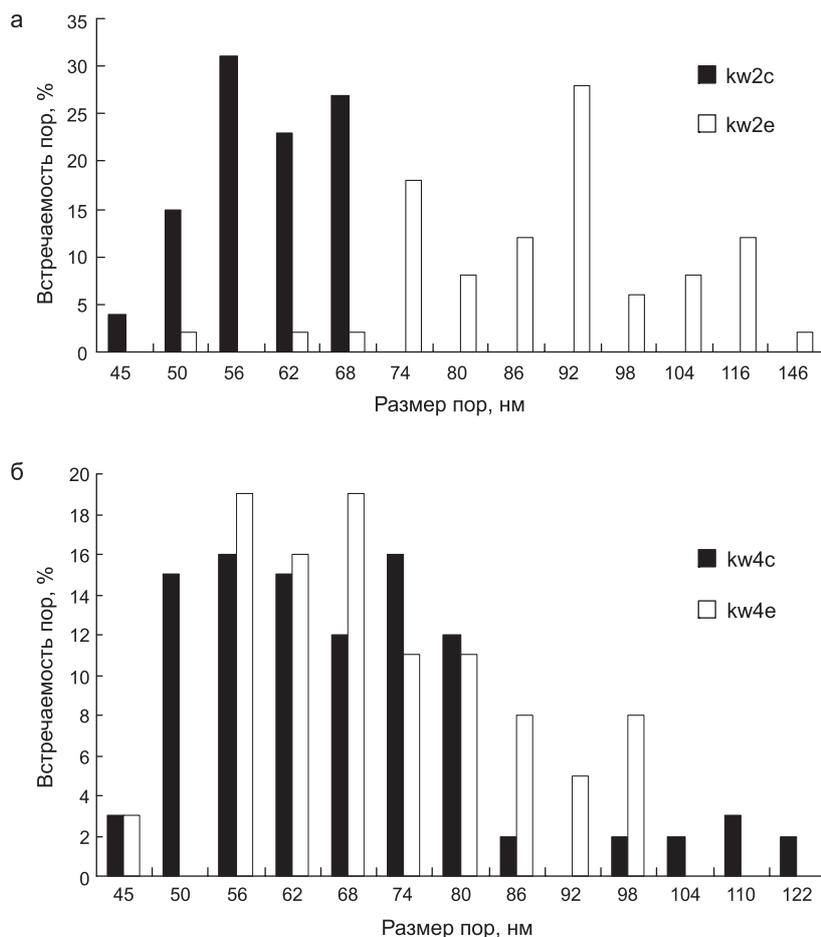


Рис. 4. Частота встречаемости ядерных пор с разным внутренним диаметром в ядерной оболочке на срезах дрожжевых клеток с разной экспрессией генов, кодирующих трансмембранные белки.

а – частота встречаемости ЯПК в оболочке ядра линии kw2a (клетки с нормальной экспрессией *POM152*) и kw2b (клетки с подавленной экспрессией *POM152*); б – частота встречаемости ЯПК в оболочке ядра линии kw4a (контрольная линия с нормальной экспрессией *POM34*) и kw4b (линия с подавленной экспрессией *POM34*).

рых составило $71,3 \pm 2,2$ нм, что достоверно не отличалось от контроля (рис. 4, б; 6, а, б). Следует отметить, что так же, как и для линии kw2, в клетках линии kw4 было зарегистрировано двукратное уменьшение количества ЯПК на срез ядерной оболочки при выращивании дрожжей в отсутствии галактозы в среде. У клеток, выращенных на селективной среде, это значение составило $3,8 \pm 0,3$, а на неселективной среде оно имело значение $1,4 \pm 0,1$ (рис. 5, б). Таким образом, в обеих линиях существенное сокращение количества одного из исследуемых трансмембранных белков приводило к уменьшению количества ЯПК в оболочке ядра, однако только в линии kw2 наблюдалось увеличение размера пор в ядерной оболочке.

Обсуждение

Согласно результатам наших исследований было установлено, что трансмембранные белки Pom152 и Pom34, несмотря на структурное сходство, имеют разную значимость для организации ядерной поры. Ранее было показано, что вместе с белками центрального канала поры, Nup53 и Nup59, они напрямую связаны с Ndc1 и отвечают за его взаимодействие с другими белками ЯПК и закрепление в поре (Onischenko *et al.*, 2009). Комплекс, образованный этими пятью белками, формирует трансмембранный слой ЯПК и прилегающий к нему слой, окружающий центральный канал поры, через который осуществляется ядерно-цитоплазма-

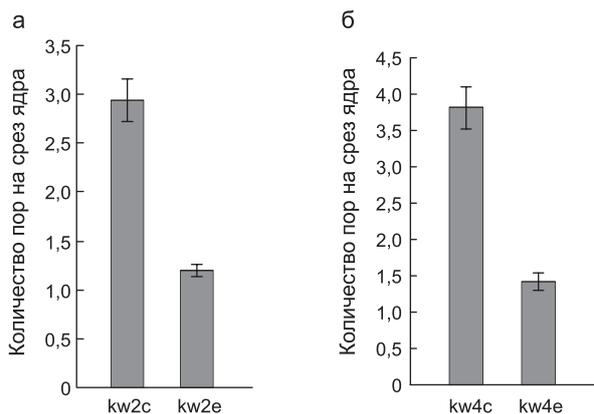


Рис. 5. Количество пор в ядерной оболочке на срезах дрожжевых клеток из линий с разной экспрессией генов, кодирующих трансмембранные белки.

а – количество пор в оболочке ядра на срезе клеток дрожжей линии kw2a (контрольная линия с нормальной экспрессией *POM152*) и kw2b (линия с подавленной экспрессией *POM152*); б – количество пор в оболочке ядра на срезе клеток дрожжей линии kw4a (контрольная линия с нормальной экспрессией *POM34*) и kw4b (линия с подавленной экспрессией *POM34*).

тический транспорт молекул. Таким образом, трансмембранные белки Pom152 и Pom34 в комплексе с белками центрального канала, Nup59 и Nup53, выполняют жизненно важные функции, связанные с обеспечением корректной структурной организации ЯПК. В исследуемых нами линиях kw2 и kw4 полностью отсутствовали белки Nup53 и Nup59, и на неселективной среде без галактозы значительно ингибировалась экспрессия либо гена *POM152*, либо гена *POM34*. Ранее было показано, что при делеции генов *NUP53*, *NUP59* и одного из генов, кодирующих трансмембранные белки Pom152 или Pom34, локализация Ndc1 нарушается (Miao *et al.*, 2006). Белок Ndc1 распределяется на мембранных структурах вне ядерной оболочки, что, вероятно, приводит к гибели клеток. Белки центрального канала поры, Nup59 и Nup53, очень схожи между собой по биохимическим и физическим параметрам, но функционально имеют большое различие (Onischenko *et al.*, 2009). Nup59 вместе с трансмембранными белками отвечает за закрепление Ndc1 в ЯПК, а Nup53 при этом, вероятно, никаких жизненно важных функций не несет (Miao *et al.*, 2006). Теми же авторами установлено, что выживаемость клеток дрожжей, несущих делеции по генам *NUP53*

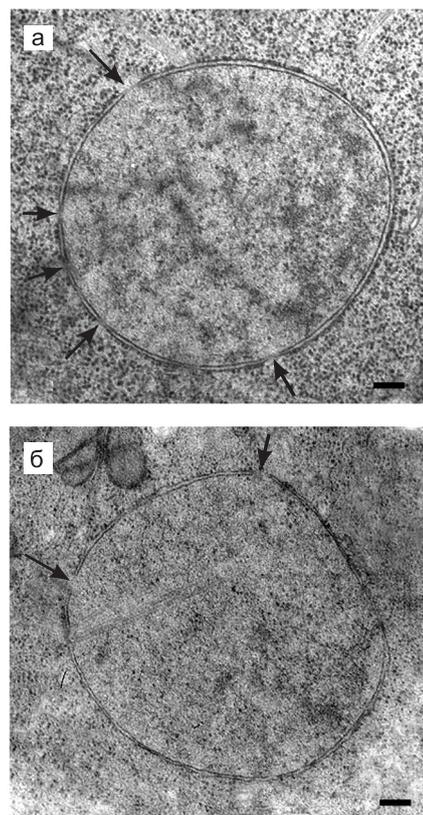


Рис. 6. Ультраструктурная организация ядерной оболочки и ядерных пор *Saccharomyces cerevisiae* до и после ингибирования экспрессии *POM34*.

а, б – ядро дрожжевой клетки до (а) и после (б) ингибирования экспрессии *POM34*. Стрелками обозначены ядерные поровые комплексы. Масштаб: 100 нм.

и *NUP59*, при существенном сокращении количества трансмембранных белков Pom152 или Pom34 резко снижается, но не происходит гибели клеток. Согласно результатам наших исследований, ингибирование экспрессии генов *POM152* или *POM34* в исследуемых мутантных линиях вызывало уменьшение количества ЯПК на срез ядерной оболочки, но только в линии kw2 наблюдалось увеличение диаметра поры. Можно предполагать, что уменьшение количества ЯПК в ядерной оболочке происходит в результате разрушения вышеописанного комплекса из 5 белков, необходимого для правильной сборки ядерных пор. Поскольку Nup53 и Nup59 в этих линиях полностью отсутствовали, а один из трансмембранных белков был представлен лишь в малом количестве, корректного связывания нуклеопоринов и трансмембранных

белков с Ndc1 в образующихся *de novo* ЯПК не происходило. Наши исследования согласуются с аналогичными данными, полученными с помощью флуоресцентной микроскопии (Onischenko *et al.*, 2009). В этой же работе было установлено, что новосинтезированные белки периферического компартмента поры не способны встроиться в ЯПК и остаются в цитоплазме, т. е. процесс сборки ядерных пор *de novo* при подавлении экспрессии *POM34* не может быть запущен, что и приводит к сокращению их количества.

Сходная ситуация наблюдалась нами при подавлении экспрессии *POM152*, однако в этом случае происходило увеличение диаметра пор. Ранее было показано, что трансмембранные белки Pom152 и Pom34 образуют между собой очень прочное кольцеобразное соединение, которое через короткий трансмембранный домен нуклеопорина Pom152 связано с Ndc1 (Alber *et al.*, 2007b). Можно предполагать, что при подавлении экспрессии *POM152* происходит существенное изменение локализации Ndc1, поскольку домен, обеспечивающий контакт трансмембранных белков с Ndc1, отсутствует. Потеря связи трансмембранных белков с Ndc1 приводит, вероятно, к потере белков центрального компартмента ядерной поры, что способствует расширению диаметра формирующихся ядерных пор. При анализе ЯПК на срезах клеток линии kw2 в электронном микроскопе было отмечено, что все поры не имеют электронно-плотного материала в центре (рис. 3, а), что свидетельствует об отсутствии белков центрального канала поры. Следует отметить, что это было характерно для линии с делецией по генам *NUP53* и *NUP59* с нормальной экспрессией *POM152* и с подавленной экспрессией этого гена. Измеренный диаметр поры клеток дрожжей, выращенных на селективной среде с галактозой, составлял $59,3 \pm 0,9$ нм и увеличивался до $90,4 \pm 2,3$ нм при сокращении количества белка Pom152 при содержании клеток на среде без галактозы. Мы предполагаем, что в данном случае помимо нарушения взаимодействий между белками центрального компартмента ядерной поры изменялось расположение Ndc1 в мембране ядерной оболочки, что, по-видимому, вызывало увеличение диаметра пор.

Исследованная линия kw4 также содержала делеции по генам *NUP53* и *NUP59*, поэтому при ее анализе в электронном микроскопе, как и в линии kw2, мы наблюдали исчезновение электронно-плотного материала на месте центрального канала. Размер поры составлял при этом $67,7 \pm 2,0$ нм. При подавлении экспрессии *POM34* нами не было отмечено увеличение размера пор, поскольку Pom152 присутствовал при этом в нормальном количестве и сохранялась взаимосвязь с белком Ndc1. Небольшую долю расширенных пор можно объяснить тем, что при подавлении экспрессии *POM34* происходило частичное ослабление взаимодействия Pom152 с Ndc1, что приводило к изменению расположения Ndc1 и увеличению диаметра ЯПК (Onischenko *et al.*, 2009). Необходимо отметить, что диаметр центрального канала поры, включая внешний слой формирующих его белков, составляет около 60 нм (рис. 4) (Rout *et al.*, 2000; Alber *et al.*, 2007a), что сходно с диаметром ЯПК в клетках, в которых Pom152 и Pom34 присутствуют в достаточном количестве. Трансмембранный слой белков имеет размер около 20 нм, и при ингибировании экспрессии *POM152* происходит увеличение внутреннего диаметра ЯПК на 20–30 нм (рис. 7). Наши морфометрические данные полностью согласуются с данными, приведенными в статьях других авторов (Rout *et al.*, 2000; Alber *et al.*, 2007a).

Заключение

Проведенные нами морфологические и морфометрические исследования структурной организации и количества ядерных пор в оболочке ядра двух мутантных линий дрожжей показали, что трансмембранные белки ЯПК, Pom152 и Pom34, выполняют как сходные, так и отличающиеся друг от друга функции в клетке. Оба белка отвечают за поддержание нормальной структуры ЯПК и за их правильную сборку в процессе деления дрожжевой клетки. Согласно ранее проведенным исследованиям, полное отсутствие синтеза одного из этих белков и делеция по гену *NUP59* блокируют формирование новых ЯПК, и клетки, как правило, гибнут (Marelli *et al.*, 1998; Miao *et al.*, 2006). При снижении количества белков Pom152 или Pom34, что имело место в наших исследованиях, проис-

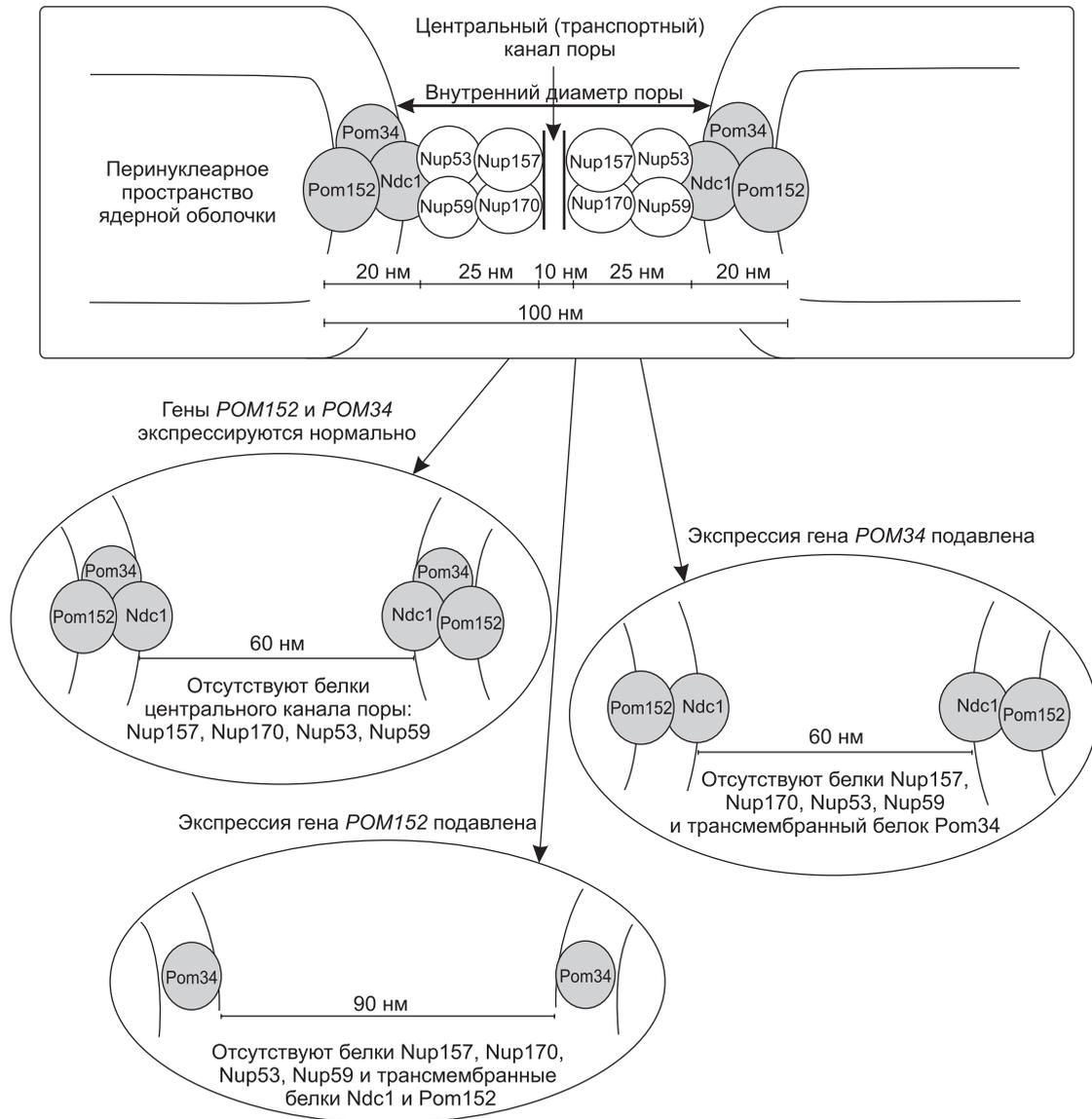


Рис. 7. Схема изменений внутреннего диаметра ЯПК при подавлении экспрессии генов, кодирующих белки центрального компартмента поры.

ходит сокращение числа образованных ЯПК более чем в два раза. Pom152 играет очень важную роль в связывании и закреплении основного трансмембранного белка Ndc1 в центральном компартменте ЯПК, поскольку взаимодействие нуклеопоринов с Ndc1 осуществляется посредством короткого трансмембранного домена Pom152. Белок Pom34 при этом можно рассматривать в качестве «усиливающего» это взаимодействие фактора, подавление экспрессии которого не оказывает существенного влияния на жизнедеятельность клеток дрожжей. Таким образом, трансмембранные белки, формирую-

щие внешний слой центрального компартмента ядерной поры дрожжей, выполняют разную функциональную роль в закреплении белков, которые организуют внутренний центральный канал, выполняющий жизненно важную функцию ядерно-цитоплазматического транспорта в клетке. Кроме того, эти белки необходимы для формирования ядерных пор *de novo* при делении дрожжевой клетки. Увеличение размеров пор связано с делецией двух генов, *POM152* и *NUP59*, что согласуется с данными, полученными ранее в работе Onischenko с соавт. (2009). В то же время выяснение вопроса о взаимодей-

ствии этих белков и механизме их участия в процессе формирования функционально активной поры требует дальнейшего исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 10-04-01426 и гранта МКБ РАН.

Литература

- Васильева Л.А. Статистические методы в биологии, медицине и сельском хозяйстве. Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 2007. 127 с.
- Губанова Н.В., Морозова К.Н., Киселева Е.В. Структурная организация, функция и динамика ядерных пор // Цитология. 2006. Т. 48. № 11. С. 887–899.
- Губанова Н.В., Киселева Е.В. Структурная организация и функция ядерной оболочки // Цитология. 2007. Т. 49. № 4. С. 257–269.
- Adelberg E.A. Organization and control in prokaryotic and eukaryotic cells // *Yale J. Biol. Med.* 1971. V. 43. № 6. P. 416–417.
- Alber F., Dokudovskaya S., Veenhoff L. M. *et al.* Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex // *J. Cell Biol.* 2002. V. 158. P. 915–927.
- Alber F., Dokudovskaya S., Veenhoff L.M. *et al.* Determining the architectures of macromolecular assemblies // *Nature*. 2007a. V. 450. P. 683–694.
- Alber F., Dokudovskaya S., Veenhoff L. M. *et al.* The molecular architecture of the nuclear pore complex // *Nature*. 2007b. V. 450. P. 695–701.
- Allen T.D., Cronshaw J.W., Bagley S. *et al.* The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm // *J. Cell Sci.* 2000. V. 113. P. 1651–1659.
- Antonin W., Ellenberg J., Dultz E. Nuclear pore complex assembly through the cell cycle: regulation and membrane organization // *FEBS Lett.* 2008. V. 582. P. 2004–2016.
- Belgareh N., Doye V. Dynamics of nuclear pore distribution in nucleoporin mutant cells // *J. Cell Biol.* 1997. V. 136. № 4. P. 747–759.
- Cronshaw J.M., Krutchinsky A.N., Zhang W. *et al.* Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex // *J. Cell Biol.* 2002. V. 158. P. 915–927.
- D'Angelo M.A., Hetzer M.W. The role of the nuclear envelope in cellular organization // *Cell. Mol. Life Sci.* 2006. V. 63. P. 316–332.
- Goldberg M.W., Wies C., Allen T.D., Wilson K.L. Dimples, pores, star-rings, and thin rings on growing nuclear envelopes: evidence for structural intermediates nuclear pore assembly // *J. Cell. Sci.* 1997. V. 110. P. 409–420.
- Hetzer M.W. The nuclear envelope // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010. V. 2. P. 1–16.
- Hetzer M.W., Walther T.C., Mattaj I.W. Pushing the envelope: structure, function, and dynamics of the nuclear periphery // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2005. V. 21. P. 347–380.
- Kiseleva E., Allen T. D., Rutherford S. *et al.* Yeast nuclear pore complexes have a cytoplasmic ring and internal filaments // *J. Struct. Biol.* 2004. V. 145. № 3. P. 272–288.
- Kiseleva E., Rutherford S., Cotter L.M. *et al.* Steps of nuclear pore complex disassembly and reassembly during mitosis in early *Drosophila* embryos // *J. Cell Sci.* 2001. V. 114. P. 3607–3618.
- Madrid A.S., Mancuso J., Cande W.Z., Weis K. The role of the integral membrane nucleoporins Ndc1p and Pom152p in nuclear pore complex assembly and function // *J. Cell Biol.* 2006. V. 173. P. 361–371.
- Marelli M., Aitchison J.D., Wozniak R.W. Specific binding of the karyopherin Kap121p to a subunit of the nuclear pore complex containing Nup53p, Nup59p, and Nup170p // *J. Cell Biol.* 1998. V. 143. P. 1813–1830.
- Miao M., Ryan K.J., Wentz S.R. The integral membrane protein Pom34p functionally links nucleoporin subcomplexes // *Genetics*. 2006. V. 172. P. 1441–1457.
- Onischenko E., Stanton L.H., Madrid A.S. *et al.* Role of the Ndc1 interaction network in yeast nuclear pore complex assembly and maintenance // *J. Cell Biol.* 2009. V. 185. № 3. P. 475–491.
- Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // *J. Cell Biol.* 1963. V. 17. P. 208–212.
- Rout M.P., Aitchison J.D., Supranto A. *et al.* The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism // *J. Cell Biol.* 2000. V. 148. P. 635–651.
- Stavru F., Hulsmann B.B., Spang A. *et al.* NDC1: a crucial membrane-integral nucleoporin of metazoan nuclear pore complexes // *J. Cell Biol.* 2006. V. 173. P. 509–519.
- Tcheperegine S.E., Marelli M., Wozniak R.W. Topology and functional domains of the yeast pore membrane protein Pom152p // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 5252–5258.
- Tran E.J., Wentz S.R. Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge // *Cell*. 2006. V. 125. P. 1041–1053.

**INHIBITION OF POM152 AND POM34 EXPRESSION IN BUDDING YEAST
ARRESTS THE ASSEMBLY OF THE NUCLEAR PORE COMPLEX
AND INCREASES ITS INNER DIAMETER**

A.A. Strunov¹, E.A. Onishchenko², E.V. Kiseleva¹

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

² Division of Cell and Developmental Biology, University of California, Berkeley, USA

Summary

The central compartment of the nuclear pore complex (NPC), allowing the nuclear-cytoplasmic transport of molecules, consists of transmembrane proteins, which anchor the pore in the nuclear envelope. Morphological and morphometric analyses of nuclear pore organization in *Saccharomyces cerevisiae* with mutations in the *POM152* and *POM34* genes have been performed. The absence of Pom152 or Pom34 initiates the disruption of nuclear pore complex assembly. As a result, their quantity in the nuclear envelope decreases. Electron microscopic examination shows that the inhibition of *POM152* expression is also accompanied by an increase in NPC inner diameter, not observed in mutant cells with Pom34 depletion. Interactions of transmembrane proteins with the other nucleoporins and their role in pore reconstruction during cell division are discussed.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, electron microscopy, nuclear pores, nucleoporins, ultrastructure.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОДУКТОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ, НЕФЕРМЕНТАТИВНОЙ И ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В ВОЗРАСТНОЙ ДИНАМИКЕ САМЦОВ КРОЛИКОВ

Д.Д. Аджиев

Российский государственный аграрный университет МСХА им. К.А. Тимирязева,
Москва, Россия;
Учреждение Российской академии медицинских наук Гематологический научный центр РАМН,
e-mail: adjiev-dd@mail.ru

Исследовали состояние перекисного окисления липидов по содержанию малонового диальдегида и диеновых конъюгатов в плазме крови самцов кроликов разных возрастных групп, состояние неферментной антиоксидантной защиты: по содержанию токоферола и ретинола, а также ферментов эритроцитов (супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы). Показано, что многие из исследованных параметров имеют уникальную возрастную динамику. Выявлена способность синтетических антиоксидантных препаратов в определенных дозах влиять на баланс в системе антиоксидантной защиты и минимизировать окислительный стресс. Приводится анализ полученных данных в связи с биологическими особенностями окислительного метаболизма животных, адаптационными возможностями и их продуктивностью.

Ключевые слова: кролики, перекисное окисление липидов, антиоксидантная система, малоновый диальдегид, диеновые конъюгаты, супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы.

Введение

Одним из важных механизмов нормального развития организма является поддержание баланса процессов свободнорадикального и перекисного окисления различных субстратов и состояния антиоксидантной защиты (АОЗ).

Сравнительно мало изучены возрастные и половые особенности состояния антиоксидантной системы кроликов. Ранее были представлены данные, полученные на самках кроликов разного возраста при воздействии различных дозировок синтетических антиоксидантов. Были выявлены многочисленные особенности, в частности снижение содержания некоторых продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) при одновременном увеличении активности некоторых ферментов антиоксидантной защиты в эритроцитах. Сделано предположение, что это, по всей видимости, коррелирует

со снижением скорости окислительного метаболизма при переходе к более зрелому возрасту.

Целый ряд различных факторов и в первую очередь качественный и количественный состав кормового рациона, обеспечивающий организм веществами и витаминами, необходимыми для формирования структуры и функционирования антиоксидантной системы (АОС), в значительной степени определяет состояние процессов ПОЛ и АОЗ.

Установлено также, что наряду с активацией ферментного звена значительную роль в становлении антиоксидантогенеза играют неферментные незаменимые факторы, одними из которых являются витамины с антиоксидантными свойствами – токоферолы и ретинолы.

В последние годы стало ясно, что одним из ведущих факторов, негативно влияющих на состояние здоровья молодняка кроликов, стали недостаточно полноценные рационы питания

с дефицитом микроэлементов, витаминов и других веществ, необходимых для нормального физиологического функционирования организма и качества получаемой от него продукции. Кроме того, до сих пор в кролиководстве не разработано существенных способов коррекции антиоксидантной недостаточности с учетом пола и возраста животных.

Целью работы явилось сравнительное исследование возрастных особенностей процессов свободно-радикального и перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы у самцов кроликов.

Материалы и методы

Исследование проведено на 40 кроликах породы *советская шиншилла*, находящихся на стандартном рационе лаборатории экспериментальных животных, которым дополнительно к основному рациону вводились различные дозы антиоксидантных препаратов. Формирование групп животных проводилось по принципу аналогов с учетом возраста, пола и живой массы. Из подобранных по полу животных было сформировано 4 группы по 10 голов в каждой. Подопытные животные находились в одинаковых условиях содержания и были клинически здоровы.

VI (контрольную) группу вошли 10 кроликов, которые получали основной рацион (ОР) в виде гранулированного комбикорма К-122. Животные II и III и IV опытных групп дополнительно к основному рациону получали препарат *агидол кормовой* в дозах 250, 350 и 450 мг/кг комбикорма. Основной рацион животных во всех группах соответствовал нормам кормления кроликов, разработанным НИИПЗК (2006 г.), и состоял из полнорационного гранулированного комбикорма. Общая питательность рационов животных подопытных групп была одинаковой. Опыт, в который были отобраны крольчата в 60-дневном возрасте со средней живой массой 1,5 кг, продолжался 120 дней и был разбит на три этапа (начало – возраст 60 дней, середина – возраст 120 дней и конец – возраст 180 дней).

Подготовка биологического материала. Образцы гепаринизированной крови центрифугировали на стандартной лабораторной центрифуге при 3000 об/мин 15 мин. Плазму отделяли от осадка эритроцитов. Гемолизаты

готовили разведением эритроцитарной смеси дистиллированной водой (1 : 1, v/v), после чего замораживали при 10–15 °С.

Методы определения. Физиологическое состояние животных определяли по биохимическим и морфологическим показателям крови. Кровь брали из краевой ушной вены у кроликов обоих полов всех возрастных групп.

Интенсивность перекисного окисления липидов определяли по накоплению продуктов перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) – диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА) в плазме крови. В качестве основных показателей антиоксидантной защиты определяли активности каталазы, супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы эритроцитов.

Содержание диеновых конъюгатов (ДК) в плазме оценивали на основе классического метода Z. Placer (1968) в модификации В.Б. Гаврилова, М.И. Мишкорудной (1983). При этом 0,2 мл плазмы вносили в пробирки с плотной крышкой и добавляли 2 мл чистоперегнанной смеси изопропанола гептан (1 : 1, v/v). Смесь встряхивали в течение 1 часа, после чего добавляли 0,5 мл HCl (pH = 2) и еще раз встряхивали 2 мин, затем добавляли 1 мл чистоперегнанного гептана и встряхивали еще 15 мин. Примерно через 1 час верхнюю фазу фотометрировали при 232 нм против контрольной пробы. Использовали коэффициент экстинции – $2,2 \times 10^5 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$.

Содержание ТБК-продуктов (малоновый диальдегид) в плазме оценивали по методу M. Mihara с соавт. (1980). 0,2 мл плазмы крови смешивали с 2 мл 1,4 %-й ортофосфорной кислоты и 1 мл 0,5 %-й тиобарбитуровой кислоты. Смесь инкубировали в кипящей бане 45 мин, после чего охлаждали и добавляли 2 мл н-бутанола. Пробирки тщательно встряхивали и центрифугировали при 4000 g в течение 20 мин. Верхнюю фазу фотометрировали против контрольной пробы при 532–570 нм. Расчеты проводили с коэффициентом экстинции $1,56 \times 10^5 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$.

Определение активности глутатионредуктазы эритроцитов проводили на основе метода J.A. Tilbetsen, H. Sauberlich (1971) в адаптации для фотометра ФП-901 Г.Ю. Мальцева, Л.А. Орловой (1993). Параметры измерения: время

задержки – 15 с, время измерения – 120 с, кинетический режим: 37 °С, $\lambda = 340$ нм, $\varepsilon = 5,66$ (для ФП).

Определение активности глутатионпероксидазы эритроцитов проводили на основе метода G. Mille (1959) в модификации для ФП-901 (Мальцев, Тышко, 2002). Параметры измерения: время задержки – 20 с, время измерения – 120 с, кинетический режим: 37 °С, $\lambda = 340$ нм, $\varepsilon = 5,66$ (для ФП). При этом каталазная компонента была блокирована добавлением азида натрия.

Определение активности каталазы эритроцитов проводили на основе метода N. Oshino с соавт. (1973) в модификации Г.Ю. Мальцева, А.В. Васильева (1994) с использованием алкогольдегидрогеназной ловушки. Параметры измерения: время задержки – 20 с, время измерения – 120 с, кинетический режим: 37 °С, $\lambda = 340$ нм, $\varepsilon = 5,66$ (для ФП).

Определение активности супероксиддисмутазы эритроцитов проводили на основе метода M. Niashikimi с соавт. (1972) в модификации для ФП-901 (Мальцев, Васильев, 1994). Режимы измерения: время задержки – 10 с, время измерения – 180 с, кинетический режим: 25 °С, $\lambda = 540$ нм, параллельный режим для опытной и фоновой пробы.

Анализ показателей периферической крови проводили на полностью автоматизированном гематологическом анализаторе «Abacus junior vet».

Биохимические исследования крови проводили на автоматическом анализаторе открытого типа Labio 200 с программным обеспечением Master Labio 200. Принцип работы – фотометрия.

Концентрацию ретинола и α -токоферола в плазме крови определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием концентрирующих патронов.

Математическую обработку полученных результатов проводили общепринятыми методами вариационной статистики с использованием программы Statistica 6,0.

Работа выполнена на кафедре кормления и кафедре морфологии и физиологии животных Российского государственного аграрного университета МСХА имени К.А. Тимирязева и в Государственном учреждении Гематологический научный центр РАМН в 2008–2010 гг.

Результаты исследований

Экспериментальные исследования различных показателей антиоксидантного статуса организма кроликов самцов показали значительные изменения как по возрастной динамике, так и при применении синтетических антиоксидантов (группы II–IV).

Основным параметром оценки наличия окислительного стресса является накопление первичных и вторичных продуктов свободно-радикального окисления. В силу стабильности продукты перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), включая диеновые конъюгаты ПНЖК (ДК) и основной продукт реакции с тиобарбитуровой кислотой – малоновый диальдегид (МДА) являются наиболее информативными показателями наличия окислительного стресса.

В табл. 1 представлены результаты измерений содержания продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в различные периоды онтогенеза кроликов-самцов при добавлении синтетических антиоксидантов.

По содержанию диеновых конъюгатов в плазме крови в контрольной группе животных с возрастом отмечаются значительные изменения. Наблюдается достоверная (до 18,2 % – в 120 дней и до 13,7 % – в 180 дней) тенденция к уменьшению. В то же время в отношении содержания малонового диальдегида следует отметить менее значительное по мере взросления (на 180-й день), но достоверное уменьшение его содержания примерно на 17,9 % ($p < 0,05$). В сравнении с полученными данными на самках следует отметить аналогию в тенденции с той лишь разницей, что в отличие от самцов снижение содержания продуктов ПОЛ на самках по мере взросления шло почти в 2 раза интенсивнее.

В экспериментальных группах (группы II–IV) в возрастном аспекте имеются аналогичные и достоверные тенденции к снижению диеновых конъюгатов: на 29,3 % в середине опыта и на 32,2 % в конце опыта в группе II, на 24,8 % и 26,7 % – в группе III и на 24,1 % и 26,1 % – в IV группе соответственно. Что касается данных по отношению к контрольной группе, то имеется значительное достоверное снижение содержания ДК в середине эксперимента в группах II и

Таблица 1

Содержание продуктов перекисного окисления липидов в плазме крови самцов кроликов

Возраст, дни	Группа			
	I (контроль)	II	III	IV
Диеновые конъюгаты, нмоль/мл				
60	2,04 ± 0,07	2,05 ± 0,09	2,06 ± 0,19	2,03 ± 0,16
120	1,67 ± 0,02	1,45 ± 0,04*	1,55 ± 0,14	1,54 ± 0,02*
180	1,76 ± 0,05	1,39 ± 0,06*	1,51 ± 0,13	1,50 ± 0,15
Малоновый диальдегид, нмоль/мл				
60	1,23 ± 0,09	1,21 ± 0,08	1,22 ± 0,07	1,21 ± 0,07
120	1,01 ± 0,11	0,74 ± 0,07	0,76 ± 0,05	0,85 ± 0,04
180	1,01 ± 0,04	0,68 ± 0,06*	0,68 ± 0,07*	0,74 ± 0,05*

* $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе I.

IV на 13,2 % и 7,8 % соответственно ($p < 0,05$). В III группе достоверных изменений не отмечается. Имеется значительное достоверное снижение содержания ДК к концу эксперимента в группе II на 21 % ($p < 0,05$). Во II и III опытной группе содержание продуктов ПОЛ в плазме крови самцов кроликов по отношению к контролю уменьшилось на 14,2 % и 14,8 % соответственно, но эти отличия недостоверны (табл. 1).

Выявлено значительное уменьшение уровня малонового диальдегида в эритроцитах самцов кроликов опытных групп в возрастной динамике по отношению к началу опыта. Так, в середине опыта содержание малонового диальдегида снизилось во всех опытных группах, однако наиболее существенное понижение уровня содержания продукта ПОЛ по отношению к началу отмечено во II и III опытных группах на 38,8 % и 37,7 % соответственно. В конце опыта (возраст 180 дней) содержание МДА снизилось еще больше во всех опытных группах животных (на 43,8 % – во II, на 44,3 % – в III и на 29,7 % – в IV группе) по отношению к началу эксперимента. По отношению к контролю содержание МДА в середине опыта недостоверно снизилось во II опытной группе на 26,7 %, в III – на 24,7 % и в IV группе – на 15,8 % соответственно. В конце опыта по отношению к контрольным значениям достоверное снижение составило: во II, III – на 32,7 и в IV опытных группах – на 26,7 % ($p < 0,05$) (табл. 1).

Таким образом, действие синтетических антиоксидантов у самцов кроликов на про-

дукты ПОЛ практически повторяет их эффект у самок с разницей по амплитуде снижения. Можно предположить, что эти различия обусловлены большей склонностью к образованию свободных радикалов у самок более зрелого возраста.

Среди низкомолекулярных антиоксидантов, представляющих неферментативное звено антиоксидантной системы, значительная роль принадлежит витамину E (α -токоферолу) и витамину A (ретинолу). Предотвращая окисление ненасыщенных жирных кислот – важнейших компонентов клеточных мембран и органелл, токоферол поддерживает структурную целостность клеток (Зенков, 2001). Кроме того, витамин E, который в организме кроликов не синтезируется, известен как витамин плодовитости, или фактор размножения. Известно, что отсутствие токоферола в пище животных ведет к бесплодию: у самцов прекращается образование спермы, у самок наблюдается резорбция яйцеклеток. Установлено, что потребность самцов в витамине E в 1,5 раза выше, чем у самок.

Антиоксидантную систему защиты организма условно можно разделить на неферментативные и ферментативные звенья, причем первые в большей степени выполняют функцию быстрой инактивации свободных радикалов кислорода и азота, в то время как ферментативные относятся к терминальным системам длительной защиты организма.

Витамины с антиоксидантными свойствами – токоферол (E) и ретинол (A) – относятся к числу

важнейших неферментативных антиоксидантов, реализующих свое действие в мембранной и липопротеиновой фазах. Содержание витаминов А (ретинола) и Е (токоферола) в плазме крови было исследовано в данных экспериментальных условиях. В табл. 2 приведены данные, полученные на самцах кроликов в различных возрастных группах в динамике использования синтетических антиоксидантов.

Исследование содержания альфа-токоферола и ретинола в плазме крови самцов кроликов позволяет выявить возрастную закономерность, заключающуюся в достоверном увеличении содержания токоферола на 21 % и на 25,7 % на сроках 120 и 180 дней по отношению к начальным значениям (в 60 дней), в то время как для ретинола таких изменений не отмечается. Эта возрастная динамика характерна и для самок.

Использование синтетических антиоксидантов в опытных группах (группы II–IV) привело к достоверному увеличению содержания токоферола на 180-й день во всех группах относительно начальных значений: во II группе – на 41,3 %, в III группе – на 28,5 % и в IV группе – на 37,2 % по отношению к начальным значениям. Однако, что касается достоверных различий с контрольной группой, то достоверное увеличение при $p < 0,05$ отмечается для II группы – на 14,7 % (табл. 2).

Содержание витамина А во всех опытных группах самцов кроликов в середине опыта достоверно не изменилось, однако тенденция к более существенному повышению по сравне-

нию с начальным этапом опыта наблюдается в опытных группах животных на 21,7 %, 23,8 % и на 13 % соответственно во II–IV группах на сроке 180 дней (различия по отношению к начальному периоду недостоверны). В то же время по отношению к контролю увеличение содержания ретинола во II опытной группе на 81,8 % можно считать достоверным ($p < 0,05$). Но в других опытных группах (III–IV) значительное увеличение (в III группе – на 54,5 % и в IV группе – на 50 %) не является достоверным из-за высокой дисперсии данных (табл. 2).

Таким образом, характер изменения токоферолов плазмы крови у самцов и самок кроликов почти идентичен, однако в отношении содержания ретинола имеются значительные половые различия неясной природы.

Ферментативная система антиоксидантной защиты на уровне целого организма представлена эритроцитарной системой ферментов, включая супероксиддисмутазу и каталазу в качестве начального звена защиты от супероксид-анион радикалов и перекиси водорода и конечного глутатионового звена – глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в качестве защиты от органических гидроперекисей.

В табл. 3 представлены данные об активности супероксиддисмутазы и каталазы этих ферментов в эритроцитах самцов кролика при воздействии синтетических антиоксидантов.

Анализ возрастной динамики активности супероксиддисмутазы и каталазы показыва-

Таблица 2

Содержание витаминов Е (альфа-токоферола) и А (ретинола) в плазме крови самцов кроликов

Возраст, дни	Группа			
	I (контроль)	II	III	IV
Альфа-токоферол, мкг/мл				
60	1,52 ± 0,02	1,55 ± 0,04	1,54 ± 0,03	1,53 ± 0,03
120	1,84 ± 0,06	1,90 ± 0,07	1,86 ± 0,03	1,87 ± 0,05
180	1,91 ± 0,08	2,19 ± 0,08*	1,98 ± 0,08	2,01 ± 0,11
Ретинол, мкг/мл				
60	0,21 ± 0,05	0,23 ± 0,05	0,21 ± 0,07	0,23 ± 0,03
120	0,25 ± 0,10	0,28 ± 0,09	0,26 ± 0,06	0,26 ± 0,06
180	0,22 ± 0,05	0,40 ± 0,06*	0,34 ± 0,07	0,33 ± 0,10

* $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе I.

Таблица 3

Активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы эритроцитов самцов кроликов

Возраст, дни	Группа			
	I (контроль)	II	III	IV
СОД, усл. ед./мл				
60	1312 ± 61	1311 ± 38	1313 ± 53	1312 ± 47
120	1218 ± 57	1229 ± 68	1222 ± 44	1222 ± 59
180	1083 ± 26	1216 ± 29*	1216 ± 27*	1201 ± 37
Каталаза, кU/мл				
60	368 ± 23	369 ± 25	371 ± 19	370 ± 18
120	345 ± 7	356 ± 20	354 ± 22	354 ± 25
180	317 ± 4	344 ± 5*	348 ± 4*	333 ± 8

* $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе I.

ет достоверное снижение активности обоих ферментов на 17,4 % и на 13,9 % по мере взросления животных. Эти данные, отчетливо проявляющиеся как у самок, так и у самцов, свидетельствуют о наличии параллелизма между оксидантными процессами и окислительным метаболизмом в расчете на единицу массы тела, которые, как известно, являются максимальными в юном возрасте.

В отличие от контрольной группы введение синтетических антиоксидантов самцам кроликов приводило к увеличению активности супероксиддисмутазы. Если в возрастной динамике отмечается лишь тенденция к уменьшению активности примерно на 6,2–7,2 % в различных группах, то по отношению к контрольным уровням активность фермента во всех опытных группах в середине опыта несколько выше (аналогичные параметры в активности супероксиддисмутазы наблюдаются и у самок кроликов). В конце эксперимента это увеличение достоверно (при $p < 0,05$) выше на 12,3 % во II, III и недостоверно – на 10,9 % – в IV опытных группах соответственно (табл. 3).

Если по мере взросления активность каталазы во всех изучаемых группах животных к концу опыта несколько уменьшается по сравнению с начальным этапом исследований, то по отношению к контрольным значениям активность фермента увеличивается в опытных группах в середине (возраст 120 дней) и в конце опыта (возраст 180 дней). Так, по отношению к контрольным уровням активность каталазы в

конце опыта достоверно (при $p < 0,05$) возросла во II и в III опытных группах на 8,5 % и 9,8 %, а в IV – недостоверно на 5 % соответственно. Такое значительное увеличение каталазной активности в группах II и III отличается по амплитуде от более умеренного увеличения активности у самок (табл. 3).

Важнейшей системой инактивации свободных радикалов, а точнее продуктов взаимодействия кислородных радикалов с органическими субстратами, преимущественно ненасыщенными жирными кислотами и образованием гидроперекисей, является комплекс ферментов – глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы. С помощью глутатиона глутатионпероксидаза катализирует реакцию восстановления гидроперекисей.

В табл. 4 представлены данные об активности указанных ферментов в возрастной динамике и при воздействии синтетических антиоксидантов.

В контрольной группе животных активность глутатионпероксидазы с возрастом понижается на 34,8 % (на грани достоверности различий) в возрасте 120 дней и достоверно (при $p < 0,05$) на 41,7 % – в возрасте 180 дней. Глутатионредуктазная активность также имеет тенденцию к уменьшению на 24,7 % к концу опыта (на грани достоверности различий). Скорее всего, эти ферменты, как и супероксиддисмутаза и каталаза, отражают снижение удельного окислительного метаболизма с возрастом.

Таблица 4

Активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы эритроцитов самцов кроликов

Возраст, дни	Группа			
	I (контроль)	II	III	IV
Глутатионпероксидаза, мкмоль/мин мл				
60	24,7 ± 2,7	24,5 ± 2,7	24,7 ± 2,4	24,3 ± 2,9
120	16,1 ± 1,6	19,4 ± 1,3	19,3 ± 1,4	19,2 ± 1,4
180	14,4 ± 0,8	18,3 ± 0,8*	17,4 ± 0,8	17,4 ± 0,7
Глутатионредуктаза, мкмоль/мин мл				
60	2,5 ± 0,2	2,5 ± 0,2	2,5 ± 0,2	2,5 ± 0,2
120	2,3 ± 0,3	2,4 ± 0,3	2,4 ± 0,3	2,4 ± 0,3
180	1,9 ± 0,05	2,1 ± 0,03*	2,04 ± 0,05	2,0 ± 0,06

* $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе I.

Анализ динамики активности глутатионпероксидазы в опытных группах показывает, что к концу экспериментального периода активность фермента последовательно возрастает по отношению к начальным значениям. К концу эксперимента (возраст 180 дней) активность глутатионпероксидазы уменьшается (на грани достоверности различий) во II, III и IV опытных группах на 25,3 %, 29,5 % и 28,4 % по отношению к началу эксперимента. По отношению к контролю увеличение активности во всех опытных группах (II–IV) в середине опыта составляет 20,5 %, 19,9 % и 19,3 %, а уже к концу становится еще выше (во II достоверно при $p < 0,05$ на 27,1 %, и в III и IV – на 20,8 % соответственно) (табл. 4).

Активность глутатионредуктазы в середине эксперимента незначительно отличалась от контрольных показателей, но в конце активность фермента достоверно (при $p < 0,05$) увеличилась во II опытной группе на 10,8 % и в III и IV опытных группах на 9,7 % и 7,5 % соответственно.

По отношению к началу эксперимента в опытных группах (II–IV) активность глутатионредуктазы уменьшилась на 19,3 %, 17,1 % и 16,6 % соответственно (табл. 4).

Результаты исследований активностей ферментов начального и конечного звеньев антиоксидантной системы показывают, что применение синтетических антиоксидантов в той или иной степени индуцирует синхронное образование ферментов для поддержания новых

стационарных условий, связанных со снижением уровня продуктов свободнорадикального и перекисного окисления.

Для того чтобы оценить биологическое действие полученных изменений, целесообразно сопоставить их с некоторыми биологическими параметрами, в частности с показателями прироста живой массы (в табл. 5 представлены результаты этих исследований).

Данные показывают, что к концу опытного периода (возраст 180 дней) живая масса в опытной группе II была достоверно ($p < 0,05$) выше на 4,4 %, чем в контроле. Показатель абсолютного прироста в этой группе был наиболее выражен и за весь период опыта превысил аналогичный показатель в I (контрольной) группе на 7,4 % (табл. 5).

Таким образом, можно считать установленным наличие связи между приростом живой массы и состоянием антиоксидантной защиты в различные периоды онтогенеза.

Мясная продуктивность молодняка самцов кроликов

В конце эксперимента был проведен контрольный убой с 12-часовой голодной выдержкой. Было отобрано по 3 животных из каждой группы. Убойные качества самцов кроликов представлены в табл. 6.

Наибольшая живая масса и масса тушки наблюдались у самцов кроликов II опытной группы, которым вводили в рационы антиок-

Таблица 5

Динамика живой массы молодняка самцов кроликов (кг)

Возраст, дни	Группа			
	I (контроль)	II	III	IV
Глутатионпероксидаза, мкмоль/мин мл				
60	1,54 ± 0,02	1,54 ± 0,01	1,55 ± 0,02	1,53 ± 0,04
120	3,15 ± 0,05	3,19 ± 0,04	3,16 ± 0,03	3,17 ± 0,02
180	3,83 ± 0,02	4,00 ± 0,03*	3,89 ± 0,04	3,91 ± 0,04
Абсолютный прирост, кг				
	2,29 ± 0,04	2,46 ± 0,01*	2,34 ± 0,06	2,38 ± 0,06
В процентах к контрольной группе				
	100	107,4	102,2	103,9

* $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе I.

Таблица 6

Убойные качества самцов кроликов

Группа	Живая масса, кг	Убойный выход, %	Масса, кг			
			тушки	головы	внутренних органов	печени
I (контроль)	3,83 ± 0,03	58,0	2,22 ± 0,03	0,333 ± 0,02	0,651 ± 0,02	0,165 ± 0,08
II	4,00 ± 0,03*	59,3	2,37 ± 0,06	0,348 ± 0,09	0,680 ± 0,03	0,171 ± 0,06
III	3,89 ± 0,01	58,2	2,26 ± 0,02	0,338 ± 0,09	0,661 ± 0,03	0,168 ± 0,05
IV	3,91 ± 0,03	58,3	2,28 ± 0,04	0,340 ± 0,01	0,665 ± 0,04	0,167 ± 0,08

сидантные препараты в дозах 250 мг/кг. Масса тушки у кроликов II опытной группы была достоверно на 6,8 % выше, чем у кроликов контрольной группы (различия достоверны при $p < 0,05$) и на 4,9 и 3,9 % выше, чем у кроликов III и IV опытных групп.

Убойный выход в контрольной группе был на 1,3 % ниже, чем у кроликов II опытной группы. По сравнению с II и III опытными группами различия незначительные.

Как показала дегустационная оценка мяса (мышцы бедра и длиннейшая) и бульона, наилучшие вкусовые качества отмечены у кроликов II опытной группы. Несколько хуже вкусовые качества мяса и бульона самцов кроликов I (контрольной), III и IV опытных групп.

В сравнении с кроликами I (контрольной), III и IV опытных групп шкурки самцов кроликов II опытной группы имели на единицу площади

более толстую мездру и соответственно наибольшую массу. Животные II опытной группы по длине волос, массе шкурок и толщине мездры превосходят животных I (контрольной), III и IV опытных групп.

Классность самцов кроликов

Итоговая оценка животных по различным признакам позволяет устанавливать классную принадлежность. Самцы кроликов всех изучаемых групп имели классность не ниже I. Животные II опытной группы по телосложению и густоте волосяного покрова оказались лучшими. По живой массе и воспроизводительной способности самцы кроликов всех исследуемых опытных групп отнесены к I классу. Конвенциональные условия содержания самцов кроликов в биоклинике существенного влияния на классность не оказали.

Экономическая эффективность использования антиоксидантных препаратов (самцы кроликов)

В период проведения опыта поедаемость комбикорма была хорошей и в целом равномерной. Животные I, II, III и IV групп потребили за первый период (60–120 дней) опыта 82,6, 85,1, 81,8 и 82,2 кг комбикорма и во второй период (120–180 дней) – 106,9, 104,5, 102,7 и 102,2 кг соответственно. За весь опытный период (60–180 дней) потреблено 189,4; 189,6; 184,5 и 184,4 кг комбикорма соответственно (табл. 7).

За период с 60- до 180-дневного возраста наименьшая величина затрат корма на 1 кг прироста живой массы была у животных II, III и IV опытных групп (7,71; 7,88 и 7,76 кг). В сравнении с контрольной группой молодняк самцов кроликов II, III и IV опытных групп в период выращивания с 60- до 180-дневного возраста затрачивал кормов на 1 кг прироста меньше на 6,8, 4,7 и 6,2 % соответственно (табл. 8).

Экономическая эффективность рассчитывалась в ценах 2010 г. с учетом показателей среднесуточного прироста, сохранности поголовья и общих затрат корма за весь период опыта. Анализ результатов показал, что по сравнению с контрольной группой стоимость прироста во II, III и IV группах была ниже на 10,52; 7,27 и 9,59 руб. соответственно. Наиболее низкая стоимость прироста отмечена во II опытной группе самцов кроликов.

Обсуждение

Как известно, у растущих животных имеет место высокая скорость окислительного или энергетического метаболизма, что в принципе сопровождается побочным дополнительным образованием активных форм кислорода и азота (АФК, АФА).

Известно, что основной функцией АОС является поддержание на стационарном уровне концентрации АФК, участвующих в таких про-

Таблица 7

Потребление корма (самцы кроликов)

Показатель	Группа			
	I (контроль)	II	III	IV
Возраст, дни	60–120			
Кормодни	600	600	600	600
Потреблено корма, кг	82,6	85,1	81,8	82,2
Потреблено корма, кг к. ед*.	76,6	78,9	75,9	76,2
Потреблено корма, г/гол./сут	137,6	141,9	136,4	137,0
Потреблено корма, к. ед./гол./сут	127,6	131,6	126,5	127,1
Возраст, дни	120–180			
Кормодни	600	600	600	600
Потреблено корма, кг	106,9	104,5	102,6	102,2
Потреблено корма, кг к. ед*.	99,1	96,9	95,2	94,8
Потреблено корма, г/гол./сут	178,1	174,1	171,1	170,4
Потреблено корма, к. ед./гол./сут	165,2	161,5	158,7	158,0
Возраст, дни	60–180			
Кормодни	1200	1200	1200	1200
Потреблено корма, кг	189,4	189,6	184,5	184,4
Потреблено корма, кг к. ед*.	175,7	175,8	171,1	171,0
Потреблено корма, г/гол./сут	157,9	158,0	153,7	153,7
Потреблено корма, к. ед./гол./сут	146,4	146,5	142,5	142,5

Примечание. Здесь и далее в таблицах в 100 г комбикорма содержится 92,74 к. ед.*

Таблица 8

Затраты корма на 1 кг прироста самцов кроликов

Возраст, дни	Группа							
	I (контроль)		II		III		IV	
	Затраты корма, кг	Затраты корма, кг к. ед.	Затраты корма, кг	Затраты корма, кг к. ед.	Затраты корма, кг	Затраты корма, кг к. ед.	Затраты корма, кг	Затраты корма, кг к. ед.
60–120	5,13	4,76	5,16	4,79	5,09	4,72	5,02	4,66
120–180	15,76	14,62	12,90	11,96	14,03	13,01	13,85	12,85
60–180	8,27	7,66	7,71	7,15	7,88	7,31	7,76	7,20

цессах жизнедеятельности клетки, как дифференцировка, пролиферация и др. (Меньщикова и др., 2006). Для сохранения гомеостаза при действии на организм разнообразных факторов среды необходим баланс между системами генерации и тушения АФК (Хавинсон и др., 2003). Функциональная роль антиоксидантной системы эритроцитов связана не только с каскадом ферментов, включая супероксиддисмутазу, каталазу, глутатионпероксидазу и глутатионредуктазу, но и с высокими диффузионными параметрами контакта с плазмой крови, содержащей продукты перекисного окисления, активные формы кислорода и др.

Эта система может представлять информативное значение благодаря относительному (например 68 суток у кроликов) долгожительству эритроцита.

В нормальных физиологических условиях деструктивное действие АКМ сдерживается многоуровневой системой антиоксидантной защиты. В случае недостатка антиоксидантов в организме развиваются процессы окислительного стресса, сопровождающиеся нарушением баланса в системе прооксидант–антиоксиданты. Организм находится в состоянии окислительного стресса, если суммарные отклонения от контрольных значений в процессе накопления основных продуктов перекисного окисления липидов превышают активность основного ферментативного звена, если наоборот, то в состоянии активированной компенсации. При этом необходимо учитывать, что свободные радикалы играют также и положительную роль в организме, в частности в образовании простагландинов, в системе антибактериальной защиты и др.

Исследование контрольной группы животных (самцов кроликов) позволяет выявить некоторые особенности формирования антиоксидантного статуса организма. Все это сопровождается снижением стационарных уровней продуктов свободнорадикального и перекисного окисления эндогенных органических соединений при одновременном увеличении активности неферментной и ферментной систем защиты. Оптимальная оценка антиоксидантного статуса организма может быть обеспечена оценкой баланса между отклонениями от контрольных значений в суммарном накоплении продуктов ПОЛ и активностью основных ферментных и неферментных антиоксидантных систем. К числу таких показателей можно отнести содержание продуктов перекисного окисления липидов – диеновых конъюгатов ПНЖК (ДК) и малонового диальдегида (МДА) в плазме крови и активность антиокислительных ферментов эритроцитов – глутатионпероксидазы (ГП), супероксиддисмутазы (СОД), глутатионредуктазы и каталазы.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что введение синтетических антиоксидантов способствует поддержанию высокой активности ферментной антиоксидантной системы эритроцитов самцов кроликов, что приводит к снижению стационарного уровня продуктов свободнорадикального и перекисного окисления эндогенных соединений. Эти данные наиболее важно рассматривать в сочетании с традиционными биологическими признаками, включая пол, прирост массы, продуктивность и др.

Определение активности основных антиоксидантных ферментов и количества продуктов перекисного окисления липидов в возрастной динамике может представлять определенный

практический интерес для кролиководов и биологов в понимании функционирования антиоксидантной системы защиты организма. Так, оценка баланса между уровнем накопления продуктов перекисного окисления липидов и активностью антиоксидантных ферментов (системы АОС-ПОЛ) может быть использована, в частности, в кормлении животных разных возрастных групп и пола для получения максимально возможной продуктивности.

Литература

- Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови // Лаб. дело. 1983. № 3. С. 33–35.
- Мальцев Г.Ю., Васильев А.В. Способ определения активности каталазы и супероксиддисмутазы эритроцитов на анализаторе открытого типа // Вопр. мед. химии. 1994. № 2. С. 56–58.
- Мальцев Г.Ю., Орлова Л.А. Оптимизация определения активности глутатионредуктазы эритроцитов человека на полуавтоматическом анализаторе // Вопр. мед. химии. 1993. № 2. С. 59–61.
- Мальцев Г.Ю., Тышко Н.В. Методы определения содержания глутатиона и активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Гигиена и санитария. 2002. № 2. С. 69–72.
- Меньшикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. М.: Слово, 2006. 556 с.
- Зенков Н.К. Окислительный стресс. Биохимические и патофизиологические аспекты / Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньшикова. М.: Наука: Интерпериодика, 2001. 343 с.
- Хавинсон В.Х., Баринов В.А., Арутюнян А.В., Малинин В.В. Свободнорадикальное окисление и старение. СПб: Наука, 2003. 327 с.
- Mihara M., Uchiyama M., Fukuzawa K. Thiobarbituric acid value on fresh homogenate of rat as a parameter of lipid peroxidation in aging, CCl₄ intoxication and vitamin E deficiency // Biochem. Med. 1980. V. 23. № 3. P. 302–311.
- Mille G. The purification and properties of glutathione peroxidase of erythrocytes // J. Biol. Chem. 1959. V. 244. P. 502–506.
- Niashikimi M., Rao N.A., Jagi K. The occurrence of superoxide anion // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1972. V. 46. № 2. P. 849–854.
- Oshino N., Chance B., Sies H. The role of H₂O₂ generation in perfused rat liver and the reaction of catalase compound I and hydrogen donors. II // Arch. Biochem. 1973. V. 154. P. 117–131.
- Placer Z. Lip peroxidation systeme im biologischen material // Nahrung. 1968. Bd. 12. S. 679.
- Tilbotsen J.A., Sauberlich H.S. Effect of riboflavin depletion and repletion on the erythrocyte glutathione reductase in the rat // J. Nutr. 1971. V. 101. P. 1459.

LIPID PEROXIDATION PRODUCTS AND NONENZYMATIC AND ENZYMATIC ANTIOXIDANT SYSTEMS IN MALE RABBITS: AGE DYNAMICS

D.D. Adjiev

Russian State Agrarian University – MTAA named after K.A. Timiryazev, Moscow, Russia;
Hematology Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia,
e-mail: adjiev-dd@mail.ru

Summary

The following parameters essential for antioxidant protection were studied in blood plasma of rabbits of various ages: level of lipid peroxidation, judged from the contents of malondialdehyde and diene conjugates; the state of nonenzymatic antioxidant system, from the contents of tocopherol and retinol; and contents of erythrocyte enzymes (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase). Many of the parameters studied showed unique age dynamics patterns, different from those previously studied in females. Certain doses of synthetic antioxidants proved to control the balance in the antioxidant protection system and reduce oxidative stress. The data are analyzed in the context of biologic features of oxidative metabolism in animals, adaptive capacity and productivity.

Key words: rabbits, lipid peroxidation, antioxidant system, malondialdehyde, diene conjugates, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase.

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ЭКСПЕРИМЕНТА ПО МАССОВОЙ ИММУНОПРЕЦИПИТАЦИИ ХРОМАТИНА С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ РАСПОЗНАВАНИЯ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ

В.Г. Левицкий, Г.В. Васильев, Д.Ю. Ощепков, Н.И. Ершов, Т.И. Меркулова

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

Метод иммунопреципитации хроматина с последующим секвенированием всего пула выделенных фрагментов (ChIP-Seq) широко используется для получения картины полногеномного распределения сайтов связывания различных транскрипционных факторов. В настоящей работе проведен анализ структуры профилей локусов ChIP-Seq, полученных в экспериментах по иммунопреципитации хроматина печени мыши с использованием антител к транскрипционному фактору FoxA2 (Wederell *et al.*, 2008), с помощью разработанных нами методов распознавания сайтов связывания белков семейства FoxA. По результатам анализа предложена следующая классификация профилей локусов: 1) унимодальные локусы (локусы, в профиле которых имеется единственный пик) длиной до 600 нт; эти локусы, вероятно, образованы одним сайтом связывания FoxA и 2) мультимодальные локусы (локусы, в профиле которых можно выделить два и более отдельно стоящих пика) длиной до 600 нт и все локусы большей длины; локусы этой группы, по-видимому, сформированы множеством отдельных сайтов.

Ключевые слова: транскрипционные факторы FoxA, сайты связывания, компьютерные методы распознавания, данные иммунопреципитации хроматина.

Введение

Среди методов, позволяющих изучать связывание транскрипционных факторов (ТФ) с ДНК, особое место занимает метод иммунопреципитации хроматина (ChIP, Farnham, 2009). Метод состоит в обработке живых клеток формальдегидом, вызывающей образование ковалентных сшивок между ДНК и близкорасположенными участками белков, а также белок-белковых сшивок. Затем хроматин дробится и с помощью иммунопреципитации со специфическими антителами выделяются районы ДНК, с которыми связываются интересные исследователя белки (Dedon *et al.*, 1991). Принципиальными преимуществами перед другими вариантами метода обладает иммунопреципитация хроматина с последующим секвенированием всего пула выделенных фрагментов (ChIP-Seq) на приборах массового

параллельного секвенирования ДНК (Illumina или SOLiD). Во-первых, результатом ChIP-Seq является картина полногеномного распределения сайтов связывания транскрипционных факторов (ССТФ). Во-вторых, полученный результат свободен от предварительной селекции исходных данных, которые могут существенно исказить конечный результат, что неизбежно в случае анализа заранее выбранных последовательностей. В-третьих, результатом ChIP-Seq являются не относительные уровни сигнала, как в случае ряда других вариантов ChIP, а конкретные районы последовательностей ДНК, что дает несравненно больше возможностей для теоретического анализа результатов эксперимента. После первичной обработки результат ChIP-Seq эксперимента оказывается представленным в виде наложенной на геномную последовательность совокупности пиков, соответствующих районам концентрации от-

дельных коротких фрагментов – чтений (reads), каждый из которых является результатом единичного акта связывания. В идеальном случае пик должен иметь форму, близкую к форме кривой нормального распределения, и важной характеристикой пика является высота – число чтений, перекрывающихся на одном нуклеотиде (Robertson *et al.*, 2007). Поэтому большую высоту пика принято интерпретировать либо как более высокое сродство ТФ к соответствующему сайту, либо как наличие нескольких близкорасположенных сайтов в данном районе (Jothi *et al.*, 2008). Однако важно отметить, что обычно значительная часть пиков ChIP-Seq имеет форму, существенно отличающуюся от теоретически ожидаемой. Например, пик может иметь несколько вершин вместо одной, иметь значительную длину (несколько т.п.н.) и т. д., что допускает несколько различных объяснений. Во-первых, это может быть результатом статистических флуктуаций, вызванных недостаточной глубиной чтения. Во-вторых, к аналогичному эффекту может приводить кластер близко расположенных ССТФ. В-третьих, на особенности позиционирования ТФ на ДНК существенное влияние могут оказывать структура хроматина и взаимодействие данного ТФ с ТФ-партнерами и другими компонентами хроматина. Одним из подходов, позволяющих приблизиться к решению этих вопросов, являются надежные биоинформатические методы распознавания ССТФ в последовательностях ДНК подпиковых областей.

Целью данной работы были исследование формы пиков ChIP-Seq, полученных в экспериментах по иммунопреципитации хроматина печени мыши с использованием антител к ТФ FoxA2 (Wederell *et al.*, 2008), и определение плотности и локализации потенциальных FoxA сайтов в подпиковых районах локусов разной формы профиля.

Материалы и методы

Разработка критериев сортировки профилей локусов ChIP-Seq эксперимента

Данные ChIP-Seq эксперимента по выявлению мишеней FoxA2 взяты из работы (Wederell *et al.*, 2008, <http://www.bcgsc.ca/data/ChIP-Seq>).

Они представлены в виде: 1) профиля ChIP-Seq эксперимента, который содержит целые значения ≥ 1 и показывает, сколько раз происходило наложение секвенированных участков ДНК на соответствующий район геномной последовательности; 2) таблицы хромосомных локализаций 11475 районов геномной ДНК мыши (локусов), для которых максимум профиля ChIP-Seq был равен или превышал значение 10. Авторы полагают, что именно это значение позволяет надежно выявить районы, потенциально содержащие мишени ТФ FoxA. Поэтому далее аннотированным пиком мы будем считать область локуса с высотой профиля ChIP-Seq не менее 10. Максимальная высота пика по всем локусам составляет 251.

Профиль считается унимодальным, если в нем есть одна неразрывная область максимальных значений (единственный пик), в мультимодальном профиле можно выделить два и более отдельно стоящих пика. Для определения, является ли профиль локуса уни- или мультимодальным, нами применен следующий подход. Пусть профиль длины L нт представляется значениями $\{H_n\}$, $1 \leq n \leq L$. Выберем некоторое значение ширины Δ нт для расчетов локальных максимумов профиля $\{M_n\}$. Если $\Delta < L$, то при условии $\Delta/2 > n > L - \Delta/2 + 1$ $M_n = \text{Max}_{i=n-\Delta/2+1}^{n+\Delta/2}(H_i)$, а в случаях $n < \Delta/2$ или $n > L - \Delta/2 + 1$ соответственно $M_n = M_{\Delta/2}$ или $M_n = M_{L-\Delta/2+1}$. Если $\Delta \geq L$, то для любой позиции профиля: $M_n = \text{Max}_{i=1}^L(H_i)$.

Расчет профиля локальных максимумов $\{M_n\}$ и выбор порога отсечения T ($0 < T < 1$) позволяют разделить все L позиций профиля на высокие «холмы» и низкие «ямы». Если значение профиля H_n удовлетворяет условию $H_n \geq T \times M_n$, то эта n -я позиция определялась нами как «холм», в противном случае – как «яма». При заданных параметрах Δ и T унимодальным считается локус, имеющий один непрерывный холм, в противном случае локус считается мультимодальным. В анализе мы использовали одно значение интервала $\Delta = 500$ нт и два значения порога отсечения $\{T_1, T_2\} = \{0,5, 0,8\}$. Выборки уни- и мультимодальных локусов составлялись на основе критерия сохранения уни- или мультимодальности локуса при двух порогах отсечения T_1 и T_2 .

Выборки уни- и мультимодальных локусов, использованные в анализе

По исходной выборке 11475 локусов (Wederell *et al.*, 2008) с применением описанного выше подхода составлены выборки всех унимодальных и мультимодальных локусов объемов 4941 и 2909 соответственно. Наряду с этими двумя классами в исходной выборке выделяются два смешанных класса: 1) 1977 локусов, которые при пороге отсечения 0,5 классифицировались как унимодальные, а при пороге 0,8 как мультимодальные; 2) 1648 локусов, каждый из которых при этих же порогах являлся мульти- и унимодальным соответственно. Далее смешанные классы мы не рассматривали.

Для анализа обогащения потенциальных ССТФ в локусах (а) вблизи пиков; (б) с различной максимальной высотой пика и (в) сравнения уни- и мультимодальных локусов нами были составлены следующие выборки: районы «холмов» уни- и мультимодальных локусов, максимальная высота пика для которых не превышала 10, 14 и 20. Для унимодальных локусов, по их определению, один «холм» соответствует одному локусу, в случае мультимодальных из каждого локуса в выборку включался единственный «холм» с самой большой высотой пика, в случае равенства высот двух «холмов» выбирался один, более протяженный. Всего составлено 12 выборок: по 3 уни- и мультимодальных типа для двух порогов отсечения 0,8 и 0,5. В табл. 1 дано описание составленных выборок уни- и мультимодальных локусов.

Выборки всех уни- и мультимодальных локусов с высотой пика ≥ 10 были разбиты соответственно на 6 и 5 классов согласно распределению длин последовательностей (табл. 2). В каждую из выборок входили только последовательности, длины которых удовлетворяют определенным условиям (1-я колонка табл. 2).

Разработка метода распознавания FoxA сайтов

Для составления обучающих выборок ССТФ подсемейства FoxA была использована выборка последовательностей 81 экспериментально подтвержденного сайта. Часть из них, 37 последовательностей, была взята из базы данных SAMPLES (<http://srs6.bionet.nsc.ru/srs6bin/cgi-bin/wgetz?-page+LibInfo+newId+lib+SAMPLES>) (Kolchanov *et al.*, 2002), а остальные 44 последовательности были собраны по литературным данным.

Для выявления наиболее представительных вырожденных олигонуклеотидных мотивов – коротких слов фиксированной длины, записанных в 15-буквенном IUPAC коде, в обучающей выборке использовался метод генетического алгоритма (ГА) (Levitsky, 2010). Мы произвели поиск набора мотивов длины не менее 12 нт, при этом допускалось описание одного сайта сразу несколькими мотивами. Затем на основе выявленных мотивов были составлены две выравненные обучающие выборки ССТФ FoxA. Выборки были использованы для построения методов распознавания ССТФ FoxA на основе подхода

Таблица 1

Выборки районов «холмов» уни- и мультимодальных локусов, полученные при двух порогах отсечения T профилей ChIP-Seq

Тип выборки	Высота пика	Объем выборки	Медиана по длинам последовательностей в выборке (нт) при пороге отсечения T	
			$T = 0,8$	$T = 0,5$
Унимодальные	≥ 10	4941	137	242
	≥ 14	2329	139	243
	≥ 20	1129	144	245
Мультимодальные	≥ 10	2909	130	245
	≥ 14	1312	133	243
	≥ 20	530	140	242

Таблица 2
Выборки уни- и мультимодальных локусов, соответствующие сходным диапазонам длин локусов L (для всех выборок высота пика ≥ 10)

Диапазон длины, L (нт)	Уни-модальные	Мульти-модальные
$L \leq 400$	1291	
$400 < L \leq 600$	1933	183
$600 < L \leq 800$	1239	395
$800 < L \leq 1000$	397	744
$1000 < L \leq 1200$	75	689
$L > 1200$	6	898
Σ	4941	2909

оптимизированных весовых матриц (PWM, Position Weight Matrix) (Levitsky *et al.*, 2007). Ранее установлено, что повышению точности распознавания способствуют (1) привлечение фланкирующих последовательностей и (2) рассмотрение динуклеотидной статистики (Zhang, Marr, 1993; Gershenson *et al.*, 2005; Levitsky *et al.*, 2007). Поэтому в каждой из выборок длина последовательностей, включающих мотив в центральном положении, составляла 32 нт, а для расчета весов матриц мы использовали динуклеотидные частоты. Для анализа результатов ChIP-Seq эксперимента (Wederell *et al.*, 2008) с помощью 1-й и 2-й матриц были выбраны пороги 0,68 и 0,685 соответственно. Эти пороги установлены методом оценки точности распознавания со скользящим контролем (jack-knife), они соответствуют ошибке недопредсказания 50 % и ошибкам перепредсказания $3,8E-04$ и $5,1E-04$ (Левицкий и соавт., в печати).

Результаты и обсуждение

Построение методов распознавания ССТФ FoxA на основе поиска мотивов

Проведенный ранее предварительный анализ последовательностей ССТФ FoxA выявил большую их вариабельность. Так, например, в выборке из 81 экспериментально подтвержденного ССТФ FoxA с помощью выявленного ранее консенсуса сайта FoxA VAWTRTTKRTY

(Welsheimer, Newbold, 1996) удалось обнаружить лишь 18 последовательностей с не более чем одним несовпадением, что составило около 22 % от всей выборки. В связи с этим составление стандартными методами выравнивания качественной выборки, включающей все сайты (81), было невозможным. Очевидно, требовалось выделение подвыборок сходных сайтов из исходной выборки. Эта задача была решена путем поиска вырожденных олигонуклеотидных мотивов. В качестве наиболее представленных мотивов было найдено два: TRTTTRYH и YRTTKDYDYD (R=A/G, Y=T/C, H=A/T/C, K=T/G, D=A/T/C). Мотив TRTTTRYH встретился в 53 последовательностях выборки (более 65 % от всего объема). Мотив YRTTKDYDYD встретился в другом (частично пересекающемся с первым) наборе из 48 последовательностей (более 59 %). Мотивы TRTTTRYH и YRTTKDYDYD вместе или отдельно содержатся в 64 последовательностях выборки из 81 ССТФ FoxA (79%) и, следовательно, существенно лучше для описания выборки, чем консенсус VAWTRTTKRTY (Welsheimer, Newbold, 1996), описывающий лишь 22 % выборки. При этом оценка частот встреч по случайным причинам мотива VAWTRTTKRTY с не более чем одним несовпадением составляет $1/1021$ нт, а для мотивов TRTTTRYH и YRTTKDYDYD эти оценки составляют $1/1183$ и $1/813$ нт соответственно. Таким образом, при значительно лучшем описании выборки парой выявленных нами мотивов по сравнению с принятым консенсусом вероятность наблюдения каждого из рассматриваемых мотивов по случайным причинам оказывается сопоставимой. На основании найденных мотивов было сформировано две выравненных подвыборки ССТФ FoxA, которые легли в основу построения методов распознавания этих факторов и были обозначены как «метод D» и «метод E», использованные для анализа данных ChIP-Seq эксперимента.

Общий анализ выборок ChIP-Seq локусов

Для изучения обогащения потенциальными сайтами FoxA как всего набора локусов ChIP-Seq, так и последовательностей, классифицированных нами как «холмы» в уни- и мультимодальных локусах при двух порогах отсечения

$T = 0,5$ и $0,8$, было проведено распознавание сайтов FoxA с помощью метода D (табл. 3). Для оценки обогащения мы сравнивали плотность потенциальных сайтов в локусах с плотностью потенциальных FoxA в геноме мыши и в случайных последовательностях, полученных путем случайного многократного перемешивания букв в последовательностях локусов. Аналогичные результаты были получены с использованием метода E.

Как видно из табл. 3, в целом геном обогащен потенциальными сайтами FoxA по сравнению со случайными последовательностями. Как ожидалось, в холмах как уни-, так и мультимодальных локусов плотность потенциальных сайтов существенно выше, чем в полноразмерных локусах. В свою очередь, плотность потенциальных сайтов в полноразмерных локусах заметно выше, чем в полном геноме и случайных последовательностях. Также важно отметить,

что чем жестче порог отсечения ($T = 0,8$ по сравнению с $T = 0,5$), тем плотность сайтов выше, что говорит в целом о том, что потенциальные сайты предпочтительно располагаются ближе к максимуму пика.

Доля локусов, содержащих потенциальные FoxA сайты, и анализ отклонений позиций потенциальных сайтов от аннотированных пиков

Учитывая, что в ходе эксперимента ChIP-Seq для проведения массового секвенирования геномная ДНК разрезается на фрагменты средней длины 200 нт (Wederell *et al.*, 2008), то возможно смещение пиков относительно сайтов FoxA на расстояние до 200 нт. Именно поэтому мы можем принять отклонение 200 нт как допустимое смещение потенциальных сайтов от пиков профиля ChIP-Seq. Напомним, что аннотированным

Таблица 3

Оценка обогащения потенциальными сайтами FoxA (метод D) последовательностей ChIP-Seq по сравнению с ожиданием по полному геному мыши и по случайным последовательностям

Выборки Background		Частота встреч	Отношение частоты встреч по отношению:		
			к случайным последовательностям	к геномным последовательностям	
Случайные		1/3512	1	0,34	
Геном (все хромосомы мыши)		1/1178	2,98	1	
Выборки ChIP-Seq		Высота пика			
Вся длина	Все локусы		1/765	4,59	1,54
	Все унимодальные	≥ 10	1/711	4,94	1,66
	Все мультимодальные		1/834	4,21	1,41
Холмы, $T = 0,8$	Унимодальные	≥ 10	1/302	11,64	3,90
		≥ 14	1/247	14,20	4,76
		≥ 20	1/226	15,51	5,20
	Мультимодальные	≥ 10	1/305	11,51	3,86
		≥ 14	1/288	12,19	4,09
		≥ 20	1/275	12,78	4,29
Холмы, $T = 0,5$	Унимодальные	≥ 10	1/469	7,48	2,51
		≥ 14	1/406	8,64	2,90
		≥ 20	1/369	9,50	3,19
	Мультимодальные	≥ 10	1/499	7,03	2,36
		≥ 14	1/480	7,32	2,45
		≥ 20	1/466	7,54	2,53

пиком мы считаем область локуса с высотой профиля ChIP-Seq не менее 10. Таким образом, нами были приняты следующие критерии для подтверждения достоверности распознавания предсказанных методом PWM потенциальных сайтов на основе данных профилей ChIP-Seq: 1) каждое предсказание должно иметь значение профиля PWM больше заданного порога; 2) отклонение позиции потенциального сайта от позиции профиля со значением большим либо равным 10 должно быть не более 200 нт.

Проанализированы выборки полноразмерных локусов, для которых максимальная высота пика не превосходит заданное значение $H_m \geq H$, ($10 \leq H \leq 50$). Для каждой выборки определены: 1) отношение числа локусов, в которых есть хотя бы один потенциальный сайт, к числу всех локусов; 2) отношение числа локусов, в которых есть хотя бы один потенциальный сайт с отклонением не более 200 нт от ближайшей позиции локуса с высотой ≥ 10 , к числу всех локусов. Результаты расчетов представлены на рис. 1 и 2. Данные расчеты проводились для методов D, E, а также для метода, построенного на основе их объединения, т. е. в этом случае учитывались сайты, распознанные любой из двух матриц.

Как видно из рис. 1, 2, методы D и E описывают меньшее количество сайтов в локусах с большой высотой пика по сравнению с локусами со средней высотой пика. Максимальную долю локусов методы D и E описывают в диапазоне высот пиков от 25 до 30. Из сравнения рис. 1 и 2 можно показать, что в 7 % локусов с максимальной высотой пика не менее 10 потенциальный сайт отклоняется от аннотированного пика более чем на 200 нт. При возрастании высоты пика до 25–30 это значение падает до 4 %, снижаясь до 2 % на больших высотах пика (около 50).

Анализ отклонений позиций потенциальных сайтов от аннотированных пиков для уни- и мультимодальных локусов

Рассмотрим две выборки локусов, уни- и мультимодальных, и проведем расчет отклонений потенциальных сайтов от аннотированных пиков. Затем по каждой из этих выборок мы рассчитаем долю потенциальных сайтов, для которых отклонение от аннотированного пика будет меньше заданного значения (10, 20 нт и т. д.). Результаты расчетов для метода D представлены

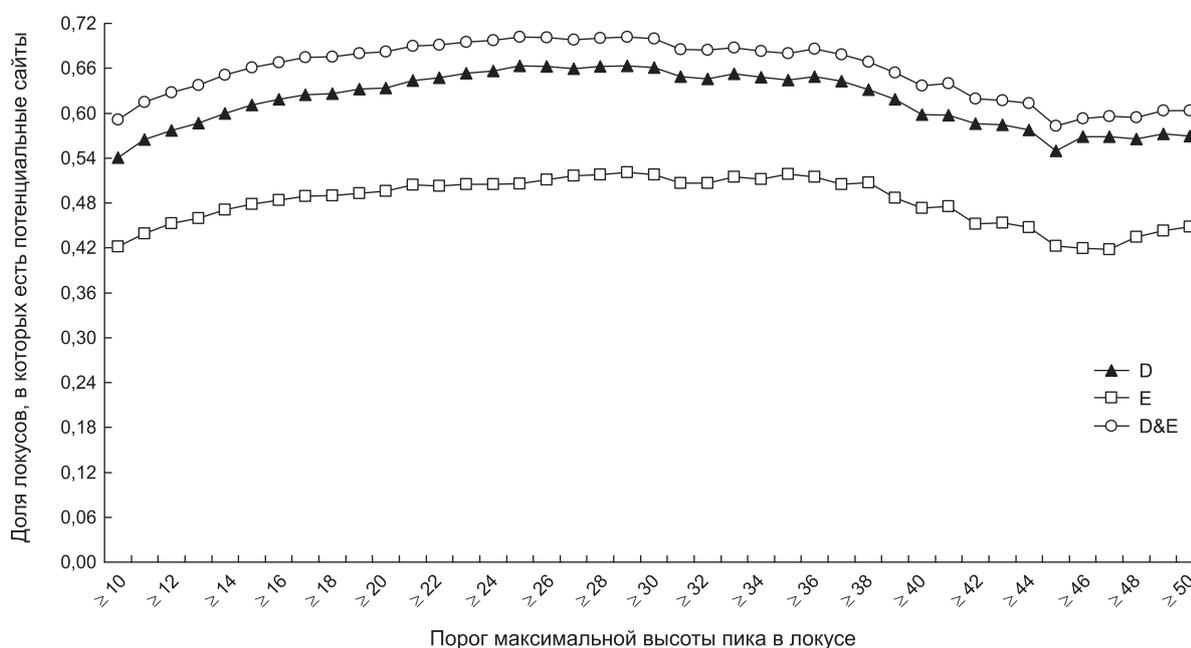


Рис. 1. Анализ выборок локусов, характеризуемых разной максимальной высотой пиков.

Каждая точка графика соответствует расчетам для выборки, в которую входили только локусы с максимальной высотой пика не менее заданного значения (ось X). По оси Y отложена доля локусов, имеющих потенциальные сайты, по отношению к числу всех локусов для заданной выборки.

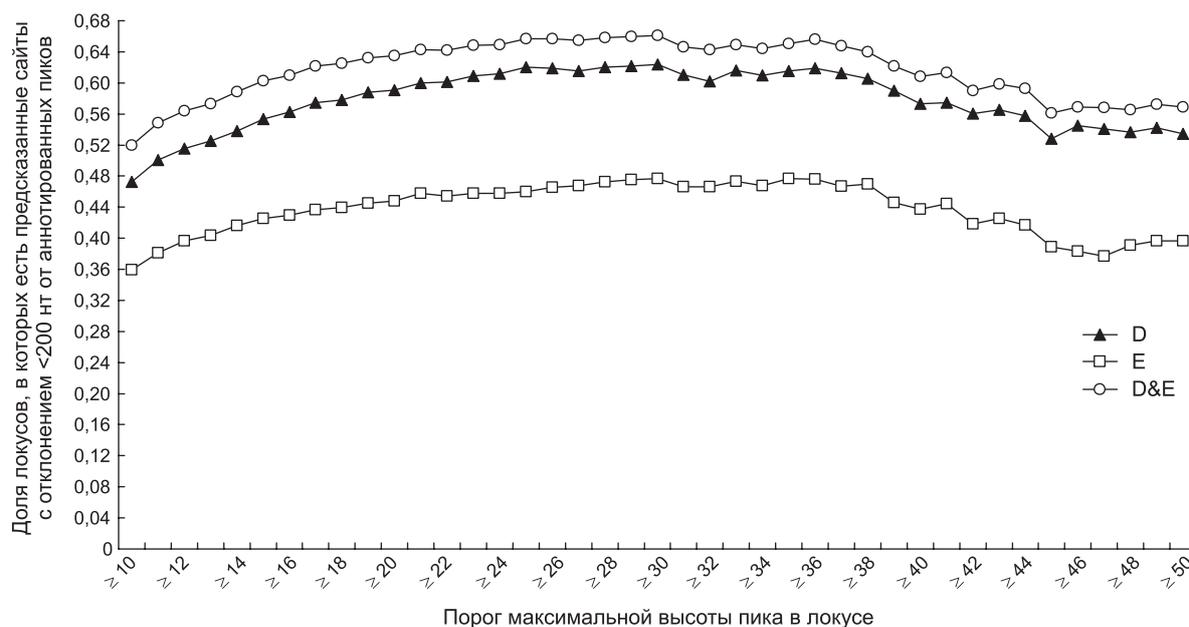


Рис. 2. Анализ выборок локусов, характеризуемых разной максимальной высотой пиков.

Каждая точка графика соответствует расчетам для выборки, в которую входили только локусы с максимальной высотой пика не менее заданного значения (ось X). Ось Y – отношение числа локусов, имеющих потенциальные сайты с отклонением менее 200 нт от пика с высотой не менее 10, к числу всех локусов с заданной максимальной высотой.

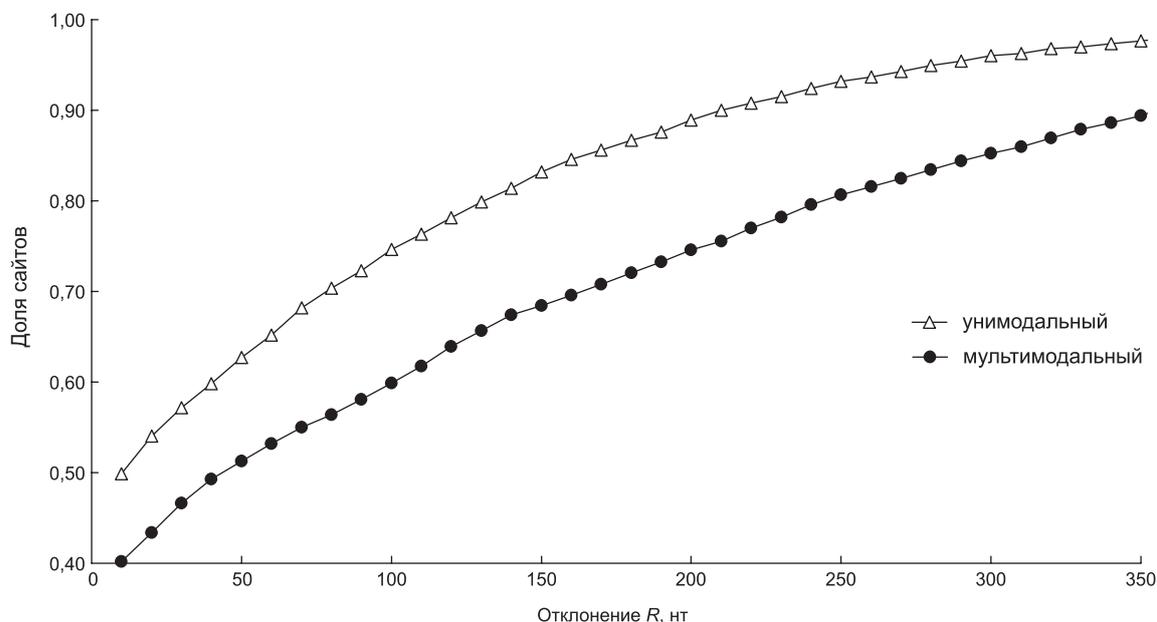


Рис. 3. Доли потенциальных сайтов в униmodalных и мультиmodalных локусах с отклонением не более заданного от аннотированных пиков.

Сайты предсказаны с помощью матрицы D.

на рис. 3. Так, видно, что 74,6 % всех потенциальных сайтов в унимодальных локусах имеют отклонение либо меньшее, либо равное 100 нт, тогда как для мультимодальных локусов соответствующая доля составляет 59,9 % (рис. 3).

Для сравнения степени обогащения потенциальными сайтами районов вблизи пиков в унимодальных и мультимодальных локусах или, другими словами, для выявления достоверности связи между нахождением потенциального сайта не далее чем на расстоянии R нт от аннотированного пика и типом локуса нами был применен следующий подход. Для каждого значения максимального отклонения составля-

лась таблица сопряженности (табл. 4). На основании этой таблицы рассчитывался критерий χ^2 , который позволяет оценить достоверность гипотезы о том, что в унимодальных локусах чаще, чем в мультимодальных, потенциальные сайты расположены не далее чем на расстоянии R нт от аннотированного пика.

Оценки значимости критерия χ^2 , рассчитанные для значений отклонений от 0 до 350 нт между аннотированными пиками и сайтами, предсказанными методами D и E, приведены на рис. 4. Заметно, что для обоих методов существует обширный диапазон значений максимального отклонения, где критерий значим.

Таблица 4

Таблица сопряженности 2×2 для проверки достоверности связи между нахождением потенциального сайта вблизи пика и типом локуса

Тип локуса	Число сайтов		Число всех сайтов в соответствующем типе локуса
	с отклонением $\leq R$ от аннотированного пика	с отклонением $> R$ от аннотированного пика	
Унимодальные	X_1	X_3	$X_1 + X_3$
Мультимодальные	X_2	X_4	$X_2 + X_4$
Всего	$X_1 + X_2$	$X_3 + X_4$	

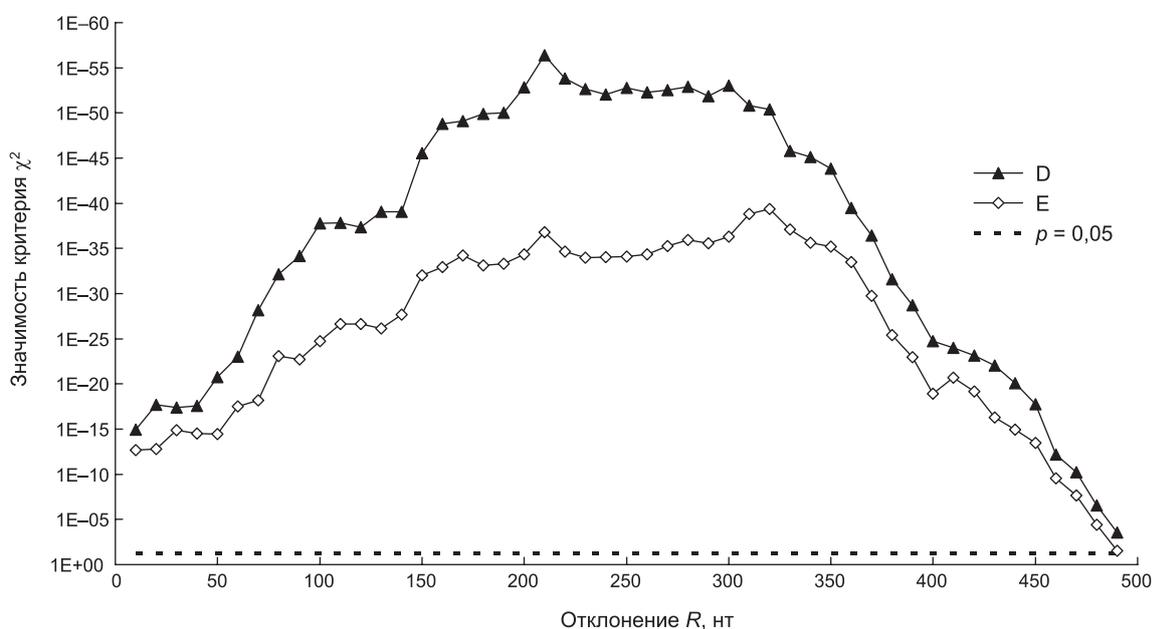


Рис. 4. Значимость по критерию χ^2 гипотезы о том, что в унимодальных локусах чаще, чем в мультимодальных, потенциальные сайты расположены не далее чем на расстоянии R нт от аннотированного пика.

Ось X – уровень значимости согласно критерию χ^2 для таблиц сопряженности 2×2 . Ось Y – верхний порог отклонения R (нт). Сайты предсказаны с помощью методов D и E. Пунктиром указан уровень, соответствующий критической значимости $p = 0,05$.

Практически для любых расстояний районы вблизи пиков в унимодальных локусах обогащены потенциальными сайтами по сравнению с районами мультимодальных локусов. Наиболее значимым критерий оказывается для диапазона отклонений от 200 до 300 нт.

Из рис. 4 видно, что пик значимости для матриц D и E достигается для отклонения, равного 210 нт ($p < 5E-57$ и $p < 2E-37$ соответственно). Представим в виде гистограммы значения в ячейках матрицы сопряженности, рассчитанной так же, как было описано выше по отклонениям не более 210 нт для метода D (рис. 5).

Из рис. 5 хорошо видно, насколько чаще потенциальные сайты встречаются вблизи (не далее 210 нт) унимодальных пиков по сравнению с мультимодальными. Таким образом, можно с уверенностью утверждать, что районы вблизи аннотированных пиков в унимодальных локусах обогащены потенциальными сайтами по сравнению с районами вблизи пиков в мультимодальных локусах. Однако при этом исследовании нами до сих пор никак не учитывалась длина локуса. В то же время этот показатель весьма важен: в случае присутствия единственного сайта по способу построения профилей локус не должен значительно превышать длину 400 нт. Исходя из этих соображений анализ более протяженных локусов представляет существенный интерес. Поэтому следующим шагом мы провели анализ отклонений позиций потенциальных сайтов от аннотированных пиков, принимая во внимание длины локусов.

Анализ отклонений позиций потенциальных сайтов от аннотированных пиков для уни- и мультимодальных локусов сходной длины

Был проведен расчет отклонений потенциальных сайтов от аннотированных пиков в выборках уни- и мультимодальных локусов, классифицированных нами по их длинам (табл. 2). Затем для каждой из выборок локусов мы рассчитали долю потенциальных сайтов, для которых отклонение от аннотированного пика было меньше заданного значения (10, 20 нт, и т. д.). На рис. 6 представлены результаты расчетов для сайтов, предсказанных методом D в выборках унимодальных локусов длиной

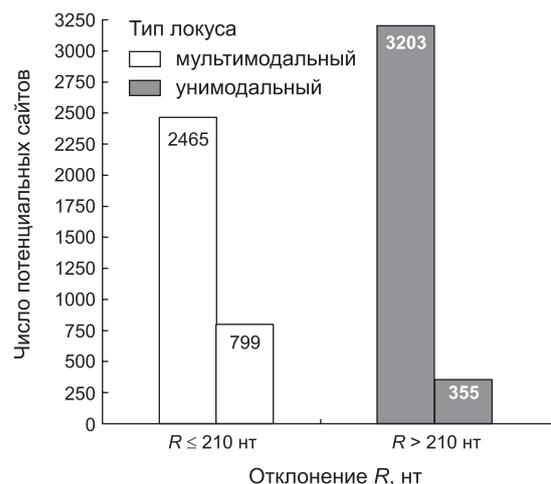


Рис. 5. Количество потенциальных сайтов, классифицированных согласно признакам: отклонение сайта от пика ≤ 210 нт или > 210 нт; тип локуса – уни- или мультимодальный.

до 400 нт, а также для уни- и мультимодальных локусов с длиной от 400 до 600 нт, от 600 до 800 нт и свыше 800 нт. Так, видно, что в выборках унимодальных локусов длиной до 400 нт отклонение 100 % сайтов, выявленных в этих локусах, не превышает 180 п.н. Этот результат ожидаем из чисто теоретических соображений: поскольку унимодальные пики имеют форму, близкую к симметричной, отклонение не должно превышать $400/2 = 200$ нт (рис. 6). При сравнении унимодальных и мультимодальных локусов длиной от 400 до 600 нт можно отметить, что районы вблизи аннотированных пиков в унимодальных локусах этой длины обогащены потенциальными сайтами по сравнению с районами вблизи пиков в мультимодальных локусах, и этот эффект заметен в случае небольших отклонений (до 110 нт). Однако при сравнении унимодальных и мультимодальных локусов длиной более 800 нт мы не наблюдаем подобного значимого обогащения. Дальнейшие расчеты (рис. 7) показали, что значимое обогащение наблюдается только при отклонениях менее 50 нт и более 150 нт. Таким образом, можно с уверенностью утверждать, что выявленная нами связь между нахождением потенциального сайта на расстоянии не далее чем 200 нт от аннотированного пика и типом локуса в значительной степени зависит от длины самого локуса.

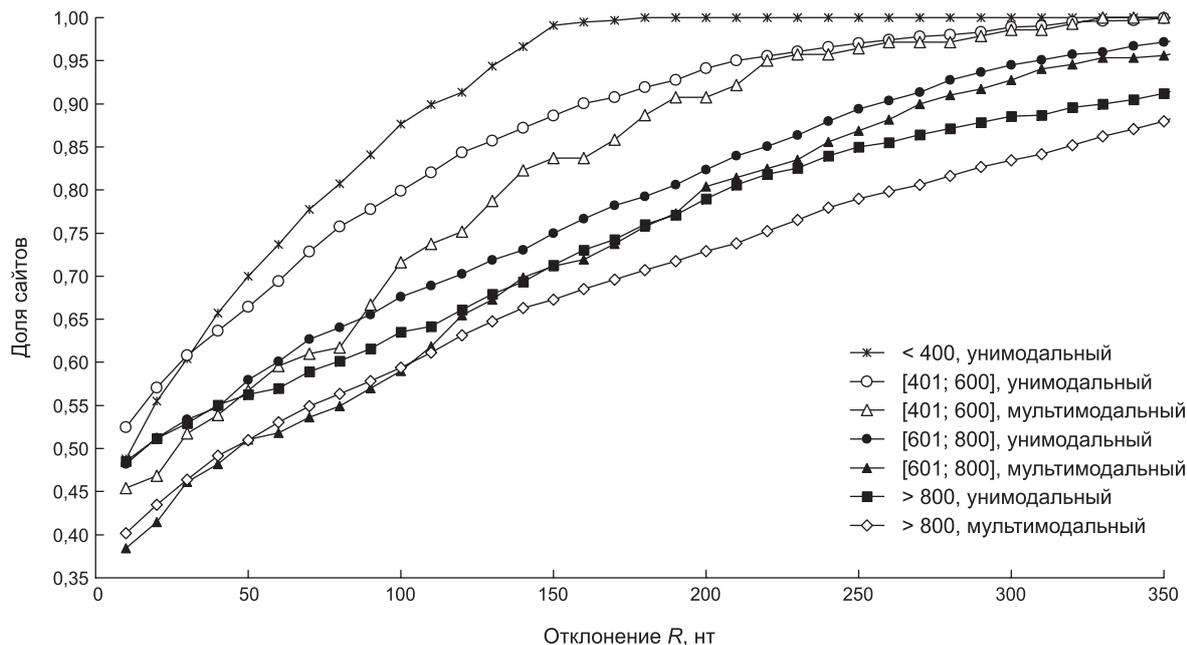


Рис. 6. Доли потенциальных сайтов в унимодальных и мультимодальных локусах различных диапазонов длин с отклонением не более заданного от аннотированных пиков.

Сайты предсказаны с помощью матрицы D.

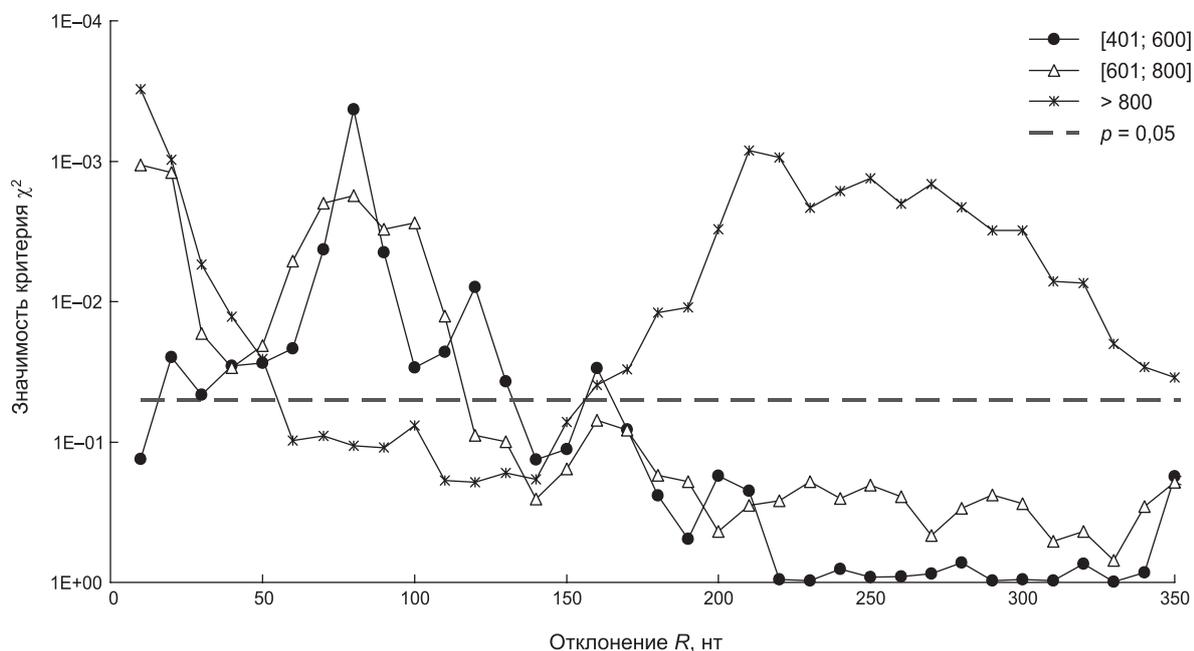


Рис. 7. Значимость по критерию χ^2 гипотезы о том, что в унимодальных локусах определенной длины чаще, чем в соответствующих мультимодальных, потенциальные сайты расположены с меньшим отклонением от аннотированных пиков.

Ось X – уровень значимости согласно критерию χ^2 для таблиц сопряженности 2×2 . Ось Y – верхний порог отклонения R (нт). Сайты предсказаны с помощью метода D. Пунктиром указан уровень, соответствующий критической значимости $p = 0,05$.

Для проверки значимости выявляемого обогащения мы сравнивали между собой попарно выборки уни- и мультимодальных локусов сходной длины, описанные в табл. 2. Значимость оценивалась с помощью критерия χ^2 согласно описанной в предыдущем разделе методике с составлением таблиц сопряженности, аналогичных табл. 4. На основании этой таблицы рассчитывались значения критерия χ^2 , которые позволяют оценить достоверность гипотезы о том, что в унимодальных локусах чаще, чем в мультимодальных, потенциальные сайты расположены с отклонением не более R нт от аннотированного пика. Оценки значимости критерия χ^2 , рассчитанные для значений отклонений от 0 до 350 нт между аннотированными пиками и сайтами, предсказанными методом D для трех пар выборок уни- и мультимодальных локусов разной длины, приведены на рис. 7.

Из рис. 7, в частности, видно, что для отклонений от 10 до 130 нт районы вблизи пиков в унимодальных локусах длиной от 400 до 600 нт значимо обогащены потенциальными сайтами по сравнению с районами мультимодальных локусов того же диапазона длин. Этот результат подтверждает наблюдение, которое мы сделали по результатам анализа распределений, представленных на рис. 6.

Для локусов длиной от 600 до 800 нт феномен обогащения все также присутствует, но он незначительно ослабевает. Так, согласно представленным на рис. 7 данным, значимое обогащение наблюдается в диапазонах отклонений менее 110 нт. Для локусов длиной более 800 нт значимое обогащение районов вблизи пиков в унимодальных локусах по сравнению с мультимодальными обнаружено только при значениях отклонения менее 50 нт и более 150 нт (рис. 7), при остальных отклонениях значимости не выявлено. Таким образом, мы наблюдаем заметное ослабление феномена обогащения, с ростом длин локусов свыше 800 нт он ослабевает или вообще не наблюдается. Анализ результатов, полученных с помощью распознавания потенциальных сайтов методом E, приводит к аналогичным выводам.

Гистограммы количества потенциальных сайтов, выявленных в выборках локусов различных диапазонов длин и классифицированных согласно признакам отклонения сайта от пика ≤ 80 нт или > 80 нт и типа локуса, представлены на рис. 8, а, б. Эти гистограммы наглядно демонстрируют наличие и исчезновение феномена соответственно.

В целом проведенная дополнительная классификация уни- и мультимодальных локусов

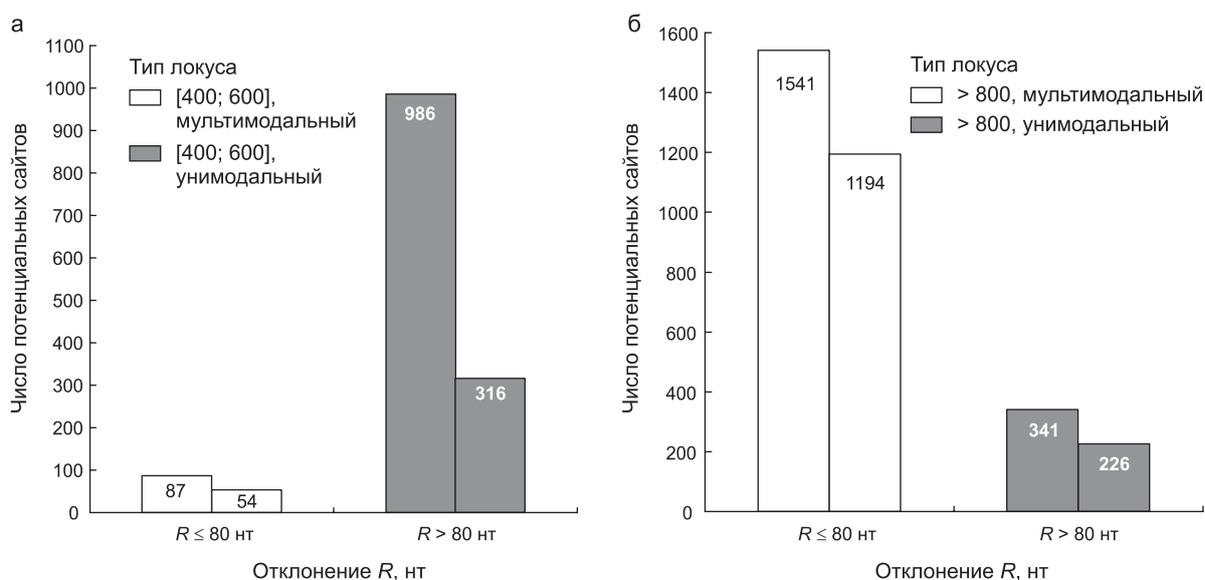


Рис. 8. Количество потенциальных сайтов, выявленных в выборках локусов диапазонов длин от 400 до 600 нт (а) и более 800 нт (б) и классифицированных согласно признакам: отклонение сайта от пика ≤ 80 нт или > 80 нт; тип локуса – уни- или мультимодальный.

по длине (табл. 2) и последующие расчеты плотностей близлежащих потенциальных сайтов позволяют более аккуратно интерпретировать обнаруженный нами ранее (рис. 3) эффект обогащения потенциальными сайтами районов вблизи пиков в унимодальных локусах по сравнению с мультимодальными локусами без учета длин локусов. Для этого следует учесть, что при расчете значимостей обогащения (рис. 4) в общую выборку унимодальных локусов входила выборка локусов длиной до 400 нт, для которых мы установили, что отклонение от пиков 100 % сайтов, выявленных в этих локусах, не превышает 180 нт. Мы предполагаем, что вследствие своего значительного объема именно эта группа дает наиболее заметный вклад в общую значимость, рассчитанную без учета длин локусов (рис. 3). Также ощутимый вклад в эту значимость дают различия пары выборок длиной от 400 до 600 нт и от 600 до 800 нт. Проведенный анализ показывает, что при длинах локусов свыше 800 нт нет ярко выраженного обогащения районов вблизи аннотированных пиков в унимодальных локусах по сравнению с мультимодальными (рис. 6). Учитывая эти соображения, а также принимая во внимание, что в случае присутствия единичного сайта по способу построения профилей локус не должен значительно превышать длину порядка 400 нт, можно предположить, что при длине свыше 600 нт локусы, определенные согласно нашей классификации как унимодальные, получены вследствие наличия не одного, а двух и более сайтов. Это позволяет заключить, что более корректной является следующая классификация локусов по форме пиков: 1) унимодальные локусы длиной до 600 нт, образованные предположительно одним сайтом связывания FoxA, и 2) мультимодальные локусы от 400 до 600 нт и все локусы большей длины, сформированные множеством отдельных сайтов. При этом мы считаем, что форма пика, на которой был основан наш способ классификации локусов, в случае длины локуса свыше 600 нт и наличия двух и более сайтов имеет стохастическую природу. Эта природа, в частности, зависит: 1) от расстояния между сайтами и 2) от аффинности каждого сайта, которая в ходе эксперимента ChIP-Seq интерпретируется как соответствующая вы-

сота пика. Поэтому локусы, отнесенные нами к первой группе, легче поддаются аннотации, более пригодны для использования методами, основанными на выявлении сходных контекстных мотивов для выявления сайтов связывания из данных ChIP-Seq. Локусы, отнесенные нами ко второй группе, предположительно, являются источниками неточностей при обработке данных ChIP-Seq, поскольку множество близко расположенных ССТФ создают более сложный паттерн покрытия, что может приводить к неточности локализации сайтов. Таким образом, настоящее исследование показывает, что при аннотации и обработке данных, полученных по технологии ChIP-Seq, необходимо принимать во внимание не только высоту пика профиля, но также его форму и протяженность локуса, что поможет устранить ряд неточностей при обработке этих данных.

Необходимо заметить, что в ходе данного исследования мы не ставили целью проведение строгой классификации локусов на два подмножества. Это связано также с тем, что есть определенный произвол в интерпретации конечных данных эксперимента ChIP-Seq. Например, а) варьирует длина фрагментов, на которые в ходе эксперимента разрезается геномная ДНК; б) выбранный нами согласно E. Wederell с соавт. (2008) порог максимальной высоты пика (10) влияет на анализ плотности сайтов с малым отклонением от пиков. Поэтому определенные нами здесь приблизительные границы подмножеств локусов применимы только к данным этого эксперимента ChIP-Seq (Wederell *et al.*, 2008). Однако наличие такой классификации локусов может помочь в процедуре аннотации данных других ChIP-Seq экспериментов.

Работа выполнена при финансовой поддержке: Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 09-04-00562-а); программы РАН 22.8 «Молекулярная и клеточная биология»; междисциплинарного интеграционного проекта СО РАН 119 «Постгеномная биоинформатика: компьютерный анализ и моделирование молекулярно-генетических систем»; госконтракта с ФАО П721 «Разработка программно-информационного комплекса для исследования механизмов регуляции экспрессии генов эукариот».

Литература

- Левицкий В.Г., Ощепков Д.Ю., Ершов Н.И. и др. Разработка методов распознавания сайтов связывания транскрипционных факторов FoxA, их экспериментальная верификация и использование для анализа данных массовой иммунопреципитации хроматина // Докл. АН (в печати).
- Dedon P.C., Soultis J.A., Allis C.D., Gorovsky M.A. A simplified formaldehyde fixation and immunoprecipitation technique for studying protein-DNA interactions // *Anal. Biochem.* 1991. V. 197. P. 83–90.
- Farnham P. Insights from genomic profiling of transcription factors // *Nat. Rev. Genet.* 2009. V. 10. P. 605–616.
- Gershenzon N.I., Stormo G.D., Ioshikhes I.P. Computational technique for improvement of the position-weight matrices for the DNA/protein binding sites // *Nucl. Acids Res.* 2005. V. 33. № 7. P. 2290–2301.
- Jothi R., Cuddapah S., Barski A. *et al.* Genome-wide identification of *in vivo* protein–DNA binding sites from ChIP-Seq data // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. № 16. P. 5221–5231.
- Kolchanov N.A., Ignatieva E.V., Ananko E.A. *et al.* Transcription Regulatory Regions Database (TRRD): its status in 2002 // *Nucl. Acids Res.* 2002. V. 30. P. 312–317.
- Levitsky V.G. Application of motif discovery tool for FoxA binding sites analysis // Proc. of the Seventh Intern. Conf. On Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\System Biology (BGRS\SB'2010). 2010. P. 165.
- Levitsky V.G., Ignatieva E.V., Ananko E.A. *et al.* Effective transcription factor binding site prediction using a combination of optimization, a genetic algorithm and discriminant analysis to capture distant interactions // *BMC Bioinformatics.* 2007. V. 8. P. 481.
- Robertson G., Hirst M., Bainbridge M. *et al.* Genome-wide profiles of STAT1 DNA association using chromatin immunoprecipitation and massively parallel sequencing // *Nature Methods.* 2007. V. 4. № 8. P. 651–657.
- Wederell E.D., Bilenky M., Cullum R. *et al.* Global analysis of *in vivo* Foxa2-binding sites in mouse adult liver using massively parallel sequencing // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. № 14. P. 4549–4564.
- Welsheimer T., Newbold J.E. A functional hepatocyte nuclear factor 3 binding site is a critical component of the duck hepatitis B virus major surface antigen promoter // *J. Virol.* 1996. V. 70. № 12. P. 8813–8820.
- Zhang M., Marr T. A weighted array method for splicing and signal analysis // *Comput. Appl. Biol. Sci.* 1993. V. 9. P. 499–509.

ANALYSIS OF DATA OF LARGE-SCALE CHROMATIN IMMUNOPRECIPITATION BY METHODS OF PERCEPTION OF TRANSCRIPTION FACTOR BINDING SITES

V.G. Levitsky, G.V. Vasil'ev, D.Yu. Oshchepkov, N.I. Ershov, T.I. Merkulova

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

Summary

Chromatin immunoprecipitation followed by massive parallel sequencing of the precipitated fragments (ChIP-Seq) is broadly used for detailed investigation of the distribution of various transcription factor binding sites over the whole-genome. The ChIP-Seq profiles obtained by immunoprecipitation of mouse liver chromatin with antibodies against the FoxA2 transcription factor (Wederell *et al.*, 2008) were analyzed by our methods of recognition of FoxA binding sites. The following classification of locus profiles is proposed: (1) Unimodal loci (possessing a single peak) of lengths below 600 bp. These loci are likely to be formed by a single FoxA binding site. (2) Multimodal loci (possessing two or more distinct peaks) of lengths over 600 bp and all longer loci. Each locus of this group is likely to involve several sites.

Key words: FoxA transcription factors, binding sites, computer perception methods, chromatin immunoprecipitation data.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМОВ ТАТА-БОКСА ПРОМОТОРА ГЕНА β -ГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА, АССОЦИИРОВАННЫХ С β -ТАЛАССЕМИЕЙ, НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТАТА-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА

И.А. Драчкова, Т.В. Аршинова, П.М. Пономаренко, Т.И. Меркулова,
Н.А. Колчанов, Л.К. Савинкова

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

Однонуклеотидные полиморфизмы (SNPs – single nucleotide polymorphisms) представляют наиболее распространенный тип вариабельности генома человека. Наследственные нарушения синтеза гемоглобина, вызываемые SNPs в ТАТА-боксе промотора гена β -глобина человека, ассоциируются с β -талассемией различной тяжести. ТАТА-связывающий белок (ТВР) – первый базальный фактор транскрипции, который узнает и связывает ТАТА-боксы на ТАТА-содержащих промоторах и иницирует сборку транскрипционного комплекса РНК-полимеразы II. В работе впервые получены количественные характеристики (K_d) взаимодействия ТВР человека с ТАТА-боксами промотора гена β -глобина, несущими SNPs, которые согласуются с литературными данными о снижении синтеза РНК нормального β -глобина у больных β -талассемией.

Ключевые слова: β -талассемия, ген β -глобина, SNP, ТАТА-связывающий белок, ТАТА-бокс, сродство.

Введение

Наследственные нарушения синтеза гемоглобина являются причиной моногенных заболеваний наиболее распространенного класса в мире – различной тяжести α -, β - и δ -талассемий (Traeger-Synodinos *et al.*, 2008). Они вызываются повреждениями (однонуклеотидные замены, вставки, делеции) в структурной части и в регуляторных районах α -, β - и δ -глобиновых генов. Симптомы β -талассемии встречаются в среднем у 1 человека на 100 тыс. и гораздо чаще у 5–30 % отдельных этнических групп в Средиземноморье, Африке и Южной Азии (Muncie, Campbell, 2009; Galanello, Origo, 2010). β -талассемии, вызываемые SNPs (single nucleotide polymorphisms – SNPs) в ТАТА-боксе промотора гена β -глобина, очень редки. SNPs в ТАТА-боксах – это наследственные нарушения, приводящие к синтезу недостаточного количества цепей нормального β -глобина или полному его отсутствию, в результате чего

возникают избыток свободных цепей α -глобина ($\alpha_2\beta_2$ – основная структурная единица гемоглобина взрослого человека, Hb A), нарушение эритропоэза и низкий выход (или полное его отсутствие) гемоглобина взрослого человека (Schechter, 2008).

Описаны три основные формы β -талассемии (Muncie, Campbell, 2009; Galanello, Origo, 2010). Если человек является носителем двух дефектных копий генов, унаследованных от обоих родителей (гомозиготен по дефектному гену β -глобина), с сильно пониженным или полным отсутствием синтеза нормального β -глобина, то это большая (major) β^0 -талассемия (или анемия Кули), которая сопровождается такими серьезными нарушениями, как гемолитическая анемия, нарушения в развитии скелета, задержка роста, поражение внутренних органов, желтуха и трансфузионная зависимость (необходимость переливания эритроцитарной массы) с 6-месячного возраста и т. д. (Muncie, Campbell, 2009). Больные обычно умирают в

возрасте до 20–30 лет, а без лечения – в первые два года жизни. Больные – носители одного мутантного аллеля, а другого – нормального β -глобина (гетерозиготы) со средним и выше среднего уровнем синтеза цепей нормального β -глобина – это малая (minor или trait) β^+ -талассемия. Они имеют умеренно выраженную анемию или бессимптомную анемию с нормальным качеством жизни. Для промежуточной формы (intermedia) β -талассемии, больные которой являются также гетерозиготами – β^+ -талассемия, но только с остаточным синтезом нормального β -глобина (~ 10 % и выше), характерны умеренно выраженные симптомы заболевания, иногда с эпизодической трансфузионной зависимостью (Muncie, Campbell, 2009). β -талассемии относятся в основном к заболеваниям аутосомно-доминантного типа (Thein, 2008). При этом типе наследования действие мутантного гена проявляется в гетерозиготном состоянии.

Семейство генов β -глобинов (семейство ϵ -, γ -, β - и δ -генов) человека располагается на коротком плече 11-й хромосомы (Schechter, 2008) и занимает участок в 60–65 т.п.н. Все гены глобинов имеют похожую организацию: каждый из них состоит из трех экзонов и двух интронов (Mears *et al.*, 1978). Порядок расположения генов совпадает с порядком их экспрессии в процессе онтогенеза: сначала в кластере β -глобинов расположен ген эмбриональной ϵ -цепи, за ним два гена фетальных γ -цепей и затем гены δ - и β -цепей взрослого организма (Schechter, 2008). Программа регуляции транскрипции этого семейства генов, ведущая к их стадиейспецифической экспрессии в онтогенезе, осуществляется через проксимальные и дистальные регуляторные элементы ДНК (Levings *et al.*, 2002). Один из наиболее важных дистальных регуляторных элементов – это LCR (locus control region), расположенный на расстоянии от 6 до 22 т.п.н. выше ϵ -глобинового гена. Взаимодействие ткане- и стадиейспецифичных транскрипционных факторов с LCR и промоторами генов β -глобинового локуса включает их экспрессию на нужной стадии развития (Levings *et al.*, 2002). Накапливаются также данные о факторах транскрипции, взаимодействующих с индивидуальными промоторами генов β -глобинового кластера на разных стадиях развития организма (Tallack *et al.*, 2010).

Начинается транскрипция каждого гена, и β -глобина в частности, на стадии взаимодействия базального фактора транскрипции TFIID с кор-промотором гена, в состав которого наиболее часто входят TATA-боксы, Inr-элемент, нижний промоторный элемент (DPE) и элемент, узнаваемый TFIIB (BRF) (Aso *et al.*, 1994; Colgan, Manley, 1995; Butler, Kadonaga, 2002). TATA-боксы расположены на расстоянии примерно 30 п.н. от старта транскрипции (Struhl, 1987; Smale, Kadonaga, 2003; Breathnach *et al.*, 1981). Каноническая последовательность TATA-боксов – TATAAAA – встречается редко, ее варибельность является фактором регуляции транскрипции генов. В состав TFIID входит TBP (TATA binding protein) вместе с многочисленными TAFs (TBP-associated factors). TBP может функционировать и как самостоятельная субъединица (Smale, Kadonaga, 2003). На TATA-содержащих промоторах взаимодействие TBP с TATA-боксом инициирует сборку транскрипционного комплекса РНК-полимеразы II и транскрипцию генов.

SNPs составляют наиболее распространенный тип генетической варибельности человека (Cotton *et al.*, 2009). В ряде работ показаны влияние SNPs в TATA-боксах промоторов на активность промоторов и на предрасположенность к наследственным заболеваниям человека (Савинкова и др., 2009), чувствительность к регуляторным сигналам, восприимчивость к лекарствам и т. д. (Miller, Kwok, 2001). В TATA-боксе гена β -глобина разных людей обнаружены SNPs, являющиеся причиной различной тяжести заболевания крови, β -талассемии. В большинстве работ наряду с выявлением мутантных TATA-боксов промоторов генов больных β -талассемией получены относительные характеристики содержания РНК нормальных цепей β -глобинов.

В данной работе представлены характеристики взаимодействия hTBP с SNP-содержащими TATA-боксами больных β -талассемией – начального этапа сборки транскрипционного комплекса, предшествующего синтезу РНК. В максимально стандартизированных условиях экспериментов получены равновесные константы диссоциации (K_d) комплексов TBP с TATA-боксами при β -талассемии, свидетельствующие о снижении сродства TBP к SNP-содержащим

ТАТА-боксам, которое, по литературным данным, согласуется с уменьшением синтеза РНК нормального β -глобина *in vivo*, в *cos*-клетках и *HeLa*.

Материалы и методы

Получение рекомбинантного ТВР

В работе использовали рекомбинантный ТВР человека (hTVР), экспрессированный в клетках *E. coli* BL21(DE3) с плазмиды pAR3038-hTVР (любезно предоставлена проф. В. Puhg, Center for Gene Regulation, Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania, USA). Трансформацию *E. coli* BL21(DE3) проводили согласно M.G. Peterson (1990). Экспрессию и очистку ТВР делали по В.Ф. Pugh (1995) за исключением концентрации ИПТГ (1 mM вместо 0,1 mM) и времени индукции (3 часа вместо 1,5 часа).

Получение меченых

³²P олигодезоксирибонуклеотидов

В работе использовали олигодезоксирибонуклеотиды (ODN), синтезированные и дополнительно очищенные электрофорезом в ПААГ (Biosset, Novosibirsk). Для получения меченых двуцепочечных ODN обе цепи метили ³²P-АТФ (Biosan, Novosibirsk) с помощью Т4-полинуклеотидкиназы (SibEnzyme, Novosibirsk), отжигали при 95 °С (в эквимолярном соотношении) и медленно (не менее 3 час) охлаждали до комнатной температуры. Дуплексы выделяли и анализировали в 15 %-м ПААГ (1х ТВЕ) в неденатурирующих условиях (Драчкова и др., 2005). Немеченые дуплексы получали так же и использовали без дополнительной очистки в ПААГ.

Определение равновесных констант диссоциации комплексов

Для определения равновесных констант диссоциации комплексов (K_d) hTVР с ТАТА-содержащими олигонуклеотидами, соответствующими «нормальным» и SNP-содержащим вариантам ТАТА-боксов, использовали тра-

диционный подход, включающий титрование hTVР в фиксированной концентрации (не менее 0,3 nM и не более 1 nM) ТАТА-содержащим ODN в возрастающей концентрации в сочетании с методом изотопного разбавления. Предварительно определяли время установления равновесного состояния, снимая кинетику ассоциации hTVР с каждым ODN. Для определения значения каждой K_d проводилось не менее 8 экспериментов.

Эксперименты по связыванию (hTVР с ODN проводили при 25 °С в буфере следующего состава: 20 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 100 μ g/ml BSA, 0,01 % NP-40, 5 % глицерин до установления равновесия. Для отделения комплексов «hTVР-ODN» от несвязавшегося ODN использовали метод «задержки в геле» (EMSA). Электрофорез проводили в 5 %-м ПААГ на трис-глициновом буфере (pH 8,3) при температуре 10 °С и напряженности поля 25 В/см в течение 40 мин (рис. 1).

Все пробы наносили на гель одновременно при напряженности поля 10 В/см. Гели высушивали и экспонировали с экраном Imaging Screen-K (Kodak) для фосфоимиджера Molecular Imager PharosFX Plus (Bio-Rad). Затем экран сканировали на фосфоимиджере и осуществляли коли-

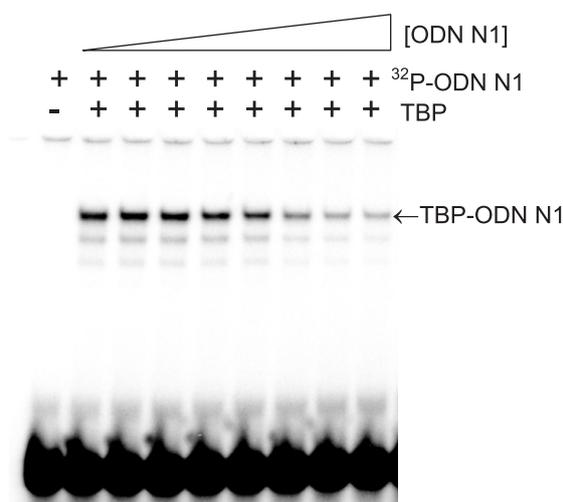


Рис. 1. Отделение комплексов «hTVР-ODN» от несвязавшегося ODN с помощью EMSA на примере ODN N1 гена β -глобина здорового человека. Суммарная концентрация ODN N1 изменялась от 5 nM до 165 nM (концентрация ³²P-ODN N1 = 5 nM), концентрация hTVР = 0,6 nM.

чественный анализ радиоавтографов с помощью программы Quantity One – 4.5.0 (Bio-Rad).

Для расчета равновесных констант диссоциации комплексов «ТВР-ODN» использовали программу OriginPro 8 (рис. 2).

Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены результаты экспериментов по определению влияния SNPs ТАТА-боксов, идентичных ТАТА-боксам больных β -талассемией, на взаимодействие с hТВР – равновесные константы диссоциации (K_d) комплексов «hТВР-ODN». Из табл. 1 видно, что ТАТА-бокс гена β -глобина здорового человека не совершенен: САТАААА вместо канонического ТАТАААА, его иногда называют АТА-бокс. АТА-бокс характерен для генов домашнего хозяйства с достаточно постоянным уровнем экспрессии (Fei *et al.*, 1988). С использованием ТВР дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (yТВР) в работе (Stewart *et al.*, 2006) показано, что последовательности ТАТАААА и САТАААА

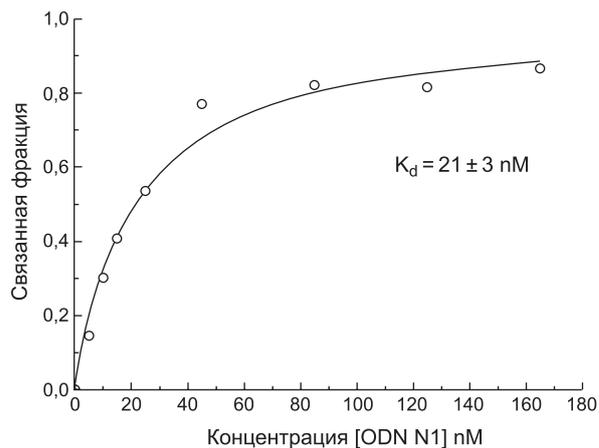


Рис. 2. Пример определения равновесной K_d комплексов «hТВР-ODN N1» с помощью OriginPro 8.

почти не отличаются при связывании. Было показано (Stewart, Stargell, 2001), что ТАТА-бокс с последовательностью САТАААА более чем в 40 раз менее эффективен в индуцированной транскрипции *in vivo* по сравнению с ТАТАААА.

С использованием очищенных из дрожжей базальных факторов транскрипции и матрицы

Таблица 1

Сродство hТВР к ТАТА-боксам промоторов гена β -глобина человека, несущим SNPs, ассоциированные с β -талассемией

Влияние SNPs на уровень мРНК β -глобина (литературные данные)			Последовательности олигонуклеотидов (5'–3' нити)	K_d «ТВР-ODN» нМ
ODN N	SNP	Уровень мРНК β -глобина		
1	β -глобин (норма) (Fei <i>et al.</i> , 1988)	Норма	cagggtctgggCATAAAAgtcagggca	21 ± 3
2	-31A > G (Takahara <i>et al.</i> , 1986)	В <i>cos</i> -клетках – в 2 раза меньше мРНК	cagggtctgggCGTAAAgtcagggca	120 ± 20
3	-30T > A (Fei <i>et al.</i> , 1988)	<i>In vivo</i> – 8–13 % мРНК	cagggtctgggCAAAAAgtcagggca	92 ± 17
4	-30T > C (Cai <i>et al.</i> , 1989)	Нет данных	cagggtctgggCACAAAgtcagggca	113 ± 17
5	-29A > G (Antonarakis <i>et al.</i> , 1984)	<i>HeLa</i> и <i>in vivo</i> – 25 % мРНК	cagggtctgggCATGAAAgtcagggca	530 ± 40
6	-28A > C (Poncz <i>et al.</i> , 1982)	<i>In vivo</i> – частичное или полное отсутствие мРНК	cagggtctgggCATACAAgtcagggca	330 ± 50
7	-28A > G (Orkin <i>et al.</i> , 1983)	<i>In vivo</i> – в 10 раз, в <i>HeLa</i> – в 3–5 раз меньше мРНК	cagggtctgggCATAGAAgtcagggca	60 ± 14
8	-27A > T (Badens <i>et al.</i> , 1999)	<i>HeLa</i> – ~ в 5 раз меньше мРНК	cagggtctgggCATAATgtcagggca	63 ± 15

Данные по содержанию мРНК β -глобина взяты из оригинальных работ авторов, открывших соответствующий SNP.

с промотором *CYCl* (Bjornsdottir, Myers, 2008) показали, что замена ТАТАААА → САТАААА снижала транскрипцию до 40 % от нормы. Другие авторы (Wobbe, Strahl, 1990) показали, что транскрипция в *HeLa* снижается в 3 раза при замене в ТАТА-боксе первого Т на С (ТАТАААА → САТАААА). Из этих примеров видно, что замена Т на С в первой позиции ТАТА-бокса оказывает разное влияние на транскрипцию, вероятно, в силу использования авторами разных экспериментальных условий. Вклад в различие данных делают и последовательности фланков ТАТА-боксов, которые отличаются по содержанию АТ-пар в цитируемых работах. В работах (Faiger *et al.*, 2006; Драчкова и др., 2007) показано, что сродство ТВР к олигонуклеотидам, имеющим разное содержание АТ-пар во фланкирующих ТАТА-боксы последовательностях, может отличаться в 25–30 раз. Определенное нами сродство hТВР к ТАТА-боксу гена β -глобина (ODN1) здорового человека – $K_d = 21$ nM.

В работе (Takihara *et al.*, 1986) выявили SNP –31 А > G (ODN N2) (табл. 1) у больной промежуточной β^+ -талассемией японки, гетерозиготной по гену β -глобина. Пациентка не зависела от переливания эритроцитарной массы. Этот SNP при экспрессии гена в клетках *COS* приводил к снижению содержания РНК нормального гемоглобина в 2 раза. Отношение β - и α -цепей равнялось 0,34 в эритроидных клетках пациентки (вместо 0,5). Определенное нами сродство hТВР к этому ODN – $K_d = 120$ nM уменьшилось почти в 6 раз относительно нормы.

У югослава и турка с промежуточной формой β^+ -талассемии обнаружили SNP –30 Т > А (Fei *et al.*, 1988) с уровнем синтеза РНК нормального β -глобина от 8 до 13 %. Сродство hТВР к ODN с таким SNP снижалось более чем в 4 раза – $K_d = 92$ nM (ODN N3).

При установлении прогноза рождения здорового ребенка для пары, имеющей одного ребенка с β -талассемией, обнаружили у отца мутацию –30 Т > С, промежуточная β^+ -талассемия (Cai *et al.*, 1989). Эта мутация приводит к снижению сродства hТВР до 113 nM – ODN N4. В работе (Strahs *et al.*, 2003) приведен пример влияния замены Т на С в третьей позиции в промоторе *AdML* – (ТАТА → ТАСА) – эффективность транскрипции снижалась до 20 % по отношению к «дикому» типу, что согласуется

с нашей характеристикой (снижение сродства в ~5,3 раза).

Молекулярный анализ мутаций (Antonarakis *et al.*, 1984) выявил SNP –29 А > G с фенотипом промежуточной β^+ -талассемии, носители которого не зависели от переливания эритроцитарной массы. Полученная нами характеристика взаимодействия hТВР с ТАТА-боксом, который содержит такой SNP (ODN N 5) – $K_d = 530$ nM. В работе Antoniou с соавт. (1995) показано, что влияние аналогичной замены в β -глобиновом промоторе (САТА → САТG) приводило к снижению связывания ТВР до 8–13 % относительно нормы, а синтез РНК в клетках *MEL* достигал 38,5 %. Такая же замена в лучшем варианте ТАТА-бокса (ТАТАААА → ТАТGААА) приводила к снижению транскрипции в *HeLa* до нерегистрируемого уровня (Wobbe *et al.*, 1990), а *in vitro* с выделенными из дрожжей базальными факторами транскрипции (Bjornsdottir *et al.*, 2008) – до 8 % и ниже, что согласуется с нашей характеристикой сродства hТВР к этому ODN. Однако в работе авторов, открывших этот SNP (Antonarakis *et al.*, 1984), показано, что с SNP-содержащего ТАТА-бокса промотора в *HeLa* и *in vivo* транскрибировалось до 25 % РНК β -глобина. При сравнении этих данных можно заключить, что они являются наглядным примером возможностей компенсаторной регуляции экспрессии генов в организме, а также результатом использования разных экспериментальных систем и условий *in vitro*.

В работе (Poncz *et al.*, 1982) впервые сообщили о SNP –28 А > С, обнаруженном у двух братьев (курдские евреи) полутора лет с большой (β^0) талассемией – оба зависели от переливания эритроцитарной массы. Анализ показал частичное или полное отсутствие мРНК глобина. Использование ODN с аналогичной мутацией (ТАТАААА → ТАТАСАА) в *HeLa* приводило к снижению транскрипции в 20 раз от нормального уровня (Wobbe *et al.*, 1990), что хорошо согласуется с полученной нами характеристикой взаимодействия hТВР с этим ODN (N6) – $K_d = 330$ nM – снижение сродства в 16 раз по сравнению с нормой.

В результате анализа ДНК 14-месячного китайца обнаружили SNP –28 А > G (Orkin *et al.*, 1983). Больной оказался гомозиготен по этому аллелю с умеренно тяжелой формой

большой β^0 -талассемии. Вскоре возникла необходимость в переливании эритроцитарной массы из-за задержки роста и анемии (Orkin *et al.*, 1983). Авторы показали, что в *HeLa* синтез нормального β -глобина снижался в 3–5 раз, а *in vivo* РНК нормального β -глобина было в 10 раз меньше относительно нормы. Авторы отмечают хорошее совпадение результатов, полученных ими *in vivo* и в *HeLa*. Транскрипция в *HeLa* (ТАТАААА → ТАТАГАА) снижалась до 5 % от нормы (Wobbe *et al.*, 1990) с промотора, содержащего такой SNP. Полученная нами характеристика – $K_d = 60$ нМ – наблюдается снижение в 3 раза.

SNP –27 А > Т (ODN N8) обнаружен у нескольких членов семьи с острова Корсика с малой (β^+) талассемией (Badens *et al.*, 1999). Из использованных нами ODN с SNPs в ТАТА-боксах этот SNP (ODN N8) привел к уменьшению сродства «hTBP-ODN» не более чем в 3 раза ($K_d = 63$ нМ). В *HeLa* (Wobbe *et al.*, 1990) такой SNP (ТАТАААА → ТАТААТАА) приводил к снижению транскрипции примерно в 5 раз относительно нормы – результаты вполне сравнимые.

Заключение

Взаимодействие ТВР с ТАТА-боксом промотора гена является одной из скорость-лимитирующих стадий инициации транскрипции. Связь между взаимодействием ТВР с промотором и уровнем транскрипции гена очень важна для понимания механизмов активации и ингибирования транскрипции и экспрессии генов, но такие данные, особенно для генов человека, практически отсутствуют. Для дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* показана корреляция (за небольшим исключением) между распределением ТВР на промоторах (но не связыванием) и уровнем транскрипции генов, считываемых РНК-полимеразой II *in vivo* (Kim, Iyer, 2004).

В данной работе мы определили в максимально стандартизированных экспериментальных условиях изменение взаимодействия hTBP с ТАТА-боксами промоторов генов больных β -талассемией и сравнили его с имеющимися литературными данными по изменению количества синтезированной РНК β -глобина генов, регулируемых этими промоторами. Видно, что

в основном наблюдается соответствие между изменением сродства hTBP к SNP-содержащим ТАТА-боксам и изменением уровня синтеза РНК. Соответствие наблюдается, несмотря на то что в клетке с комплексом ТВР-ТАТА взаимодействуют TAFs и транскрипционные факторы, регулирующие это взаимодействие и транскрипцию в зависимости от последовательности ТАТА-бокса и его фланков, физиологического состояния и внешних сигналов (Pugh, 2000; Basehoar *et al.*, 2004). Как можно видеть из табл. 1, K_d , характеризующие взаимодействие hTBP с ТАТА-боксами при заболеваниях β -талассемией различной тяжести, по нашим данным, более чем в 70 % случаев отличаются от K_d здорового человека в 3–6 раз (ODN N2–4, 7 и 8).

Итак, нами впервые получены количественные данные влияния SNPs на взаимодействие hTBP с ТАТА-боксами промоторов генов больных β -талассемией, показывающие диапазон наиболее характерных изменений K_d , в основном согласующихся с известным из литературы уменьшением содержания мРНК β -глобина *in vivo* и *in vitro*.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, гранты № 10-04-00462 и № 08-04-01048; проект 119 СО РАН; проект 23.29 «Биологическое разнообразие» РАН.

Литература

- Драчкова И.А., Лысова М.В., Репкова М.Н. и др. Взаимодействие белков базального транскрипционного комплекса РНК-полимеразы II с олигорибонуклеотидами // Молекуляр. биология. 2007. Т. 39. № 1. С. 139–146.
- Савинкова Л.К., Пономаренко М.П., Пономаренко П.М. и др. Полиморфизмы ТАТА-боксов промоторов генов человека и ассоциированные с ними наследственные патологии // Биохимия. 2009. Т. 74. № 2. С. 149–163.
- Antonarakis S.E., Irkin S.H., Cheng T.C. *et al.* Beta-thalassemia in American Blacks: novel mutations in the «ТАТА» box and an acceptor splice site // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 4. P. 1154–1158.
- Antoniou M., de Boer E., Spanopoulou E. *et al.* TBP binding and the rate of transcription initiation from the human β -globin gene // Nucl. Acids Res. 1995. V. 23. № 17. P. 3473–3480.
- Aso T., Conaway J.W., Conaway R.C. Role of core promoter structure in assembly of the RNA polymerase II preinitiation complex. A common pathway for

- formation of preinitiation intermediates at many TATA and TATA-less promoters // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 26575–26583.
- Badens C., Jassim N., Martini N. *et al.* Characterization of a new polymorphism, IVS-I-108 (TC), and a new beta-thalassemia mutation, -27 (AT), discovered in the course of a prenatal diagnosis // *Hemoglobin.* 1999. V. 23. № 4. P. 339–344.
- Basehoar A.D., Zanton S.J., Pugh B.F. Identification and distinct regulation of yeast TATA box containing genes // *Cell.* 2004. V. 116. № 5. P. 699–709.
- Bjornsdottir G., Myers L.C. Minimal components of the RNA polymerase II transcription apparatus determine the consensus TATA box // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. № 9. P. 2906–2916.
- Breathnach R., Chambon P. Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins // *Ann. Rev. Biochem.* 1981. V. 50. P. 49–383.
- Butler J.E., Kadonaga J.T. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression // *Genes and Dev.* 2002. V. 16. № 20. P. 2583–2592
- Cai S.P., Zhang J.Z., Doherty M., Kan Y.W. A new TATA box mutation detected at prenatal diagnosis for beta-thalassemia // *Am. J. Hum. Genet.* 1989. V. 45. № 1. P. 112–114.
- Colgan J., Manley J.L. Cooperation between core promoter elements influences transcriptional activity *in vivo* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92. № 6. P. 1955–1959.
- Cotton R.G., Al Aqeel A.I., Al-Mulla., Carrera P. *et al.* Members of the human variome project data collection from clinics, data collection from laboratories and publication, credit and incentives working groups. capturing all disease-causing mutations for clinical and research use: toward an effortless system for the human variome project // *Genet. Med.* 2009. V. 11. № 12. P. 843–849.
- Faiger H., Ivanchenko M., Cohen I., Haran T.E. TBP flanking sequences: asymmetry of binding, long-range effects and consensus sequences // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. № 1. P. 104–119.
- Fei Y.J., Stoming T.A., Efremov G.D. *et al.* Beta-thalassemia due to a T-A mutation within the ATA box // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988. V. 153. № 2. P. 741–747.
- Galanello R., Origo R. Beta thalassemia // *Orphanet J. Rare Diseases.* 2010. V. 5. № 11.
- Kim J., Iyer V. Global role of TATA box-binding protein recruitment to promoters in mediating gene expression profiles // *Mol. Cell. Biol.* 2004. V. 24. № 18. P. 8104–8112.
- Levings P.P., Bungert J. The human beta-globin locus control region // *Eur. J. Biochem.* 2002. V. 269. P. 1589–1599.
- Mears J.G., Ramirez F., Leibowitz D., Bank A. Organization of human delta- and beta-globin genes in cellular DNA and the presence of intragenic inserts // *Cell.* 1978. V. 15. № 1. P. 15–23.
- Miller R.D., Kwok P.Y. The birth and death of human single-nucleotide polymorphisms: new experimental evidence and implications for human history and medicine // *Hum. Mol. Genet.* 2001. V. 10. № 20. P. 2195–2198.
- Muncie H.L. Jr., Campbell J.C. Alpha and beta thalassemia // *Am. Fam. Physician.* 2009. V. 80. № 4. P. 339–344.
- Orkin S.H., Sexton J.P., Cheng T.C. *et al.* ATA box transcription mutation in beta-thalassemia // *Nucl. Acids Res.* 1983. V. 11. № 14. P. 4727–4734.
- Peterson M.G., Tanese N., Pugh B.F., Tjian R. Functional domains and upstream activation properties of cloned human TATA-binding protein // *Science.* 1990. V. 248. № 4963. P. 1625–1630.
- Poncz M., Ballantine M., Solowiejczyk D. *et al.* Beta-thalassemia in a Kurdish Jew. Single base changes in the T-A-T-A box // *J. Biol. Chem.* 1982. V. 257. № 11. P. 5994–5996.
- Pugh B.F. Purification of the human TATA-binding protein, TBP // *Methods in Molecular Biology.* V. 37: *In Vitro* Transcription and Translation protocols / Ed. M.J. Tymms Copyright. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 1995.
- Pugh B.F. Control of gene expression through regulation of the TATA-binding protein // *Gene.* 2000. V. 255. № 1. P. 1–14.
- Schechter A.N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine // *Blood.* 2008. V. 112. № 10. P. 3927–3938.
- Smale S.T., Kadonaga J.T. The RNA polymerase II core promoter // *Annu. Rev. Biochem.* 2003. V. 72. P. 449–479.
- Stewart J.J., Stargell L.A. The stability of the TFIIA-TBP-DNA complex dependent on the sequence of the TATAAA element // *Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 32. P. 30078–30084.
- Stewart J.J., Fischback J.A., Chen X., Stargell L.A. Non optimal TATA element exhibit diverse mechanistic consequences // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 32. P. 22665–22673.
- Strahs D., Barash D., Qian X., Schlick T. Sequence-dependent solution structure and motion of 13 TATA/TBP (TATA-box binding protein) complexes // *Biopolymers.* 2003. V. 69. P. 216–244.
- Struhl K. Promoters, activator proteins, and the mechanism of transcriptional initiation in yeast // *Cell.* 1987. V. 49. № 3. P. 295–297.
- Takahara Y., Nakamura T., Yamada H. *et al.* A novel mutation in the TATA box in a Japanese patient with beta⁺-thalassemia // *Blood.* 1986. V. 67. P. 547–550.
- Tallack M.R., Whittington T., Yuen W.S. *et al.* A global

- role for KLF1 in erythropoiesis revealed by ChIP-seq in primary erythroid cells // *Genome Res.* 2010. V. 20. P. 1052–1063.
- Traeger-Synodinos J., Vrettou C., Kanavakis E. Rapid detection of fetal Mendelian disorders: thalassemia and sickle cell syndromes // *Methods Mol. Biol.* 2008. V. 444. P. 133–145.
- Thein S.L. Genetic modifiers of the β -haemoglobinopathies // *Brit. J. Haematol.* 2008. V. 141. P. 357–366.
- Wobbe C.R., Strahl K. Yeast and human TATA-binding proteins have nearly identical DNA sequence requirements for transcription *in vitro* // *Mol. Cell Biol.* 1990. V. 10. № 8. P. 3859–3867.

**EFFECT OF TATA BOX POLYMORPHISMS
IN THE HUMAN β -GLOBIN GENE PROMOTER
ASSOCIATED WITH β -THALASSEMIA ON THE INTERACTION
OF THE TATA-BINDING PROTEIN**

**A. Drachkova, T.V. Arshinova, P.M. Ponomarenko, T.I. Merkulova,
N.A. Kolchanov, L.K. Savinkova**

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

Summary

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are the most common type of genetic variability in humans. Hereditary disorders of the hemoglobin synthesis caused by SNPs in human β -globin gene TATA boxes are associated with β -thalassemia. The TATA-binding protein (TBP) is the first basal factor that recognizes and binds the TATA box in TATA-box-containing promoters and nucleates the assemblage of RNA polymerase II transcription complexes. This report is the first to present quantitative parameters (K_d) of human TBP interaction with β -globin gene promoter TATA boxes possessing SNPs. These data are in agreement with data from the literature on a decrease in normal β -globin RNA production in patients with β -thalassemia.

Key words: β -thalassemia, β -globin gene, TATA-binding protein, TATA box, affinity.

ОСТЕОПОРОЗ КАК ПРОЯВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ ДЕТЕРМИНИРОВАННОГО СИНДРОМА ПРЕЖДЕВРЕМЕННОГО СТАРЕНИЯ У КРЫС OXYS

Н.А. Муралева¹, А.А. Макеев², Н.Г. Колосова¹

¹ Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: kolosova@bionet.nsc.ru;
² Новосибирский государственный педагогический университет, Новосибирск, Россия

Остеопороз – системное заболевание скелета, приводящее к снижению костной массы, нарушению структуры костной ткани и росту риска переломов. Его патогенез связан с возрастными нарушениями процесса ремоделирования костной ткани, но до конца не ясен. Показано, что крысы OXYS – перспективная модель для исследования патогенеза остеопороза. В настоящей работе проведено сравнение процессов ремоделирования у преждевременно стареющих крыс OXYS и крыс Вистар (контроль) в возрасте от 10 дней до 24 месяцев. Оценивали содержание паратиреоидного гормона (ПТГ) и маркера костеобразования остеокальцина (ОК) в крови и маркеров резорбции: метаболитов коллагена – пиридинолина (PYD) и дезоксипиридинолина (DYD) в моче и С-концевых телопептидов α -цепи коллагена I типа (С-TN) в сыворотке крови. Не выявлено межлинейных различий в уровне маркеров костного обмена в возрасте 10 дней. В 3 месяца у крыс OXYS С-TN в крови, PYD и DYD в моче были повышены, в 12 месяцев на фоне дальнейшего роста маркеров резорбции был снижен ОК, в 17 месяцев – ПТГ. Таким образом, доминирование резорбции над остеосинтезом происходит у крыс OXYS уже в молодом возрасте. Но, как показали гистологические исследования, в отличие от сенильного остеопороза усиленную резорбцию костной ткани обеспечивают в большей степени остеоциты, а не остеокласты. Следствием усиления резорбции становится нарушение структуры костной ткани: объем губчатой ткани и ширина трабекул в позвонках крыс OXYS в 21 месяц на 74 и 39 % меньше, чем у крыс Вистар.

Ключевые слова: остеопороз, патогенез, модели, преждевременно стареющие крысы OXYS.

Остеопороз – системное заболевание скелета, приводящее к снижению костной массы, нарушению микроархитектоники костной ткани и повышению риска переломов, вероятность развития которого с возрастом увеличивается. Это полиэтиологическое заболевание, основной причиной развития которого могут быть как генетическая предрасположенность, так и факторы внешней среды, но, как правило, имеет место их сложное взаимодействие. Наиболее весомым наследуемым предиктом остеопороза считается низкая пиковая масса костной ткани, значения которой определяются большим количеством генов (Ferrari, 2008; Giroux *et al.*, 2010). Неблагоприятные воздействия окружающей среды и качество жизни – экологическая обстановка, характер питания, гиподинамия – способствуют распространению заболевания. В основе пато-

генеза остеопороза лежит нарушение процесса ремоделирования костной ткани – баланса между остеосинтезом и резорбцией (Duque, Troep, 2008). Его смещение в направлении резорбции характерно для старения, но не всегда приводит к развитию заболевания. Механизмы, запускающие переход обычных возрастных изменений в патологический процесс, остаются неясными, что связано с невозможностью проведения исследований на ранних стадиях заболевания, протекающих у людей бессимптомно. Продуктивным подходом к выяснению этиологии и патогенеза заболеваний, разработке новых способов их лечения и профилактики является создание биологических моделей.

Ранее мы показали, что перспективной моделью остеопороза могут стать крысы линии OXYS, у которых он становится одним из про-

явлений преждевременного старения. Основной диагностический признак остеопороза – низкие значения минеральной плотности костной ткани (МПКТ) – у крыс OXYS регистрируется уже в возрасте 6 мес. (Муралева и др., 2010). О нарушении минерализации у полугодовалых крыс OXYS свидетельствуют повышение в костной ткани доли железа, фосфора и снижение кальций-фосфорного потенциала. На раннее завершение формирования скелета указывает сниженное содержание органического компонента в костной ткани полугодовалых крыс OXYS (Колосова и др., 2002) на фоне изменения количественного и качественного состава протеогликанов костного матрикса, играющих важную роль в процессах минерализации (Ершов и др., 2009). Косвенно на нарушение ремоделирования костной ткани у крыс OXYS указывает увеличение активности в ней катепсина К (Venediktova *et al.*, 2009), однако специальных исследований его состояния ранее не проводилось. Целью настоящей работы явилось исследование состояния процессов ремоделирования костной ткани у крыс OXYS в период раннего онтогенеза и на разных стадиях развития остеопороза. Эффективность ремоделирования оценивали гистологически и по уровню традиционных маркеров костного метаболизма (Singer, Eyre, 2008): остеокальцина (ОК) как маркера костеобразования, паратиреоидного гормона (ПТГ), регулирующего обмен Са – основного элемента костной ткани, а также метаболитов коллагена – пиридинолина (PYD) и дезоксипиридинолина (DYP) в моче и С-концевого телопептида в сыворотке крови как маркеров резорбции.

Материалы и методы

Животные. Работа выполнена на 120 крысах-самцах OXYS и Вистар (контроль) в возрасте 10 дней, 3, 6, 12, 17 и 24 мес. на базе Центра коллективного пользования ИЦиГ СО РАН «Генофонды экспериментальных животных». Количество животных в группах – от 8 до 15. Животных содержали при естественном освещении. Они получали стандартный гранулированный корм «Чара» (ЗАО «Ассортимент-Агро», Россия) и воду без ограничений. Животных выводили из опыта в соответствии

с международными нормами (Council of the European Communities Directive 86/609/EES). Забранные образцы сыворотки крови и мочи до проведения исследования хранили при температуре -20°C .

Биохимические методы исследования. Активность щелочной фосфатазы (ЩФ) определяли кинетическим методом с остановкой реакции (DGKC) на автоматическом биохимическом анализаторе «Сапфир-400» (Токуо Boeki Medical System, Япония), используя набор реактивов «Вектор-Бест» (Россия). Концентрацию остеокальцина в сыворотке определяли с помощью набора реактивов «Rat Gla-OC Competitive EIA Kit Manual» (Takara Bio Inc., Japan) на аппарате иммуноферментного анализа ТЕКАН (GmbH Austria). Уровень пиридинолина и дезоксипиридинолина в моче определяли набором реактивов «Rit Pyridinium-Crosslinks» (Immunodiagnostik, Germany) согласно протоколу. ПТГ в сыворотке крови определяли с помощью набора реактивов «PTH (Intact, Rat) ELISA» (ALPCO Immunoassays, USA) согласно протоколу. С-концевые телопептиды α -цепи коллагена I типа в сыворотке крови определяли, используя набор реактивов «RatLapsTM EIA» (Immunodiagnostic Systems, UK).

Гистологическое исследование. Гистологическое исследование препаратов костной ткани методом световой микроскопии выполнено с использованием микроскопа Axioskop 40 (Carl Zeiss, Германия). Морфометрическую обработку данных проводили с использованием программы AxioVision. Фрагменты тел позвонков поясничного отдела крыс фиксировали в 10 %-м растворе нейтрального формалина и в 4 %-м растворе параформа, приготовленного на растворе Хенкса. Образцы костной ткани декальцинировали в забуференном растворе ЭДТА, обезживали в растворах этилового спирта возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заливали в целлоидин-парафин. На санном микротоме готовили серийные срезы толщиной 3–5 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином Бемера и эозином. Реакцию на суммарные кислые гликозаминогликаны (ГАГ) ставили с альциановым синим по С. Стивену.

Статистический анализ результатов. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ Statis-

tica 6.0 для Windows, применяя однофакторный и дисперсионный факторный ANOVA анализы с последующими post hoc сравнениями средних групповых величин (Newman Keul test). Как независимые рассматривали факторы «генотип» и «возраст» животных. Результаты представлены как $M \pm SE$, их считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Содержание метаболитов коллагена PYD и DYD (маркеры костной резорбции) определяли в моче крыс Вистар и OXYS в возрасте от 3 до 24 мес. Как показал дисперсионный анализ, на уровень PYD влияли возраст ($F_{4,64} = 51$; $p < 0,000$) и генотип ($F_{1,64} = 28,1$; $p < 0,000$) животных, при этом факторы взаимодействовали ($F_{4,120} = 2,1$; $p < 0,030$). Направленность возрастных изменений этого показателя сходна у крыс Вистар и OXYS, но их темпы отличались (рис. 1, а). Максимальный уровень PYD у крыс обеих линий выявлен в возрасте 3 мес., когда его содержание у крыс OXYS было несколько выше, чем у Вистар ($p < 0,052$). К возрасту 6 мес. содержание PYD в моче крыс Вистар снижалось на 50 % ($p < 0,000$), у OXYS – на 35 % ($p < 0,000$), что привело к нарастанию межлинейных различий ($p < 0,000$). В возрасте 6, 12 и 17 мес. уровень PYD в моче крыс Вистар был ниже, чем у OXYS ($p < 0,000$; $p < 0,032$ и $p < 0,050$ соответственно). К возрасту 24 мес. показатель вырос у крыс Вистар на 46 % ($p < 0,000$), у OXYS – на 38 % ($p < 0,000$) и межлинейные различия нивелировались (рис. 1, а).

Содержание в моче DYD также менялось с возрастом ($F_{4,64} = 28,6$; $p < 0,000$), и на него влиял генотип ($F_{1,64} = 48,1$; $p < 0,000$). Динамика возрастных изменений DYD у крыс обеих линий была аналогичной динамике изменений PYD (рис. 1): в возрасте 3 мес. выявлен максимальный уровень DYD у крыс обеих линий и несколько более высокие его значения у крыс OXYS ($p < 0,06$). К возрасту 6 мес. уровень DYD снижался: у крыс Вистар на 49 % ($p < 0,000$), у крыс OXYS – на 36 % ($p < 0,000$) и у крыс Вистар в возрасте 12–17 мес. оставался на том же уровне, в то время как у крыс OXYS продолжал снижаться. В результате в возрасте 6, 12 и 17 мес. этот показатель был выше в моче крыс

OXYS ($p < 0,000$; $p < 0,028$ и $p < 0,042$ соответственно). С возраста 17 мес. до 24 мес. DYD повышался вдвое у крыс Вистар ($p < 0,000$) и в 1,6 раза ($p < 0,000$) – у OXYS, при этом межлинейные различия исчезали (рис. 1, б). В соответствии с литературными данными у животных всех исследованных групп содержание DYD было в 4 раза ниже содержания PYD.

С-концевые телопептиды являются специфичными продуктами деградации коллагена I типа, уровень которых возрастает в крови пациентов с повышенной костной резорбцией. Они специфичны для костной ткани и не подвергаются дальнейшему катаболизму. Содержание С-концевых телопептидов было исследовано в сыворотке крови животных в возрасте 10 дней,

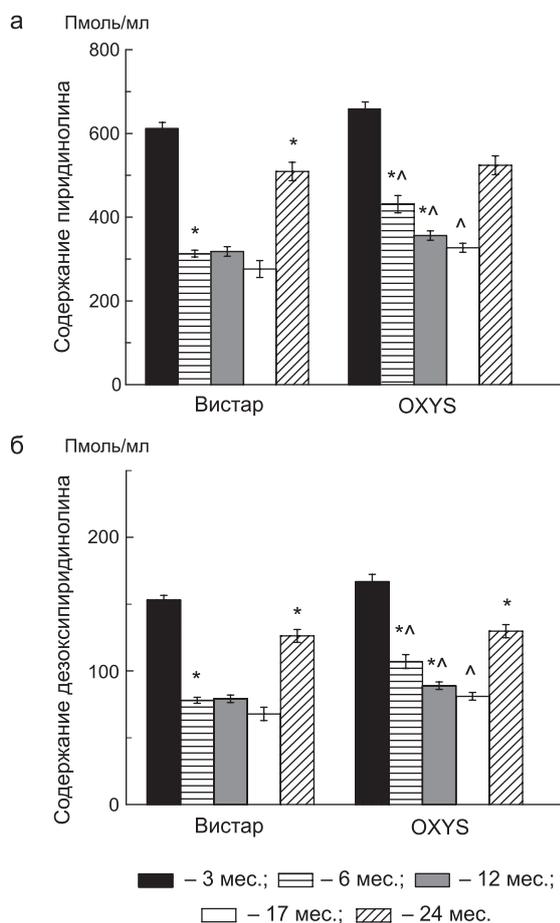


Рис. 1. Изменения содержания метаболитов коллагена в моче крыс Вистар и OXYS с возрастом.

а – пиридинолин (PYD); б – дезоксипиридинолин (DYD) ($M \pm SE$). Различия достоверны: ^ между одновозрастными крысами Вистар и OXYS ($p < 0,05$), * по сравнению с предыдущим возрастом животных одной линии ($p < 0,05$).

3 и 12 мес. Оно было выше у крыс OXYS ($F_{1,40} = 12,0; p < 0,001$) и изменялось с возрастом ($F_{3,64} = 90,9; p < 0,000$). Максимальные значения показателя зарегистрированы у 10-дневных крыс обеих линий (рис. 2). К возрасту 3 мес. уровень С-концевых телопептидов в сыворотке крови резко снижался и в возрасте 3 мес. и 12 мес. у крыс OXYS был достоверно выше, чем у крыс Вистар ($p < 0,023$ и $p < 0,035$ соответственно).

Важную роль в регуляции костного метаболизма играет ПТГ, повышение которого в сыворотке крови стимулирует резорбцию костной ткани. Уровень ПТГ в сыворотке крови значительно изменялся с возрастом ($F_{5,40} = 28,2; p < 0,000$) и на него влиял генотип ($F_{1,80} = 7,9; p < 0,006$). Однако в возрасте 10 дней межлинейные различия в содержании ПТГ отсутствовали (рис. 3). К возрасту 3 мес. содержание ПТГ у крыс Вистар и OXYS снижалось на 56 и 58 % соответственно, и показатель становился несколько выше у крыс OXYS ($p < 0,06$). У крыс Вистар уровень ПТГ в сыворотке крови постепенно снижался до возраста 17 мес. У крыс OXYS практически не менялся до года, но к возрасту 17 мес. достоверно вырос и стал выше, чем у крыс Вистар ($p < 0,02$). Однако к возрасту 24 мес. и по этому показателю межлинейные различия нивелировались.

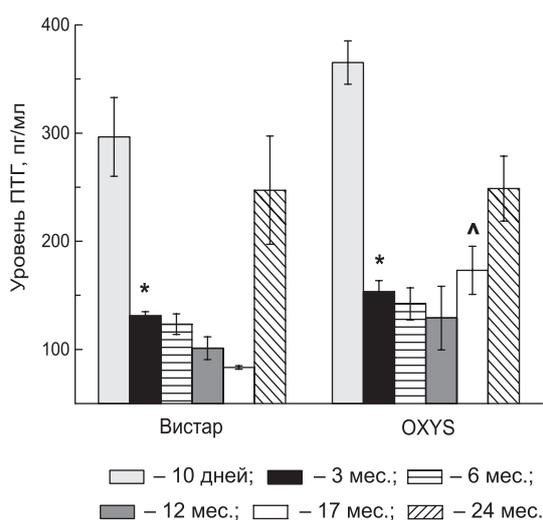


Рис. 3. Уровень ПТГ в сыворотке крови крыс Вистар и OXYS разного возраста ($M \pm SE$).

Различия достоверны: ^ между одновозрастными крысами Вистар и OXYS ($p < 0,05$), * по сравнению с предыдущим возрастом животных одной линии ($p < 0,05$).

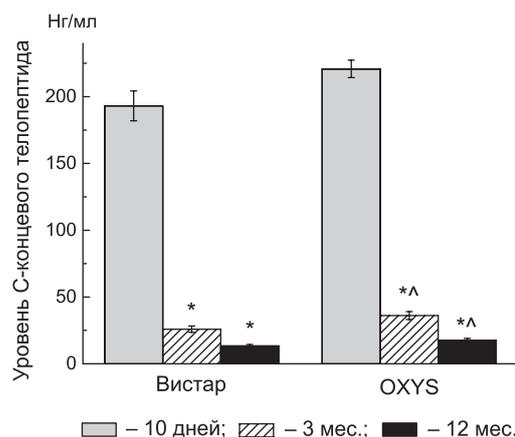


Рис. 2. Уровень С-концевого телопептида в сыворотке крови крыс Вистар и OXYS разного возраста ($M \pm SE$).

Различия достоверны: ^ между одновозрастными крысами Вистар и OXYS ($p < 0,05$), * по сравнению с предыдущим возрастом животных одной линии ($p < 0,05$).

Содержание маркера костеобразования остеокальцина также менялось с возрастом ($F_{2,48} = 50; p < 0,000$) и зависело от генотипа животных ($F_{2,48} = 7,7; p < 0,009$). Его минимальные значения выявлены у 10-дневных животных (рис. 4), к возрасту 3 мес. остеокальцин у крыс Вистар вырос в 2,1 ($p < 0,000$), у крыс OXYS – в 2,7 раза. Только в возрасте 12 мес., очевидно, за счет некоторого снижения показателя у крыс OXYS межлинейные различия в содержании остеокальцина были достоверными ($p < 0,015$).

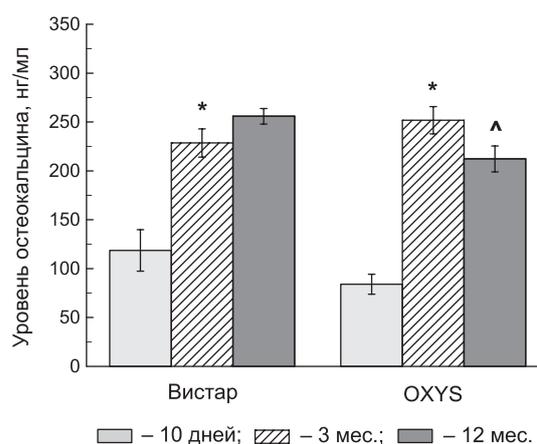


Рис. 4. Изменение уровня остеокальцина в сыворотке крови крыс Вистар и OXYS с возрастом ($M \pm SE$).

Различия достоверны: ^ между одновозрастными крысами Вистар и OXYS ($p < 0,05$), * по сравнению с предыдущим возрастом животных одной линии ($p < 0,05$).

Гистохимическое исследование структурно-функциональной организации костной ткани тел позвонков показало, что в возрасте 6 мес. у крыс обеих линий резорбция матрикса костной ткани преимущественно затрагивает вертикальные трабекулы губчатого слоя (рис. 5, а, б). Закономерно, что за счет остеолиза костного матрикса вертикальных трабекул как наименее нагружаемых компарментов тела позвонков поддерживается минеральный гомеостаз. Отличительная особенность костной ткани крыс OXYs – отсутствие гаушиптовых лакун на поверхности костных балок. Интенсивность остеолиза костных трабекул у крыс OXYs в возрасте 6 мес. более выражена, чем у крыс Вистар. Однако присутствие в поле зрения лишь единичных малоактивных остеокластов указывает на отсутствие доминирования остеокластического типа резорбции костной ткани крыс OXYs. Ведущим механизмом резорбции матрикса костной ткани у крыс OXYs является периканаликулярный с локализацией процесса вокруг сосудов эндоста и периоста.

В возрасте 21 месяца различия в структурной организации костной ткани тел позвонков крыс OXYs и Вистар ярко выражены. На обзорных

препаратах у крыс OXYs выявляются истончение и лизис вертикальных трабекул губчатого слоя компактной костной ткани. Результаты морфометрического анализа показали, что объем губчатой костной ткани и ширина трабекул у крыс OXYs меньше, чем у крыс Вистар на 74 и 39 % соответственно ($p < 0,05$). Согласно данным гистохимического анализа основными механизмами остеолиза и в этом возрасте у крыс OXYs остается гладкая резорбция, которая реализуется без участия остеокластов и обеспечивает аутолиз костных структур в области расположения кровеносных сосудов периоста (рис. 6, а) и прорастающих каналов компактного слоя пластинчатой костной ткани. Гистохимическое исследование выявило у крыс OXYs отчетливое расширение лакун остецитов и локальные участки костного матрикса с демаскированным коллагеном, что является морфологическим проявлением остеокластического остеолиза. Считается, что данный механизм резорбции является длительным и медленно протекающим во времени.

У крыс Вистар архитектура губчатой костной ткани в возрасте 21 мес. сохраняет типичное ячеистое строение. Характерное для этого возраста усиление резорбции костной ткани

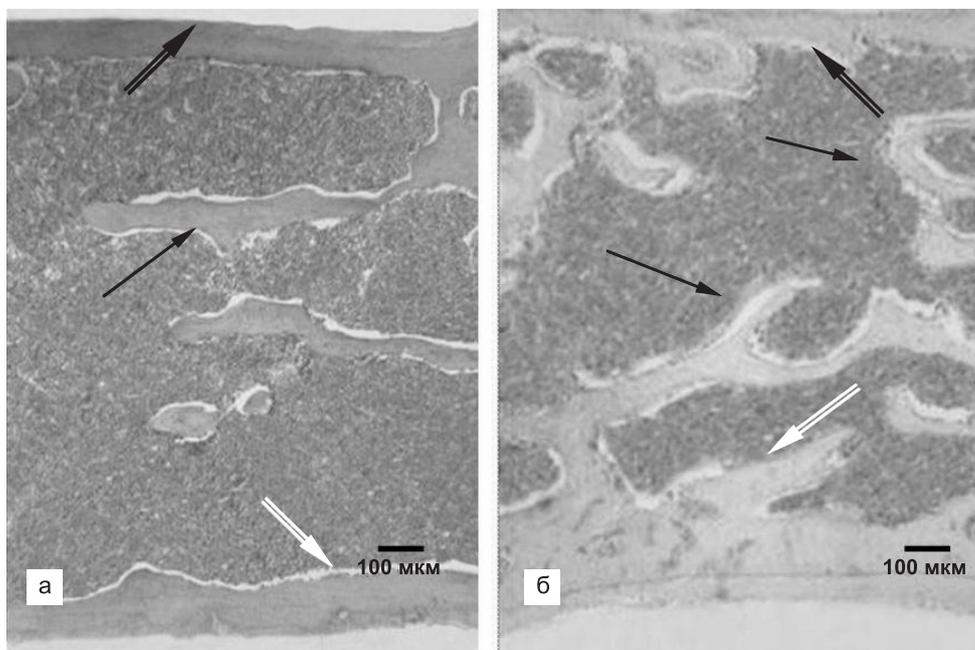


Рис. 5. Тела позвонков крыс OXYs (а) и Вистар (б) в возрасте 6 месяцев.

Черной стрелкой обозначены костные балки; двойной черной – дорсальная кортикальная пластинка; двойной белой – вентральная кортикальная пластинка. Ув. 40 ×.

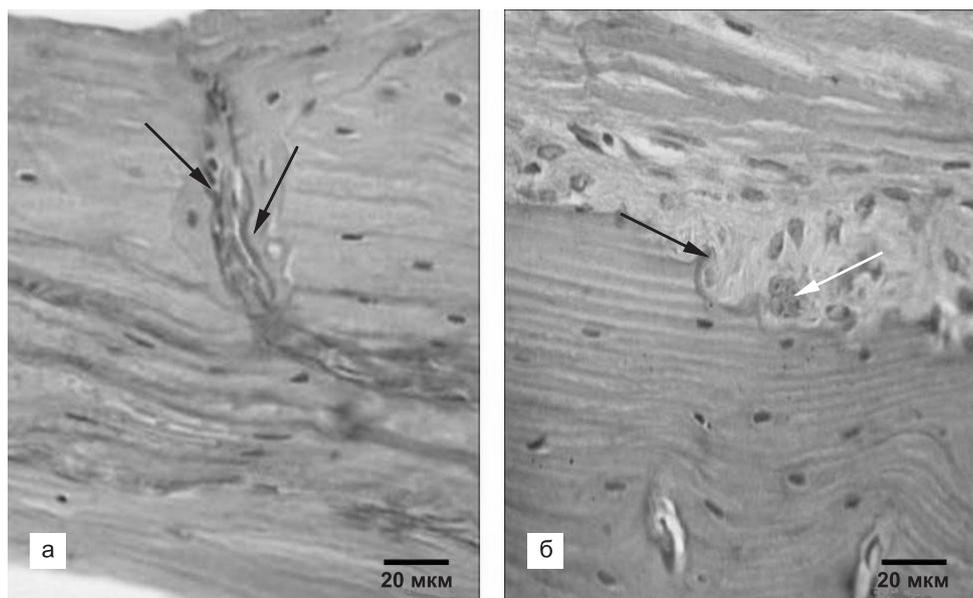


Рис. 6. Кортикальная пластинка тел позвонков крыс OXYS (а) и Вистар (б) в возрасте 21 мес. (со стороны дорсальной поверхности).

а – стрелкой обозначена резорбция костного матрикса на периферии кровеносного сосуда; б – черная стрелка – гаушиптовы лакуны, белая стрелка – остеокласт. Ув. 400 ×.

обеспечивается за счет повышенной активности остеокластов. Поверхность дорсальной кортикальной пластинки на всем ее протяжении имеет неровные контуры (рис. 6, б). На поверхности кортикальной кости среди клеток внутреннего слоя периоста идентифицируются функционально активные остеобласты и остеокласты, расположенные в гаушиптовых лакунах.

Обсуждение

Полученные в настоящем исследовании данные существенно дополнили картину развития остеопороза у крыс OXYS. Ранее мы показали (Муралева и др., 2010), что у крыс OXYS формирование скелета завершается раньше, а пиковые значения МПКТ существенно ниже, чем у крыс Вистар. Такие особенности формирования скелета в условиях отсутствия средовых влияний в соответствии с современными представлениями об этиологии и патогенезе заболевания могут рассматриваться как генетически детерминированные предпосылки развития остеопороза.

Ключевую роль в патогенезе остеопороза играют нарушение ремоделирования костной ткани, нарастающее с возрастом преобладание

процессов резорбции над процессами остеосинтеза. Результаты настоящего исследования и полученные ранее данные показали, что в возрасте 10 дней по ряду ключевых маркеров костного метаболизма крысы OXYS не отличаются от крыс Вистар. Так, содержание остеокальцина и С-концевых телопептидов α -цепи коллагена 1-го типа одинаковы, а активность щелочной фосфатазы (относительного показателя активности процессов остеосинтеза) даже несколько повышена у крыс OXYS (Муралева и др., 2010). Однако уже в возрасте 3 мес., когда у крыс OXYS еще отсутствует основной признак остеопороза – снижение МПКТ, процессы резорбции протекают уже интенсивнее, чем у крыс Вистар. Об этом свидетельствуют повышенный уровень в крови С-концевых телопептидов, а также некоторое увеличение экскреции с мочой PУD – конечных продуктов распада коллагена.

Пиковые значения костной массы у крыс OXYS достигаются к возрасту 6 мес., и в этом же возрасте появляются значимые отличия от крыс Вистар в МПКТ (Муралева и др., 2010). По времени это совпадает с усилением дисбаланса в процессах костного ремоделирования: нарастанием экскреции продуктов распада коллагена с мочой (PУD и DYD) и снижением

по сравнению с крысами Вистар уровня остеокальцина в крови, что косвенно указывает на уменьшение количества активных остеобластов (Singer, Eyre, 2008).

С возрастом дисбаланс процессов ремоделирования у крыс OXYS продолжает нарастать: на фоне сохраняющихся повышенными значений маркеров резорбции (PYD, DYD и C-концевого тепептида) костной ткани происходит снижение маркера костеобразования остеокальцина. К возрасту 24 мес. межлинейные различия по этим параметрам нивелируются, но структурные изменения костной ткани крыс OXYS уже носят необратимый характер. Следует отметить, что межлинейные различия уровня ПТГ в сыворотке крови были выявлены только в возрасте 17 мес. Повышение этого показателя у крыс OXYS предшествовало появлению необратимых изменений в костной ткани.

Присутствие структурно-функциональных нарушений в костной ткани крыс OXYS уже в возрасте 6 мес. – снижение количества и активности остеобластов и остеокластов – продемонстрировали гистологические исследования. К возрасту 21 мес. деструктивные изменения костной ткани крыс OXYS усиливаются и приобретают ярко выраженный характер. Принципиально важно, что остеолиз матрикса костной ткани у них не осуществляется по механизму классической резорбции за счет повышенной активности резидентных макрофагов костной ткани остеокластов. В резорбции костной ткани крыс OXYS и в возрасте 6 мес., и еще в большей степени в возрасте 21 мес. активное участие принимают остециты. При этом очаги резорбции локализуются преимущественно периканаликулярно – вокруг сосудов эндоста и периоста. К возрасту 21 мес. процессы резорбции закономерно усиливаются и у крыс Вистар, однако происходит это за счет остеокластов. Такой механизм лежит как в основе возрастных изменений костной ткани при «физиологическом старении», так и в основе патогенеза сенильного остеопороза.

Таким образом, развитие остеопороза у крыс OXYS тесно связано с нарушениями процессов костного ремоделирования. Доминирование резорбции над остеосинтезом происходит у них уже в молодом возрасте, но в отличие от сенильного остеопороза усиленную резорбцию

костной ткани обеспечивают в большей степени остециты, а не остеокласты. Такие результаты не позволяют рассматривать, как это делалось ранее, линию крыс OXYS как модель сенильного остеопороза (Фаламеева и др., 2006). Мы определяем его как идеопатический, т. е. остеопороз неясной этиологии, которую еще предстоит выяснить.

Благодарности

Работа поддержана грантами: Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» (№ 21.13) и РФФИ (№ 08-04-00722).

Литература

- Ершов К.И., Русова Т.В., Фаламеева О.В. и др. Гликозаминогликаны костного матрикса при развитии остеопороза у преждевременно стареющих крыс OXYS // Усп. геронтологии. 2009. Т. 22. № 2. С. 285–291.
- Колосова Н.Г., Куторгин Г.Д., Сафина А.Ф. Особенности минерализации костной ткани преждевременно стареющих крыс OXYS // Бюл. эксперим. биологии. 2002. № 133. С. 203–206.
- Муралева Н.А., Садовой М.А., Колосова Н.Г. Особенности развития остеопороза у преждевременно стареющих крыс OXYS // Усп. геронтологии. 2010. Т. 23. № 2. С. 233–243.
- Фаламеева О.В., Садовой М.А., Храпова Ю.В., Колосова Н.Г. Структурно-функциональные изменения костной ткани позвоночника и конечностей крыс OXYS // Хирургия позвоночника. 2006. Т. 1. С. 88–94.
- Duque G., Troen B.R. Understanding the mechanisms of senile osteoporosis: new facts for a major geriatric syndrome // J. Amer. Geriatr. Soc. 2008. V. 56. № 5. P. 935–941.
- Ferrari S. Human genetics of osteoporosis // Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. 2008. V. 22. № 5. P. 723–735.
- Giroux S., Elfassihi L., Clément V. *et al.* High-density polymorphisms analysis of 23 candidate genes for association with bone mineral density // Bone. 2010. V. 47. № 5. P. 975–981.
- Singer F.R., Eyre D.R. Using biochemical markers of bone turnover in clinical practice // Cleve Clin. J. Med. 2008. V. 75. № 10. P. 739–750.
- Venediktova A.A., Falameeva O.V., Kolosova N.G. *et al.* Cathepsin K and matrix metalloprotease activities in bone tissue of the OXYS rats during the development of osteoporosis // Biomed. Chem. 2009. V. 3. № 4. P. 393–398.

OSTEOPOROSIS AS A MANIFESTATION OF GENETICALLY DETERMINED SYNDROME OF SENESCENCE ACCELERATION IN OXYS RATS

N.A. Muraleva¹, A.A. Makeev², N.G. Kolosova¹

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

² Novosibirsk State Pedagogical University, Novosibirsk, Russia

Summary

Osteoporosis is a systemic disease of bones. It involves decrease in bone mineral density, abnormal bone tissue structure, and high risk of fracture. Its development is associated with age-related anomalies of bone tissue remodeling; however, it is not clearly understood. OXYS rats are considered to be a convenient model for osteoporosis studies. In this study, bone tissue remodeling processes are compared between senescence accelerated OXYS rats and control standard Wistar rats in the age range from 10 days to 24 months. Parathyroid hormone (PTH) and the marker of bone formation osteocalcin (OC) were assayed in blood. The following resorption markers were assayed: collagen metabolites (pyridinoline, PYD, and deoxypyridinoline, DYD) in urine and C-terminal telopeptides of type I collagen α chain (C-TN) in serum. No difference between the rat strains in the contents of bone metabolism markers was found at the age of 10 days. The contents of C-TN in blood and PYD and DYD in the urine of OXYS rats were elevated at the age of 3 months. The content of OC in 12-month old OXYS rats was lower than in Wistar, the resorption marker levels continuing to increase. An elevated PTH content was recorded in OXYS rats at the age of 17 months. Thus, resorption dominated over bone formation in OXYS rats even in the youth. However, histological examination showed that, in contrast to cases of senile osteoporosis, the elevated bone tissue resorption was determined mainly by osteocytes rather than osteoblasts. Elevated resorption caused abnormal bone tissue structure. At the age of 21 months, the volume of spongy tissue and trabecula width in the vertebrae of OXYS rats were less than in Wistar by 74 and 39 %, respectively.

Key words: osteoporosis, pathogenesis, models, senescence accelerated OXYS rats.

НАСЛЕДОВАНИЕ ПРИЗНАКА «УСТОЙЧИВОСТЬ К ВЫСОКИМ ТЕМПЕРАТУРАМ» У РИСА

Ю.К. Гончарова

Всероссийский научно-исследовательский институт риса, Краснодар, п. Белозерный, Россия,
e-mail: serggontchar@mail.ru

На 25 сортах российской селекции изучена сортовая специфика устойчивости к высоким температурам. Установили, что с увеличением температуры (до 35 °С) у большинства исследованных образцов возрастает количество пустых колосков (в среднем на 35,8 %). У отдельных образцов это количество возрастает более чем на 80 %. Повышение пустозерности сопровождается снижением массы 1000 зерен, которое в среднем составило 20,6 % (в зависимости от сорта от 2 % до 48 %). Масса зерна главной метелки у всех сортов снизилась по сравнению с контролем в среднем на 62,1 % (в зависимости от сорта от 16 % до 98 %). Для одних сортов была характерна устойчивость к фактору по всем изучаемым признакам, другие сорта характеризовались как устойчивые только по отдельным признакам. Изучено влияние цитоплазматической ДНК на наследование признака «устойчивость к высоким температурам».

Ключевые слова: рис, устойчивость, генетика, высокие температуры, материнский эффект.

Погодно-климатические аномалии не только сопровождаются ощутимыми потерями сельскохозяйственной продукции во многих районах земного шара, но и имеют тенденцию возрастать (Пташкин, 1970; Мусиенко, 1985). К середине следующего столетия изменение климата приведет к повышению средних температур приблизительно на 2 °С, кроме того, чаще будут отмечаться кратковременные повышения и понижения температуры, не характерные для регионов (Atkin, Tjoelker, 2003).

Выявленные тенденции в изменении основных агроклиматических показателей отрицательно сказываются на продуктивности зерновых культур и увеличивают межгодовую вариабельность урожаев. Для яровой пшеницы установлено, что увеличение средней за период вегетации температуры воздуха на 1 °С выше нормы вызывает снижение урожайности яровой пшеницы на 30 % (1,5–2,0 ц/га) (Левицкая и др., 2004). Генетический анализ устойчивости пшениц к абиотическим факторам показал, что увеличение температуры воздуха в период вегетации по сравнению со среднемноголетним значением на 1 °С приводит к снижению урожайности в среднем на 10 % (количество колосков

снижается на 5 %, масса 1000 зерен в среднем на 4,8 %) (Крупнов, Германцев, 2001).

По наследованию признака «устойчивость к высоким температурам» у риса работы носят фрагментарный характер. Так, в фитотроне IRR1 были проведены исследования сортовой специфики устойчивости к повышенным температурам, которые показали значительные сортовые различия по изучаемому признаку среди коллекционных образцов. Все образцы были поделены на устойчивые (фертильность более 84 % при 35 °С) и чувствительные (фертильность менее 10 %). Были также проведены экологические испытания изученных по данному признаку образцов в нескольких странах (Саудовская Аравия, Ирак, Пакистан, США). В основном полевые испытания подтвердили данные, полученные в фитотроне (Maskill *et al.*, 1982). В испытания также были включены сорта, устойчивые к холоду, однако все они оказались чувствительны к высоким температурам, что показывает независимое наследование данных признаков. Наиболее устойчивыми к высоким температурам среди изученных сортов оказались сорта IR 8, IR 20, IR 36, IR 50 селекции Международного института риса.

Изучение специфической и общей комбинационной способности по устойчивости к высоким температурам в диаллельном скрещивании 6 сортов в фазу цветения показало, что оба эффекта как специфической, так и общей комбинационной способности были высоко значимы. В вышеприведенном эксперименте также была рассмотрена наследуемость данного признака в широком смысле (76 %) и узком смысле (71 %), это показывает возможность эффективного отбора по данному признаку при соответствующих условиях среды (De Costa, 2000).

Другие исследования данной проблемы затронули вопросы, связанные с вариабельностью количества пыльцевых зерен на рыльце у чувствительных и устойчивых форм. Было отмечено большее количество пыльцевых зерен у устойчивых форм как при обычных, так и повышенных температурах. Коэффициент корреляции между числом пыльцевых зерен на рыльце при температуре 29–21 и 38–27 и уровнем колосковой фертильности при 38–27 °С был 0,94 и 0,98 соответственно (Satake, Yoshida, 1978). Эти генотипические различия связаны, прежде всего, с расположением пыльников относительно цветковых чешуй и уровнем их раскрытия. Следовательно, при селекции на устойчивость к повышенным температурам можно отбирать растения с высоким числом пыльцевых зерен на рыльце в обычных условиях. Авторы также отметили важное значение раннего открытия цветков для повышения устойчивости к высоким температурам. Было отмечено, что даже всего на один час более раннее открытие цветков значительно влияет на процент стерильных колосков, так как при раннем цветении опыление происходит до того, как температура достигает критической отметки. Они также показали, что образцы, подвергшиеся в период цветения температурам более 35 °С (в течение пяти дней), были полностью стерильны вследствие нераскрытия пыльников, пересыхания рылец.

Высокие температуры приводят к нарушению процесса опыления, наиболее значительные потери отмечены при воздействии их в период начала мейоза, озерненность метелки снижается уже при температуре 30 °С. Развитие пыльцы, ее перемещение на рыльце, прораста-

ние зерна пыльцы и рост пыльцевых трубок, оплодотворение и развитие зиготы – стадии, успешное прохождение которых обеспечивает высокую озерненность метелки, чувствительны к температуре, высокие температуры могут вызывать мужское и женское бесплодие (Saini, Aspinall, 1982). Время цветения образца (в течении суток), высокая жизнеспособность пыльцевых зерен, пелликулы рылец, скорость роста пыльцевых трубок, размеры стилодия оказывают значительное влияние на процесс. Высокая температура выше 31 °С снижает эффективность фотосинтеза, индекс стабильности хлорофилла, стабильность мембраны клетки, число выполненных зерен и их массу. Продуктивность растения снижалась на 78 %, количество выполненных зерен на 63 % и масса 1000 зерен на 29 % при температурах 35–20,8 °С по сравнению с 20–20,8 °С при воздействии высокой температуры за 10 дней до цветения и созревания (Tashiro, Wardlaw, 1990). Температура выше 36 °С в период раскрытия пыльников приводит к стерильности пыльцы. Фазы цветения, оплодотворение, трубкование – самые восприимчивые к температуре у риса. Реакция растений значительно варьирует в зависимости от времени и продолжительности воздействия фактора (Matsunaga *et al.*, 1986).

Долгое время влиянию высоких температур на продуктивность риса в нашей стране не уделялось должного внимания, поскольку считалось, что культура ранее выращивалась в более жарком климате, и этот фактор значительно снижать ее продуктивность не может. Анализ урожайности риса в период с 1961 по 2000 гг., проведенный В.Д. Агарковым и А.И. Касьяновым (2002), показал связь температуры воздуха во второй–третьей декадах июня (время формирования конуса нарастания у большей части посевов риса) с величиной урожая. Было отмечено, что превышение температуры воздуха в этот период на 1,4–2,2 °С приводит к снижению урожая. Изучение межсортовой вариабельности по устойчивости к высоким температурам, проведенное на 30 сортах отечественной селекции, показало, что большая их часть достоверно снижает продуктивность при воздействии высоких температур (Гончарова и др., 2006). При постоянной дневной температуре 35 °С в фазу цветения (ночные температуры –

20–22 °С) продуктивность практически всех изучаемых образцов снизилась. Однако реакция сортов на изменение температуры была различной. В среднем пустозерность сортов повысилась на 35,8 %. У 7 сортов она была выше 90 %. Повышение пустозерности сопровождалось снижением массы 1000 зерен. В среднем снижение массы 1000 зерен при повышении температуры составило 20,6 % (в зависимости от сорта от 2 до 48 %). Масса зерна главной метелки у всех сортов снизилась по сравнению с контролем в среднем на 62,1 % (в зависимости от сорта от 98 % до 16 %). Несколько сортов снизили продуктивность главной метелки менее чем на 50 % (Гончарова, 2006).

Как показали исследования, время воздействия стресса значительно изменяет не только интенсивность, но и направление его воздействия. Так, при действии стресса в фазы «кущение–выметывание», «выметывание–созревание» продуктивность растения снижалась, причем в фазу цветения воздействие было максимальным. При возрастании температуры с 25 °С до 35 °С в фазу кущения снизились масса главной метелки, ее длина, количество заложённых колосков, количество выполненных колосков. Однако основное влияние изучаемый фактор оказал на признак «продуктивное кущение», а вместе с тем и на «массу зерна с растения». Так, количество продуктивных стеблей возросло от $1,71 \pm 0,04$ шт. при температуре 35 °С до $2,4 \pm 0,04$ шт. при температуре 20 °С. Влияние стресса в начальные фазы роста оказывало «закаливающее» воздействие на образцы (Гончарова, 2007).

Материалы и методы

Наследование устойчивости к признаку изучали в 2005–2008 гг. на четырех сортах риса (*Oryza sativa* L.) отечественной селекции (Хазар, Лиман, Снежинка, Изумруд), а также в первом поколении пяти гибридных комбинациях между ними. Растения выращивали на вегетационной площадке до фазы «выметывание», в сосудах по 10 растений на сосуд, 20 растений на вариант опыта. В изучаемую фазу сосуды заносили в камеры искусственного климата с температурами 25 и 35 °С, ночные температуры в обеих камерах совпадали: 20–22 °С. В анализ

брали только метелки главного побега, которые до начала опыта помечались ленточками.

Результаты исследования

Изучение внутрисортовой вариабельности позволило выделить несколько растений в популяциях сортов риса, различающихся по устойчивости к высоким температурам. В фазу цветения устойчивые и неустойчивые линии помещались в камеру на 10 дней, созревание линий происходило на вегетационной площадке. Биометрический анализ данных устойчивых и неустойчивых линий сортов показал их достоверные различия по реакции на воздействие стрессового фактора. Для выделенных по устойчивости к фактору линий показано сохранение признака в последующих поколениях (табл. 1). Средняя пустозерность линий, выделенных в сорте Лиман, составила у устойчивых $61,9 \pm 7,2$, у неустойчивых – $86,4 \pm 3,1$; у линий, выделенных в сорте Изумруд, составила у устойчивых $53,8 \pm 6,5$, у неустойчивых $80,8 \pm 5,9$; у линий, выделенных в сорте Хазар, составила у устойчивых $57,3 \pm 3,8$, у неустойчивых $80,9 \pm 7,6$. Гибридизация более устойчивых линий сорта приводит к получению более устойчивого гибрида (табл. 2 и 3). Так, при скрещивании устойчивых родительских форм в комбинации Хазар/Изумруд средняя пустозерность гибридов F_1 составила $47,4 \pm 5,9$, у неустойчивых – $86,3 \pm 4,7$; у устойчивых родительских форм в

Таблица 1

Различия по признаку «высокая или низкая пустозерность» при воздействии высоких температур (среднее значение признака по линиям сорта)

Образец	Характеристика родительских форм	Средняя пустозерность линии	Ошибка средней
Лиман	неустойчивые	86,4	3,1
Лиман	устойчивые	61,9	7,2
Изумруд	неустойчивые	80,8	5,9
Изумруд	устойчивые	53,8	6,5
Хазар	неустойчивые	80,9	7,6
Хазар	устойчивые	57,3	3,8

Таблица 2

Различия по признаку «высокая или низкая пустозерность» при воздействии высоких температур в гибридных комбинациях с использованием устойчивых и неустойчивых родительских форм (среднее значение признака по гибридной комбинации)

Гибридная комбинация	Характеристика родительских форм	Средняя пусто-зерность линии	Ошибка средней
Хазар/Изумруд	неустойчивые	86,3	4,7
Хазар/Изумруд	устойчивые	47,4	5,9
Изумруд/Хазар	устойчивые	50,1	5,9
Изумруд/Хазар	неустойчивые	78,2	4,6
Снежинка/Хазар	устойчивые	54,9	4,5
Снежинка/Хазар	неустойчивые	85,5	7,3

комбинации Изумруд/Хазар средняя пустозерность гибридов составила $50,1 \pm 5,9$, у неустойчивых $78,2 \pm 4,6$; у устойчивых родительских форм в комбинации Снежинка/Хазар средняя пустозерность гибридов составила $54,9 \pm 4,5$, у неустойчивых $85,5 \pm 7,3$; при скрещивании устойчивых родительских форм в комбинации Изумруд/Лиман средняя пустозерность гибридов составила $59,7 \pm 5,4$, у неустойчивых $74,9 \pm 3,6$.

Установлено влияние материнского эффекта на устойчивость гибрида к воздействию высокой температуры (табл. 4).

При гибридизации более устойчивого сорта Лиман (в качестве материнской формы) при опылении его менее устойчивым сортом Хазар полученные гибриды более устойчивы к стрессовому фактору: средняя пустозерность гибридов составила $39,9 \pm 8,1$; в обратной комбинации при гибридизации менее устойчивого сорта Хазар (в качестве материнской формы) при опылении его более устойчивым сортом получены гибриды, средняя пустозерность которых составила $74,5 \pm 10,1$. Следовательно, в качестве материнской формы при гибридизации необходимо брать более устойчивый образец.

Таблица 3

Варьирование признака «высокая или низкая пустозерность» при воздействии высоких температур в гибридных комбинациях при использовании устойчивых и неустойчивых родительских форм

Гибридная комбинация	Характеристика родительских форм	Средняя пусто-зерность линии	Ошибка средней
Хазар/Изумруд	устойчивые	38,4	5,1
Хазар/Изумруд	устойчивые	44,2	3,9
Хазар/Изумруд	устойчивые	59,7	8,6
Хазар/Изумруд	неустойчивые	84,1	4,5
Хазар/Изумруд	неустойчивые	83,9	5,9
Хазар/Изумруд	неустойчивые	91,0	3,8
Изумруд/Хазар	устойчивые	51,0	4,2
Изумруд/Хазар	устойчивые	49,0	7,6
Изумруд/Хазар	неустойчивые	62,8	5,8
Изумруд/Хазар	неустойчивые	93,2	3,3
Снежинка/Хазар	устойчивые	54,9	4,5
Снежинка/Хазар	неустойчивые	86,6	8,9
Снежинка/Хазар	неустойчивые	86,6	7,3
Снежинка/Хазар	неустойчивые	83,2	5,8
Изумруд/Лиман	неустойчивые	74,9	3,6
Изумруд/Лиман	устойчивые	59,7	5,4

Выводы

1. Выявлен межсортовой и внутрисортовой полиморфизм по признаку «устойчивость к высоким температурам».

2. Анализ по признаку «высокая или низкая пустозерность» при воздействии высоких температур в последующих поколениях (среднее значение признака по линиям сорта) показал сохранение признака.

3. Гибридизация более устойчивых линий сорта приводит к получению более устойчивого гибрида.

4. Установлено влияние материнского эффекта на устойчивость гибрида к воздействию высокой температуры.

Таблица 4
Влияние материнского эффекта
на устойчивость гибрида
к воздействию высокой температуры

Характеристика родительских линий	Гибридная комбинация	Среднее значение по признаку «пустозерность» при высоких температурах	Ошибка средней
Н/Н	Хазар/Лиман	77,1	5,7
Н/У	Хазар/Лиман	72,4	8,6
У/У	Хазар/Лиман	31,6	5,3
У/Н	Хазар/Лиман	74,5	10,1
	Среднее значение	63,9	7,4
Н/Н	Лиман/Хазар	46,5	6,1
Н/У	Лиман/Хазар	42,0	8,4
У/Н	Лиман/Хазар	41,2	8,7
У/У	Лиман/Хазар	29,7	9,2
	Среднее значение	39,9	8,1

* Н – неустойчивая; У – устойчивая.

Литература

Агарков В.Д., Касьянов А.И. К обоснованию высоких и низких урожаев риса // Рисоводство. 2002. № 1. С. 25–30.

Гончарова Ю.К. Влияние температур на продуктивность риса // Матер. Междунар. науч.-практ. конф. «Проблемы ресурсосберегающего производства и переработки экологически чистой сельскохозяйственной продукции». 2006. С. 65–67.

Гончарова Ю.К., Харитонов Е.М., Ковалев В.С. и др. Физиологические аспекты влияния высоких температур на продуктивность риса // Матер. Междунар. науч. конф. «Устойчивое производство риса: настоящее и перспективы». 2006. С. 277–235.

Гончарова Ю.К. Внутрисортовая вариабельность по признаку «устойчивость к высоким температурам» у риса // Матер. 7 Междунар. симп. «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их

использования». Пушино, 2007. С. 71–73.

Крупнов В.А., Германцев Л.А. Влияние температуры воздуха на продуктивность яровой пшеницы в зоне каштановых почв Поволжья // Вестн. Российской Академии сельскохозяйственной наук. 2001. № 2. С. 33–35.

Левицкая Н.Г., Шаталова О.В., Курдюков Ю.Ф. Влияние глобального потепления климата на величину его биохимического потенциала в Поволжье // Адаптивные технологии производства качественного зерна в засушливом Поволжье. Саратов, 2004. С. 83.

Муслиенко Н.Н., Капля А., Оканенко А. и др. Жаростойкость и продуктивность озимой пшеницы. Киев, 1985. 23 с.

Пташкин В.В. Влияние внешних условий на структуру урожая риса: Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. Краснодар, 1970. 33 с.

Atkin O.K., Tjoelker M.G. Thermal acclimation and dynamic response of plant respiration to temperature // Trends Plant Sci. 2003. V. 8. P. 343–351.

De Costa W. Prediction of the effects of elevated CO₂ and temperature on irrigated rice yields in the low-country dry zone of Sri Lanka using a process-based simulation model // J. Nat. Sci. Found. Sri Lanka. 2000. V. 28. № 3. С. 165–184.

Makoto A., Hiroyuki S., Ikuo A., Masahiro Y. Genetical studies on germination of seed and seedling establishment for breeding of improved rice varieties suitable for direct seeding culture JARQ // Jap. Agr. Res. Quart. 2004. V. 38. № 1. S. 1–5.

Mackill D.J., Coffman W.R., Rutger J.N. Pollen shedding and combining ability for high temperature tolerance in rice // Crop Sci. 1982. № 22. P. 730–733.

Matsunaga K., Sasaki T., Okamoto E. Cool weather resistance at the booting stage in Japanese upland rice // Bull. Tohoku Branch. Crop Sci. Soc. 1986. V. 29. P. 39–40.

Satake T., Yoshida S. High temperature-induced sterility in Indica rice in the flowering stage // Japan J. Crop Sci. 1978. № 47. P. 6–17.

Saini R., Aspinall S. Genetic analysis of high temperature resistance in rice // Crop Prot. 1982. P. 289–297.

Tashiro T., Wardlaw N. Studies of high temperature resistance in rice // Crop Sci. Soc. 1990. V. 39. P. 46–49.

INHERITANCE OF HEAT RESISTANCE IN RICE

Y.K. Goncharova

All-Russian Rice Research Institute (ARRRI), Belozerno Village, Krasnodar, Russia,
e-mail: serggontchar@mail.ru

Summary

Studies of 25 Russian rice varieties have shown that the percentage of sterile spikelets increases at an elevated temperature (35 °C) to 35,8 % on the average, reaching 80 % in some samples. The spikelet sterility is accompanied by decrease in 1000 grains weight 20,6 % on the average. This decrease varied among rice varieties from 2 to 48 %. The grain weight in the main panicle of all varieties decreased as compared to control by 62,1 % on the average: 16 to 98 %. Some varieties were heat-tolerant with regard to all traits under study, whereas only few traits were heat-insensitive in others. The effect of cytoplasmic DNA on the inheritance of heat tolerance has been investigated.

Key word: rice, tolerance, genetics, heat, cytoplasmic factors.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ФОРМИРОВАНИЯ ОКРАСКИ КОРНЕПЛОДА У КОРМОВОЙ СВЕКЛЫ

А.В. Мглинец, З.А. Осипова

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

Изучены формирование и наследование желтой (желто-оранжевой) окраски корнеплода кормовой свеклы. Показано, что данный тип окраски определяется одним ядерным фактором, находящимся на расстоянии $4,26 \pm 2,08$ % единиц рекомбинации от гена *R*, определяющего красный цвет гипокотилия. На основании полученных данных делается предположение, что данный тип окраски корнеплода определяется аллелем гена *Y*, который ранее не был описан в литературе и который предлагается обозначить *Y^e*. Полученные результаты позволяют предположить, что ген *Y* отвечает за распределение пигментов окраски в тканях корнеплода, а ген *R* определяет их качественный и количественный состав.

Ключевые слова: *Beta vulgaris*, свекла кормовая, окраска корнеплода, генетический контроль, беталаины.

Введение

Первые исследования генетики окраски корня у культурной свеклы были выполнены Б. Каянусом в начале XX в. (Kajanus, 1917). Он использовал гибридизацию кормовой свеклы (Баррес и Эккендорфская) с сахарной и выделял три окраски корнеплода: белую, желтую и красную. На основании полученных данных Каянус предположил, что желтая окраска корнеплода, характерная для кормовой свеклы, определяется доминантным фактором, который он обозначил *G* (от *Gelb*), а красная окраска корнеплода определяется комбинацией данного фактора и дополнительного, который он обозначил *R* (от *red*). По мнению Каянуса, эти два фактора наследуются независимо.

Следующим шагом в изучении окраски у культурной свеклы можно считать работу В. Келлера, опубликованную в 1936 г. (Keller, 1936). Он выделял 9 типов окраски: учитывалась не только окраска корнеплода, но и окраска гипокотилия. В качестве окрашенной формы Келлер использовал столовую свеклу сорта Детройт темно-красный, а в качестве формы без окраски – свеклу сахарную. Данные генетического анализа

демонстрировали, что окраска, характерная для столовой свеклы (окраска кожицы корнеплода, мякоти и надземной части), определяется взаимодействием всего двух генов, расположенных в одной группе сцепления. Значение коэффициента рекомбинации, рассчитанное на основании суммарных данных, составило около 7,5 %. Эти гены были обозначены как *R* (red) и *Y* (yellow), а их аллели как *R* и *r*, *Y* и *y* соответственно. Обозначение генов, которое использовал Келлер, соответствует обозначению, предложенному ранее Каянусом. Ген *R* Келлера соответствует гену *R*, предложенному Каянусом, а ген *Y* соответствует гену *G*.

Согласно Келлеру, растения генотипа *r/r y/y* имеют зеленый или бледно-желтый гипокотиль (в зависимости от условий выращивания), корнеплод и надземную часть без всяких признаков окраски. Растения генотипа *R/_ y/y* имеют красный (или розовый) гипокотиль, корнеплод без окраски, однако его головка может быть окрашена в розовый цвет. Растения генотипа *r/r Y/_* имеют желтые гипокотиль и мякоть корнеплода. Растения генотипа *R/_ Y/_* имеют красный (малиновый) гипокотиль, корнеплод (мякоть и кожицу), окрашенный в красно-фи-

олетовый цвет, и такого же цвета надземную часть.

Кроме того, Келлер изучил наследование красно-полосатой окраски корнеплода и показал, что она также определяется парой ядерных генов, коэффициент рекомбинации между которыми составляет около 7,5 %. Отсюда он сделал вывод, что данный тип окраски определяется генами R и Y , но с другими аллелями – R^t и Y^r . Позднее было показано, что аллель R доминирует над R^t , который, в свою очередь, доминирует над r (Wolyn, Gabelman, 1989). Наличием серии аллелей по генам R и Y можно объяснить большое разнообразие окрасок корнеплода и ботвы у столовой свеклы. Позднее данные Келлера были подтверждены другими исследователями (Wolyn, Gabelman, 1989; Goldman, Austin, 2000).

Изучение генетического контроля окраски корнеплода было выполнено и на листовой свекле (Linde-Laursen, 1972). Полученные в этом исследовании данные не укладывались в дигенную схему, предложенную Келлером, поэтому был сделан вывод, что существует еще один ген, влияющий на окраску корня.

Окраска растения свеклы (гипокотиль, корнеплод, мякоть корнеплода, кожица корнеплода и т. д.) определяется пигментами, принадлежащими к классу беталаинов. Беталаины делятся на две группы: фиолетовые (красно-фиолетовые, фиолетово-красные, пурпурные) – бетацианины и желтые – бетаксантины (Wylter, Dreiding, 1961; Mabry, Dreiding, 1968). Различие в цвете обусловлено различиями в их химической структуре. По этой причине они достаточно четко различаются не только спектрофотометрически, но и визуально.

Американские исследователи Д. Волин и В. Габельман, изучая отношение бетацианинов к бетаксантинам у растений второго гибридного поколения, полученного с использованием столовой свеклы, пришли к выводу, что ген R определяет синтез бетацианинов, а ген Y – бетаксантинов, при этом доминантные аллели гена R подавляют синтез бетаксантинов (Wolyn, Gabelman, 1989). Однако некоторые экспериментальные данные не подтверждают данное предположение. В частности, на продольном срезе культуры «бородатого корня», полученной на основе свеклы желтого цвета сорта «Golden Beet», под микроскопом видно,

что клетки эпидермиса имеют разную окраску. Наружный слой клеток имеет красно-фиолетовую, что говорит о том, что в них идет синтез бетацианинов. Далее идут клетки, окрашенные в оранжевый цвет, что свидетельствует о том, что их окраска определяется бетацианинами и бетаксантинами. И внутренний слой имеет желтый цвет, что обусловлено бетаксантинами (Strack *et al.*, 2003).

Поэтому целью данной работы было проведение наблюдений за формированием желтой (желто-оранжевой) окраски корнеплода у кормовой свеклы в ходе онтогенеза, а также выяснение ее генетического контроля.

Материалы и методы

Семена кормовой свеклы сортов Голиат ад урсус и Эккендорфская желтая были куплены в магазине. Растения кормовой свеклы, использованные в генетическом анализе, имели бледно-желтый гипокотиль и желтую окраску кожицы корня. Методика получения гибридного поколения F_1 путем контролируемых скрещиваний подробно описана ранее (Мглинец, Осипова, 2005). При получении гибридного поколения F_2 путем принудительного самоопыления растений F_1 использовали пергаментные изоляторы.

В качестве образца, имеющего красный гипокотиль и корнеплод без признаков окраски, генотип которого можно записать как R/R y/y , были использованы дикорастущая свекла (*Beta vulgaris ssp. maritima*), полученная из Всероссийского НИИ сахарной свеклы и сахара (ВНИИСС, г. Рамонь, Россия), и образец ИЦГ-1 (к-3680 коллекции ВИР, г. Санкт-Петербург, Россия). Данный образец был получен в результате гибридизации дикорастущей свеклы, полученной из ВНИИСС, и свеклы сахарной, а также последующих нескольких циклов отбора по ряду маркерных признаков, характерных для дикорастущей свеклы (тип развития, окраска гипокотилия, окраска стебля). Поскольку гены, контролирующие эти признаки, находятся в одной группе сцепления и расположены достаточно близко друг от друга, то можно считать, что эти два образца имеют одинаковый аллельный состав по генам X и Y , определяющим окраску корня (Мглинец, Осипова, 2006).

Для выполнения анализирующего скрещивания была использована мужскостерильная форма (sp 85320-01) сахарной свеклы, имеющая зеленый гипокотиль, корнеплод и ботву без признаков окраски. Генотип данной формы по генам, определяющим окраску корня, можно записать как $r/r y/y$.

Растение с желтым гипокотилем и желтой мякотью корнеплода было получено следующим образом. Одно растение столовой свеклы сорта Бордо было скрещено с линией SLC 03, которая по генам, определяющим окраску корнеплода, имеет генотип $r/r y/y$. Во втором гибридном поколении было отобрано одно растение с желтым гипокотилем, которое и было использовано для получения гибридов, гетерозиготных по генам X и Y . Данное растение также было самоопылено, а его потомство было использовано для наблюдения за развитием окраски корнеплода в ходе онтогенеза.

Выращивание растений проводили в условиях тепличного комплекса – при естественном освещении в светлое время суток и искусственном – в темное, в качестве питательного раствора использовали однократный раствор Кноппа; в полевых условиях растения выращивались в почве при естественном освещении (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия).

Для сравнения соответствия экспериментальных и теоретически ожидаемых данных использовался статистический критерий χ^2 . Для расчета коэффициента рекомбинации и его ошибки был использован метод максимального правдоподобия, предложенный Фишером (Fisher, Balmukand, 1928).

Результаты

Формирование окраски корнеплода у кормовой свеклы. Наши наблюдения показали, что у проростков сорта Голиад ад урсус гипокотиль имеет розовую окраску. У только что появившихся всходов часть гипокотиля, находящаяся в грунте, имеет бледно-розовый цвет. Через несколько дней после появления всходов данная окраска исчезает. Окраска же надземной части гипокотиля зависит от условий выращивания.

При выращивании в гидропонной теплице при искусственном освещении в отсутствие прямого солнечного света всходы сорта Го-

лиат ад урсус имеют практически зеленый гипокотиль. У одних растений цвет надземной части подсемядольного колена начиная со второй–третьей пары настоящих листьев приобретает желтоватый цвет. У других растений эта часть гипокотиля продолжает оставаться зеленоватой. Однако через 2–2,5 месяца желтая или желто-зеленая окраска надземной части корнеплодов присутствует у всех растений. Окраска подземной части корнеплода колеблется от бледно-желтой до желтой. Мякоть корня окраски не имеет.

При выращивании в гидропонной теплице на прямом солнечном освещении у всходов сорта Голиат ад урсус цвет гипокотиля колеблется от зеленого–желто-зеленого до почти желтого. Через несколько дней после появления всходов желтый цвет гипокотиля начинает усиливаться. Через 2–2,5 месяца у большинства растений надземная и подземная части корнеплода имеют хорошо выраженный желтый или желто-оранжевый цвет.

В полевых условиях у всходов сорта Голиат ад урсус цвет гипокотиля колеблется от зеленого до оранжевого. На стадии 2–3-й пары настоящих листьев у всех растений цвет гипокотиля желтый. У взрослых растений верхняя часть корнеплода имеет зеленый (зелено-желтый) цвет, а нижняя часть (в том числе и находящаяся в почве) – ярко-оранжевый. Мякоть корнеплода окраски не имеет.

Наши наблюдения показали, что у проростков сорта Эккендорфская желтая, как и у сорта Голиад ад урсус, гипокотиль имеет розовую окраску. Через несколько дней после появления всходов розовая окраска подземной части гипокотиля исчезает. У всходов окраска надземной части гипокотиля зависит от условий выращивания.

При выращивании в гидропонной теплице на искусственном освещении и в отсутствие прямого солнечного света всходы и растения сорта Эккендорфская желтая имеют такую же окраску, как и у сорта Голиат ад урсус. При выращивании в гидропонной теплице при наличии прямого солнечного света у всходов цвет надземной части гипокотиля колеблется от зеленого до бледно-розового. Через несколько дней после появления всходов надземная часть гипокотиля приобретает желтый цвет.

В полевых условиях у всходов сорта Экендорфская желтая цвет гипокотили варьирует от бледно-желтого до бледно-розового. Через несколько дней цвет гипокотили у всех растений становится желтым (от бледно-желтого до ярко-желтого). Через 2,5–3 месяца у растений верхняя часть корнеплода имеет зеленый (зелено-желтый) цвет, а нижняя часть (в том числе и находящаяся в почве) – желтый. Мякоть корнеплода окраски не имеет.

Формирование окраски у растений с желтым гипокотилем и желтой мякотью. Наши наблюдения показали, что на стадии проростков у таких растений гипокотиль имеет желтый цвет. У всходов часть гипокотили, находящаяся в грунте, также имеет желтую окраску, которая исчезает через несколько дней. Надземная часть гипокотили имеет бледно-желтый или ярко-желтый цвет в зависимости от условий выращивания. Бледно-желтая окраска наблюдается при отсутствии прямого солнечного света, а ярко-желтая – при его наличии. Взрослые растения имеют желтую мякоть корнеплода и оранжевый цвет кожицы.

Генетический анализ. Растение с желтым гипокотилем и желтой мякотью корнеплода было скрещено с дикорастущей свеклой (*Beta vulgaris ssp. maritima*), имеющей генотип $R/R y/y$ по генам, определяющим окраску корнеплода. В первом гибридном поколении было получено 7 растений. Все они имели красный гипокотиль. В условиях открытого грунта 5 растений имели красно-фиолетовую окраску мякоти и кожицы, у остальных 2 растений корнеплод не имел никаких признаков окраски. Эти наблюдения указывают на то, что растение, взятое в скрещивание, было гетерозиготно по гену Y . А генотип гибридов первого поколения с красно-фиолетовой окраской мякоти и кожицы корнеплода можно записать как $R/r Y/y$ (рис. 1).

Гибрид первого поколения между растением кормовой свеклы сорта Голиат ад урсус и растениями образца ИЦГ-1 был получен с помощью контролируемого скрещивания. Наблюдения показали, что все всходы имеют красный гипокотиль. В условиях открытого грунта и при естественном освещении у данных растений местами на жилках листа появилась красная окраска, листовая пластинка других признаков окраски не имела.

Если сравнить распределение окраски мякоти корнеплода у гибридов первого поколения Голиат ад урсус \times ИЦГ-1 и растений генотипа $R/r Y/y$, то видна существенная разница (рис. 1). Растения генотипа $R/r Y/y$ имеют темно-малиновую окраску кожицы корнеплода. Мякоть корнеплода также вся окрашена, но не столь равномерно, как у обычной столовой свеклы. Гибриды первого поколения (Голиат ад урсус \times ИЦГ-1) имеют малиновую окраску кожицы. Мякоть корнеплода имеет малиновую окраску только в базальной части, а в остальной части окраски нет.

Одно растение из F_1 гибридной комбинации Голиат ад урсус \times ИЦГ-1 было использовано для получения гибридов второго поколения. При выращивании в грунте при естественном освещении всходы по цвету гипокотили отчетливо разделились на две группы: с желтым (желто-оранжевым) и красным (от бледно-розового до ярко-красного) гипокотилем (табл. 1). В дальнейшем все растения с желтым гипокотилем приобрели желтую или желто-оранжевую кожицу корнеплода. Наблюдаемое число таких растений составило 15 шт. Растения с крас-



Рис. 1. Распределение окраски на поперечном разрезе корнеплода у растения, гетерозиготного по генам R и Y (слева), и гибрида Голиат ад урсус \times ИЦГ-1 (справа).

Стрелкой показано наличие малиновой окраски в базальной части корнеплода гибрида.

Таблица 1

Распределение растений по классам окраски гипокотила и кожицы корнеплода в родительских и гибридных поколениях

Поколение	Число растений			$\chi^2 (1 : 2 : 1)$ Корнеплод: без окраски : малиновый : желтый
	с красным гипокотилем		с желтым гипокотилем	
	с неокрашенным корнеплодом	с малиновым корнеплодом	с желтым, оранжевым корнеплодом	
P1			1	
P2	8			
F ₁ (P1 × P2)		4		
F ₂	27	32	15	5,42

P1 – растение сорта Голиат ад урсус; P2 – растения ИЦГ-1; $\chi^2_{0,05} (d.f. = 2) = 5,99$.

ным гипокотилем разделились на две группы: 1) растения, которые не имели окраски корня, окраски жилок листа. По данным признакам они соответствовали родительской форме ИЦГ-1. Число таких растений составило 27 шт. (табл. 1); 2) растения, которые имели малиновую окраску корнеплода и наличие окраски на жилках листа, по фенотипу данные растения напоминали гибриды первого поколения. Число таких растений составило 27 шт. Однако появилось 5 растений, которые имели бледно-розовую окраску кожицы корня, малиновую окраску мякоти корня и красную окраску жилок листа, как гибриды F₁. Поэтому данные растения по совокупности признаков были отнесены в класс растений с малиновой окраской корня. Статистический анализ полученных данных показывает, что они не противоречат гипотезе моногенной кодоминантной схемы наследования окраски кожицы корня. Рассчитанное значение критерия $\chi^2 (5,42)$ меньше табличного значения (5,99) для 5 %-го уровня значимости при двух степенях свободы.

Генетический контроль окраски корнеплода у растений сорта Эккендорфская желтая выяснялся по следующей схеме: были получены гибриды первого поколения, затем второго, а также было выполнено анализирующее скрещивание. При

проведении гибридизации между сортом Эккендорфская желтая и дикорастущей свеклой (*B. vulgaris ssp. maritima*) были высажены по одному растению каждой формы на изолированном участке для свободного переопыления. Семена были убраны индивидуально с каждого растения. Выращивание гибридов первого поколения проводили в открытом грунте при естественном освещении. Наблюдение за потомством растения сорта Эккендорфская желтая показало, что 16 растений являются гибридами первого поколения: всходы имеют красный гипокотиль, малиновую окраску кожицы корня, окраску мякоти корнеплода в базальной части (табл. 2). При этом окраска жилок листа у некоторых растений отсутствовала. 5 растений имели все признаки, характерные для кормовой свеклы, что говорит об их негибридном происхождении (поэтому они не были включены в табл. 2). Потомство дикорастущей свеклы было представлено только растениями, имеющими признаки, характерные для гибридов первого поколения (табл. 2).

Для получения следующего гибридного поколения 3 растения из гибридной комбинации, в которой дикорастущая свекла выступала в качестве матери, были переопылены друг с другом. Для получения анализирующего скрещивания эти растения свободно опыляли одно мужскостерильное. Семена были убраны индивидуально с каждого растения. Следует подчеркнуть, что цветение растений не было одновременным. Только окончание цветения растения № 1 совпало с цветением других растений. Цветение растений № 2 и 3 в основном совпало. Время цветения стерильной формы частично пришлось на конец цветения растения № 1 и отчасти на цветение растений № 2 и 3.

Семена были убраны индивидуально с каждого растения и высеяны в грунт при естественном освещении. Растения, представляющие собой результат анализирующего скрещивания, четко разделились на два класса: растения с красным гипокотилем и растения с желтым–желто-оранжевым гипокотилем (табл. 2). Растения с красным гипокотилем четко разделились на две группы: 3 растения, имеющие малиновый корнеплод, и 44 растения, не имеющие никакой окраски корня. 5 растений имели бледно-розовую окраску корня, однако мякоть корня была не окрашена. Поэтому они

Таблица 2

Распределение растений по классам окраски гипокотыля и корнеплода у родительских форм в первом гибридном поколении и анализирующем скрещивании

Поколение	Число растений				$\chi^2 (1 : 1)$ гипокотиль (красный : желтый)	$\chi^2 (1 : 1 : 1 : 1)$	Коэффициент реком- бинации, %
	с красным гипокотилем		с желтым гипокотилем				
	с мали- новым корне- плодом	с неокра- шенным корне- плодом	с желтым, оранже- вым кор- неплодом	с неокра- шенным корне- плодом			
P1		1					
P2			1				
F ₁ (P2 × P1)	16						
F ₁ (P1 × P2)	20						
St × F ₁ (P1 × P2)	3	49	41	1	1,06383*	80,1**	4,26 ± 2,08

* Экспериментальные данные не отличаются от теоретически ожидаемых при 5 %-м уровне значимости;
** экспериментально полученные данные отличаются от теоретически ожидаемых при 1 %-м уровне значимости.
 $\chi^2_{0,05} (d.f. = 1) = 3,84$; $\chi^2_{0,01} (d.f. = 3) = 11,34$; P1 – *B. vulgaris ssp maritima*; P2 – растение сорта Эккендорфская желтая.

были отнесены в группу растений, не имеющих окраски корня. Растения с желтым–желто-оранжевым гипокотилем разделились на две группы: растения без всяких признаков окраски (1 растение) и растения с желтой окраской корня. В последнюю группу были отнесены 41 растение, которые имели желтый или желто-оранжевый корнеплод (табл. 2). Статистический анализ полученных результатов показывает, что наблюдаемое число растений с красным и желтым гипокотилем очень хорошо соответствует соотношению 1 : 1. Рассчитанное значение критерия χ^2 меньше табличного для 5 %-го уровня значимости и одной степени свободы. В то же время распределение растений по классам: красный гипокотиль–малиновый корнеплод; красный гипокотиль–корнеплод без окраски; желтый гипокотиль–желтый корнеплод; желтый гипокотиль–корнеплод без окраски статистически значимо отличается от соотношения 1 : 1 : 1 : 1. Полученные данные могут быть объяснены гипотезой дигенного контроля окраски корнеплода, когда эти гены сцеплены. На основании полученных данных можно оценить коэффициент рекомбинации между этими генами. Полученное значение составляет 4,26 ± 2,08 %. Среднее значение коэффициента рекомбинации для генов R и Y, определяющих окраску корнеплода у столовой свеклы, составляет 7,5 % по одним данным и

7,4 ± 1,7 % по другим (Keller, 1936; Goldman, Austin, 2000). Как видим, коэффициент рекомбинации, рассчитанный на основании наших данных, близок к приводимому в литературе.

Помимо анализирующего скрещивания был проведен анализ расщепления по окраске гипокотыля и корнеплода у гибридов второго поколения. Растения F₂ выращивались в грунте при естественном освещении. Во втором гибридном поколении по окраске гипокотыля наблюдалось распределение растений на два класса: растения с красным и желтым гипокотилем. Поскольку растения генотипа *yy rr* и *Y_ rr* не всегда возможно различить по цвету гипокотыля, то их следует объединить в один класс. Поэтому ожидаемое соотношение растений с красным гипокотилем к растениям с желтым гипокотилем должно быть 3 : 1. Использование критерия χ^2 показывает, что в двух потомствах растений, цветение которых в основном совпало, наблюдается хорошее соответствие экспериментальных данных и теоретически ожидаемых (табл. 3).

Растения с красным гипокотилем, в свою очередь, разделились на две группы: растения с малиновым корнем и неокрашенным. Кроме того, появились растения с бледно-розовой окраской кожицы корня. В потомстве растения № 1 их насчитывалось 10 шт.: 5 из них не имели окраски мякоти в базальной части корнеплода,

Таблица 3

Распределение растений по классам окраски гипокотыля и корнеплода во втором гибридном поколении

Потомство растений	Число растений				χ^2 (3 : 1) гипокотыль (красный : желтый)	χ^2 для сцепленного наследования генов <i>R</i> и <i>Y</i> , <i>r</i> = 4 %
	с красным гипокотылем		с желтым гипокотылем			
	с неокрашенным корнеплодом	с малиновым корнеплодом	с желтым, оранжевым корнеплодом	с неокрашенным корнеплодом		
1	42	130	77		4,66**	10,41*
2	32	85	43		0,3*	2,18*
3	40	97	48		0,09*	1,18*
Сумма	114	312	168		3,41*	11,52***

* Экспериментально полученные данные не отличаются от теоретически ожидаемых при 5 %-м уровне значимости; ** экспериментально полученные данные отличаются от теоретически ожидаемых при 5 %-м, но не отличаются при 1 %-м уровне значимости; *** экспериментально полученные данные отличаются от теоретически ожидаемых при 1 %-м уровне значимости. $\chi^2_{0,05}$ (d.f. = 1) = 3,84; $\chi^2_{0,01}$ (d.f. = 1) = 6,63; $\chi^2_{0,05}$ (d.f. = 3) = 7,81; $\chi^2_{0,01}$ (d.f. = 3) = 11,3.

поэтому были отнесены в группу растений с неокрашенным корнем, а 5 имели окраску мякоти, поэтому были отнесены в группу с малиновым корнем. В потомстве растения № 2 было обнаружено 8 растений с бледно-розовой окраской кожицы. Все они не имели окраски мякоти корнеплода в базальной части и были отнесены в группу растений с неокрашенным корнеплодом. В потомстве растения № 3 насчитывалось 15 растений с бледно-розовой кожицей корня, 4 из них не имели окраски мякоти и были отнесены в группу растений с неокрашенным корнеплодом, а 11 имели окраску мякоти в базальной части, поэтому были отнесены в группу с малиновым корнеплодом. Все растения с желтым гипокотылем имели желтую или оранжевую кожицу корнеплода, но не имели окраски мякоти.

Полученные нами данные о расщеплении по фенотипическим классам в анализирующем скрещивании соответствуют модели наследования, предложенной Келлером. Значение коэффициента рекомбинации, рассчитанное на основании наших данных, равно 4,26 %. Поэтому для второго гибридного поколения можно сравнить экспериментально полученные данные с теоретически ожидаемыми при данном коэффициенте рекомбинации. Как видно из табл. 3, для потомств, в которых расщепление по окраске гипокотыля соответствовало теоретически ожидаемому, также наблюдается

соответствие экспериментальных данных и теоретически ожидаемых.

На основании полученных данных можно предположить, что за развитие окраски кожицы корня кормовой свеклы отвечает ген *Y*. Только он представлен аллелем, который определяет развитие окраски кожицы и не влияет на развитие окраски мякоти. Этот аллель предлагается обозначить *Y^e* (Yellow – Eckendorf). Поскольку гипокотыль у проростков, а также его нижняя часть, находящаяся в грунте, у всходов имеет бледно-розовую окраску, можно предположить, что у кормовой свеклы ген *R* так же, как и ген *Y*, представлен аллелем, не описанным в литературе.

Обсуждение

При изучении генетического контроля окраски корнеплода в качестве исходного материала использовались все возможные формы свеклы: кормовая, сахарная, столовая и листовая (или мангольд). Однако основные результаты были получены при использовании свеклы столовой и сахарной. Повторные эксперименты по изучению генетического контроля окраски корнеплода у столовой свеклы полностью подтвердили вывод, что окраска корнеплода у нее определяется всего двумя генами *R* и *Y*.

В настоящее время известно, что все многообразие окрасок культурной свеклы определяется

пигментами, принадлежащими к классу беталаинов, ранее они назывались азотсодержащими антоцианами. Беталаины в зависимости от химической структуры делятся на бетацианины, цвет которых варьирует от красного до почти фиолетового, и желтые – бетаксантины. Сейчас известно, что в синтезе бетаксантинов принимают участие три фермента, а в синтезе бетаксантинов – только два. Потому представляет интерес, как соотносятся генетический контроль окраски корнеплода у свеклы и процесс синтеза бетацианинов и бетаксантинов. Д. Волин и В. Габельман высказали предположение, что ген *R* определяет синтез бетацианинов, а ген *Y* – бетаксантинов, при этом доминантные аллели гена *R* подавляют синтез бетаксантинов (Wolyn, Gabelman, 1989).

Полученные нами экспериментальные данные в основном совпадают с данными литературы. Так, вывод о дигенном контроле окраски корнеплода у кормовой свеклы полностью совпадает со схемой наследования окраски корнеплода у столовой свеклы. Совпадает даже значение коэффициента рекомбинации, рассчитанное на основании наших данных. Если посмотреть на распределение желтой окраски корнеплода у кормовой свеклы и на окраску тех же частей корнеплода у гибридов первого и второго поколений, то создается впечатление, что наши данные подтверждают предположение Волина и Габельмана о том, что доминантный аллель гена *R* определяет синтез бетацианинов и подавляет синтез бетаксантинов, синтез которых определяется геном *Y*.

Однако другая часть наших данных – формирование окраски у проростков всходов и молодых растений кормовой свеклы – противоречит предположению о роли генов *R* и *Y* в синтезе бетацианинов и бетаксантинов. Нами установлено, что у кормовой свеклы на стадии проростков гипокотиль имеет розовую окраску, а такой цвет может быть получен только при наличии бетацианинов. Но у всходов и молодых растений гипокотиль имеет желтый цвет, а это возможно только при наличии бетаксантинов. Химический анализ гипокотыля 23-дневных проростков кормовой свеклы показал, что у них цвет гипокотыля обусловлен только бетацианинами (Schliemann *et al.*, 1999). Налицо изменения биосинтеза пигментов в ходе онтогенеза.

На основании наших наблюдений мы предлагаем иную схему участия генов *R* и *Y* в синтезе бетацианинов и бетаксантинов. По нашему мнению, ген *Y* – это ген-распределитель окраски. Он определяет, как окраска будет распределена в корнеплоде и представлен серией доминантных аллелей. Рецессивный аллель данного гена блокирует любое проявление окраски в корнеплоде, а доминантные аллели определяют характер распределения окраски в тканях корнеплода. Ген *R* отвечает собственно за развитие окраски или, другими словами, за синтез пигментов в растении, в частности, в корнеплоде. Рецессивный аллель данного гена определяет синтез бетаксантинов, а серия доминантных аллелей определяет различное соотношение бетацианинов и бетаксантинов. Другими словами, за синтез беталаинов отвечает ген *R*. Для экспериментальной проверки наших предположений относительно того, что определяют гены *R* и *Y*, необходимы дополнительные исследования с использованием форм свеклы, имеющей корнеплоды разной окраски.

Литература

- Мглинец А.В., Осипова З.А. *dw2* – новая мутация свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Генетика. 2005. Т. 41. № 5. С. 657–660.
- Мглинец А.В., Осипова З.А. Генетическое изучение новой окраски у свеклы *Beta vulgaris* L. // Генетика. 2006. Т. 42. № 7. С. 936–938.
- Fisher R.A., Balmukand B.B. The estimation of linkage from the offspring of selfed heterozygotes // J. Genet. 1928. V. 20. № . P. 79–92.
- Goldman I.L., Austin D. Linkage among the R, Y and BI loci in table beet // Theor. Appl. Genet. 2000. V. 100. № 3/4. P. 337–343.
- Kajanus B. Über die Farbvariation der Beta-Rüben // Z. Pflanzenzüchtg. 1917. Bd. 5. S. 357–372.
- Keller W. Inheritance of some major color types in beets // J. Agric. Res. 1936. V. 52. № 1. P. 27–38.
- Linde-Laursen I. A new locus for colour formation in beet, *Beta vulgaris* L. // Hereditas. 1972. V. 70. № 10. P. 105–112.
- Mabry T.J., Dreiding A.S. The betalains // Recent Advances in Phytochemistry / Ed. A.R.E. T.J. Mabry, V.C. Runeckler. N.Y.: Appleton Century Croft, 1968. P. 145–160.
- Schliemann W., Kobayashi N., Strack D. The decisive step in betaxanthin biosynthesis is a spontaneous reaction // Plant Physiol. 1999. V. 119. № 4. P. 1217–1232.

Strack D., Vogt T., Schliemann W. Recent advances in betalain research // *Phytochemistry*. 2003. V. 62. № 3. P. 247–269.

Wolyn D.J., Gabelman W.H. Inheritance of root and petiole pigmentation in red table beet // *J. Hered.*

1989. V. 80. № 1. P. 33–38.

Wylter H., Dreiding A.S. Über Betacyane, die stickstoffhaltigen Farbstoffe der Centrospermen. Vorläufige Mitteilung // *Experientia*. 1961. Bd. 17. S. 23–25.

FORMATION OF ROOT COLOR AND ITS GENETIC CONTROL IN FODDER BEET

A.V. Mglinets, Z.A. Osipova

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

Summary

The formation and inheritance of yellow (yellow-orange) root color was studied in fodder beet. It was shown that this type of root color was determined by a single nuclear locus. This locus proved to be $4,26 \pm 2,08$ map units apart from the *R* gene, determining the red color of the hypocotyl. Our results suggest that this type of root color is defined by an allele of the gene, not described in the literature so far. We propose that this allele be denoted as *Y^e*. The results are interpreted in the context of the conjectured biochemical pathway of betalain pigments. We suggest that the *Y* gene is responsible for the distribution of pigments in the root tissue, whereas the *R* gene determines their range and quantities.

Key words: *Beta vulgaris*, fodder beet, beet root color, genetic control, betalain.

ФОТОПЕРИОДИЧЕСКИЙ СИГНАЛ КАК КЛЮЧЕВОЙ ФАКТОР ВО ВЗАИМООТНОШЕНИЯХ ГЕНОТИП–СРЕДА

Д.В. Клочков, Р.Г. Гулевич, О.В. Трапезов

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

Рассматривается поиск критических периодов в чувствительности гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы американских норок на фотопериодическое воздействие. Рассматривается модель трехступенчатого типа фотопериодической чувствительности.

Ключевые слова: американская норка, фотопериод, сигнал, размножение, плодовитость, генотип–среда.

Исторический экскурс

Огромно влияние фотопериодизма на жизненно важные функции животных организмов. У всех филогенетических групп отмечено, что свет выступает в качестве сигнального фактора, информирующего организм о состоянии внешней среды и сигнализирующего о предстоящих в ней изменениях. Вполне вероятно, что именно свет среди других факторов среды оказался в процессе эволюции жизни на Земле сигналом такого ключевого значения; ведь он повторяется в течение веков эволюции, в течение геологических периодов жизни на Земле в совершенно определенной и математически точной последовательности, он не подвержен таким колебаниям, каким подвержены, например, температура или обеспеченность кормами.

Д.К. Беляев

Фотопериодизм (греч. *photos* – свет и *periodos* – определенный круг времени) – ответная реакция организмов на продолжительность периодов света и темноты в суточном ритме. Способность живых организмов реагировать на длину дня получила название *фотопериодической реакции*. Фотопериодизм был открыт в 1920 г. В. Гарнером и Х. Аллардом во время селекционной работы с табаком (Garner, Allard, 1920). Они обнаружили, что один из сортов, который цвел весной и осенью в теплице, не зацветает летом в открытом грунте. В связи с тем что летние ус-

ловия практически не отличались от тепличных, за исключением периода освещенности, было сделано предположение, что цветению препятствует длинный летний день. Предположение подтвердилось, когда удалось получить цветение табака летом при искусственно укороченном дне. В дальнейшем было установлено, что фотопериодическая реакция свойственна растениям разных таксономических групп.

Способность воспринимать и реагировать на длину дня широко распространена и в животном мире. Фотопериодические реакции животных контролируют наступление и прекращение периода размножения, эмбриональное развитие (активное или с диапаузой), плодовитость, осенние и весенние линьки, переход к зимней спячке, чередование обоеполых и партеногенетических поколений, миграции (яркий пример – перелеты птиц). Физиологические и биохимические основы фотопериодизма у животных во многом до конца неясны. Предполагают, что фотопериодические реакции осуществляются путем сложной цепи нервно-рефлекторных и гормональных процессов, контролируемых у позвоночных гипоталамо-гипофизарной системой.

Другие факторы, например, температура воздуха, как сигнал используются в меньшей мере, поскольку она изменяется не с такой строгой закономерностью, как фотопериод, и способна только запускать наступление у организмов тех или иных фаз или явлений преждевременно или

с запозданием. Это всего лишь «шум», который модулирует действие фотопериода.

С 1925 г., когда W. Rowan показал факты фотопериодического влияния на физиологические функции птиц, в промышленном птицеводстве была разработана целая индустрия фотопериодических технологий по оптимизации яйценоскости и мясной продуктивности (Rowan, 1925; Пигарев, 1965, 1990). Универсальность влияния фотопериодических условий на репродуктивную функцию, рост и развитие стала широко использоваться в работах на овцах, лошадях, крупном рогатом скоте (Линтварева, 1955; Цимборович, 1959; Эмме, 1960; Tucker *et al.*, 1984; Zinn *et al.*, 1986; Poulton, Robinson, 1987; Dahl *et al.*, 2000).

Начало фотопериодическим работам на пушных зверях положил в 1932 г. Т.Н. Bissonnette, добившийся изменения половых функций хорьков под влиянием дополнительного освещения в осенне-зимний период (Bissonnette, 1932, 1935).

Вскоре фотопериодические эффекты на пушных зверях стали прорабатываться и в нашей стране в Центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦНИЛ) пушного звероводства при Министерстве внешней торговли СССР, располагавшейся на территории поселка Раисино (позже в 1950-х годах ЦНИЛ слилась с НИИ кролиководства и звероводства). Опытной базой этого научного звероводческого центра стала 1-я Московская зооферма (будущий зверосовхоз «Пушкинский»), а учебным центром – 2-я Московская зооферма (будущий зверосовхоз «Салтыковский») (Милованов, 2001. С. 10–13).

Следует сказать, что в стране в ту предвоенную пору были предприняты мобилизационные меры по развитию звероводства, поскольку эта отрасль обеспечивала поставки в страну конвертируемой валюты («нефтедоллары» появятся гораздо позже). Вся система звероводства полностью подчинялась Наркомвнешторгу СССР – необходимо было выполнять государственный план поставки на экспорт шкурок *серебристо-черных* лисиц клеточного разведения. Именно этот вид экспортной пушнины перед войной котировался очень высоко – одна шкурка лисы – пулемет! Поэтому к началу ВОВ Наркомвнешторг собрал в свое централизованное управление все специализированные звероводческие хозяйства и научные коллективы.

В 1939 г. в ЦНИЛ пушного звероводства, которой заведовал известный генетик-селекционер Борис Николаевич Васин, после окончания Ивановского сельскохозяйственного института в качестве лаборанта пришел Дмитрий Константинович Беляев. Начало его научной работы будет связано с изучением влияния отбора на интенсивность серебристости окраски меха у *серебристо-черных* лисиц в подмосковных звероводческих хозяйствах и в зверосовхозе «Тобольский» Тюменской области. Уже тогда намечались планы проведения первых фотопериодических экспериментов, но все прервала на долгие пять лет война. В конце 1945 г. по телеграмме-запросу министра внешней торговли А.И. Микояна Д.К. Беляев вернется в родную лабораторию. Послевоенное звероводство развивалось быстрыми темпами, Минвнешторг собирал кадры – звероводство давало стране такую нужную валюту.

Параллельно с проработкой вопросов частной генетики пушных зверей Д.К. Беляев начинает работы по анализу фотопериодических механизмов регуляции продуктивности *серебристо-черных* лисиц и соболей. Вместе с Н.Ш. Перельдиком и Н.Т. Портновой Д.К. Беляеву удалось изменением фотопериодических условий («подсвечиванием», как он говорил) сократить сроки беременности у соболей. С наступлением темноты в соболиных шедях на несколько часов включали электрическое освещение для изучения влияния световой добавки на протекание беременности у самок. Если в обычных условиях беременность у соболей длится около 9 месяцев, то в опытной группе (она была названа «группой продленного дня») самки начали щениться уже через 6 (!) месяцев (Беляев и др., 1951). При этом потомство было совершенно нормальным (фото 1).

В результате проделанных экспериментов были четко показано влияние фотопериодизма не только на перестройку сезонности размножения, но и на такие сезонные функции, как весенняя линька и осенняя смена летнего мехового покрова на зимний. В 1949–1950 гг. полученные экспериментальные материалы публикуются в отраслевом журнале «Каракулеводство и звероводство» в соавторстве с Л.Г. Уткиным и Н.Т. Портновой (Беляев, Уткин, 1949; Беляев, Портнова, 1950). В 1950 г. Д.К. Беляев



Фото 1. Раисино. 1948 г. Центральная научно-исследовательская лаборатория пушного звероводства (ЦНИЛ). Гистологические исследования влияния фотопериодизма на протекание беременности у самок соболей.

Слева направо: Д.К. Беляев, Е.В. Клецкина, Л.Г. Уткин, И.Г. Повецкий.

обобщает эти исследования в «Журнале общей биологии» в статье «Роль света в управлении биологическими ритмами млекопитающих» (Беляев, 1950). Это были первые опубликованные в нашей стране работы по регуляции функции размножения и формирования зимнего мехового покрова у пушных зверей с помощью искусственных фоторежимов. Именно эти работы Д.К. Беляева по фотопериодизму зададут импульс поиска и другим исследователям, которые поставят вопрос: возможно ли изменением суточного соотношения света и темноты получать от пушных зверей два приплода в течение одного календарного года (Кузнецов, 1952а, б). В эксперименте 1963 г. были получены два приплода от *серебристо-черных* лисиц (Кузнецов, 1963; Беляев, 1976; Кузнецов и др., 1977). Фотопериодические работы на соболях на базе зверосовхоза «Пушкинский» продолжались и после отъезда Д.К. Беляева в Новосибирск, вплоть до 1960 г. (Беляев, Уткин, 1960а, б; Беляев и др., 1964).

После переезда в новосибирский Академгородок по приглашению директора Института цитологии и генетики СО АН СССР члена-корреспондента АН СССР Н.П. Дубинина Д.К. Беляев сразу же продолжает начатые в Пушкинском зверосовхозе работы по изучению влияния фотопериодических условий на плодовитость, но уже не на соболях и лисах, а на другом важном

объекте клеточного пушного звероводства – американских норках разных генотипов. Ведь в 1960-х гг. зверосовхозы превращаются в настоящие фабрики пушнины; так, по выходу шкурок норки СССР в 1965 г. занимает второе место в мире после США, значительно опередив скандинавские страны. Именно в эти годы особенно интенсивно ведутся исследования по воздействию световых условий на воспроизводительную функцию у норок (Беляев и др., 1962, 1963).

Новосибирский научный центр еще только создавал материальную базу, но Д.К. Беляев уже организует фотопериодические эксперименты в зверосовхозе «Белоярский» Мошковского района Новосибирской области. Зверосовхоз располагался в 60 км от Новосибирска на берегу р. Оби. Причем от районного центра Мошково до села Белоярка (35 км) зимой нужно было добираться целый день на тракторных саниах по огромным сугробам. Следует сказать, что руководство, специалисты и рядовые звероводы «Белоярского» зверосовхоза с энтузиазмом восприняли идею фотопериодизма и создали для той поры неплохие технические условия в проведении экспериментальной работы по дополнительному освещению норок. Удлинение светового дня в марте привело к стимуляции половой функции норок и увеличению их плодовитости. Проведение этих экспериментов по времени совпадало с аналогичными исследованиями американских ученых (Holcomb *et al.*, 1962а, б). По этой причине полученные результаты нужно было срочно опубликовать – приоритет есть приоритет (Беляев и др., 1962; Клочков, 2002).

В 1962 г. при активном содействии и участии экономиста-зверовода М.Н. Жукова (фото 2), имевшего опыт строительства крупного зверосовхоза «Северинский», завершилось строительство экспериментальной зверофермы ИЦиГ, на которой и были развернуты основные фотопериодические опыты не только на норках, но и на лисах.

Именно на этой звероферме (фото 3) было показано, что изменением соотношения света и темноты в течение суток можно добиться снижения эмбриональной смертности и даже преодоления ее, как было с видимыми мутациями с летальным рецессивным действием – *белой грузинской* (W^G/W^G) мутацией у лисиц



Фото 2. Справа налево: М.Н. Жуков – имея опыт строительства крупного зверосовхоза «Северинский» Краснодарского края, принимал самое активное участие в строительстве экспериментальной зверофермы Института цитологии и генетики СО АН СССР; Д.К. Беляев – директор ИЦиГ СО АН СССР; М.Д. Абрамов – автор первого вышедшего в 1957 г. практического пособия по генетическим основам цветного норководства (НИИПЗК); Н.Ш. Перельдик – основатель школы кормления пушных зверей в нашей стране (НИИПЗК). 1975 г.

и *Shadow* (S^H/S^H) у норок (Беляев и др., 1962, 1963; Беляев, Клочков, 1965; Беляев и др., 1973; Belyaev *et al.*, 1975).

Особо впечатляющие результаты были получены при отработке метода ускоренного созревания меха у норок. На экспериментальной звероферме ИЦиГ СО АН СССР в летне-осенний период испытывались 12 различных фотопериодических световых режимов, из которых впоследствии выбрали два наиболее перспективных. Прошло немного времени и при обсуждении результатов этой работы с директором зверосовхоза «Магистральный» Д.Г. Ковешниковым была принята программа производственных испытаний метода ускоренного созревания меха норок на базе зверосовхоза. Результат был убедительным – меховой покров у норок созревал на месяц раньше обычных контрольных сроков.

Следует сказать, что одновременно и независимо от фотопериодического метода, созданного в ИЦиГ СО АН СССР, был разработан более экономичный и более технологичный прием в ускорении созревания опушения – использование «фотопериодического гормона» мелатонина (коммерческое название – мелакирил). Однако следует сделать оговорку: при использовании

фотопериодического метода, созданного в ИЦиГ СО РАН, качество меха было гораздо выше, чем при использовании мелакирила. Это было подтверждено независимой экспертизой во Всесоюзном НИИ меховой промышленности, что и было доложено на состоявшемся в октябре 1982 г. в зверосовхозе «Магистральный» семинаре по фотопериодизму (фото 4).

Испытание разных фотопериодических режимов позволило Д.К. Беляеву сделать вывод: свет – это регулятор, способный изменить гормональный статус организма. При этом наиболее значимы так называемые управляющие гормоны, которые вырабатываются в гипоталамо-гипофизарной системе мозга. Гипоталамо-гипофизарная система – объединение структур гипофиза (мозгового придатка в форме округлого образования) и гипоталамуса (отдела головного мозга) – выполняет важнейшие для организма функции. И эта система – самое защищенное место организма! Гипофиз надежно спрятан в костном углублении и имеет связь с остальными органами и системами только через узенький канал. Гипофиз выделяет гормоны,



Фото 3. На экспериментальной звероферме Института цитологии и генетики СО АН СССР. 1976 г.

Слева направо: В.И. Евсиков (исследуя генетико-селекционные аспекты моногибридного гетерозиса в норководстве, осуществил вместе с Д.К. Беляевым первый в нашей стране генетический синтез трехрецессивных *жемчужных* норок, но не по американскому, $k/k a/a p/p$, а по шведскому паломينو – $t^p/t^p a/a p/p$; в настоящее время разрабатывает генетико-эволюционные вопросы гомеостаза плодовитости млекопитающих); Д.К. Беляев; В.М. Гукин (работал главным зоотехником Белоярского зверосовхоза, с 1962 по 1981 г. заведовал экспериментальной зверофермой ИЦиГ СО АН СССР); Л.П. Зверева (научный сотрудник ИЦиГ СО АН СССР, провела обширные исследования по генетико-гистологическим вопросам меланогенеза у мутантных форм американской норки).



Фото 4. Участники семинара по проблемам фотопериодизма в клеточном пушном звероводстве в зверосовхозе «Магистральный» Алтайского края. 1982 г.

Первый ряд: в центре Д.К. Беляев, справа от него – директор зверосовхоза Д.Г. Ковешников, слева – начальник Главного управления звероводства РСФСР М.И. Казаков.

управляющие работой почти всей эндокринной системы, к примеру, гормон роста соматотропин или гормоны, которые регулируют деятельность половых желез. С помощью гормонов можно усилить или ослабить любой процесс, через гормоны можно влиять на активность генов.

Вдова Д.К. Беляева, Светлана Владимировна Аргутинская в своих воспоминаниях писала: «Подводя итоги своих исследований, Д.К. Беляев подчеркивал: “Генетики и селекционеры животных не имеют в своих руках таких мощных формообразующих факторов, как радиационные воздействия и химические мутагены, поэтому надо всемерно использовать световой фактор, эффекты которого далеко еще не исчерпаны”». Эти представления о связи световых влияний с нейрогормональной системой возникли у Д.К. Беляева еще в 1950-х гг. и были тогда абсолютно новыми. Именно в опытах по фотопериодизму он обнаружил сильнейшее действие смены режима освещения на строго стабилизированные сезонные функции пушных зверей. Обдумывая результаты экспериментов, Беляев пришел к пониманию ключевой роли отбора по поведению в процессе одомашнивания диких животных. Он предположил, что отбор по поведению, затронув

нейрогормональные компоненты фотопериодических механизмов регуляции, может вызвать реорганизацию сезонных функций животных, в частности, изменить моноэстричность, характерную для диких животных, на полиэстричность, отличающую домашних животных.

Свою идею о ведущей роли отбора по поведению и роли нейрогормональной регуляции в наследственной перестройке в процессе доместикации Д.К. Беляев изложил в ряде докладов в 1951–1952 гг. Это была чистая идея без экспериментального подтверждения, помимо того что новая, еще и сложная для восприятия.

На заседании производственно-технического совета в Главзверопроеме с участием ученых его выступление было встречено молчанием непонимания. С.В. Аргутинская вспоминала: «Прозвучало несколько вопросов. ДК [Беляев] еще раз разъяснил свои представления и предложил модель эксперимента. Все-таки решили согласиться на проведение опытов, дали “добро” и даже определили зверосовхоз. После окончания совещания, уходя, я с горечью и почти с вызовом сказала во всеулышание: “Один Павел Александрович кое-что понял!” Это о П.А. Петряеве – он был выдающейся лично-

стью, говорили, что он бывший гвардейский офицер царской армии. Осваивал азы звероводства на практике, отбывая срок на Соловках. Впоследствии П.А. Петряев был директором Пушкинского зверосовхоза и какое-то время директором Московского зоопарка. Он воспринял мои слова как комплимент и позже на заседании МОИП перед научной аудиторией, когда ДК уже более основательно рассказал о своей идее, после обсуждения прислал мне записку: “Ну как, я кое-что понимаю?”

Профессор Московской ветеринарной академии Г.И. Азимов во время сдачи мной кандидатского экзамена по физиологии после ответа по билету с пристрастием расспрашивал меня об этой идее ДК и в 1954 г. написал в своей книге со ссылкой на Д.К. Беляева: “Нужно полагать, что домашние животные потеряли строгую сезонность размножения... главным образом в связи с изменением их высшей нервной деятельности”. Это и было первым упоминанием о работе, которая, развиваясь и расширяясь, продолжается уже около 50 лет.» (цит. по: Аргутинская, 2002. С. 25–28).

Поиск критических периодов в чувствительности гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы животных на фотопериодическое воздействие. Американская норка клеточного разведения как модель

В литературе по фотопериодизму явление стадийности в чувствительности организма к фотопериодическому сигналу из среды осталось до конца не раскрытым, что приводит иногда к неправильной интерпретации экспериментальных результатов даже опытными исследователями.

Так, еще в 1982 г. Z. Boissen-Agasse выносит в оглавление своей статьи, опубликованной в журнале «Biology Reproduction», категорическое заключение: «норка – животное короткого дня» (... the mink a short day mammal) (Boissen-Agasse *et al.*, 1982). Но многолетние работы по фотопериодизму, проведенные в Институте цитологии и генетики СО РАН, указывают на необоснованность и поспешность такого заключения.

Фотопериодизм и репродуктивные процессы у американской норки клеточного разведения

Чувствительность норок клеточного разведения к фотопериодическим воздействиям оценивалась по функциональному состоянию гонад, гаметогенезу, сезонному уровню половых гормонов, характеру эстральной цикличности, плодовитости и половому поведению. Для оценки поэтапных сдвигов физиолого-морфологических процессов в гонадах использовались варианты световых режимов, представленных на графике.

Влияние фотопериодических условий на функцию гонад у американской норки

Для выяснения вопроса о влиянии световых условий на фолликулогенез были проведены опыты с применением *постоянного освещения*: 1) вне сезона размножения (октябрь–ноябрь); 2) в сезон размножения (февраль–март). Результаты опытов приводятся в табл. 1.

На фоне существенного увеличения массы яичников в марте (160 мг) по сравнению с ноябрем (100 мг) различий по массе гонад между группами не обнаружено. Однако благо-

	Режимы освещения и номер экспериментальных групп										
	1-я серия опытов				2-я серия опытов						
	1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	7
Июль								☀			
Август									☀		
Сентябрь										☀	

■ – сокращенный световой день (8 часов: с 9:30 до 17:30); ☀ – постоянное освещение; □ – естественные условия освещения

График. Варианты световых режимов.

даря гистологическому анализу были выявлены различия в сезонной реактивности на световые воздействия. Так, постоянное освещение вне сезона размножения (октябрь–ноябрь) привело к снижению числа примордиальных и созревающих фолликулов типа $\geq 4C$ и резкому (в 8 раз) увеличению числа фолликулов с хорошо развитой полостью. И все же этот фотостимулирующий эффект не приводил к созреванию зрелых графовых фолликулов. Вместе с этим отмечалось значительное увеличение числа атретических фолликулов поздних стадий (A3 – $171,5 \pm 35,7$, A4 – $477,7 \pm 69,4$ против A3 – $83,9 \pm 3,6$, A4 – $169,4 \pm 44,1$ в контроле).

В марте на фоне общих как для контрольных, так и для подопытных самок процессов снижения числа примордиальных растущих фолликулов типа 3C и $\geq 4C$ и увеличения числа созревающих фолликулов у подопытных самок по сравнению с контролем отмечается уменьшение числа созревающих фолликулов на ранних стадиях развития типа ПП с увеличением числа фолликулов типа РП и ГП (табл. 1).

Последствия варьирующих фотопериодических воздействий на фолликулогенез

Для выяснения влияния вариаций фотопериодических воздействий в летне-осенний период на фолликулогенез, а также в дальнейшем на функциональное состояние яичников в сезоне размножения также были испытаны I и II световые режимы с применением *постоянного освещения*: 1) вне сезона размножения (октябрь–ноябрь); 2) в сезон размножения (февраль–март). Результаты опытов приводятся в табл. 2.

В нормальных фотопериодических условиях у контрольных *стандартных* норок в ноябре количество примордиальных фолликулов колеблется около 1000 (табл. 2). Фотопериодические воздействия вызвали увеличение числа примордиальных фолликулов: при первом фотопериодическом режиме до 2591 ($p < 0,001$), при втором – до 2210 ($p < 0,01$). По количеству растущих фолликулов разница между контрольной и подопытными группами меньшая. В 1-й группе отмечена тенденция к большему числу фолликулов типа 3C и $\geq 4C$. В 1-й группе число растущих фолликулов существенно не

отличалось от контроля. Во 2-й группе фотопериодические воздействия вызвали трехкратное увеличение числа зрелых графовых пузырьков. Возможно, что за счет этого число созревающих фолликулов на более ранних стадиях развития (типа ПП и РП) у них незначительно снижено. 2-я группа по числу созревающих фолликулов не отличалась от контроля.

Изменение фотопериодических условий содержания норок в летне-осенний период отразилось на картине фолликулогенеза в сезоне размножения (март). У самок 1-й группы это выразилось в трехкратном снижении числа примордиальных фолликулов, более чем двухкратном снижении растущих фолликулов типа 1C ($p < 0,01$), тенденции к снижению числа растущих фолликулов типа 2C, 3C, $\geq 4C$ и созревающих фолликулов типа ПП и РП и незначительному повышению числа зрелых фолликулов по сравнению с контролем. В 1-й группе это выразилось в общей однозначной тенденции к снижению числа всех растущих и созревающих фолликулов.

Влияние фотопериодических воздействий в летне-осенний период на уровень эстрадиола в крови у самок норок

Изменение светового режима приводит к изменению содержания эстрадиола в крови стандартных самок (рис. 1).

После постоянного освещения у норок 1-й группы в июле отмечалось снижение уровня эстрадиола по сравнению с контролем ($p < 0,01$). В период сокращенных световых дней (август, сентябрь) содержание гормона у самок 1-й группы было выше, чем в контроле (соответственно $p < 0,05$; $p < 0,01$). У норок 2-й группы повышение уровня эстрадиола зарегистрировано только в августе. После окончания световых воздействий на фоне естественного освещения у самок 1-й и 2-й групп в октябре наблюдается более низкий уровень эстрадиола, чем в контроле ($p < 0,05$, $p < 0,01$ соответственно). Затем в январе–феврале у самок 1-й группы уровень гормона повышался ($p < 0,01$, $p < 0,05$ соответственно), тогда как у самок 2-й группы концентрация эстрадиола в крови не отличалась от контроля. В марте уровень эстрадиола в подопытных группах не отличался от контроля.

Таблица 1

Влияние постоянного освещения на фолликулогенез в яичниках норок в разные сезоны года (число фолликулов разного типа) (Клочков, 1992)

Месяц	Группа	n	Тип фолликулов							
			примордиальные	растущие				созревающие		
				1С	2С	3С	≥4С	ПП	РП	ГП
Ноябрь	Опыт	8	2865,5 ± 132,7**	37,3 ± 8,0	12,0 ± 1,0	10,6 ± 1,2*	12,6 ± 3,3	17,2 ± 5,1**	–	
	Контроль	8	3703,7 ± 151,7	38,3 ± 3,0	15,1 ± 1,8	17,5 ± 2,8	11,3 ± 4,0	2,1 ± 1,2	1,0 ± 0,4	
Март	Опыт	8	1555,2 ± 150,9	39,4 ± 5,5	3,6 ± 1,3	7,8 ± 2,0	17,0 ± 2,8*	11,4 ± 2,6*	8,6 ± 1,7*	
	Контроль	8	1251,6 ± 192,1	42,6 ± 9,8	7,0 ± 1,9	7,2 ± 1,4	33,2 ± 5,8	4,4 ± 1,7	4,6 ± 1,0	

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ по сравнению с контролем; 1С, 2С, 3С, ≥4С – растущие фолликулы с 1, 2, 3, 4 и более слоями гранулезных клеток; созревающие фолликулы: ПП – появление полости, РП – хорошо развитая полость, ГП – граафов пузырьки.

Таблица 2

Влияние фотопериодических условий на фолликулогенез у стандартных норок (число фолликулов различных типов)

Месяц	Группа	n	Тип фолликулов							
			примордиальные	растущие				созревающие		
				1С	2С	3С	≥4С	ПП	РП	ГП
Ноябрь	Контроль	8	1331,9 ± 147,4	55,4 ± 9,6	18,7 ± 2,5	27,3 ± 4,7	11,1 ± 1,8	6,9 ± 1,3	0,8 ± 0,3	
	I	8	2591,1 ± 169,8***	51,4 ± 7,5	26,7 ± 4,4	31,2 ± 8,8	8,7 ± 2,3	6,1 ± 2,2	2,3 ± 0,4*	
	II	8	2210,0 ± 181,4**	53,4 ± 8,6	19,0 ± 3,9	22,2 ± 2,9	10,0 ± 1,7	8,6 ± 2,4	1,0 ± 0,2	
Март	Контроль	8	3479,7 ± 15,8	37,6 ± 11,9	19,4 ± 4,5	28,8 ± 7,9	16,3 ± 4,2	10,9 ± 1,8	4,4 ± 0,7	
	I	8	912,7 ± 161,8***	20,4 ± 5,5	13,7 ± 2,4	22,2 ± 2,8	13,7 ± 3,2	7,0 ± 2,3	5,3 ± 0,9	
	II	8	3866,3 ± 823,2	14,6 ± 3,0	15,6 ± 2,5	19,5 ± 3,6	8,5 ± 2,7	6,1 ± 3,3	4,2 ± 1,0	

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; К – контроль; I-я группа – постоянное освещение с 20.06–20.07, сокращенный день с 21.07–10.10; II-я группа – сокращенный день с 21.07–10.10; 1С, 2С, 3С, ≥4С – растущие фолликулы с 1, 2, 3, 4 и более слоями гранулезных клеток. Созревающие фолликулы: ПП – появление полости, РП – хорошо развитая полость, ГП – граафов пузырьки.

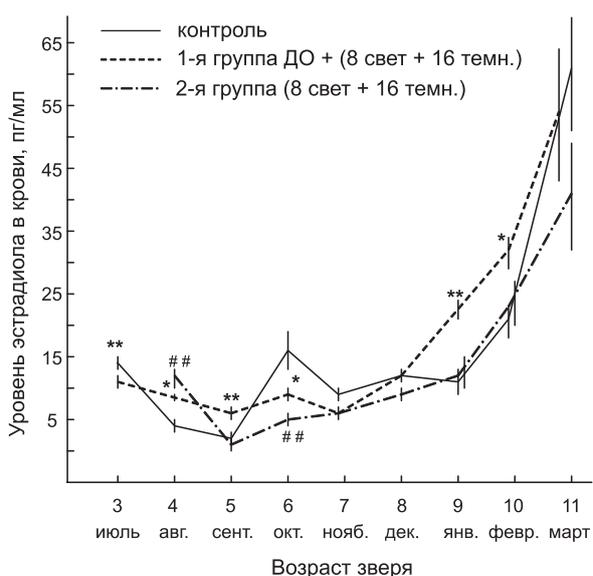


Рис. 1. Влияние световых режимов на уровень эстрадиола в крови самок норок стандартного генотипа в постнатальном онтогенезе (Гулевич, Клочков, 1988).

* $p < 0,05$ – различия между 1-й группой и контролем;
 ** $p < 0,01$ – различия между 1-й группой и контролем;
 ## $p < 0,01$ – различия между 2-й группой и контролем.

Влияние постоянного освещения в разные сезоны на сперматогенез

Постоянное освещение в ноябре не оказало влияния на массу тела животных: у подопытных и контрольных самцов она составила в среднем 1750 г. В то же время постоянное освещение привело к снижению массы семенников: $0,95 \pm 0,08$ г в опыте и $1,41 \pm 0,11$ г в контроле ($p < 0,01$).

Гистологическая картина выявила уменьшение под воздействием постоянного освещения диаметра семенных канальцев: $72,9 \pm 1,4$ мкм в опыте и $96,4 \pm 4,2$ мкм в контроле ($p < 0,01$).

Анализ процентного соотношения канальцев разного типа показал характерную тенденцию преобладания у подопытных животных канальцев I типа и снижения числа канальцев IV типа, что можно расценить как торможение процесса сперматогенеза (табл. 3).

На это же указывают и результаты подсчета клеточных элементов в канальцах III типа (табл. 4). У подопытных животных насчитывается больше сперматогоний типа А, но меньше сперматоцитов в стадии зигонемы по сравнению с контролем.

Постоянное освещение в марте не привело к изменению массы тела самцов – в среднем она составила 2,0 кг. Тогда как масса семенников весной увеличилась по сравнению с осенью. Хотя масса семенников у подопытных зверей составила $6,2 \pm 0,3$ г против $7,6 \pm 0,4$ г у контрольных ($p < 0,05$), диаметр семенных канальцев у подопытных животных ($225,5 \pm 2,4$ мкм) был больше, чем у контрольных ($210,0 \pm 1,9$ мкм, $p < 0,001$). Просвет канальца придатка был заполнен зрелыми спермиями. На II стадии ЦСЭ помимо клеток Сертоли встречаются сперматогонии типа А и Б, сперматоциты первого порядка двух поколений в прелептоне и пахине и 2 генерации сперматид 6-го и 17-го этапов сперматогенеза.

Результаты подсчета сперматогенных клеток на VI стадии ЦСЭ показали: число сперматоцитов в стадии пахинемы у подопытных животных составило $23,0 \pm 0,5$ против $18,6 \pm 0,4$ в контроле ($p < 0,001$). Подопытные звери по числу сперматид ($116,2 \pm 2,9$) превосходили контроль ($79,3 \pm 1,6$; $p < 0,001$).

Итак, количественный анализ сперматогенного эпителия позволил установить стимулирующее действие постоянного освещения на сперматогенез самцов норок весной и тормозящее – осенью.

Таблица 3

Частота встречаемости семенных канальцев разного типа в зависимости от светового режима (ноябрь)

Группа	n	Соотношение семенных канальцев разных типов в зависимости от светового режима, %			
		I	II	III	IV
Постоянное освещение	8	$50,5 \pm 10,7$	$4,2 \pm 1,2$	$0,0 \pm 5,7$	$25,3 \pm 9,1$
Контроль	8	$29,5 \pm 9,3$	$5,2 \pm 1,6$	$24,3 \pm 4,3$	$41,0 \pm 10,0$

Таблица 4

Число сперматогенных клеток на разных стадиях дифференцировки в семенных канальцах III типа при различных световых режимах. Среднее число клеток на поперечном срезе канальца (ноябрь)

Тип клеток	Постоянное освещение	Контроль
Сперматогонии типа А	1,16 ± 0,09**	0,66 ± 0,05
Промежуточные	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Сперматогонии типа В	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01
Сперматоциты	3,83 ± 0,25*	4,75 ± 0,30

* $p < 0,05$ (по сравнению с контролем); ** $p < 0,01$.

Влияние фотопериодических воздействий в летне-осенний период на сперматогенез

Фотопериодические воздействия в ноябре повлияли на массу гонад *стандартных* самцов. Максимальная масса гонад отмечена в 1-й группе в условиях сокращенного светового дня в течение 3 месяцев, несколько меньшей была она в 3-й группе – сокращенный день в течение 2 месяцев (август и сентябрь). Такая же экспозиция в более ранние сроки во 2-й группе (июль и август) не оказала существенного влияния на массу гонад (табл. 5).

Между массой семенников и диаметром канальцев наблюдается четкая связь.

Гистологический анализ семенников у контрольных самцов показывает, что у них преобладали канальцы I типа (76,1 %), содержавшие клетки Сертоли и сперматогонии (табл. 6). Значительно меньше (19,1 %) было канальцев II типа и еще меньше (4,7 %) – III типа. В 1-й серии опытов при 3-месячном содержании в условиях сокращенного 8-часового дня в семенниках наблюдалось сильное увеличение числа канальцев I типа, увеличение числа канальцев III типа и появление канальцев IV типа (сперматоциты в пахинеме) и V типа (сперматоциты II порядка и сперматиды). У самцов 3-й группы по сравнению с контрольными животными уменьшилось число канальцев I типа (но на меньшую величину, чем в 1-й группе) и возросло число канальцев III и IV типов. Во 2-й группе при двухмесячном сокращенном дне, но в более

ранние сроки (июль и август) отмечалось еще меньшее снижение числа канальцев I типа (по сравнению с 1-й и 3-й группами), но и меньшее увеличение числа канальцев III типа.

Фотопериодические воздействия влияют не только на распределение канальцев, но и на динамику пролиферативных процессов. Так, гистологический анализ канальцев III типа выявил различия в соотношении сперматогоний и сперматоцитов в зависимости от режима освещения животных (табл. 7). Наибольшие сдвиги в процессе сперматогенеза отмечены при содержании норок в условиях сокращенного дня в течение 3 месяцев (1-я группа) и 2 месяцев (3-я группа). Характерно более чем 4-кратное увеличение числа сперматоцитов 1-го порядка в стадии зигонемы по сравнению с контролем. Воздействие 2-месячным сокращенным днем в более ранние сроки оказалось не столь эффективным.

Результаты вышеперечисленных опытов стимулировали постановку более детальных экспериментов с 1-месячными воздействиями в летне-осенний период как с постоянным освещением так и с сокращенным световым днем в июле, августе и сентябре соответственно (график). Содержание в этих условиях

Таблица 5

Масса гонад и диаметр семенных канальцев у самцов норок при разных световых режимах

Группа	n	Масса гонад	Диаметр семенных канальцев (мкм)
1-я серия опытов			
1	18	2,04 ± 0,14***	99,50 ± 4,95***
2	8	0,82 ± 0,06	68,89 ± 4,03
3	8	1,68 ± 0,16**	90,34 ± 4,60**
4	8	0,91 ± 0,04	76,6 ± 1,33
2-я серия опытов			
1	8	0,77 ± 0,07	75,22 ± 1,95
2	8	0,93 ± 0,06	84,69 ± 2,08**
3	8	1,03 ± 0,06	84,71 ± 2,04**
4	8	0,97 ± 0,06	73,85 ± 1,83
5	8	0,96 ± 0,06	79,57 ± 1,50
6	8	0,90 ± 0,03	76,69 ± 2,87
7	8	0,91 ± 0,04	76,60 ± 1,33

** $p < 0,01$ по сравнению с контролем; *** $p < 0,001$.

Таблица 6

Частота встречаемости семенных канальцев разного типа
в зависимости от светового режима

Группа	n	Тип канальцев				
		I	II	III	IV	V
1-я серия опытов						
1	18	4,1 ± 1,9***	20,0 ± 7,4	14,2 ± 3,1**	49,6 ± 7,3***	12,0 ± 5,1*
2	8	4,17 ± 1,3**	17,5 ± 4,2	20,1 ± 4,9**	20,6 ± 6,3***	–
3	8	19,6 ± 9,9***	15,8 ± 2,4	17,8 ± 2,5**	46,7 ± 11,3***	–
2-я серия опытов						
1	8	55,7 ± 11,7	31,5 ± 8,9	7,0 ± 1,8	5,7 ± 2,5*	–
2	8	48,8 ± 12,4	8,2 ± 4,0*	24,4 ± 8,1*	18,5 ± 8,1*	–
3	8	57,7 ± 9,4	19,5 ± 4,2	19,8 ± 3,6**	3,0 ± 3,0	–
4	8	79,6 ± 8,2	11,2 ± 5,1	8,2 ± 2,8	0,9 ± 0,6	–
5	8	63,2 ± 10,7	16,9 ± 3,7	19,9 ± 6,2*	–	–
6	8	96,9 ± 2,1	1,6 ± 1,1*	1,5 ± 1,0*	–	–
Контроль	8	76,1 ± 4,8	19,1 ± 4,2	4,7 ± 1,0	–	–

* $p < 0,05$ (по сравнению с контролем); ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Таблица 7

Число сперматогенных клеток
на разных стадиях дифференцировки
в семенных канальцах III типа
при различных световых режимах
(среднее число клеток
на поперечном срезе канальца)

Группа	n	Сперматогонии	Сперматоциты
1-я серия опытов			
1	18	1,66 ± 0,06***	31,86 ± 1,04***
2	8	3,12 ± 0,12***	12,42 ± 0,47***
3	8	2,15 ± 0,07***	30,55 ± 1,12***
4	8	4,49 ± 0,13	7,72 ± 0,30
2-я серия опытов			
1	8	2,89 ± 0,13***	15,78 ± 0,80***
2	8	4,18 ± 0,14	11,44 ± 0,42***
3	8	3,51 ± 0,13**	14,69 ± 0,54***
4	8	3,09 ± 0,14	9,94 ± 0,37**
5	8	5,28 ± 0,16**	11,05 ± 0,39**
6	8	2,18 ± 0,18***	6,24 ± 0,45
7	8	4,49 ± 0,13	7,72 ± 0,30

** $p < 0,01$ по сравнению с контролем; *** $p < 0,001$.

не оказало существенного влияния на массу семенников, но гистологическое исследование показало, что диаметр семенных канальцев при сокращенном дне в августе и сентябре увеличивался, а при других вариантах светового воздействия он оставался без изменения (табл. 5). Более детальный гистологический анализ состояния семенных канальцев вскрыл большую чувствительность животных к контрастным световым воздействиям в отдельные периоды года. Так, в целом в эти 3 месяца гонады самцов более чувствительны к действию сокращенного дня. Активизация сперматогенеза приводит к увеличению количества канальцев III типа и к появлению канальцев IV типа.

Максимальная количественная реакция при сокращенном дне зарегистрирована в августе (табл. 6). Постоянное освещение в сентябре характеризуется ингибирующим действием, регистрируется незначительное число канальцев II и III типов. При постоянном освещении в июле только в одиночных случаях регистрируются канальцы IV типа, а постоянное освещение в августе, возможно, приводит к более активному сперматогенезу, если учитывать высокую долю канальцев II типа.

Эта картина подтверждается в целом анализом пролиферативных процессов в канальцах III типа. При сокращенном дне во все летние месяцы наблюдается активизация трансформации сперматогониев I порядка в сперматоциты, в результате чего при снижении числа сперматогоний I порядка существенно увеличивается число сперматоцитов ($p < 0,001$). При постоянном освещении в сентябре ярко проявляется ингибирующее действие света, выражающееся в резком (в 2 раза) снижении числа сперматогониев I порядка на фоне стимулирующего действия на сперматогенез постоянного освещения в июле и августе (табл. 7).

Усиление стимулирующего эффекта при резком переходе от постоянного освещения к сокращенному световому дню

Эксперименты с 1-месячным содержанием самцов норок в условиях сокращенного дня и постоянного освещения стимулировали дальнейшие исследования влияния комбинированных световых режимов на морфофизиологические процессы в гонадах.

Для этого были сформированы три группы животных: 1-я группа: комбинация резкого перехода от постоянного освещения (20 июня–20 июля) к сокращенному 7-часовому световому дню (21 июля–10 октября). 2-я группа: сокращенный день (21 июля–10 октября). 3-я группа – контрольная, содержащаяся в условиях естественного фотопериода.

В каждой группе животных 5–10 октября и 1–5 марта был проведен гистологический анализ семенников. Масса гонад контрольных норок в октябре составила $0,91 \pm 0,04$ г, в то время как в 1-й группе их масса увеличилась до $2,22 \pm 0,22$ г ($p < 0,001$), а во 2-й группе – на меньшую величину $1,68 \pm 0,16$ г ($p < 0,01$).

Установлено, что масса гонад коррелировала с гистологической структурой семенников. Диаметр семенных канальцев в октябре у контрольных самцов был равен $76,6 \pm 1,3$ мкм, в 1-й группе зафиксировано увеличение диаметра до $105,1 \pm 5,1$ мкм ($p < 0,001$) и до $90,3 \pm 4,6$ мкм ($p < 0,01$) во 2-й группе. Диаметр семенных канальцев связан с прогрессивными пролиферативными процессами. У самцов обеих подопытных групп наблюдается значительное увеличение числа канальцев II и III типов за счет снижения числа канальцев I типа. У самцов 1-й группы регистрируется появление канальцев IV типа со сперматоцитами в стадии пахинемы (табл. 8).

В сезоне же размножения, в марте, длительное последствие светового летне-осеннего воздействия проявилось, по-видимому, в более раннем снижении активности морфофизиологических процессов в гонадах. У подопытных животных отмечалось снижение массы гонад. Так, при массе гонад $7,1 \pm 0,5$ г в контроле в 1-й группе она снизилась до $5,5 \pm 0,6$ г ($p < 0,05$), во 2-й группе – до $4,6 \pm 1,0$ г ($p < 0,05$). Одновременно у контрольных животных регистрировался максимальный диаметр семенных канальцев: $198,8 \pm 3,8$ мкм, что было значительно выше показателей 1-й группы: $139,1 \pm 9,5$ мкм

Таблица 8

Частота встречаемости семенных канальцев разного типа в зависимости от светового режима

Месяц	Группа	n	Типы семенных канальцев, %				
			I	II	III	IV	V
Октябрь	Контроль	8	$76,2 \pm 4,8$	$23,8 \pm 4,0$	–	–	–
	1	8	$13,6 \pm 8,1^{***}$	$23,3 \pm 4,0$	$40,0 \pm 8,8^{***}$	$23,1 \pm 8,4^{**}$	–
	2	8	$19,7 \pm 9,9$	$33,6 \pm 2,4^*$	$46,7 \pm 11,3^{**}$	–	–
Март	Контроль	8	–	–	$1,0 \pm 1,0$	$48,0 \pm 2,2$	$51,0 \pm 2,2$
	1	8	$2,3 \pm 2,3$	$14,6 \pm 9,9$	$34,7 \pm 5,7^{**}$	$34,3 \pm 5,3^{**}$	$14,1 \pm 5,2^{***}$
	2	8	$5,2 \pm 2,9$	$50,0 \pm 16,9^{**}$	$21,7 \pm 7,4^{**}$	$18,3 \pm 9,7^{**}$	$4,8 \pm 3,2$

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

($p < 0,001$) и 2-й группы: $112,3 \pm 13,4$ мкм ($p < 0,001$). Гистологическая картина семенников свидетельствовала об усилении деструктивных процессов в семенниках подопытных самцов (табл. 8).

Анализ уровня тестостерона в крови по месяцам исследования подтвердил коллинеарность содержания в крови тестостерона с пролиферативными процессами в семенниках (рис. 2).

Под воздействием установленных фотопериодических режимов повышался уровень тестостерона в октябре и январе, особенно у самцов 1-й группы, что коррелировало с гистологической картиной сперматогенеза. Однако такая ранняя активация сперматогенеза привела к более быстрому его угасанию, что прослеживается и по уровню тестостерона. В это же время у подопытных самок уровень эстрадиола в период половой активности не отличался от контрольного уровня (рис. 1). Гистологический анализ функционального состояния яичников также свидетельствовал об отсутствии в нем более ранних деструктивных процессов.

Влияние фотопериодических условий на процесс беременности и плодовитость у норок разных генотипов

Первые исследования, проведенные в зверосовхозе «Белоярский» Новосибирской области, показали, что дополнительное освещение (2 ч 30 мин) в вечернее время самок норок в

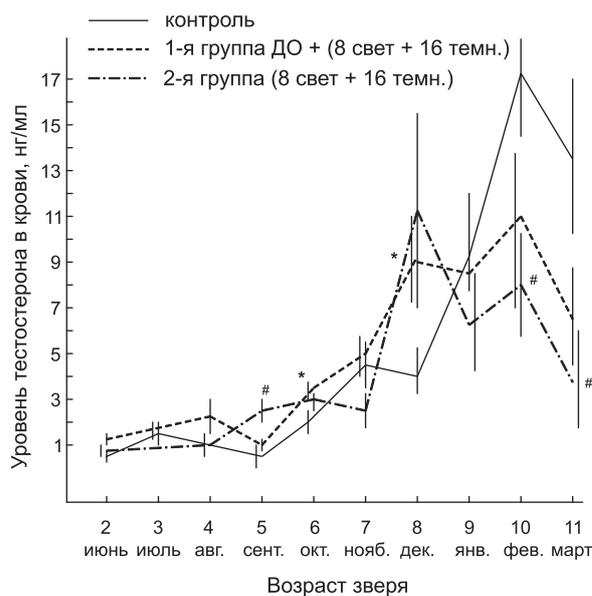


Рис. 2. Влияние световых режимов на уровень тестостерона в крови самцов норок стандартного генотипа в постнатальном онтогенезе (Gulevitch *et al.*, 1995).

* $p < 0,05$ различия между 1-й группой и контролем; # $p < 0,05$ различия между 2-й группой и контролем.

течение беременности увеличивало их плодовитость. Широкомасштабные исследования, проведенные более чем на 3 тыс. самок норок в зверосовхозах «Черепановский» (Новосибирская область), «Северинский» (Краснодарский край) и «Лесной» (Алтайский край), показали, что дополнительное освещение самок в период беременности привело к увеличению их плодовитости (табл. 9). Анализ материалов показал,

Таблица 9

Влияние дополнительного освещения на плодовитость самок норок разных генотипов в зверосовхозах «Белоярский», «Черепановский» (Новосибирская область), «Лесной» (Алтайский край) и «Северинский» (Краснодарский край)

Генотип	Число самок		Родилось щенков		Разность опыт–контроль	Зарегистрировано на 5-й день		Разность опыт–контроль
	опыт	контроль	опыт	контроль		опыт	контроль	
Стандартные (+/+)	380	380	6,5	6,1	+0,4*	6,1	5,9	+0,2
Белые-хедлунд (h/h)	105	105	6,4	5,3	+1,1***	5,7	4,5	+1,2***
Сапфировые (a/a p/p)	193	193	5,9	5,4	+0,5*	5,0	4,6	+0,4*
Серебристо-голубые (p/p)	368	368	6,2	5,7	+0,5*	5,8	5,3	+0,5*
Шведское паломино (t ^s /t ^s)	101	101	5,5	5,1	+0,4*	5,4	4,9	+0,5*

Примечание. Учитывалась плодовитость подопытных и контрольных норок с учетом даты спаривания. * $p < 0,05$ (по сравнению с контролем); *** $p < 0,001$.

что эффект повышения плодовитости зависит от длительности интервала между последним спариванием норки и началом их дополнительного освещения. Чем меньше этот интервал, тем выше эффект светового воздействия на сокращение длительности беременности (рис. 3). Но при этом обнаружилось, что наиболее чувствительными к фотопериодическому сигналу оказались норки, гомозиготные по рецессивным мутациям, затрагивающим окраску волосяного покрова (!) – именно по ним оказалось наиболее выгодно применять данную технологию.

Дополнительное освещение самок в сезоне спаривания вызвало увеличение не только плодовитости, но и массы тела новорожденных норчат. Так, живая масса сотен новорожденных щенков от освещаемых дополнительно самок колебалась по исследованным группам от $10,0 \pm 0,1$ г (стандарт +/-) до $10,8 \pm 0,1$ г (пастель *b/b*), а в контрольных группах она колебалась соответственно от $8,7 \pm 0,1$ г до $9,7 \pm 0,2$. Имея большую массу тела при рождении, норчата от подопытных самок и в 1-месячном возрасте сохраняли значительное превосходство по массе по сравнению с контрольными. Так, по стандартным самкам это превосходство составило 15,5 % ($168,4 \pm 2,8$ г против $145,8 \pm 2,3$ г в контроле), а по самцам 16,0 % ($190,0 \pm 3,5$ г против $163,8 \pm 2,3$ г в контроле).

Эффект фотопериодических воздействий на размножение в последующие сезоны размножения

Анализ результатов размножения в 2 последовательных годах (подопытные самки в первый

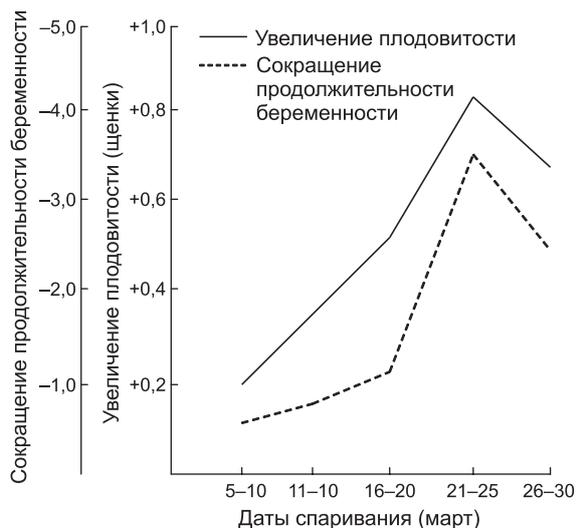


Рис. 3. Изменение плодовитости и продолжительности беременности норки в зависимости от интервала между датой последнего спаривания и началом дополнительного освещения (Беляев, Клочков, 1965; Клочков, 1991).

год находились в условиях дополнительного освещения, а в последующий – в естественных фотопериодических условиях) зафиксировал «последствие» дополнительного освещения, заключающегося в повышенной плодовитости самок в следующем после светового воздействия году (табл. 10). Это явление заслуживает особого внимания, учитывая тот факт, что на размножение в следующем году отбираются самки с высокими репродуктивными показателями.

Заключение

Норки – моноэстричные сезонно размножающиеся животные. Вне зависимости от вре-

Таблица 10

Влияние дополнительного освещения на репродукцию норки в следующем году

Группа	n	Плодовитость		Зарегистрировано щенков	
		1-й год	2-й год	1-й год	2-й год
Подопытные 1-й год (ДО) 2-й год (ЕО)	25	$7,3 \pm 0,6$	$6,8 \pm 0,5$	$6,9 \pm 0,6$	$6,2 \pm 0,5$
Контроль	25	$6,7 \pm 0,6$	$5,1 \pm 0,4$	$6,4 \pm 0,5$	$4,8 \pm 0,4$
Разность опыт–контроль		+0,6	+1,7	+0,5	+1,4
Достоверность различий		$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$

Примечание. ДО – дополнительное освещение, ЕО – естественное освещение.

мени спаривания концентрация прогестерона у самок норок увеличивается к 15–30 марта, достигая пика – 40–160 нг/мл и снижаясь к концу беременности (Allais, Martinet, 1978). Для самок характерна различная продолжительность беременности за счет эмбриональной диапаузы, контролируемой весенним увеличением продолжительности дня (Hansson, 1947; Абрамов, 1974). Исследованиями установлена зависимость лютеотропной фазы репродукции норок от световых условий в сезоне года. Изучение этого процесса (Martinet *et al.*, 1980, 1981) позволило авторам сделать следующие заключения: 1) основным лютеотропным гормоном у норок является пролактин. Ежедневные инъекции пролактина вызывают повышение уровня секреции прогестерона, более раннюю имплантацию бластоцист и сокращение продолжительности беременности; 2) искусственное удлинение или сокращение продолжительности светового дня оказывало стимулирующее или тормозящее влияние на секрецию прогестерона; 3) процесс спаривания также регулирует продолжительность беременности – у самок, спаренных по двум периодам с интервалом 7–10 дней, продолжительность беременности меньше, чем у спаренных по одному периоду.

Лютеотропное действие пролактина отмечено также в ряде других исследований (Murphy *et al.*, 1980; Parke *et al.*, 1980). Хотя роль эпифиза в этом процессе не ясна, обнаружена связь секреции пролактина с мелатонином (Martinet *et al.*, 1981). Показано, что прогестерон играет важную роль в имплантации и регуляции продолжительности эмбриональной диапаузы и что определенное количество функционирующих желтых тел необходимо для поддержания оптимального числа эмбрионов (Murphy *et al.*, 1983).

В наших исследованиях удлинение светового дня во время сезона размножения активировало наступление эструса, но в то же время вызывало более быстрое его окончание.

Анализ массового материала, полученного на норках, содержащихся в условиях дополнительного освещения, указывает на общий гормональный фактор, вызывающий сокращение продолжительности беременности с увеличением уровня плодовитости. На основании работ В.Д. Murphy с соавт. (1983) одним из этих

факторов может быть пролактин. И в работах американских и канадских исследователей было показано, что дополнительное освещение во время беременности увеличивало плодовитость норок (Holcomb *et al.*, 1962a; Aulerich *et al.*, 1963; Bowness, 1970, 1972).

Стимулирующее действие света продемонстрировано и в опытах с экспериментальной регуляцией жизнеспособности лисиц и норок (Беляев и др., 1973; Беляев, Железова, 1976). Было показано, что летальность гомозигот по некоторым мутациям, приводящим к гибели эмбрионов на доимплантационных стадиях развития, может быть преодолена или смещена во времени путем дополнительного освещения матерей во время беременности.

Явление «последствия» световых воздействий, отмеченное в опытах по фотопериодической стимуляции плодовитости норок, основано на свойстве норок иметь «долгосрочную фотопериодическую программу», контролирующую развитие и становление репродуктивных функций. У норок, выращенных в модифицированных фотопериодических условиях, по сравнению с контролем изменялось время половой активации в сезоне размножения, сокращалась продолжительность беременности.

В первых экспериментах с увеличением продолжительности дня во время половой активности были показаны более ранние спаривания, но в то же время и более быстрое их окончание. Модификации фотопериодических условий в летне-осенний период выявили дифференциальную чувствительность к коротким и длинным дням по месяцам воздействий.

Фотопериодический сигнал оказывает влияние на функцию гонад, в особенности на сперматогенез у самцов норок.

В этом отношении следует отметить определенные различия в чувствительности к фотопериодическому сигналу самок и самцов – более четкие и дифференцированные реакции характерны для самцов. Август для самцов – критический переходный период в чувствительности к длительности дня. Причем, если в июле четко регистрируются положительная реакция на постоянное освещение и отрицательная на сокращенный день, то в сентябре напротив положительная – на сокращенный день и отрицательная – на постоянное освещение. Осенью

постоянное освещение самцов вызывало резкое торможение сперматогенеза, весной в сезоне размножения наоборот стимулировало его. У самок же постоянное освещение как осенью, так и весной стимулировало активность яичников.

Фотопериодический сигнал действует в качестве специфического фактора в механизме сезонной регуляции половой функции. С одной стороны, он может действовать как стресс-фактор, приводя адренокортикальную функцию в состояние напряжения, и резко тормозить сперматогенез у неполовозрелых животных (Ramaley, 1974), с другой – дозированное воздействие фотопериодическим сигналом способно стимулировать половую функцию у половозрелых самцов норок (Bowness, 1970, 1972).

Эксперименты показывают, что оптико-гипоталамо-гипофизарная система норок реагирует как на короткие, так и на длинные дни, но отношение к ним в различные периоды года разное. В период осеннего равноденствия (22 сентября) короткие дни обладают стимулирующим действием, напротив, в период, предшествующий весеннему равноденствию (22 марта), стимулирующим действием обладают длинные дни. В свете этих данных разделение животных по их реактивности на фотопериодический сигнал на «короткодневных» и «длиннодневных» в определенной степени условно.

Результаты экспериментов с применением месячной экспозиции (сокращенный день или постоянное освещение) в летне-осенний сезон дают основание говорить о наличии критических периодов в реактивности гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы норок, контролирующей сперматогенез. Сокращенный день оказался мало эффективным в июле, но в августе и сентябре его действенность возрастала. Напротив, постоянное освещение оказывало стимулирующее действие в июле и тормозило сперматогенез в сентябре.

Учет такой стадийности дает возможность создания композиционных синтетических фотопериодов (постоянное освещение + сокращенный день), способных увеличить эффективность фотопериодических воздействий на норок.

В процессе эволюции у животных возникли сложные связи с фотопериодическими условиями среды. На примере норок видно, что в

комбинациях фотопериодических режимов, в которых месячное постоянное освещение сопровождалось резким переходом к сокращенному световому дню, отчетливо видно использование животными и условий удлиненного светового дня и последующего сокращенного дня для активизации гипоталамо-гипофизарно-гонадного комплекса. В этом отношении уместно провести аналогию реагирования гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы норок с двухступенчатой системой фотопериодической реактивности насекомых (Заславский, 1975; Фоменко, Заславский, 1978), заключающейся в том, что некоторые виды насекомых (например божья коровка) для прохождения диапаузы нуждаются в ступенчатом воздействии определенных периодов длинных и коротких дней. По наблюдениям этих авторов, резкий переход от длинного к короткодневному фотопериоду, – основа фотопериодической реактивности у насекомых (Тыщенко, 1973).

Оценивая фотопериодическую реактивность норок в плане ступенчатой фотореактивности, следует отметить, что в целом эволюция фотопериодической чувствительности норок пошла дальше. Можно говорить о наличии трехступенчатого типа фотопериодической реактивности, состоящей из: 1) стадии реактивности на максимальные по длительности дни лета; 2) стадии, учитывающей короткие дни осени и зимы, и 3) стадии, идущей при максимальном напряжении функциональных систем, – реакции на возрастающие по длительности весенние дни при подготовке к сезону размножения.

Литература

- Абрамов М.Д. Норководство. М.: Колос, 1974. 208 с.
- Аргутинская С.В. Дима // Дмитрий Константинович Беляев: Книга воспоминаний. Новосибирск: Изд-во СО РАН. Филиал «Гео», 2002. 284 с.
- Беляев Д.К. Роль света в управлении биологическими ритмами млекопитающих // Журн. общ. биологии. 1950. Т. 11. № 1. С. 39–50.
- Беляев Д.К. Теоретические основы и практические аспекты использования фотопериодизма в разведении пушных зверей // Световой фактор в повышении продуктивности пушных зверей. М.: Колос, 1976. С. 7–30.
- Беляев Д.К., Железова А.И. Опыт экспериментальной регуляции эмбриональной жизнеспособности у

- норок // Генетика. 1976. Т. 1. № 6. С. 55–59.
- Беляев Д.К., Клочков Д.В. О повышении плодовитости у норок путем дополнительного освещения // Кролиководство и звероводство. 1965. № 12. С. 2–5.
- Беляев Д.К., Клочков Д.В., Железова А.И. Влияние света на процессы размножения и плодовитость норок // Проблемы зоологических исследований в Сибири. Горно-Алтайск, 1962. С. 270–271.
- Беляев Д.К., Клочков Д.В., Железова А.И. Влияние световых условий на воспроизводительную функцию и плодовитость норок // Бюлл. Моск. об-ва испытателей природы. Отд. биологии. 1963. Т. 18. Вып. 2. С. 9–13.
- Беляев Д.К., Перельдик Н.Ш., Портнова Н.Т. Экспериментальное сокращение периода эмбрионального развития у соболей // Журн. общ. биологии. 1951. Т. 12. № 4. С. 260–265.
- Беляев Д.К., Портнова Н.Т. К вопросу об ускорении созревания меха у лисиц // Каракулеводство и звероводство. 1950. № 5. С. 47–50.
- Беляев Д.К., Трут Л.Н., Рувинский А.О. Генетически детерминированная летальность у лисиц и возможности ее преодоления // Генетика. 1973. Т. 9. № 9. С. 71–79.
- Беляев Д.К., Уткин Л.Г. Влияние сокращенного светового дня на сроки созревания меха у лисиц // Каракулеводство и звероводство. 1949. № 2. С. 59–62.
- Беляев Д.К., Уткин Л.Г. Некоторые данные по размножению соболей, разводимых в неволе // Науч. тр. НИИПЗК. М., 1960а. С. 40–70.
- Беляев Д.К., Уткин Л.Г. Вопросы повышения плодовитости соболей, разводимых в неволе // Науч. тр. НИИПЗК. М., 1960б. С. 95–115.
- Беляев Д.К., Уткин Л.Г., Куличков Б.А. Влияние светового режима на развитие мехового покрова у норок // Изв. СО АН СССР. Сер. биол. наук. 1964. № 4. Вып. 1. С. 91–100.
- Гулевич Р.Г., Клочков Д.В. Эндокринная функция гонад и надпочечников у самок норок двух генотипов в постнатальном онтогенезе // Журн. эвол. биохимии и физиологии. 1988. Т. 24. С. 445–450.
- Заславский В.А. Распространенность ступенчатых фотопериодических реакций среди насекомых и клещей // Энтотом. обзор. 1975. Т. 54. № 2. С. 291–304.
- Клочков Д.В. Фотопериодическая регуляция репродуктивной функции животных и ее практические аспекты: Дис. ... докт. биол. наук. Новосибирск: ИЦИГ СО РАН, 1991. 330 с.
- Клочков Д.В. Влияние фотопериодических условий на фолликулогенез в раннем постнатальном онтогенезе норок // Эндокринология размножения пушных зверей. Новосибирск, 1992. С. 112–123.
- Клочков Д.В. Свет – это жизнь // Дмитрий Константинович Беляев: Книга воспоминаний. Новосибирск: Изд-во СО РАН. Филиал «Гео», 2002. С. 143–146.
- Кузнецов Г.А. Влияние светового режима на половые функции самок серебристо-черных лисиц // Каракулеводство и звероводство. 1952а. № 3. С. 31–34.
- Кузнецов Г.А. Влияние светового режима на половые функции самок серебристо-черных лисиц // Каракулеводство и звероводство. 1952б. № 6. С. 31–34.
- Кузнецов Г.А. Получение от серебристо-черных лисиц двух приплодов в год // Науч. тр. НИИПЗК. Т. 4. М., 1963. С. 29–50.
- Кузнецов Г.А., Казаков М.И., Кузнецов В.Г., Казакова Г.П. Изучение возможности получения от голубых песцов двух приплодов в году при изменении длительности светового дня // Проблемы пушного звероводства и кролиководства: Науч. тр. НИИПЗК. М., 1977. Т. 15. С. 159–168.
- Линтварева Н.И. Влияние светового фактора на функции размножения животных // Вопр. физиологии размножения лошадей: Науч. тр. ВНИИК. М., 1955. С. 44–65.
- Милованов Л.В. История звероводства. Салтыковский. М.: Колос-Пресс, 2001. 168 с.
- Пигарев Н.В. Свет в интенсивном птицеводстве. М.: Колос, 1965. 360 с.
- Пигарев Н.В. Энергосберегающий световой режим для яичных кур // Изв. Тимирязевской сельскохоз. академии. 1990. № 6. С. 136–149.
- Тыщенко В.Н. О происхождении и эволюции фотопериодической реакции насекомых // Журн. общ. биологии. 1973. Т. 34. № 4. С. 539–558.
- Эмме А.М. Фотопериодическая реакция размножения // Усп. соврем. биологии. 1960. Т. 49. С. 240–259.
- Фоменко Р.Б., Заславский В.А. Ступенчатые фотопериодические реакции у тли (*Megoura vicia* Vuct.) // Тр. Зоол. ин-та АН СССР. 1978. № 69. С. 102–109.
- Цимборович А.Ф. Влияние светового фактора на организм овец асканийской тонкорунной породы // Науч. записки Херсонского сельскохоз. ин-та. 1959. С. 201–207.
- Allais C., Martinet L. Relation between daylight ration plasma progesterone levels and timing of nidation in mink (*Mustela vison*) // J. Reprod. Fertil. 1978. V. 54. № 1. P. 133–136.
- Aulerich R., Holcomb L.C., Schaible P.J., Ringer R.K. Influence of photoperiod on reproduction in mink // Fur Trade J. Canada. 1963. V. 43. № 3. P. 8–19.
- Belyaev D.K., Trut L.N., Ruvinsky A.O. Genetics of the *W* locus in foxes and expression of its lethal effects // J. Hered. 1975. V. 66. P. 331–338.

- Bissonnette T.H. Modification of mammalian sexual cycles; reactions of ferrets (*Putorius vulgaris*) of both sexes to electric light added after dark in November and December // Proc. Roy. Soc. Lond. 1932. V. 110. P. 322–336.
- Bissonnette T.H. Modification of mammalian sexual cycles: IV. Delay of oestrus and induction of anoestrus in female ferrets by reduction of intensity and duration of daily light periods in the normal oestrous season // J. Exptl Biol. 1935. V. 12. № 4. P. 315–320.
- Boissen-Agasse Z., Boissin J., Ortavant R. Circadian photosensitive phase and photoperiodic control of testis activity in the mink (*Mustela Peale and Beauvois*), a short day mammal // Biol. Reprod. 1982. V. 26. № 1. P. 110–119.
- Bowness E.L. Light on control of environment // U.S. Fur Rancher. 1970. V. 49. № 7. P. 12–13.
- Bowness E.L. Light control shows great promise in cutting feed cost // U.S. Fur Rancher. 1972. V. 51. № 2. P. 5–6.
- Dahl G.E., Buchanan B.A., Tucker H.A. Photoperiodic effects on dairy cattle: a review // J. Dairy Sci. 2000. V. 83. P. 885–893.
- Garner W.W., Allard H.A. Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants // J. Agric. Res. 1920. V. 18. P. 553–606.
- Gulevich R.G., Klotchkov D.V., Ivanova L.N., Osadchuk L.V. Gonadal function in mink under artificial photoperiods // J. Reprod. Fertil. 1995. V. 103. P. 147–152.
- Hansson A. The physiology of reproduction in the mink (*Mustela vison* Schreber) with special reference to delayed implantation // Acta Zool. 1947. V. 28. P. 136.
- Holcomb L.C., Schaible P.J., Ringer R.K. The effects of varied lighting regimes on reproduction in mink // Fur Trade J. Canada. 1962a. V. 39. № 9. P. 10–17.
- Holcomb L.C., Schaible P.J., Ringer R.K. The effects of varied lighting regimes on reproduction in mink // Mich. Agric. Exptl. Stn. Q. Bull. 1962b. V. 44. P. 666–678.
- Martinet L., Allais C., Allain D. The control of progesterone secretion in the pregnant mink // 2nd Intern. Sci. Congr. Fur Anim. Prod. Denmark. 1980. P. 1–5.
- Martinet L., Allais C., Allain D. The role of prolactin and LH in luteal function and blastocyst growth in mink (*Mustela vison*) // J. Reprod. Fertil. 1981. Suppl. 29. P. 119–130.
- Murphy B.D., Humphrey W.D., Stepstone S.L. Luteal function in mink: The effects of hypophysectomy after the preimplantation rise in progesterone // Anim. Reprod. Sci. 1980. V. 3. № 1. P. 225–232.
- Murphy B.D., Mead R.A., McKilbin P.E. Luteal contribution to the termination of preimplantation delay in mink // Biol. Reprod. 1983. V. 28. № 2. P. 479–503.
- Papke R.L., Concanon P., Travis H.F., Hansel W. Control of luteal function and implantation in the mink by prolactin // J. Anim. Sci. 1980. V. 50. № 4. P. 1102–1107.
- Poulton A.L., Robinson T.J. The response of rams and ewes of three breeds to artificial photoperiod // J. Reprod. Fertil. 1987. V. 79. № 2. P. 609–626.
- Ramaley J.A. A review of adrenal-gonadal interactions at puberty // Life Sci. 1974. V. 14. P. 1623–1633.
- Rowan W. Relation of light to birds migration and development change // Nature. 1925. № 115. P. 424–425.
- Tucker H.A., Petitclerc D., Zinn S.A. The influence of photoperiod on body weight gain, body composition, nutrient intake and hormone secretions // J. Anim. Sci. 1984. V. 59. P. 1610.
- Zinn S.A., Chapin L.T., Tucker H.A. Response of body weight and clearance and secretion rates of growth hormone to photoperiod in Holstein heifers // J. Anim. Sci. 1986. V. 62. P. 1273.

PHOTOPERIODIC SIGNALING AS A KEY FACTOR IN GENOTYPE–ENVIRONMENT INTERACTION

D.V. Klochkov, R.G. Gulevich, O.V. Trapezov

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

Summary

Critical periods have been sought in the sensitivity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis to photoperiod in American minks. A three-step model of photoperiod sensitivity is presented.

Key words: American mink, sensitivity to photoperiod, reproduction, genotype-environment interaction.

**КОНФЕРЕНЦИЯ «СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ГЕНЕТИКИ,
РАДИОБИОЛОГИИ, РАДИОЭКОЛОГИИ И ЭВОЛЮЦИИ»,
ПОСВЯЩЕННАЯ ПАМЯТИ ВЫДАЮЩИХСЯ ГЕНЕТИКОВ
И РАДИОБИОЛОГОВ Н.В. ТИМОФЕЕВА-РЕСОВСКОГО,
В.И. КОРОГОДИНА, В.А. ШЕВЧЕНКО**

Традиция проведения этой международной конференции была заложена в 2000 г. (г. Дубна) в связи со столетием со дня рождения Н.В. Тимофеева-Ресовского, ученика великих русских генетиков Н.К. Кольцова и С.С. Четверикова. Следующее за ним поколение ученых, непосредственно испытавшее влияние неординарной личности Николая Владимировича, тогда еще было с нами. На их счету – «надежность» и «непостоянство» генома, переход «от теории мутаций к теории мутационного процесса», изучение эффектов малых радиационных воздействий, исследование последствий Чернобыльской аварии. Этим темам была посвящена Вторая «Тимофеевская» конференция (Ереван, 2005 г.), на которой уже не было многих из ученых второй половины прошлого века.

Наши итальянские коллеги проф. М. Дуранте (M. Durante) и проф. А. Чинья (A. Cigna) обратились в научное общество «Биосфера и человечество» имени Н.В. Тимофеева-Ресовского с предложением увековечить память о Владимире Ивановиче Корогодине и Владимире Андреевиче Шевченко. Российские биологи поддержали итальянцев, и появились медали «Феномен жизни» памяти В.И. Корогодина и «За успехи в радиационной генетике» памяти В.А. Шевченко. Третья Тимофеевская конференция (Алушта, 9–14 октября 2010 г.) уже включала направления исследований В.И. Корогодина и В.А. Шевченко. Области научных интересов этих ученых органично дополнили программу конференции, что позволило рассмотреть вопросы взаимосвязи адаптационных и эволюционных изменений на разных уровнях организации – генетическом, популяционном, биоценологическом, биосферном. Такое сочетание программных направлений конференции расширяет научное мировоззрение

и создает основу для размышлений по сакральному вопросу Тимофеева-Ресовского «почему сие важно, в-пятых?».

В секции генетики, руководители С.Г. Инге-Вечтомов, Д.В. Дрейк (J.W. Drake), основными темами лекций и сообщений являлись: генетические механизмы, мутационный процесс; белковая передача наследственности, эпигенетика. О механизмах индукции и репарации повреждений ДНК доложили М.А. Резник (M. Resnick, USA, NIEHS) и В.Г. Королев (Россия, СПб ИЯФ РАН). Американские генетики Д.В. Дрейк (J. Drake, USA, NIEHS), С. Розенберг (S. Rosenberg, USA, Baylor College of Medicine), Д.А. Горденин (USA, NIEHS, ранее СПбГУ) рассказали о своих последних исследованиях генетических механизмов мутационного процесса, гипермутационного. Эпигенетику представил С.Г. Инге-Вечтомов (Россия, СПбГУ), этой модной в последние годы темой кафедры генетики СПбГУ занимается уже много лет и имеет приоритет во многих открытиях. В секции прозвучало много докладов из новосибирской школы генетиков по регуляции генов растений, дрозофилы, геному человека и математическому моделированию. Традиционно коллеги из Германии (Helmholtz Centers) представили исследования по медицинской генетике (M. Bader, MDC, Berlin Buh; M. Rosemann, GRC, Munich).

Программа радиобиологической секции, основной руководитель К. Матерсил (C. Mothersill), была очень насыщенной. Основными темами радиобиологов были немишенные эффекты на разных уровнях организации и хромосомная нестабильность. Базисной явилась лекция К. Матерсил (C. Mothersill, Canada, McMaster University) об индуцированных малыми радиационными воздействиями немишенных эффектах. Раз-

ным сторонам этого феномена были посвящены сообщения К. Сеймура (С. Seymour, Canada, McMaster University), Э. Аззама (E. Azzam, USA, New Jersey Medical School Cancer Center), И.Б. Моссэ (Беларусь, ИГиЦ НАН Беларуси), Н.А. Зюзикова (UK, University of Dundee, ранее ОИЯИ). Особый интерес вызвали доклады О. Ковальчук (O. Kovalchuk, Canada, University of Lethbridge) по эпигенетике радиационно-индуцированной геномной нестабильности и Ю.Е. Дуброва (UK, University of Leicester) о передаче геномной нестабильности в поколениях. Наши соотечественники Б.П. Суринов (МРНЦ РАМН, Обнинск) и Е.В. Даев (Россия, Спб ГУ) рассказали об исследованиях эффекта свидетеля между облученными и необлученными организмами. Большой доклад о биофизике тяжелых ионов был сделан М. Дуранте (M. Durante, Germany, GSI). Анализ эпидемиологических данных был представлен российскими учеными В.Л. Корогодиной, А. Корсаковым. Радиационные генетики из Института общей генетики РАН (Москва, бывшая лаборатория В.А. Шевченко) сообщили о своих исследованиях радиочувствительности индивидуумов при радиационных воздействиях (А.В. Рубанович, Л.Е. Сальникова и Н.С. Кузьмина).

Стержневыми вопросами на секции радиоэкологии (основной руководитель – Р.М. Алексахин) стали: чувствительность популяций к радиационным и сочетанным воздействиям, эффективность контрмер на загрязненных территориях, миграция радионуклидов в экосистемах. Обзорный доклад по эффективности контрмер после Чернобыльской катастрофы по снижению накопленной дозы растениями сделал Р.М. Алексахин (Россия, ВНИИ СХРАЭ РАСХН; Бельгия, МСЭ). Экс-президент Международного союза радиоэкологии А.А. Чинья (A. Cigna, Italy) рассказал о своем видении будущего радиоэкологии. Институт биологии южных морей НАН Украины представил итоговый доклад «Уроки радиоэкологического ответа Черного моря на Чернобыльскую катастрофу» (В.Н. Егоров, Г.Г. Поликарпов и С.Б. Гулин). Действие радиации на морскую и наземную биоту было проанализировано в докладах Т. Хинтона (T. Hinton, France, IRSN), С.А. Гераскина (Россия, ВНИИ СХРАЭ РАСХН), Д.И. Гудкова (Украина, Институт гидробиологии),

Н.И. Рябоконе (Беларусь, ИЦиГ НАН Беларуси), В.Н. Позолотиной (Россия, ИЭРиЖ УрО РАН). Исследования миграции радионуклидов в экосистемах рек и наземных биоценозах были представлены в сообщениях ученых Красноярска, Обнинска и других.

Особый интерес представляла секция «Эволюция» (основной руководитель М.Д. Голубовский). В первом докладе А.В. Марков (Россия, ИП РАН) продемонстрировал параллелизм эволюционных преобразований, направляемый экологическими, морфофизиологическими и генетическими ограничениями. О значении мобильных элементов в эволюции генома рассказала К. Виера (C. Viera, France, Lyon University). Лекция М.Д. Голубовского (USA, Berkeley University, ранее Россия) была посвящена принципу факультативности, обобщенной концепции генома и наследственной изменчивости. Прекрасный доклад был сделан А.А. Буздиным (Россия, ИБОХ РАН) о роли транспозонов в современном функциональном преобразовании генома человека. О значении симбиоза в эволюции и влиянии климатических условий на эволюцию генома сообщили ученые из Новосибирска Ю.Ю. Илинский и Л.П. Осипова (Россия, ИЦиГ СО РАН). Значение полиморфизма популяции для ее адаптации в среде обитания было подчеркнуто в сообщении И.М. Хохуткина (Россия, ИЭРиЖ УрО РАН). Во время дискуссии В.Л. Корогодина (Россия, ОИЯИ) рассказала о представлениях В.И. Корогодина об информации как феномене жизни.

В мемориальный день конференции были заслушаны доклады о Н.В. Тимофееве-Ресовском Ю.Ф. Богданова (Россия, ИОГен РАН), И.В. Молчановой (Россия, ИЭРиЖ УрО РАН) и Г. Эрцгребер (G. Erzgraeber, Germany, MDC). Н.Г. Горбушин (Россия, Обнинск) обратил внимание на сформулированные в работах Николая Владимировича идеи, связанные с термодинамикой живых систем. А.В. Рубанович (Россия, ИОГен РАН) рассказал о В.А. Шевченко, а В.Л. Корогодина – о научном наследии В.И. Корогодина (Россия, ОИЯИ). Медалями памяти этих ученых были награждены ученые за выдающийся вклад в науку: С. Розенберг (S. Rosenberg, USA), М. Дуранте (M. Durante, Germany), В.Д. Жестянников (Россия), М. Резник (M. Resnick, USA), Т. Хинтон (T. Hinton,

France). Молодые ученые были награждены медалями и другими наградами, которые они, безусловно, заслужили: многие из них выступили на этом международном симпозиуме впервые и сумели отстоять свои позиции в дискуссиях с западными маститыми коллегами.

Приятным сюрпризом было объявление Р.М. Алексахиним о том, что Общественный совет Государственной корпорации по атомной энергии «Росатом» и Международный союз радиоэкологии также учредили премии и медали памяти Н.В. Тимофеева-Ресовского, В.И. Корогодина и В.А. Шевченко, которыми были награждены как профессора, так и молодые ученые.

По просьбе экологов Крыма в рамках конференции был организован круглый стол «Проблемы экологии Крыма». К участникам конференции присоединились крымские ученые Таврического университета, Экологического центра, Карадагского заповедника, Никитского ботанического сада, Института биологии южных морей, представители Правительства АР Крым и общественных организаций по охране природы. Заслушаны доклады о проблемах экологии Крыма профессора В.А. Бокова, директора Карадагского заповедника А.Л. Морозовой и др. Участниками конференции и круглого стола было принято решение рекомендовать НАН Украины и комиссии «The Man and the Biosphere» ЮНЕСКО выдвинуть Карадагский природный заповедник НАН Украины для внесения в Список всемирного природного наследия ЮНЕСКО. Непосредственное участие

в обсуждении документов принял В.Н. Большаков (Россия, ИЭРиЖ УрО РАН). Участники конференции поддержали также инновационный проект «Создание музея ноосферного развития (Universum)», представленный коллективом Таврического национального университета; соответствующая рекомендация поступит в Правительство АР Крым.

Конференция закончилась замечательными экскурсиями в Карадагский природный заповедник и Никитский ботанический сад.

Остается поблагодарить Российский фонд фундаментальных исследований и Научную программу НАТО, которые оказывают нам постоянное содействие. наших молодых ученых поддерживают издательства и редакции ведущих отечественных журналов РАН: «Генетика»; «Радиационная биология, Радиоэкология»; «Экология»; «Информационный вестник ВОГиС»; научная электронная библиотека eLibrary. Спонсировал молодых ученых из Никитского ботанического сада и Карадагского природного заповедника пансионат Объединенного института ядерных исследований «Дубна» в Алуште. Проявили личную заботу о конференции: акад. РАСХН Р.М. Алексахин, акад. РАН В.Н. Большаков, акад. РАЕН Е.Б. Бурлакова, акад. РАН А.И. Григорьев, проф. Д.В. Дрейк, проф. И.К. Захаров, акад. РАН С.Г. Инге-Вечтомов, проф. М.Г. Иткис, акад. НАНУ Г.Г. Поликарпов, акад. РАМН А.Ф. Цыб, проф. Г. Эрцгребер, помогла дирекция Новосибирского Института цитологии и генетики СО РАН акад. Н.А. Колчанов и акад. В.К. Шумный.

НАГРАЖДЕНИЕ ИЗВЕСТНЫХ И МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

**Конференция «Современные проблемы генетики, радиобиологии, радиэкологии и эволюции», посвященная памяти выдающихся генетиков и радиобиологов Н.В. Тимофеева-Ресовского, В.И. Корогодина, В.А. Шевченко
Алушта, 9–14 октября 2010 г.**

Научное общество «Биосфера и человечество» и ученый совет Медицинского радиологического научного центра РАМН наградили известных ученых за их существенный вклад в биологию и молодых ученых за их талант и блестящее начало научных исследований медалями и дипломами памяти Н.В. Тимофеева-Ресовского, В.И. Корогодина и В.А. Шевченко.

Общественный совет Государственной корпорации по атомной энергии «Росатом» и Международный союз радиэкологии учредили премии и медали в честь этих русских ученых-радиэкологов. Как известные, так и молодые ученые получили награды на конференции.

Молодые ученые были награждены Российской академией наук, научными обществами, редакционными коллегиями и издательствами грамотами и дипломами, подписками на ведущие научные журналы.

Вавиловское общество генетиков и селекционеров (ВОГиС) наградило Никитский ботанический сад (Ялта, Крым) и Карадагский природный заповедник (Феодосия, Крым) подпиской на журнал «Информационный вестник ВОГиС».

НАГРАЖДЕНИЯ И МЕДАЛИ

**Научное общество «Биосфера и человечество им. Н.В. Тимофеева-Ресовского»,
Ученый совет медицинского радиологического научного центра РАМН:**

Диплом и медаль «Биосфера и человечество» памяти Н.В. Тимофеева-Ресовского
S. Rosenberg, Baylor College of Medicine, Houston, USA,
M. Durante, GSI, Darmstadt, Germany,

G. Erzgraeber, Max-Delbrück Center, Berlin Buh, Germany.

Диплом и серебряная медаль «Феномен жизни» памяти В.И. Корогодина:

В.Д. Жестянников, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия,
M.A. Resnick, National Institute of Environmental Health Sciences, USA.

Премия, диплом и медаль «Феномен жизни» памяти В.И. Корогодина для молодых ученых:

П.М. Морозик, Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь.

Диплом и серебряная медаль «За успехи в радиационной генетике» памяти В.А. Шевченко:

Th. Hinton, Institute of Radioprotection and Nuclear Safety, Cadarache, France.

Премия, диплом и медаль «За успехи в радиационной генетике» памяти В.А. Шевченко для молодых ученых:

Н.С. Кузьмина, лаборатория экологической генетики, Институт общей генетики РАН им. Н.И. Вавилова, г. Москва, Россия.

**ДИПЛОМЫ И МЕДАЛИ
Общественный совет госкорпорации по атомной энергии «Росатом»,
Международный союз радиэкологии:**

Памяти Н.В. Тимофеева-Ресовского:
A.A. Cigna, International Union of Radioecology, Turin, Italy,

Th. Hinton, Institute of Radioprotection and Nuclear Safety, St-Paul-lez-Durance Cedex, France,

С.А. Гераськин, Всероссийский институт сельскохозяйственной радиологии и агроэкологии РАСХН, Обнинск, Россия,

Е.М. Мозолин, Всероссийский институт сельскохозяйственной радиологии и агроэкологии РАСХН, Обнинск, Россия.

Памяти В.И. Корогодина:

С. Mothersill, McMaster University, Hamilton, Canada,

В.Л. Корогодина, Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия,

В.Г. Королев, Институт ядерной физики РАН, Санкт-Петербург, Россия,

Е. Плюсина, Институт биологии, Научный центр Коми УрО РАН, Сыктывкар, Россия.

Памяти В.А. Шевченко:

S.G. Chankova, Central Laboratory of General Ecology, Bulg. Acad. Sci., Sofia, Bulgaria,

А.В. Рубанович, Институт общей генетики РАН им. Н.И. Вавилова, г. Москва, Россия,

А.А. Удалова, Всероссийский институт сельскохозяйственной радиологии и агроэкологии РАСХН, Обнинск, Россия,

А.В. Дикарев, Всероссийский институт сельскохозяйственной радиологии и агроэкологии РАСХН, Обнинск, Россия.

ГРАМОТА

РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

О.Ю. Терещенко, Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, Россия,

С.С. Сорокина, Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино, Россия,

А.В. Еремеев, Центр репродуктивной медицины человека, г. Красноярск, Россия.

ДИПЛОМЫ И ПОДПИСКИ НА ЖУРНАЛЫ Научные общества, редакции и издательства

**Диплом и электронная подписка (2011),
журнал «Genetics»,**

Общество «Genetic Society of America»:

Е. Александрова, Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия,

А. Жук, кафедра генетики и селекции Санкт-Петербургского университета, г. Санкт-Петербург, Россия,

Е. Клименко, группа радиационного канцерогенеза, Институт радиационной биологии, Гельмгольц центр, Мюнхен, Германия.

**Диплом и электронная подписка (2011),
журнал «Генетика», редакция журнала
«Генетика», издательство elibrary:**

Ю. Сошкина, кафедра генетики и селекции Санкт-Петербургского университета, г. Санкт-Петербург, Россия,

Л. Намолован, лаборатория ядерных проблем, Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия,

П. Морозик, Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь.

**Диплом и электронная подписка (2011),
журнал «Радиационная биология.
Радиоэкология», редакция журнала
«Радиационная биология. Радиоэкология»,
издательство elibrary:**

А. Дюкина, Государственный университет г. Пущино, Россия,

В. Харламов, Государственный технический университет г. Обнинска, Россия,

Е. Плюсина, Институт биологии, Научный центр Республики Коми, УрО РАН, Сыктывкар, Россия.

**Диплом и подписка (2011),
журнал «Экология»,**

редакция журнала «Экология»:

А. Ловинская, Казахский национальный университет им. аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан,

И. Прокопьев, Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, Якутск, Якутия.

**Диплом и подписка (2011), журнал
«Информационный вестник ВОГиС»
Вавиловское общество генетиков и
селекционеров, редакция журнала
«Информационный вестник ВОГиС»:**

Н.В. Зотова, Центр репродуктивной медицины, г. Красноярск, Россия,

К.П. Афанасьева, Лаборатория ядерных проблем, Объединенный институт ядерных исследований, г. Дубна, Россия,

С.С. Сорокина, Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино, Россия.

Подписка (2011), журнал «Информационный вестник ВОГиС» Вавиловское общество генетиков и селекционеров, редакция журнала «Информационный вестник ВОГиС»:

Карадагский природный заповедник НАН Украины, г. Феодосия, Украина,

Никитский ботанический сад НАН Украины, г. Ялта, Украина.

Диплом и подписка (2011), журнал «Радиационная биология. Радиоэкология», Экспертный комитет конкурса молодых ученых конференции:

А. Корсаков, Государственный технический университет, г. Брянск, Россия.

В.Л. Корогодина,
ученый секретарь конференции, Дубна

ФЕНОМЕН ЖИЗНИ. АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОЛОГИИ В НАУЧНОМ НАСЛЕДИИ В.И. КОРОГОДИНА

В.Л. Корогодина

Владимир Иванович Корогодина обладал одним волшебным свойством. Это свойство можно описать так: мы входим в темную комнату, где нам надо что-то найти. Ничего не видно, можно продвигаться только ощупью... Тут кто-то приходит и зажигает свет. Проступают в полутьме места, где надо искать. Исследования Владимира Ивановича показали, «где копать». Его статьи и доклады всегда возбуждали интерес, они до сих пор заставляют думать и ставят вопросы. Сам же Владимир Иванович всегда был занят увлекательным изучением свойств живого. Его последняя книга по теоретической биологии «Информация как основа жизни» суммирует его пионерские труды в области радиобиологии, генетики, радиоэкологии, проблем эволюции. Подчеркивая нескончаемость научного процесса, он предварил свои публикации цитатой Г. Мелвилла из «Моби Дика»: «Ничего законченного я не обещаю, потому что дело рук человеческих, объявленное законченным, тем самым уже является делом гиблым».

Годы учебы

В.И. Корогодина родился 4 января 1929 г. в г. Донецке. После школы он поступил на физический факультет МГУ (там представлялось общежитие), а через год смог перевестись на биолого-почвенный факультет, который закончил по кафедре генетики в 1952 г. Затем он год работал зоотехником-оленоводом на Крайнем Севере.

Пострадиационное восстановление клеток

В 1953 г. В.И. Корогодина вернулся в Москву и поступил работать старшим лаборантом на кафедру биофизики биолого-почвенного факультета МГУ, организованную в то время Борисом Николаевичем Тарусовым. Тарусов дал ему научную тему – действие радиации на клетки живых организмов. В качестве объекта В.И. Корогодина выбрал клетки дрожжей.

К началу научных исследований Корогодина были известны отдельные факты отдаленной гибели клеток, а также «выздоровления» после радиационного воздействия, полученные Г.А. Надсоном, Ф. Хольвеком, А. Лакассанем. В то время Д.Е. Ли, Н.В. Тимофеев-Ресовский и К.Г. Циммер уже создали теорию мишени,

которая объясняла ограниченный круг явлений: инактивацию вирусов и некоторых бактерий, а также генетический эффект. Владимир Иванович разработал методики для наблюдения динамики развития действия радиации на клетки и в своей первой статье количественно описал эффект последствия для сохраняющих жизнеспособность клеток методом макроколоний



На летней практике в Звенигороде (в руках – жаворонок). 1949 г.



Летняя школа на берегу озера Большое Миассово.

Слева направо: В.И. Корогодина, Л.С. Царапкин, Н.А. Порядкова, Н.В. Лучник, О.В. Малиновский. 1961 г.

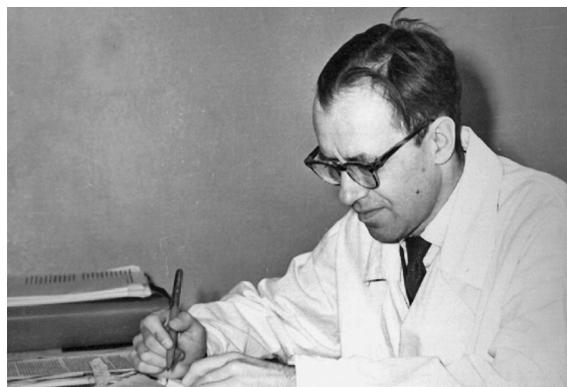
(Корогодина, 1957). Он заметил, что инактивация наступает после нескольких циклов размножения и стал выдерживать клетки после облучения в простой водопроводной воде для задержки их деления. Позже (1972 г.) за доказательство реальности пострадиационного восстановления клеток В.И. Корогодину был выдан диплом на открытие (№ 115) с приоритетом от марта 1957 г., определенным по дате публикации его самой первой статьи (Корогодина, 1957).

В 1956 г. В.И. Корогодина познакомился с Н.В. Тимофеевым-Ресовским, который после долгого перерыва приехал в Москву и прочитал лекцию в МГУ. Впечатление было столь глубоким, что Владимир Иванович тогда решил связать свою научную жизнь с Тимофеевым-Ресовским. Через год он поехал в отпуск в летнюю школу Николая Владимировича на озере Большое Миассово, где выступил с докладом о своей работе. Его хорошо приняли в тимофеевском окружении.

В конце 1961 г. Корогодина перешел на работу в Институт медицинской радиологии РАМН в Обнинске, где создал лабораторию радиобиологии клеток и тканей. Вскоре по приглашению академика Г.А. Зедгенидзе в Обнинск переехал Н.В. Тимофеев-Ресовский с сотрудниками своей миассовской лаборатории. В 1960-х гг.

вокруг Тимофеева-Ресовского сформировалась обнинская школа радиобиологов.

В Обнинске Владимир Иванович с К.М. Ближником, Ю.Г. Капутьцевичем, В.Г. Петиним и другими сотрудниками лаборатории продолжил изучение пострадиационного восстановления. Они показали зависимость восстановления клеток от плоидности (пострадиационное восстановление наблюдалось у диплоидов и практически отсутствовало у гаплоидов) (Корогодина, 1963); радиочувствительности (Korogodin *et al.*, 1968); качества излучения (Корогодина,



Институт медицинской радиологии РАМН, Обнинск. 1963 г.

Карабаев, 1962; Корогодина и др., 1963); условий культивирования (Корогодина, Карабаев, 1962; Капульцевич и др., 1972а). Тогда же они установили, что потомки облученных клеток несут разное число повреждений (Капульцевич и др., 1972б). Эти наблюдения не могли быть объяснены классической детерминистской моделью. В.И. Корогодиным и его коллегами было проведено статистическое моделирование (Капульцевич и др., 1972а–в), и Ю.Г. Капульцевичем была построена вероятностная модель (Капульцевич, 1978), которая сочетала принцип попадания и мишени и стохастический подход к восстановлению клеток от повреждений.

Каскадный мутагенез

Как-то раз чашки с колониями облученных клеток дрожжей были забыты на несколько недель. Владимир Иванович взялся их рассматривать и был поражен появлением новых ранее не учтенных колоний и разнообразием их форм (рис. 1). Хорошо зная работы Г.А. Надсона и Г.С. Филиппова (1932), он понял, что это «сальтанты», описанные этими исследователями еще в 1920–1930-х гг.; Владимир Иванович вместе с К.М. Близник начал изучать явление лучевого расообразования и нестабильности радиорас у дрожжей, которое наблюдалось ими на протяжении сотен клеточных генераций. Это явление он назвал «каскадным мутагенезом», подчеркивая фенотипические различия отдаленных потомков облученных клеток. Серию статей по расообразованию он посвятил светлой памяти академика Г.А. Надсона. Процесс нестабильности изучали в конце 1930-х гг. Б. Мак Клинтон и в 1960-х годах А.А. Прокофьева-Бельговская.

Корогодина и его коллеги впервые подробно описали феномен нестабильности, включая расообразование, связь нестабильности с летальными повреждениями (Близник и др., 1974); связь с нарушением деления клетки (Корогодина и др., 1977), образование большей части сальтантов в области «плеча» кривой выживания (Капульцевич и др., 1972в) или в контроле при неоптимальных условиях культивирования (Близник и др., 1974). Они отметили различие между первичным радиационным поражением, возникающим случайно, и формирующимися повреждениями, появляющимися в основном в

гибнущей, чувствительной к неоптимальным условиям части популяции (Близник и др., 1974).

Владимир Иванович пришел к выводу, что расообразование связано с хромосомными перестройками и заключил, что хромосомные aberrации могут суммироваться в клетке (Корогодина и др., 1977). Он считал каскадный мутагенез проявлением «в мире микроорганизмов закона гомологических рядов наследственной изменчивости, сформулированного Вавиловым» (Корогодина, 1982).

Надежность генома

Представления о надежности как фундаментальном свойстве биологических объектов формировались давно. И.И. Шмальгаузен отмечал связь прогрессивной эволюции с повышением надежности генетических процессов (Шмальгаузен, 1982). В 1970-х гг. была опубликована монография С. Оно, в которой было показано, что прогрессивная эволюция связана с повышением количества ДНК в геноме (Ohno, 1970). Разные группы ученых, среди которых Н.С. Карлан, А.Н. Sparrow, Н. Dertinger, А.В. Савич, М.И. Шальнов проанализировали зависимость радиобиологической характеристики генома D_0 (число попаданий, необходимое для уменьшения выживаемости в e раз) от содержания ДНК

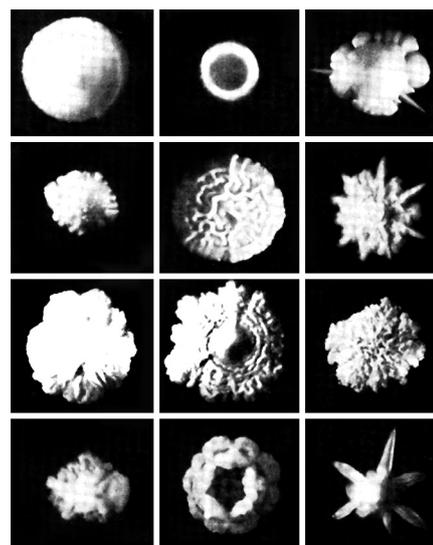


Рис. 1. Колонии дрожжей, относящиеся к радиорасам разных морфологических групп (Корогодина, Близник, 1972).

на клетку (С) и выявили разбиение на «радиотаксоны» (термин Спэрроу). С увеличением содержания ДНК на клетку происходит переход от одноклеточных организмов к многоклеточным; в пределах же каждого радиотаксона значения D_0 уменьшаются. Снижение характеристики надежности генома D_0 с увеличением размера генома С в пределах радиотаксона можно было объяснить с точки зрения принципа попадания и мишени. Не был понятен механизм перехода из радиотаксона более низкого в более высокий (рис. 2).

В.И. Корогодиным проблема надежности генома была впервые сформулирована в докладе «Некоторые генетические аспекты надежности клеток» на ученом совете Объединенного института ядерных исследований (г. Дубна), после которого в дирекции был подписан приказ об организации под его руководством (1.04.1977) в ОИЯИ сектора биологических исследований.

Пользуясь методологией радиационной генетики, В.И. Корогодина ввел понятие удельной надежности генома как количества поглощенной энергии в ДНК, необходимого и достаточного для вызывания одного элементарного повреждения (Корогодина, 1982). Из этого следовало деление всех организмов на группы («кариотаксоны») примерно с одинаковыми удельными надежностями генома, которые соответствовали их структурной организации. Самый большой скачок надежности генома наблюдался при переходе от гаплоидных клеток к диплоидным, который можно было объяснить возникновением диплоид-специфической репарации (рис. 3). Корогодиным была сформулирована гипотеза о преобразовании набора ферментов гаплонтов, использующих во время диплофазы двойной набор хромосом для репарации ДНК, в систему диплоид-специфической репарации, активной во время вегетативной фазы одноклеточных эукариот. Возникновение диплоидов имело двойное значение: повышалась надежность генома и увеличивалась частота жизнеспособных хромосомных мутаций. Он ввел в биологию античный принцип *поризма*: ведущая роль в эволюции принадлежит изменениям, имеющим характер идиоадаптаций, а затем выявляющим системные свойства, обеспечивающие осуществление ароморфозов.

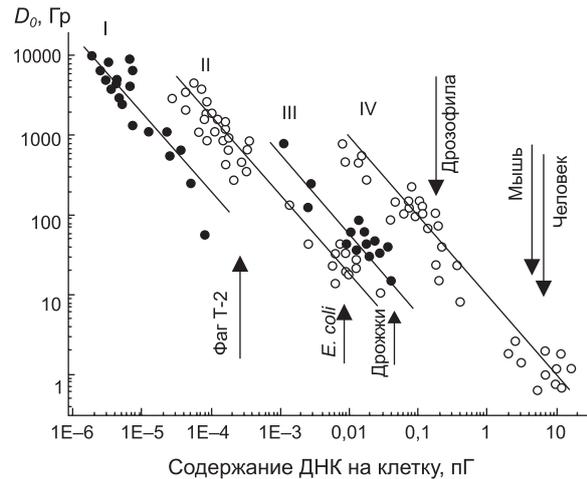


Рис. 2. Зависимость надежности генома (D_0) от содержания ДНК на клетку (С) для разных биологических объектов (Корогодина, 1982).

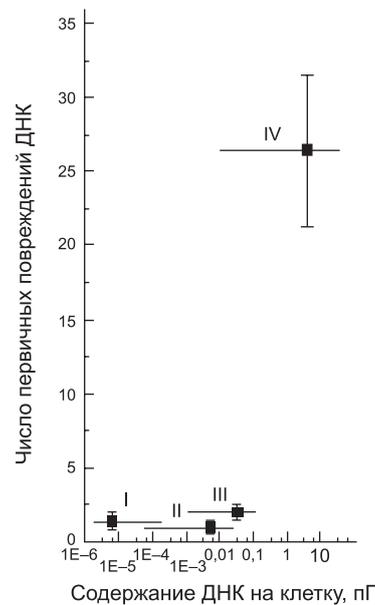


Рис. 3. Выход первичных повреждений ДНК на геном при облучении клеток в дозе D_0 для организмов, относящихся к разным кариотаксонам (Корогодина, 1982).

Владимир Иванович сделал вывод, что структура генома определяет надежность генетического аппарата, которая по мере накопления в клетках ДНК приобретает все большую селективную ценность. Он заключил, что переход из одной таксономической группы в другую возможен только в результате структурных перестроек генома. В.И. Корогодина

сделал важный вывод о том, что роль мутации в эволюции зависит от ее типа (Корогодина, 1985). Хромосомные aberrации могут служить материалом для прогрессивной эволюции, а генные мутации – только для «пришлифовки» организма к экологической нише. Важную роль в эволюции Корогодина отвел феномену нестабильности генома.

Гипотеза зависимости мутагенеза от функциональной активности гена

Для В.И. Корогодина был очень интересен вопрос: регулируется ли мутационный процесс или он полностью случаен? На этот счет уже существовали гипотезы. В конце 1940-х гг. М.Е. Лобашев предложил физиологическую (паранекротическую) гипотезу, которая связывала появление мутаций с ошибками процесса репарации и условиями среды обитания организмов (Лобашев, 1947). Изучение механизмов репликации показало, что источником мутаций могут быть ошибки копирования, связанные с различного рода дисбалансами в синтезе ДНК или метаболизме предшественников. Среди этих исследований следует упомянуть работы С.С. Коэна, С.Е. Бреслера, Р. Хейнса (1970–1980-е гг.).

Владимир Иванович поставил опыты на аденин-зависимых клетках дрожжей. Опыты показали, что на среде с дефицитом аденина

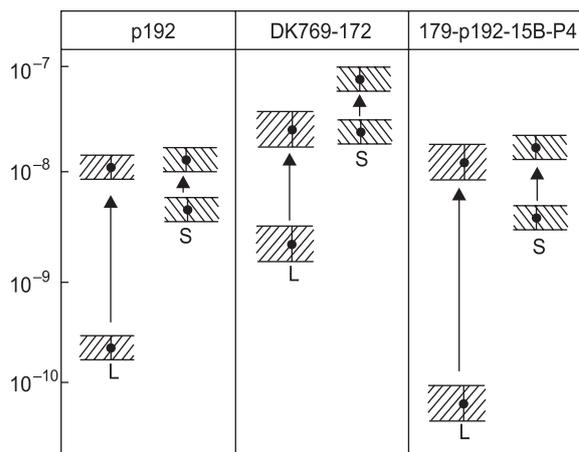
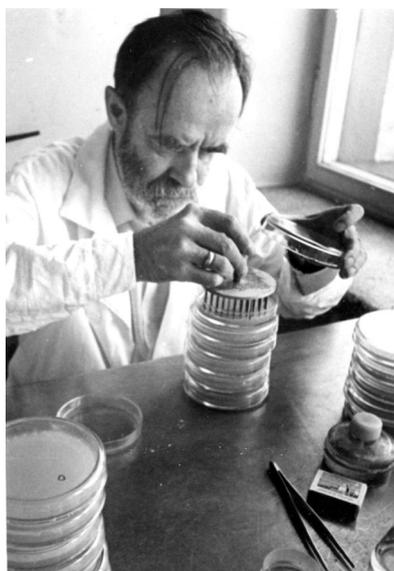


Рис. 4. Частота возникновения мутаций в гене, контролирующем синтез аденина (L) и в генах-супрессорах (S) у аденин-зависимых штаммов дрожжей-сахаромицетов.

Внизу – частота мутаций генов при избытке аденина в среде, вверху – при его отсутствии.

происходит более активная транскрипция аденинового гена, а частота мутирования повышается на 2–3 порядка, в то время как в генах-супрессорах она повышается, но не столь значительно (рис. 4) (Ильина и др., 1987). Эти эксперименты дали основания для вывода, что мутирование генов зависит от их транскрипционной активности. Через год такую же гипотезу высказал Кэрнс (Cairns *et al.*, 1988).

В 1970 г. Корогодиным была сформулирована гипотеза о влиянии функциональной активности гена на мутабельность (Korogodin *et al.*, 1990). Он указал на несколько важных следствий из этой гипотезы. Во всех случаях, когда изменение условий среды сопровождается изменением активности генов, может наблюдаться «генная специфичность» мутагенеза. Поэтому частоту мутирования генов следует задавать не одной величиной, а распределением на пространстве режимов; эти эффекты играют существенную роль в эволюции и в дифференцировке тканей в онтогенезе и иммунной системе. В.И. Корогодина сформулировал функциональную концепцию мутагенеза: мутационный процесс зависит от структурной организации генома и функционального состояния генов, которое изменяется во внешней среде (Корогодина и др., 1990).

Радиоемкость экосистем

Радиоэкологические исследования не занимали большого места в исследованиях Владимира Ивановича, но играли важную роль в его мировоззрении. В отличие от лабораторных опытов в изучении экосистем следует обращать внимание не только на отдельные свойства клеток и организмов, но и на их системные функции.

С радиоэкологией он впервые познакомился, когда работал на кафедре биофизики МГУ (1956 г.), и его вместе с другими сотрудниками кафедры послали на оз. Карачай оценить последствия сброса в озеро радиоактивных отходов. Корогодин знал короткий жизненный цикл микроорганизмов, их большую долю в биоте водоема. Ему стали ясными и понятными направленность и механизм естественного самоочищения этого непроточного водоема, и он предложил механизм его естественного самоочищения (Агре, Корогодин, 1960): вода – микроорганизмы – донные отложения, что было описано формулой:

$$A = C S (H + K h),$$

где A – общая радиоактивная загрязненность водоема; C – удельная загрязненность воды; H – площадь поверхности и S – средняя глубина водоема, K – коэффициент накопления радионуклидов в грунте; h – толщина сорбирующего слоя грунта. Тогда же он ввел фундаментальное понятие радиоемкости – количества радионуклидов, которое может поглотить экосистема без нарушения ее функционирования.

Это понятие было положено в основу методологии оценок радиоемкости, разработанных Ю.А. Кутлахмедовым, Г.Г. Поликарповым и В.И. Корогодиным для каскада Днепровских водохранилищ сразу после катастрофы в Чернобыле (Кутлахмедов, 1988). В то время В.И. Корогодин активно работал в составе Научной комиссии по радиационной защите России, Международного союза радиоэкологии, Международного союза экоэтики, участвовал в разработке контрмер на загрязненных территориях. Основными правилами, которыми он считал необходимым руководствоваться в разработке контрмер на больших загрязненных территориях, являются сохранение существующих биогеоценозов; определение доз радиации,

которые могут вызвать необратимые изменения в экосистемах; стимуляция медицинского обследования населения и принятие мер для снижения коллективных доз в регионах.

Информация, целенаправленное действие и феномен жизни

В.И. Корогодин рассмотрел в своих исследованиях свойства живого и элементы прогрессивной эволюции. Оставался вопрос: чем отличается живое от неживого?

Доминировала точка зрения, что отличие организма от кристалла состоит только в количестве информации. М.М. Волькенштейн отмечал, что термодинамические подходы к рассмотрению биологических процессов, оперирующие лишь количеством информации, не эффективны, так как биологические объекты являются не статистическими, а динамическими объектами. Телеология была известна еще до Аристотеля, но к XX в. о ней все забыли. В конце 1970-х – начале 1980х гг. Корогодин пришел к выводу, что *живое – это совокупность объектов, способных совершать целенаправленные действия, конечная цель которых – самовоспроизведение. В основе целенаправленного действия, повышающего вероятность его осуществления, лежит информация – «руководство к действию»*. Таким образом, он объединил в живых организмах информационный и динамический компоненты (Корогодин, 1983).

Корогодин описал целенаправленное действие формулой:

$$(R, s) \frac{Q(I)}{p, P} \rightarrow (Z, w)$$

где s – «исходная ситуация» или пространство режимов, в котором могут происходить различные события; Z – событие «цели»; R – ресурсы, содержащиеся в s и идущие на осуществление действия; Q – «механизм», или оператор, применение которого в условиях s приводит к желаемому результату; I – информация, на основании которой этот оператор построен и w – события, неизбежно сопутствующие осуществлению Z , или «побочные продукты» достижения цели.

В последующие годы Корогодин показал, что можно различать *три типа биологической информации: генетическую, поведенческую и логическую* (Корогодин, Корогодина, 2000).



Медаль «Феномен жизни» памяти В.И. Корогодина. С.-Петербургский монетный двор (художники: Е.В. Крамская, А.А. Долгополов, А.В. Бакланов).

Поведенческая информация передается непосредственным обучением в сообществе у животных, птиц. Логическая информация (знания) свойственна только человеческому сообществу и может быть распространена с помощью книг, интернета и другими способами.

В.И. Корогодина рассмотрел *автогенез информации*, основанный на присущей целенаправленному действию компоненте – событиях, неизбежно сопутствующих достижению цели («побочных продуктах»). Именно они изменяют среду обитания, повышают размерность новых экологических ниш и создают «ярусы» жизни.

В этом кратком обзоре упомянуты исследования, составляющие основу видения В.И. Корогодина феномена жизни. Медаль его имени так и называется «Феномен жизни», на ее оборотной стороне представлены мотивы из публикаций Корогодина по восстановлению клеток, мутагенезу, надежности генома, радиоемкости экосистем, информации как феномена жизни.

Литература

Агре А.Л., Корогодина В.И. О распределении радиоактивных загрязнений в непроточном водоеме // Мед. радиологии. 1960. № 1. С. 67–73.

Близник К.М., Капульцевич Ю.Г., Корогодина В.И., Петин В.Г. Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов. 4. Зависимость выхода сальтантов от условий пострадиационного культивирования // Радиобиология. 1974. Т. 14. № 2. С. 229–236.

Ильина В.Л., Корогодина В.И., Файси Ч. Зависимость частоты спонтанного возникновения реверсов разных типов у ауксотрофных по аденину дрожжей от содержания аденина в среде // Генетика. 1987. Т. 23. № 4. С. 637–642.

Капульцевич Ю.Г. Количественные закономерности лучевого поражения клеток. М.: Атомиздат, 1978.

Капульцевич Ю.Г., Близник К.М., Корогодина В.И. и др. Анализ радиобиологических реакций дрожжевых клеток. 3. Характеристика колоний, вырастающих из облученных дрожжевых клеток // Радиобиология. 1972в. Т. 12. № 4. С. 554–560.

Капульцевич Ю.Г., Корогодина В.И., Петин В.Г. Анализ радиобиологических реакций дрожжевых клеток. I. Кривые выживания и эффект дорастания // Радиобиология. 1972а. Т. 12. № 2. С. 267–271.

Капульцевич Ю.Г., Петин В.Г., Корогодина В.И., Близник К.М. Анализ радиобиологических реакций дрожжевых клеток. II. Формы инактивации и пост-радиационная модификация лучевого поражения // Радиобиология. 1972б. Т. 12. № 3. С. 408–415.

Корогодина В.И. Некоторые закономерности роста макроколоний после облучения дрожжевых клеток гамма-лучами радиокобальта // Биофизика. 1957. Т. 2. № 2. С. 178–186.

Корогодина В.И. Роль фактора плоидности в лучевом поражении клеток и некоторые генетические аспекты облучения // Первичные механизмы биологического действия ионизирующих излучений. Тр. Моск. общ. испытателей природы. М.: АН СССР, 1963. Т. 7. С. 181–188.

Корогодина В.И. Радиотаксоны и надежность генома. (Памяти М.И. Шальнова) // Радиобиология. 1982. Т. 22. № 2. С. 147–154.

Корогодина В.И. Определение понятия «информация» и возможности его использования в биологии // Биофизика. 1983. Т. 28. Вып. 1. С. 171–178.

Корогодина В.И. Кариотаксоны, надежность генома и прогрессивная биологическая эволюция (Памяти моего учителя Н.В. Тимофеева-Ресовского) // Природа. 1985. № 2. С. 3–14.

Корогодина В.И., Билуши В., Маркова Л.И., Шехтман Я.Л. Восстановление жизнеспособности дрожжевых клеток разной плоидности, пораженных альфа-частицами // Радиобиология. 1963. Т. 3. № 1. С. 39–44.

Корогодина В.И., Близник К.М. Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов. I. Радиорасы диплоидных дрожжей // Радиобиология. 1972. Т. 12. № 2. С. 163–170. [Серия сообщений, публикуемых под этим общим названием, посвящается светлой памяти академика Г.А. Надсона].

Корогодина В.И., Близник К.М., Капульцевич Ю.Г. Закономерности формирования радиорас у дрожжевых организмов. 11. Факты и гипотезы // Радиобиология. 1977. Т. 17. № 4. С. 492–499.

- Корогодин В.И., Карабаев Э.М. О зависимости эффективности гамма-облучения дрожжей от условий пострadiaционного воспитания // Радиобиология. 1962. Т. 2. № 6. С. 824–830.
- Корогодин В.И., Корогодина В.Л. Информация как основа жизни. Дубна: Феникс, 2000. 208 с.
- Корогодин В.И., Корогодина В.Л., Файси Ч. Функциональная концепция мутагенеза // Природа. 1990. № 2. С. 5–12.
- Кутлахмедов Ю.А., Поликарпов Г.Г., Корогодин В.И. Принципы и методы оценки радиоемкости экосистем // Эвристичность радиобиологии. Киев: Наук. думка, 1988. С. 109–115.
- Лобашев М.Е. Физиологическая (паранекротическая) гипотеза мутационного процесса // Вестн. ЛГУ. 1947. № 8. С. 10–29.
- Надсон Г.А., Филиппов Г.С. Образование новых резистентных рас микроорганизмов при действии X-лучей. Радиорасы *Sporobolomyces* // Вестник рентгенол. радиологии. 1932. Т. 10. С. 275–299.
- Шмальгаузен И.И. Избранные труды. Пути и закономерности эволюционного процесса. Т. 1; Организм как целое в индивидуальном и историческом развитии. Т. 2. М.: Наука, 1982.
- Cairns J., Overbaugh J., Miller S. The origin of mutants // Nature. 1988. V. 335. P. 142–145.
- Korogodin V.I., Kapultsevitch Yu.G., Myasnik M.N. *et al.* Cellular repair processes: survival of irradiated yeast, bacteria and phages under different postradiation conditions // Adv. in Biol. Med. Physics. 1968. V. 12. P. 253–274.
- Korogodin V.I., Korogodina V.L., Fajsci Cs. Mutability of genes depends on their functional state – a hypothesis // Biol. Zentbl. Bl. 1990. V. 109. P. 447–451.
- Ohno S. Evolution by Gene Duplication, 1970.

ДЖЕК ХАРЛАН – ВЫДАЮЩИЙСЯ АМЕРИКАНСКИЙ УЧЕНИК Н.И. ВАВИЛОВА

В.А. Соколов

Учреждение Российской академии наук Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: sokolov@mcb.nsc.ru;
Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства им. Н.И. Вавилова Российской академии сельскохозяйственных наук,
Санкт-Петербург, Россия;
Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

В статье сообщается о выдающемся американском ботанике, генетике и коллекционере растений Джеке Харлане. Он еще в детстве определился с выбором профессии и всю жизнь занимался изучением культурных растений и их сородичей с практической точки зрения. Много внимания в своей творческой деятельности им было уделено развитию идей Н.И. Вавилова о происхождении и распространении земледелия. Освещены вопросы эволюционных процессов у травянистых растений, впервые изученные Джеком Харланом.

Ключевые слова: центры происхождения, нецентры, комплоиды, агрокультура, цитогенетика гибридов.

В 2010 г. и в 2011 г. генетики и селекционеры растений отмечают несколько дат, связанных с именем выдающегося американского исследователя Джека Родни Харлана. Все они приурочены к выходу работ, расширивших идеи Н.И. Вавилова о центрах происхождения растений и развитии земледелия на нашей планете. (Список этих работ приведен в конце публикации). Рабочее название данной статьи было «Американский Вавилов», но оказалось, что именно с таким титулом вышли две публикации в США о нем. Повторение могло восприниматься как заимствование. Однако хотелось, чтобы эти два имени были связаны в заголовке данного сообщения. Поэтому, основываясь на мнении Дж. Харлана, написавшем о Н.И. Вавиллове: «... он был гигантом среди исследователей происхождения и доместикации культурных растений. Все, кто интересуется этой проблемой, являются его учениками», было решено дать вышеприведенное название.

Будущий почетный профессор и выдающийся исследователь культурных растений Джек Харлан родился 7 июня 1917 г. в семье Гарри Харлана и его жены Аугусты и был младшим из их

двух сыновей. Его профессиональные устремления определились еще в юном возрасте под влиянием профессиональной активности отца Г. Харлана, известного агронома и генетика, специалиста по селекции ячменя и коллекционированию диких сородичей. В детстве он провел несколько лет во Франции, где Харлан-старший помогал восстановлению хозяйства страны после первой мировой войны. С 1920 по 1944 гг. его отец был лидером исследований по ячменю в системе Министерства сельского хозяйства США, равно как и открывателем новых форм культурных растений. В летние месяцы отец брал сыновей на станцию в Абердин (Айдахо) и в Сакатон (Аризона), где наряду с работой по культурным растениям они занимались археологическими раскопками остатков древнеиндейской культуры. Возможно, в таких экспедициях и зародилась тяга к палеонтологическим исследованиям, столь блестяще осуществленным позднее Дж. Харланом. В 1932 г. в период прохождения VI генетического конгресса в Вашингтоне 15-летний Джек познакомился с выдающимся ученым из СССР Н.И. Вавиловым, который был принят в доме его родителей. Совсем юный, он



Слева направо: В.А. Соколов, Дж. Харлан, Ч. Дивальд – бывший дипломник Дж. Харлана. В Университете штата Оклахома. Июнь, 1996 г. Снимок сделан в Вудварде, куда Дж. Харлан прибыл в составе комиссии по проверке деятельности Станции южных равнин, где он работал с 1942 по 1951 гг.

с огромным вниманием следил за дискуссиями отца с советским путешественником и собирателем растений. Память об этой встрече, одном из самых ярких событий своей жизни, он хранил до конца своих дней. В 1996 г. при нашей встрече в Вудварде он сказал мне, что наибольшее в жизни впечатление как личность произвел на него Николай Вавилов. После окончания школы Дж. Харлан поступил в университет Дж. Вашингтона (Вашингтон), где в 1938 г. получил степень бакалавра. Он собирался продолжить учебу в аспирантуре у Н.И. Вавилова и даже изучал русский язык. Но этим надеждам не суждено было сбыться. Как он сам пишет в своей последней книге «The Living Fields» (1995), неудача с работой в СССР связана с трудностями в карьере Николая Ивановича, закончившимися его арестом и гибелью. Его отец постоянно обменивался письмами с Н.И. Вавиловым, и у них было условлено, что если письмо начинается со слов «My dear Dr. Harlan...», то в жизни Вавилова имеются какие-то проблемы. Если же письмо начинается «Dear Dr. Harlan...», то все более менее нормально. Когда Гарри Харлан написал Вавилову о возможной учебе сына в Ленинграде, то немедленно получил ответ: «My dear Dr Harlan, what you said about Chinese barley is very

interesting...». Поскольку отец ничего не писал о китайском ячмене, стало ясно, что у Вавилова какие-то проблемы и Джек не может поехать в СССР. Поэтому он поступил в аспирантуру Калифорнийского университета в Беркли, где получил степень доктора по генетике в 1942 г. Его руководителем был выдающийся ботаник и эволюционист Дж.Л. Стеббинс. В августе 1938 г. Дж. Харлан женился на Джин Йокум, и они прожили вместе 43 года, до ее смерти в 1982 г. У них было четверо детей: Су, Гарри, Шерри и Ричард. Получив докторскую степень, Дж. Харлан очень короткое время работал в железнодорожной компании в Гондурасе в качестве ассистента-исследователя. Позднее он получил постоянное место работы в качестве генетика в министерстве сельского хозяйства на исследовательской станции в Вудварде, где проработал с 1942 по 1951 гг., возглавляя программу по пастбищным растениям для Южных равнин. В 1951 г. Дж. Харлан перешел на другую исследовательскую станцию при Университете штата Оклахома в Стиллвотере и по совместительству занял должность профессора генетики. В 1961 г. он ушел из системы Министерства сельского хозяйства и стал полным профессором. В Университете Дж. Харлан читал курс «Классической эволюции

и эволюционной механики». Именно здесь у него зародилась идея коэволюции культурных растений и цивилизации. В Вудварде и позднее в Стиллвотере Дж. Харлан создал и внедрил много сортов фуражных культур, таких, как бородач «Вудвард», костер безостый «Саузленд», просо «Каддо», овес «Коронадо» и др. В Стиллвотере он организовал лабораторию биосистематики для изучения трех родов растений *Bothriochloa*, *Dichanthium*, *Capillidium*. Результаты этих исследований привели к пересмотру таксономических отношений между ними и была обоснована концепция «compilospecies» («компиловидов»). Эти три рода формируют полиплоидные агамные комплексы. Особый интерес вызывал вид *B. intermedia*. Оказалось, что он достаточно легко гибридизуется с другими растениями трибы Andropogoneae (в Северной Австралии с *Capillidium parviflorum* и *Bothriochloa ewartiana*, на северо-западе Пакистана и в Индии с *Dichanthium annulatum*, *Bothriochloa grahamii*, и обычным евроазиатским *B. ischaemum* и т. д.). Вид *B. grahamii* сам оказался продуктом гибридизации *Dichanthium annulatum* с расой *Bothriochloa intermedia* из долины р. Ганг. Почти все остальные виды этого сложного комплекса, как было экспериментально воспроизведено, также содержали либо значительную, либо небольшую часть генотипа *B. intermedia*. Более того, Харлан пришел к заключению, что в этом виде «генетически растворился» его предшественник. В коллекции Харлана имелось свыше 200 образцов этого вида из Южной и Восточной Африки, Южной и Юго-Восточной Азии, Индонезии, Новой Гвинеи и Австралии, но ни один из них не может быть с уверенностью назван его основной формой. Безусловно, что первооснова этого вида тетраплоидная. Рассматриваемый вид может служить моделью «compilospecies», т. е. вида брутального в генетико-эволюционном отношении (захватывающего у родственных форм при скрещиваниях ценные признаки и даже способного вполне ассимилировать некоторые из них). Такое поглощение может приводить к полному исчезновению ассимилированного вида и в то же время укреплять брутальный вид. Компилониды, таким образом, выступают как агрессивные генетические грабители, вбирающие наследственный материал родственных видов и способные расширять свои адаптивные

ресурсы. Полиморфность, широкая норма реакции, высочайшая пластичность и приспособляемость компилонидов, по-видимому, делает этот путь видообразования очень перспективным. Мягкая пшеница, сахарный тростник, мятлики *P. pratensis* могут служить классическими примерами брутальных компилонидов. Возможно, что апомиктические формы, входящие в агамные комплексы таких видов, могут играть роль шлюзов, впускающих потоки геномов от других видов и удерживающих их продолжительное время. Такое сосуществование может сопровождаться реконструкцией объединенного генома и формированием нового вида.

Здесь же, в лаборатории систематики, Дж. Харлан и его коллеги провели таксономический анализ родов *Synodon* и *Sorghum*. В результате этих исследований они предложили новую классификацию входящих в эти роды видов. Она основывалась на морфологии, географическом распространении, полевых наблюдениях, изучении коллекций и цитогенетики. В случае рода *Synodon* Харлан принял сторону таксономистов-«расщепленцев». Например, вид *S. dactylon* был разделен на 6 разновидностей. С другой стороны, культивируемое сорго было объединено им в одном виде, представленном несколькими базовыми расами: *bicolor*, *guinea*, *caudatum*, *kafr*, *durra*.

В 1966 г., отказавшись подписывать клятву на лояльность факультету, составленную администрацией, и продемонстрировав приверженность принципам академической свободы, Дж. Харлан ушел из Университета Оклахомы. Он перешел в Иллинойский университет в качестве профессора генетики растений на факультете агрономии. Годом позже он со своей коллегой Д. де Ветом (de Wet) основал лабораторию эволюции культурных растений. Лаборатория была космополитическим местом, в ней выполняли работы студенты-дипломники и аспиранты, стажировались ученые-визитеры со всего света. В начале 1983 г. Д. де Вет и Т. Химовитц подсчитали, что в лаборатории говорили на 19 языках. В Университете Иллинойса Дж. Харлан создал и читал уникальный курс «Культурные растения и человек». Позднее эти лекции составили основу всемирно известной книги с одноименным названием. Он был великолепным лектором, поскольку обладал хорошим английским языком и

был наделен тонким чувством юмора. Например, одна из его последних лекций в Иллинойсе называлась «Салат и сикаморы: секс и романтика в древнем Египте». Конечно, на лекцию с таким интригующим названием пришло огромное количество слушателей.

Представления, сформулированные А. де Кандоллом в 19-м веке по поводу происхождения культурных растений, позднее были существенно модернизированы. В 20-м веке мышление в этом направлении находилось под сильным влиянием идей Н.И. Вавилова. Он предложил концепцию центров происхождения. Для этого им были осуществлены глобальные исследования, хотя в некоторых районах они были неполны. Так, в Африке он описал эфиопский очаг происхождения, но им не были исследованы районы, прилегающие к Сахаре, где были доместцированы многие ценные растения. Он исследовал высокогорья Южной Америки, но оставил без внимания равнины, имеющие иной набор культурных форм. Н.И. Вавилов указал на 8 мировых центров происхождения большинства культурных растений. Дж. Харлан уточнил и обновил эту концепцию, включив представления о пространстве, времени и разнообразии. Он считал, что теория Вавилова не является абсолютом и, отдавая должное его точному определению трех центров происхождения (Перу, Мексика и Палестина), уточнил неопределенности, имевшие место в пяти других, указанных Николаем Ивановичем. Так, в частности, Джек Харлан указал на то, что район, прилегающий к Сахаре, также является независимым центром происхождения культурных растений. Он очень внимательно прочел работы Н.И. Вавилова, но по мере изучения культурных растений и их сородичей обнаружил, как и некоторые другие исследователи, что центры происхождения, описанные Николаем Ивановичем, являются и центрами разнообразия. Кроме того, они же – и центры сельскохозяйственной деятельности, которые могут быть местами эволюции культурной флоры, или центры доместикации. Он синтезировал свои наблюдения в ставшем классическим труде «Agricultural Origin: Centers and Noncenters», вышедшем в 1971 г. В этой работе было обосновано понятие о «нецентрах» как дополнение к идее Вавилова о центрах проис-

хождения и разнообразия культурных растений. «Я предполагаю, что агрокультура возникла независимо в трех различных регионах и в каждом из них наряду с центрами существовали нецентры, где доместикационная активность простиралась на 5–10 тыс. километров. Одна из таких систем включала центр на Ближнем Востоке и нецентр в Африке; другая центр в Северном Китае и нецентр в Юго-Восточной Азии; и третий центр включал Центральную Америку и североамериканский нецентр. Культурные растения не обязательно происходили из центра». Дж. Харлан переработал эти представления спустя 25 лет и изложил в книге «The Living Fields», вышедшей в 1995 г. В ней он много размышлял над возникновением феномена культурного растениеводства. Он считал, что не следует и невозможно указать время или место, где возникло земледелие, потому что оно произошло неодномоментно. Земледелие – не результат счастливого случая, идеи, открытия, божьего провидения или дара. По всей видимости, это результат длительной коэволюции между растениями и человеком. Животных во внимание не берем, так как 90 % пищи мы получаем от растений. Коэволюция имела место многие тысячелетия на огромных территориях. Происходило много независимых событий во многих местах, которые, сливаясь во времени, дали эффективные системы производства пищевых продуктов. Таким образом, можно заключить, что происхождение агрокультур размыто во времени и пространстве». Отсюда видно, что идея пространственной разобщенности и многократного окультуривания растений, впервые сформулированная им в 1951 г. в работе «Анатомия генных центров» и развитая в статье «Происхождение агрокультуры: центры и нецентры», на протяжении десятилетий была в поле внимания Дж. Харлана. Он подчеркивает, что история – это не набор фактов и дат, а то, что определяет наше настоящее и будущее. В этой работе Дж. Харлан высказал свои взгляды на историю развития производства растительной продукции в мире. Он весьма обоснованно описал, кто, когда, где, почему и как в мире начал и развил возделывание агрокультур. Он также указал на уязвимость будущих проблем с производством пищи. Почему, как и где началось производство растительной продукции

не известно до сих пор. И почему некоторые племена остаются охотниками-собираателями – это их выбор или необходимость? Долго считалось, что это вынужденная необходимость. Но бушмены и австралийские аборигены только около половины недели проводят в поисках пищи. Как писал Дж. Харлан, оценка энергетической ценности их пищи подтвердила библейскую версию о том, что агрокультура – это проклятие, а не благословение, и его нужно по возможности избежать. Ближний и Дальний Восток, Африка и Латинская Америка, каждый из этих регионов внес свой вклад в современное аграрное производство. Дальнейшие главы содержат материалы о необыкновенных моментах доместикизации и распространения традиционной технологии возделывания растений, а также поддержания паров, орошения и хранения урожая. И если кто-либо полагает, что мы сильно обязаны Плодородному Полумесяцу или Азии как главным источникам ранней агрокультуры, то Дж. Харлан считает, что все инноваторы из аборигенов Америки заслуживают особой похвалы. Они domesticiровали наиболее важные пищевые растения, широко известные в мире: кукурузу, картофель, маниок, батат, бобы, арахис, тыкву, перец, томаты, хлопок, многие фрукты, некоторые виды ароматических растений и орехи. Они отобрали прекрасные декоративные цветы и были мастерами в биохимии, экспертами по детоксикации и экстракции психоактивных соединений и восстановительной медицине.

Но происхождение культурных растений – это не то же самое, что возникновение сельского хозяйства, хотя конечно они родственны. Сельское хозяйство должно иметь соответствующие центры происхождения растений, равно как и географические точки его начала. Большинство исследований, детализированных археологическими и историческими данными, указывают на Ближний Восток. В основном это пшеница и ячмень, хотя показано использование гороха, корнеплодов и других. Но основные растения – пшеница и ячмень, которые в дальнейшем распространялись на запад вдоль побережья Средиземного моря, по побережьям Африки и Европы, а далее через Балканы в Западную Европу, на Британские острова, в Скандинавию и Россию. Они распространились на Эфиопское

плато и далее в Индию. В Индии они возделывались в горных условиях и в зимний сезон на равнинах. Они дополняли рис, сорго, и просо – летние злаки. Пшеница и ячмень стали важнейшими культурами в Китае и Японии, но не нашли достойной ниши в Юго-Восточной Азии, где рис остался доминирующей культурой.

Вместе с тем, независимое сельское хозяйство возникло в Африке. Здесь около Сахары были domesticiрованы некоторые растения вне очевидных центров, но активно распространены от Атлантики до Индийского океана (сорго, жемчужное просо и чина, африканский рис и др.). Эфиопия дала небольшой набор растений, некоторые из которых растут до сих пор. Сюда входят полевичка, гвизотия, или негритянские семена, и бананы, кроме того, там встречаются некоторые виды капусты. Эфиопия имеет признаки центра, а районы около Сахары – таковых не имеют. Возможно, агрокультура была привнесена туда с Ближнего Востока.

В северном Китае развитая агрокультура датируется 8,5 тыс. лет до рождения Христа. Многие ранние участки возделывания расположены на лессовых террасах вдоль Желтой реки. Наиболее ранними культурами были просо и чумиза. Этот регион сельского хозяйства характеризуется множеством видов овощей, как листовых, так и корнеплодных. Рис возделывался на равнинах в долине дельты р. Янцзы. Отсюда он распространился в Индию и на юг до Индонезии.

В Новом Свете – это Южная Мексика и прилегающие районы, агрокультура базировалась на кукурузе. Далее она распространилась до Канады и вниз в Южную Америку. Конечно, возделывались и другие растения, но кукуруза была доминирующей. В Южной Америке агрокультурой для высокогорий были клубневые, в частности картофель, который стал важной культурой для Северной Америки и других географических районов с умеренным климатом. Для равнин главной культурой был адаптированный к влажному тропическому климату маниок, очень важный источник крахмала.

Работа Дж. Харлана по вовлечению новых видов растений легендарна по собранному числу образцов (около 12 тыс.) и их разнообразию. Эта коллекция является его вкладом в генные банки по всему свету и особенно в США. Она

включает виды пшеницы, ячменя, кукурузы, кормовых бобовых и трав, крупносемянных бобовых, лесных деревьев и декоративных форм. Дж. Харлан быстро осознал огромное значение диких сородичей как ресурса генов для селекции. Хотя эта концепция не была новой, он вместе с Д. де Ветом формализовал ее в концепцию пула генов для селекционного использования, которая изложена в работе «К рациональной классификации культивируемых растений». Они понимали, что, с одной стороны, формальный метод, используемый в таксономии, не совсем точен при классификации культурных растений. С другой стороны, селекционеры приняли свою собственную неформальную систему группирования растений по родству. Харлан и де Вет решили примирить эти два подхода путем создания унифицированной классификации. Они распределили общий пул генов культивируемых растений и близких родственников по трем уровням – первичному, вторичному и третичному. К первичному уровню были отнесены пулы генов (GP-1) культурных растений и их диких сородичей того же вида. Внутри представителей этого пула гибридизация осуществляется без проблем и получают плодовитые гибриды, поскольку хромосомы нормально конъюгируют. К вторичному пулу (GP-2) относятся формы, которые могут обмениваться генами с domesticiрованными растениями (поскольку близкородственны). Внутри этого пула перенос генов весьма затруднен, но возможен. Гибриды между растениями этого пула в значительной степени стерильны, а хромосомы либо вообще не конъюгируют, либо конъюгируют слабо. И, наконец, третичный пул (GP-3) включает растения родственных видов, к которым принадлежат и культурные растения. Гибридизация диких представителей с культурными формами возможна, но получаемое потомство, как правило, летально или полностью стерильно. Перенос генов возможен только с использованием специальной техники (культура эмбрионов, удвоение хромосом или использование видов-мостов). Потенциальная польза от коллекционных образцов не всегда может быть понята в поле при обнаружении растений. Это хорошо иллюстрируется пшеницей (PI 178383), которая была найдена в 1948 г. в Восточной Турции. Она имеет тонкий высокий стебель, сильно полегаёт,

поражается листовой ржавчиной, не зимостойка и плохо яровизируется, а также не годится для приготовления хлеба. По этим причинам на нее никто не обращал внимания более 15 лет. Неожиданно штриховатая ржавчина стала серьезной проблемой в северо-западных штатах США, и выяснилось, что образец PI 178383 устойчив к четырем расам этого заболевания, 35 расам общей головни, 10 расам карликовой головни, достаточно устойчив к стеблевой головне и снежной плесени. Использование в качестве донора устойчивости этой линии позволило сберечь миллионы долларов ежегодно. В своих экспедициях по сбору диких сородичей культурных растений Дж. Харлан был глубоко впечатлен тесной ассоциацией сорняков и культурных растений: на Среднем Востоке это были пшеница и определенные диплоидные сорняки; в Африке в местах культивирования сорго – его дикие расы; в Азии – как культурный, так и сорный рис; в Центральной Америке и Мексике – кукуруза и теосинте. Харлан пришел к выводу, что такие сорняки являются естественным банком генов, используемых как источник устойчивости против болезней и насекомых и расширяющих норму реакции к внешним условиям. После «зеленой революции» и массового распространения в мире близкородственных сортов короткостебельной пшеницы в статье «Genetic Disaster» (1972) Дж. Харланом была поднята и заострена проблема опасности унификации. В ней он сформулировал концепции о генетической уязвимости и генетической опасности. Эта работа напоминала о необходимости поддержания коллекций не только в местах обитания, но и в специальных резервациях (*ex situ*), что важно с практической точки зрения, как было показано в статье «Evolution of cultivated plants» (1970). Он считал, что ради будущих поколений мы должны собирать и изучать диких и сорных сородичей культивируемых растений также тщательно, как и уже domesticiрованные разновидности. Этими ресурсами в прошлом неосмотрительно пренебрегали, но будущее не должно быть к этому безразлично. В завтрашних селекционных программах мы не должны игнорировать ни одного источника полезных генов.

Его точка зрения на подходы по сбору и поддержанию генетических коллекций была рас-

крыта в нескольких статьях после 1960–1970 гг., однако вначале она не получила должного внимания. Тем не менее Дж. Харлан продолжал действовать в направлении современных подходов в деле охраны растительных ресурсов как системе сбора коллекций, документирования, оценки и сохранения *ex situ*. Международная комиссия по генетике растений совместно с Международным институтом генетических ресурсов растений для этой цели создали международную консультативную группу. Это было сделано специально для организации таких междисциплинарных исследований в мире.

Дж. Харлана весьма беспокоило то, что цивилизация неумолимо разрушает материальную и духовную культуру аборигенов или, как он говорил, то что прошлое уничтожается настоящим. При этом теряются и генетические ресурсы в связи с переходом племен на новую систему земледелия. Он заострил этические проблемы сбора, коллекционирования и использования собранных материалов. Ничто не должно быть украдено. Никакого «воровства» – аналоги образцов обязательно должны оставаться в местах их сбора.

Дж. Харлан получил широкое мировое признание и был избран в Национальную академию наук США в 1972 г. и в Американскую академию наук и искусств в 1975 г. и в 1965–1966 гг. он был президентом американского общества наук о культурных растениях «Crop Science Society of America». В 1948 г. он предпринял поездки в Турцию, Сирию, Ливан и Ирак. В 1960 г. при поддержке Министерства сельского хозяйства США он провел экспедиции в Иран, Афганистан (об этом путешествии он отснял прекрасный фильм), Пакистан, Индию и Эфиопию. Он был консультантом ФАО в 1970–1979 гг. В 1974 г. Дж. Харлан был выбран в первую делегацию ученых агрономов, посетивших КНР. Дж. Харлан был участником многих археологических раскопок. Так, с 1963 г. он был участником Иранского доисторического проекта и Турецкого проекта 1964 г., а также участником Археологического проекта по Мертвому морю в 1977, 1979 и 1983 гг. В знак признания его заслуг в деле изучения растений в 1997 г. в Сирии был проведен международный симпозиум в его честь.

Ранее уже отмечались принципиальность и высокие этические качества Дж. Харлана как

ученого и человека. Но еще хотелось подчеркнуть его активное отстаивание нравственных позиций. Это ярко проявилось во время Генетического конгресса в США в 1973 г. Когда советская делегация генетиков предложила следующий конгресс провести в СССР, то многие делегаты отказались поддержать это предложение. Причиной этих возражений были сомнения в возможности беспрепятственного получения делегатами въездных виз, в частности, Ф. Добржанским. Провести же конгресс в СССР было необходимо, прежде всего, как выполнение долга перед предвоенным поколением советских генетиков. Дело в том, что конгресс, запланированный на 1937 г. в Москве, был отменен, а некоторые члены оргкомитета расстреляны. По этой причине советская делегация во главе с академиком Д.К. Беляевым предпринимала все усилия для получения права проведения конгресса в Москве. У Дмитрия Константиновича, кроме прочего, были и личные причины бороться за проведение его в СССР, поскольку старший брат – Николай Константинович Беляев, известный генетик, тоже был арестован и погиб в 1937 г. Решение о месте проведения конгресса принимается голосованием делегатов от национальных генетических организаций. Поскольку все происходило вскоре после ввода войск Варшавского договора в Чехословакию, то результаты могли быть неблагоприятными, что нашло отражение в дискуссии о возможности проведения конгресса в Москве. В частности, активно отрицательную позицию занял известный югославский генетик и селекционер Славко Бороевич. Тем не менее благодаря последовательной поддержке и авторитету Дж. Харлана удалось провести решение о проведении конгресса 1978 г. в Москве, где он и состоялся.

В 1984 г. Дж. Харлан перебрался в Новый Орлеан поближе к сыновьям и до своей кончины в августе 1998 г. работал адъюнкт-профессором в Университете Тулейна. Дж. Харлан был разносторонним человеком и интересовался музыкой, иностранными языками, птицами, музеями, книгами и плаванием под парусом. Он считал, что образование настоящего ученого не заканчивается на получении PhD, а должно носить непрерывный характер в течение всей жизни.

Работа выполнена при поддержке гранта
Интеграционный проект СО РАН № 53.

**Список избранных трудов Дж. Харлана,
некоторые из них выполнены
в соавторстве с коллегами**

Anatomy of gene center // Amer. Nat. 1951. V. 85.
P. 97–103.

Geographic origin of plants useful to agriculture // Germ
Plasm Resources / Ed. R.E. Hodgson. Washington
D.C., 1961. P. 3–19.

Agricultural origins: Centers and Noncenters // Science.
1971. V. 174. P. 468–474.

The origin and domestication of *Sorghum bicolor* //
Econ. Bot. 1971. V. 25. P. 128–135.

The Early History of Wheat: Earliest Traces to Sack of
Rome. Cambridge Univ. Press, 1981. P. 1–19.

Crop and Man. Wisc.: American Society of Agronomy,
1975.

The Living Fields: Our Agricultural Heritage. N.Y.:
Cambridge Univ. Press, 1995.

Apomixis, polyploidy and speciation in *Dihantium* //
Evolution. 1970. V. 24. P. 270–277.

JACK HARLAN, A PROMINENT AMERICAN N.I. VAVILOV'S DISCIPLE

V.A. Sokolov

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: sokolov@mcb.nsc.ru;

N.I. Vavilov All-Russian Research Institute of Plant Industry, St. Petersburg, Russia;
Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

Summary

The article is dedicated to the prominent American botanist, geneticist, and collector of plants Jack Harlan. He made the choice of his occupation in his childhood and devoted his life to practical studies of crops and their relatives. He contributed much to the development of N.I. Vavilov's ideas on agriculture origin and spread. Problems of evolutionary processes in herbs first studied by Jack Harlan are considered.

Key words: centers of origin, noncenters, compilospecies, crop species, cytogenetics of hybrids.

ФЕНОТИПИЧЕСКОЕ И ГЕНОТИПИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ *LATHYRUS SATIVUS* L. ИЗ КОЛЛЕКЦИИ ВИР

М.О. Бурляева, М.А.Вишнякова

ГНУ ВИР Россельхозакадемии, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: m.burlyaeva@vir.nw.ru

Изучены образцы введенного в культуру вида *Lathyrus sativus* L. из коллекции ВИР по комплексу морфологических и фенологических признаков и посредством RAPD-маркирования. По результатам канонического и дискриминантного анализов в качестве значимых морфологических признаков (из 30 изученных) для классификации внутривидового разнообразия выделены тип куста, окраска семенной кожуры, диаметр и ширина крыльев стебля, толщина боба и высота семени. При этом обнаружена их взаимосвязь с происхождением образца. Группирование образцов на основе RAPD-анализа отразило наличие двух подвидов и нескольких экологических типов почвы в соответствии с имеющейся внутривидовой классификацией. В целом данные молекулярного анализа отражают эколого-географическую дифференциацию изученных образцов и их филогению. По степени генетической оригинальности – частоте встречаемости аллелей – выявлены образцы с уникальными аллелями, которые могут оказаться полезными для селекции.

Ключевые слова: *Lathyrus sativus*, чина посевная, фенотипическое и генетическое разнообразие, RAPD-анализ, коэффициент генетической оригинальности.

Введение

Lathyrus sativus L. (чина посевная) – однолетняя бобовая культура, имеющая обширный ареал (рис. 1). Основные районы ее возделывания – страны с засушливым и полусушливым климатом. В диком или одичавшем виде встречается крайне редко: в степях около Каспийского моря, в окрестностях г. Ленкорань, в северных районах Индии и как сорное растение – среди злаковых и бобовых культур в западном Средиземноморье и в горных районах Юго-Западной Азии (Памир).

В коллекции Всероссийского НИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова (ВИР) вид представлен 950 образцами практически из всех частей ареала. Он имеет важное экономическое значение в качестве кормовой и отчасти продовольственной и технической культуры. Выявление внутривидового полиморфизма культуры – важная составляющая процесса изучения коллекции. Познание эволюции вида, его географии, путей расселения и истории доместики важно для селекционного улучшения культуры.

Существует несколько внутривидовых классификаций чины посевной, из которых наиболее информативной мы считаем классификацию, созданную в ВИР монографом вида Ф.Л. Залкинд (1937, 1953). В ее основе – эколого-географическая дифференциация вида, выявляющаяся по комплексу морфологических и хозяйственно-биологических признаков. Географическая обособленность ареалов растений с темноокрашенными и светлоокрашенными семенами и цветками дала основание для выделения двух подвидов (климатипов): *ssp. asiaticus* и *ssp. europaeus*. Впоследствии эти подвиды были узаконены Т.Н. Смекаловой (1991) в соответствии с современными требованиями ботанической номенклатуры как *ssp. sativus* и *ssp. albus* Smekal.

Ф.Л. Залкинд (1937) выделила 30 разновидностей, объединенных в 7 групп – географических ветвей или экологических типов (рис. 2). Она отметила, что разновидности не имеют строго ограниченных ареалов, хотя имеют некоторую определенность и закономерности в распределении.



Рис. 1. Ареал *L. sativus* (по: Ф.Л. Залкинд, 1937).

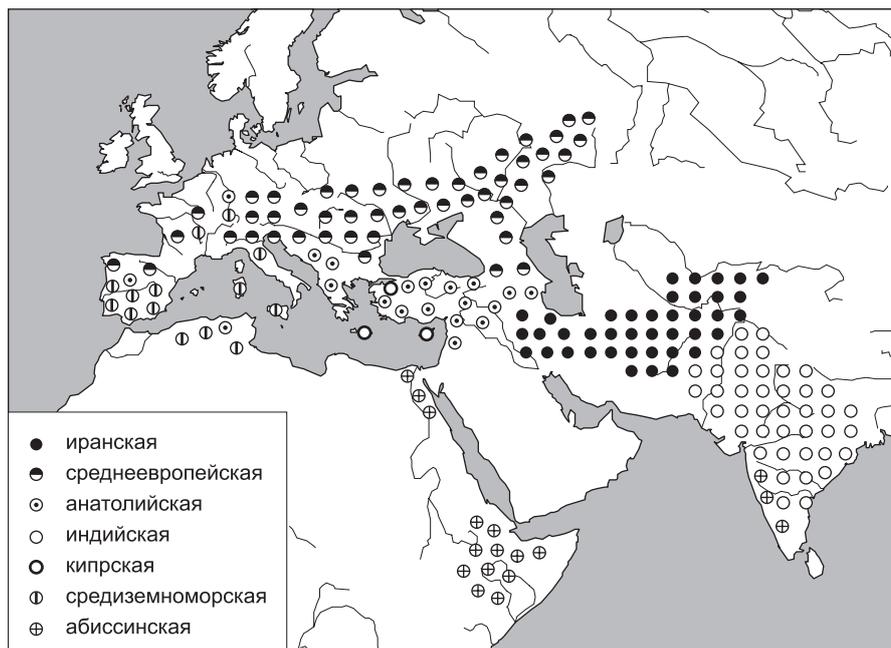


Рис. 2. Географическое распространение групп разновидностей *L. sativus* (по: Залкинд Ф.Л., неопубл. данные).

Первичным центром формообразования вида считается Северная Индия и прилегающие к ней районы – там до настоящего времени сохранились эндемичные наиболее примитивные формы. Средиземноморье – район вторичного

формообразования культурного типа чины, при этом прибрежные и горные экотипы сильно различаются. Чины из горных районов Испании и Эфиопии по своим морфологическим признакам сходны с азиатскими (индийскими)

чинами, что говорит о связи между ними и о том, что ранее ареал азиатских чин был более обширным и охватывал все древнее Средиземноморье (Залкинд, 1937).

Судя по классификации Ф.Л. Залкинд (1937, 1953) и последующим исследованиям, чина посевная отличается значительным внутривидовым полиморфизмом (Przybylska *et al.*, 1998; Tadesse, Bekele, 2003; Polignato *et al.*, 2005; Hanbury *et al.*, 2006; Sammour *et al.*, 2007 и др.). Это подтверждено на уровне белковых и молекулярных маркеров (Croft *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 2007 и др.). Данные, полученные на основе анализа изоферментов, свидетельствуют о большом полиморфизме мирового разнообразия чины посевной, обнаруживая наличие генетического сходства образцов из различных географических точек земного шара и нередко – отсутствие генетической близости образцов одного географического происхождения (Gutierrez-Marcos *et al.*, 2006). Высокая изменчивость белковых фракций у образцов одного географического происхождения была показана и другими исследователями (Roy *et al.*, 2001). AFLP-маркеры выявили значительное разнообразие даже у популяций, растущих в сравнительно небольшом районе Центральной Италии, при этом принципиальное генетическое различие выявилось между мелко- и крупносемянными формами (Tavoletti, Iommarini, 2007).

Начато картирование генома чины посевной с целью определения маркеров хозяйственно ценных признаков. Определено несколько групп сцепления RAPD-маркеров, окраски цветка и двух изоферментов (Choudhury, Slinkard, 1999). На образцах, устойчивых и восприимчивых к *Mycosphaerella pinodes* (Berk. and Blox.) Vestergren, показана перспективность PCR-RFLP-маркеров для маркирования генов устойчивости к этой болезни (Skiba *et al.*, 2003).

Целью нашего исследования было изучение внутривидового разнообразия чины посевной из коллекции ВИР на основе анализа фенотипических признаков, а также поиск RAPD-маркеров, выявляющих внутривидовую дифференциацию генофонда. Кроме того, в наши задачи входило определение частоты встречаемости редких аллелей с помощью коэффициента генетической оригинальности (КГО) у представителей разных эколого-географических групп.

Материал и методы

Растительный материал. Исследовали 35 образцов *L. sativus*, отобранных из коллекции ВИР, принадлежащих по классификации Ф.Л. Залкинд (1937, 1953) к различным эколого-географическим группам: (средиземноморской – страны Средиземноморья; средневропейской – Средняя Европа и европейская часть России, Закавказье (светлосемянные формы); кипрской – о-ва Кипр и Крит; анатолийской (псевдоазиатская) – Малая Азия, Закавказье (темносемянные формы), горная Кабилия; иранской – Афганистан, Иран, Средняя Азия; абиссинской – Эфиопия, Египет; индийской – Индия) и одного представителя вида чина красная *L. cicer* L. (табл. 1). Изученные образцы являются типовыми для вышеперечисленных групп чины посевной.

Фенотипическое изучение образцов проводили на Екатеринбургской опытной станции ВИР (Тамбовская область) и в Пушкинском филиале ВИР (г. Пушкин) в 2005 и 2007 гг. Анализировали по 10 растений каждого образца по 30 признакам: высота растения (см), тип куста, число ветвей первого и второго порядка, высота до прикрепления первого боба (см), диаметр стебля (мм), длина среднего междоузлия (см), длина листа (см), ширина листа (мм), длина листочка (см), ширина листочка (см), длина цветоноса (см), длина чашечки (мм), длина венчика (мм), окраска венчика (балл), число бобов на растении (шт.), длина боба (мм), ширина боба (мм), толщина боба (мм), число семян в бобе (шт.), масса 1000 семян (г), длина семени (мм), ширина семени (мм), высота семени (мм), окраска семенной кожуры (балл), окраска рубчика (балл), продолжительность периодов: всходы–начало цветения, всходы–налив бобов, всходы–созревание (дни). Всего было проанализировано 1440 растений.

Выделение ДНК. Выделение ДНК осуществляли по методике S. Edwards с соавт. (1991) из 10–14-дневных проростков индивидуальных растений каждого образца, а также смеси из 5–10 проростков одного образца. Для полимеразной цепной реакции использовали наборы реактивов производства «Диалат ЛТД». Реакционная смесь для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) объемом 25 мкл содер-

Таблица 1

Список изученных образцов

Каталог ВИР	Происхождение	Эколого-географическая группа	Примечание
704(1)	Италия	средиземноморская	
704(2)	Италия	средиземноморская	
705	Эфиопия	средиземноморская	
773	Испания	средиземноморская	
775	Испания	средиземноморская	
390	Кипр	кипрская	
393	Кипр	кипрская	
401	Восточный Кипр	кипрская	
407	Кипр	кипрская	
408	Кипр	кипрская	
772	Испания (Севилья)	анатолийская	
800(1)	Малая Азия	анатолийская	Крупные семена
800(2)	Малая Азия	анатолийская	Мелкие семена
801(1)	Малая Азия	анатолийская	Крупные семена
801(2)	Малая Азия	анатолийская	Мелкие семена
413	Алжир	анатолийская	
415	Алжир	анатолийская	
416	Алжир	анатолийская	
592	Эфиопия	абиссинская	
701	Эфиопия	абиссинская	
964	Грузия	среднеевропейская	
965(1)	Грузия	среднеевропейская	Белые семена
965(2)	Грузия	среднеевропейская	Бурые семена
240	Германия	среднеевропейская	
936	Аргентина	среднеевропейская	
1218	Украина	среднеевропейская	
1246	Россия	среднеевропейская	
13	Иран	иранская	
841	Памир	иранская	
998	Памир	иранская	
22(1)	Индия	индийская	Мелкие семена
22(2)	Индия	индийская	Крупные семена
583(1)	Индия	индийская	Низкорослые растения
583(2)	Индия	индийская	Высокорослые растения
1684	Сирия		<i>L. cicera</i>

жала 50 нг геномной ДНК, 10 мМ TAG буфера pH 8,6 25м Mg²⁺, 0,2 мМ каждого dNTPs, 1 мкМ праймера, 0,2 ед. Taq-полимеразы.

RAPD-анализ. Использовали 14 стандартных десятинуклеотидных праймеров серии

OPA, OPN, OPK, OPC (Operon Technologies, USA): OPA10, OPA11, OPA14, OPA16, OPA19, OPN2, OPN3, OPN4, OPN6, OPN9, OPK4, OPK8, OPK9 и OPK10 (Operon Technologies, USA). ПЦР проводили в амплификаторе Teche (США) в

следующих условиях: предденатурация – 5 мин при 94 °С; 38 циклов: денатурация – 30 сек при 94 °С, отжиг праймера – 45 сек при 37 °С и синтез – 50 сек при 72 °С; элонгация – 10 мин при 72 °С. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 1,8 %-м агарозном геле в 1 × TAE буфере с добавлением этидиум бромид и фотографировали с помощью Transilluminator UVP Bio Doc-It™ Imaging System, модель M-20. Размеры амплифицированных фрагментов определяли относительно маркера 1 kb SmartLader 1700-02. RAPD-анализ всех образцов проводили в 2–3 повторностях, и только в случае воспроизводимости фрагменты включались в анализ.

Статистический анализ данных. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакетов программ STATISTICA 6.0, NTSYSpc 2.02, TREECON и WINCLADANONA.

Статистический анализ включал составление бинарных матриц по каждому из праймеров, в которых отмечалось «присутствие» (1) или «отсутствие» (0) фрагментов с одинаковой молекулярной массой на электрофореграмме. Каждый RAPD-фрагмент рассматривался как отдельный генетический локус. На основании суммарной матрицы RAPD-спектров с помощью компьютерного программного пакета NTSYSpc 2.02 были определены генетические дистанции между исследуемыми образцами. Для построения кладограммы, отражающей генетическое сходство образцов или филогенетическую близость таксонов, применяли метод невзвешенного парногруппового кластерного анализа с арифметическим усреднением (UPGMA) с использованием программы TREECON. Для построения наиболее оптимального дерева (критерий оптимальности – максимальная парсимония) использовали программу WINCLADANONA.

Изучение образцов по встречаемости у них редких аллелей проводили при помощи коэффициента генетической оригинальности (КГО) в Excel из пакета Microsoft Office 2003 и в пакете программ STATISTICA 6.0 (Потокина, Александрова, 2008).

Анализ морфометрических признаков осуществляли с помощью дискриминантного и канонического анализа с использованием программы STATISTICA 6.0.

Результаты и обсуждение

Для выявления из изученного нами комплекса 30 морфологических и фенологических признаков, значимых для внутривидовой классификации чины посевной, был проведен пошаговый дискриминантный анализ с последовательным исключением признаков. Это позволяет произвести перегруппировку данных и вычислить значения дискриминантной функции, которая отличается минимально возможной трансгрессией своих распределений в исследуемых совокупностях (группах). Использование полученной дискриминантной функции позволяет отнести отдельно взятое наблюдение (образец) к одной из этих совокупностей. Достоверные различия образцов по группам были получены по 7 признакам: тип куста, окраска семенной кожуры, диаметр стебля, ширина листа и крыльев стебля, толщина боба и высота семени. Число переменных в дискриминантной функции (модели) было равно 7, значения лямбды Уилкса равнялось 0,014, т. е. мощность дискриминации была близка к 1.

При анализе расположения образцов по группам в классификационной матрице дискриминации (табл. 2.) было отмечено, что ряд образцов, первоначально отнесенных по классификации Ф.Л. Залкинд (1937) к определенной эколого-географической группе, находятся в других группах. При рассмотрении квадратов расстояний Махаланобиса для данных случаев было обнаружено, что эти образцы находятся примерно на одинаковом расстоянии от разных групп. Например, образцы из Грузии, относящиеся к среднеевропейской группе, располагаются примерно на равных расстояниях как от средиземноморской, так и от иранской групп, более тяготея к первой. Подобная картина в распределении образцов наблюдалась и для К-800 и К-801 из Малой Азии, которые были близки и к анатолийской, и среднеевропейской группе. Такое положение данных образцов можно объяснить отсутствием значительных различий по изученным нами признакам между вышеперечисленными группами. Возможно также, что образцы из Грузии являются гибридами образцов из иранской и средиземноморских групп. О возможности естественной гибридизации (ауткроссинга) и низком проценте самоопыле-

Таблица 2

Классификационная матрица

Группы	Корректное определение (%)	Группы (по результатам классификации)						
		1	2	3	4	5	6	7
1 – средиземноморская	57,2	4	0	3	0	0	0	0
2 – абиссинская	100,0	0	2	0	0	0	0	0
3 – средневропейская	71,4	0	0	5	2	0	0	0
4 – анатолийская	83,3	0	0	0	5	0	0	1
5 – кипрская	100,0	0	0	0	0	5	0	0
6 – индийская	100,0	0	0	0	0	0	5	0
7 – иранская	100,0	0	0	0	0	0	0	4
Всего	85,7	4	2	8	7	5	5	5

ния у европейского климатипа упоминается и в исследовании Ф.Л. Залкинд (1937). Степень ауткроссинга у вида *L. sativus*, по оценкам разных авторов, может варьировать от 17 % (Дорофеев и др., 1990) до 36 % (Choudhury, Slinkard, 1999). В целом распределение образцов в полученной нами классификационной матрице практически совпадает с их внутривидовой классификацией, данной Ф.Л. Залкинд (1937), которой мы пользуемся при систематизации коллекции (табл. 1).

Интересно отметить, что включенный в исследование близкий к чине посевной вид чина красная (*L. cicera* L.), характеризующийся широкой амплитудой изменчивости признаков (Залкинд, 1937) и по классификациям некоторых исследователей относящийся к *L. sativus*, не занимал обособленного положения на графике и располагался примерно на одинаковом расстоянии от анатолийской и иранской групп и в классификационной матрице оказался в иранской группе.

Для выяснения закономерностей межгрупповой вариации признаков был проведен канонический анализ. В результате были выделены две основные канонические оси. С первой канонической осью (R1) были связаны признаки: тип куста, окраска семенной кожуры, диаметр стебля, ширина листа и крыльев стебля, толщина боба, а со второй (R2) – число семян в бобе и высота семени.

Таким образом, и канонический, и дискриминантный анализы выявили, что значимыми признаками при классификации внутривидового разнообразия образцов являются тип куста,

окраска семенной кожуры, диаметр стебля и ширина крыльев стебля, ширина листа, толщина боба и высота семени. При этом в ходе проведенного статистического анализа всех изученных признаков была выявлена их четкая взаимосвязь с происхождением образца. По своим морфометрическим признакам образцы объединились в несколько групп (рис. 3).

Образцы из Италии, Кипра, Испании и образец из Алжира обладают максимальной высотой растений, сильной ветвистостью, самыми широкими крыльями стебля, светлыми семенами, средней высотой семян и бобов (средиземноморская, анатолийская группы). Образцы из Сирии, Ирана, Памира и Индии отличаются низкорослостью, слабой ветвистостью, узкими крыльями стебля, темными семенами и средней высотой семян и бобов (индийская, иранская группы). В левой части графика находятся местные сорта из Алжира, Эфиопии, Украины, Германии, России, Аргентины, имеющие средние показатели по параметрам: высота растения, ветвистость, ширина крыльев стебля и окраска семенной кожуры, плоские бобы и семена (анатолийская, абиссинская, средневропейская группы). Образцы из Грузии (средневропейская группа), имеющие схожий габитус растений и относящиеся к средневропейской группе, отличаются от последних максимальной высотой семян и толщиной бобов.

Таким образом, по совокупности морфометрических признаков четко дифференцированными оказались 4 группы образцов: 1) из Западного и Среднего Средиземноморья (Испа-

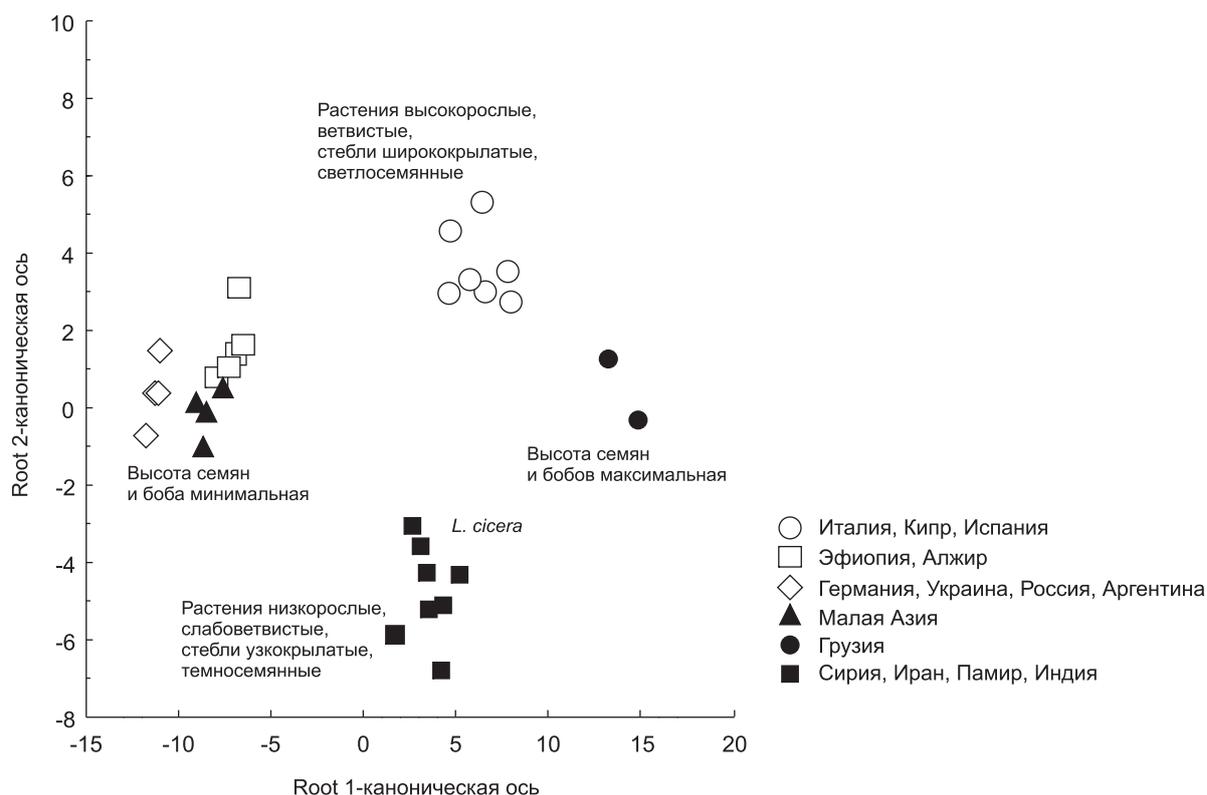


Рис. 3. Распределение образцов *L. sativus* разного географического происхождения и образца *L. cicera* в пространстве двух канонических осей по результатам морфометрической оценки.

ния, Италия, Кипр); 2) из Грузии; 3) из Средней, Центральной, Юго-Западной и Южной Азии; 4) из Северной Африки, Средней и Восточной Европы и Малой Азии (условно Восточного Средиземноморья). Образец из Аргентины, попавший в группу образцов из Германии, Украины и России, является селекционным сортом и, видимо, имеет европейское происхождение. Такое распределение образцов не полностью совпадает с экологическими типами, выделяемыми по Ф.Л. Залкинд (1937). Оно выявляет более крупные группировки, но в целом не вступает в противоречие с ее классификацией. В нашем исследовании объединились образцы из близких средиземноморской и кипрской групп; сравнительно смешанную группу сформировали местные сорта из географически близких иранской и индийской групп, а образцы из анатолийской, абиссинской и средневропейской групп образовали ассоциации с не очень строго определенной спецификой и значительной трансгрессией, что характерно для форм с промежуточными или перекрывающимися признаками и вполне

согласуется с пограничным положением их ареала. Как переходную между азиатским и европейским типами анатолийскую (псевдоазиатскую) группу характеризует и Ф.Л. Залкинд (1937). Образцы из Грузии отличались от других представителей средневропейской группы, к которой они относятся, и проявляли некоторые признаки иранской (азиатской) группы.

Безусловным результатом в выполненном нами анализе фенотипического разнообразия чины посевной оказалось деление вида на две основные группы (климатипы, или подвиды), признаваемые всеми систематиками культуры: европейскую и азиатскую (*ssp. albus* и *ssp. sativus*). При этом очевидно, что с окраской семян и цветков – основными признаками, которые наряду с географическим обособлением определяют это деление, связан еще ряд признаков: размеры семян, бобов, крыльев стебля, диаметр стебля, тип ветвления и др.

Проведенное с помощью RAPD-анализа молекулярно-генетическое маркирование изученных образцов выявило значительное внутри-

видовое разнообразие генома чины посевной (рис. 4). Большинство образцов имели свой определенный спектр амплифицированных RAPD-продуктов, отличающийся от других числом фрагментов, их размером и степенью выраженности (интенсивностью). Основная зона разделения компонентов находилась в пределах 150–2500 п.н. Девять праймеров выявили наличие 28 мономорфных фрагментов у всех исследуемых образцов. Данные мономорфные фрагменты могут считаться RAPD-маркерами для всех представителей *L. sativus*. Один праймер показал наличие фрагментов, характерных для группы образцов азиатского происхождения, – Памира, Индии, Малой Азии (ОРА-16–1300 п.н.) – азиатского типа или подвида.

На основе идентифицированных индивидуальных RAPD-спектров были составлены базы данных амплифицированных фрагментов ДНК. С помощью статистических программ определен уровень внутривидового полиморфизма изученных образцов и построена кладограмма UPGMA (рис. 5).

Обособленное положение на кладограмме заняли образцы из Индии, Памира, имеющие невысокий рост, тонкие стебли, мелкие темноокрашенные семена, относящиеся к подвиду *sativus* (индийская, иранская и 1 образец из анатолийской (псевдоазиатской) групп разновидностей).

Большинство исследуемых образцов объединились в большую кладу, в которую вошли образцы из подвида *albus* и анатолийской группы подвида *sativus*. Эта клада, в свою очередь, разделилась на две субклады.

В одной из них расположились типичные средиземноморские чины из Италии и Кипра (высокорослые, с толстыми, ширококрылатыми стеблями и крупными светлоокрашенными семенами) – средиземноморская группа разновидностей. Образец из Ирана (среднерослый, тонкостебельный, с узкими крыльями стебля, со средними темноокрашенными семенами) – иранской группы разновидностей – оказался близким к образцам из Испании (высокорослые, со стеблями средней толщины и крупными светлоокрашенными семенами) – средиземноморской группы.

Во второй субкладе оказались образцы из Грузии и Алжира (высокорослые, со стеблями

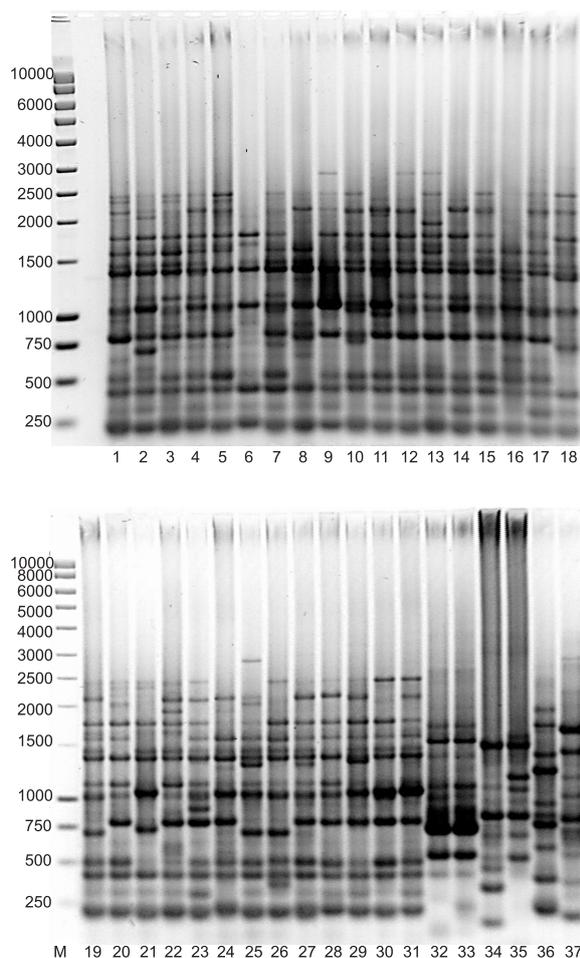


Рис. 4. Электрофоретические спектры RAPD-фрагментов 31 образца *L. sativus* (1–31) разного происхождения и 2 образцов *Pisum sativum* L. (32, 33), 2 образцов *Vicia faba* L. (34, 35), 1 образца *Lens culinaris* Medik. (36) и 1 образца *Vicia ervilia* Willd. (37), полученные с помощью праймера ОРК 09.

М – маркер молекулярной массы SmartLader 1700-02; 1 – к-704 (1) (Италия); 2 – к-704 (2) (Италия); 3 – к-705 (Италия); 4 – к-773 (Испания); 5 – к-775 (Испания); 6 – к-240 (Германия); 7 – к-390 (Кипр); 8 – к-393 (Кипр); 9 – к-401 (Кипр); 10 – к-407 (Кипр); 11 – к-408 (Кипр); 12 – к-772 (Испания); 13 – к-800 (Малая Азия); 14 – к-801 (Малая Азия); 15 – к-592 (Эфиопия); 16 – к-701 (Эфиопия); 17 – к-413 (Алжир); 18 – к-415 (Алжир); 19 – к-416 (Алжир); 20 – к-965(1) (Грузия); 21 – к-965(2) (Грузия); 22 – к-1684 (Сирия); 23 – к-13 (Иран); 24 – к-841 (Памир); 25 – к-998 (Памир); 26 – к-22(1) (Индия); 27 – к-22(2) (Индия); 28 – к-583 (Индия); 29 – к-936 (Аргентина); 30 – к-1218 (Украина); 31 – к-1246 (Россия).

средней толщины и темноокрашенными средними по величине семенами), а также *L. cicera*. В эту же субкладу попали образцы из Германии и Кипра (среднерослые, толстостебельные, со средними светлоокрашенными семенами) –

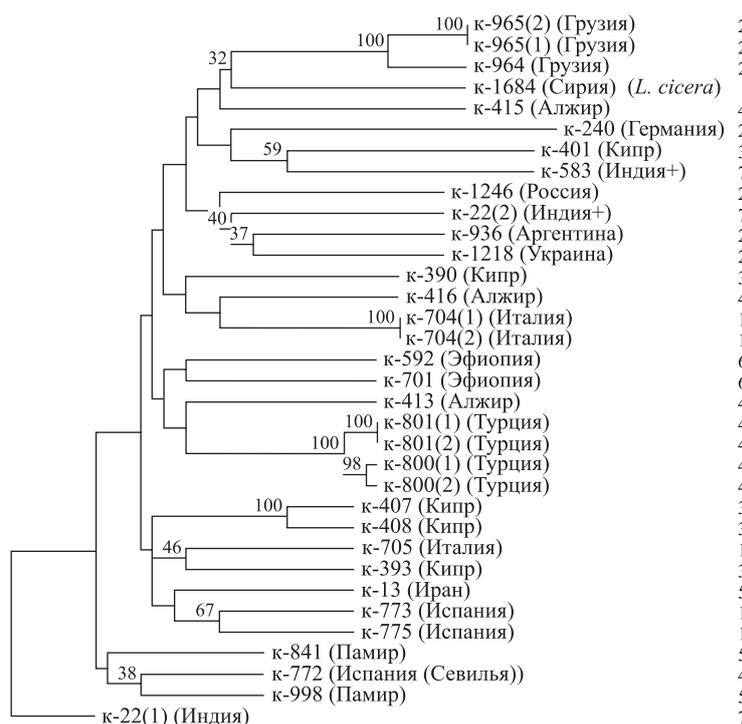


Рис. 5. Кладограмма UPGMA, полученная на основе сравнительного анализа 185 полиморфных амплифицированных RAPD-фрагментов образцов *L. sativus* (из разных эколого-географических групп) и *L. cicera*. («+» – естественные гибриды F₁ указанных образцов с образцами европейского подвида).

1 – средиземноморская группа – страны Средиземноморья; 2 – среднеевропейская – Средняя Европа и европейская часть России; 3 – кипрская – о-ва Кипр и Крит; 4 – анатолийская – Малая Азия, Закавказье, горная Кабилия; 5 – иранская – Афганистан, Иран, Сирия, Средняя Азия; 6 – абиссинская – Эфиопия, Египет; 7 – индийская – Индия.

типичные представители среднеевропейской и кипрской групп и естественные гибриды первого поколения индийских образцов (низкорослые, со стеблями средней толщины и крупными темными семенами). Кроме того, во вторую группу вошли сорта из Украины и Аргентины (среднерослые, со стеблями средней толщины и средними светлоокрашенными семенами), что по большинству черт характерно для растений из среднеевропейской группы, которые, очевидно, и послужили исходным материалом для данных сортов.

Также в одной из ветвей этой субклады объединились образцы анатолийской группы из Алжира и Малой Азии (высокорослые, со стеблями средней толщины и крупными темноокрашенными семенами).

Таким образом, RAPD-анализ выявил, во-первых, разделение изученных образцов на два подвида, один из которых представлен более примитивными азиатскими формами, а второй – более эволюционно продвинутыми европейскими, и, во-вторых, промежуточные черты анатолийской (псевдоазиатской) группы. Четкая дифференциация на два подвида выявилась и при анализе полиморфизма ITS1-5.8S-ITS2 рибосомного оперона *L. sativus*, предпринятом ранее с участием одного из наших авторов (Рыжова и

др., 2009). Отличное от ожидаемого положение некоторых образцов не является, на наш взгляд, артефактом, во-первых, в силу возможной гибридизации, а, во-вторых, в силу известного положения об отсутствии у некоторых экологических типов строгой приуроченности к определенным районам (рис. 2) (Залкинд, 1937) и согласуется с данными о наличии генетического сходства образцов из различных географических точек земного шара (Gutierrez-Marcos *et al.*, 2006). Имея ряд фенотипических отличий (окраска цветков и семян) от типичного для данного региона экотипа, такие образцы (экотипы) могут островками встречаться в регионах с соответствующими экологическими условиями. В целом при сопоставлении топологии кладограмм, полученных на основе RAPD-анализа, с совокупностью морфологических признаков, учитываемых при эколого-географической классификации, было отмечено, что большинство образцов распределилось по группам, соответствующим географическим ветвям или экологическим типам. Исходя из этого можно утверждать, что RAPD-анализ может быть использован для выявления образцов со сходной экотипической организацией.

Для реконструкции эволюционных отношений между группами образцов нами было построено оптимальное дерево согласия, где в

качестве критерия оптимальности использовали максимальную парсимонию.

Образец из Индии к-22(1), произрастающий в районе предковых диких форм и имеющий наибольшее число плезиоморфных признаков, резко отличающих его от культурных форм: мелкие интенсивно-синие цветки, мелкие семена, сильно выраженная антоциановая окраска на всем растении, растрескивающиеся бобы и осыпающиеся семена – признаки «дикого» типа, взяли в качестве внешней группы. Доля гомоплазии от общего числа изменений признаков была равна $C_1 = 28$, число синапоморфий на кладограмме $R_1 = 48$ (рис. 6).

Полученная схема, на наш взгляд, отображает филогенетические отношения между изученными образцами. Наиболее близкими к укорененному каталогу оказались образцы из Памира (иранская группа) и к-772 (анадолийская группа). Близка к ним ветвь с образцами из Италии (средиземноморская группа), Алжира (анадолийская группа) и к-583 из Индии (естественный гибрид). Затем дерево образует две равноценные ветви. В одной из них группируются образцы из средиземноморской, кипрской и анадолийской групп, в другой – из Грузии (среднеевропейской группы) и Ирана. Вид

L. cicera оказался близок к образцам из Грузии. По Ф.Л. Залкинд (1937), вхождение в культуру чины посевной шло от индийских тонкостебельных темно- и мелкосемянных образцов, причем либо сразу в нескольких направлениях в сторону Закавказья, Средиземноморья и в Африку (к высокорослым растениям с темными семенами средних и крупных размеров), либо сначала только в средиземноморские страны, где в горных условиях растения остались тонкостебельными, темно- и мелкосемянными, а в равнинных районах в силу мутаций и окультуривания появились растения с толстыми стеблями и крупными светлоокрашенными семенами. В дальнейшем в результате естественных скрещиваний между индийскими (или горными эфиопскими) и средиземноморскими образцами возникли группы образцов Закавказья, Малой Азии, Африки, Европы. Характер кладограммы позволяет предположить, что более вероятным был первый вариант. Однако при этом прослеживается особая роль Кавказа как промежуточного этапа пути при расселении вида из Южной Азии в Средиземноморье. Об этом свидетельствует близость иранских и грузинских образцов, а также генетическое сходство последних с европейскими формами.

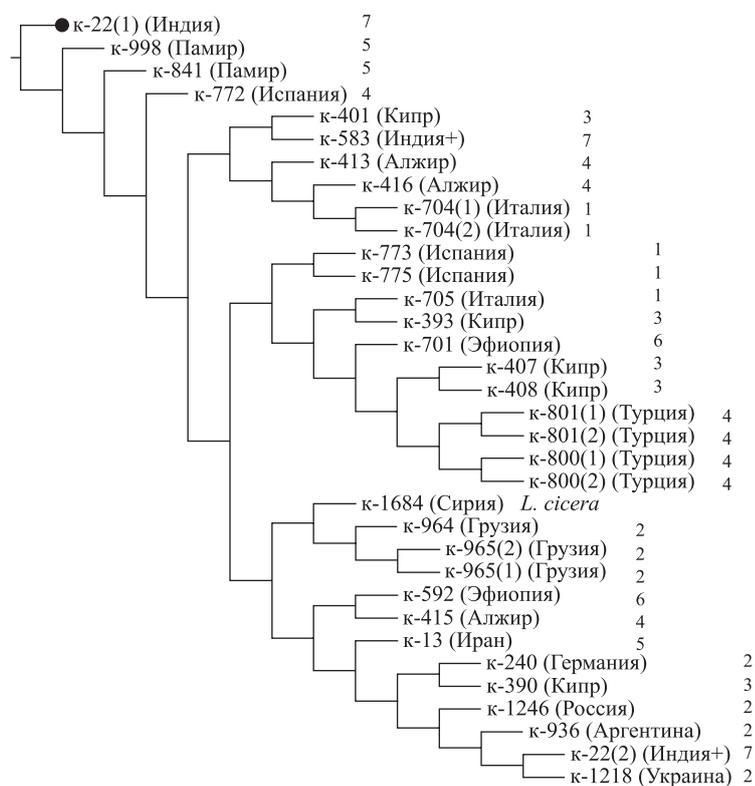


Рис. 6. Дерево согласия, построенное на основе сравнительного анализа 185 полиморфных амплифицированных RAPD-фрагментов образцов *L. sativus* (из разных эколого-географических групп) и *L. cicera*. Критерий оптимальности – максимальная парсимония.

Обозначения 1–7 см. на рис. 5.

Сходная закономерность, а именно примерно одинаковый уровень генетического родства образцов Кавказа с европейскими и азиатскими формами, отмечена и для пшеницы (Митрофанова и др., 2004). Авторы объясняют это промежуточным положением Кавказа при распространении пшеницы из Азии в Европу.

Для формирования коллекций и их рационального (эффективного) использования необходимо знание не только о генетическом сходстве образцов, но и о наличии у них редких и широко встречающихся аллелей. Данная классификация внутривидового полиморфизма по результатам молекулярного маркирования основана на принципе «взвешивания» признаков в зависимости от частоты их встречаемости (Смирнов, 1964). Этот метод был разработан Е.С. Смирновым (1964) для оценки родства таксонов во внутривидовых классификациях. Автор считал, что наиболее значимыми для таксономии являются редко встречающиеся признаки, наличие сходства по ним у родственных групп более информативно, чем по часто встречающимся характеристикам. Он предложил рассчитывать «коэффициент отношения» таксонов как усредненное значение весов всех признаков. Коэффициент отношения признаков тем выше, чем больше совпадающих редких признаков. На основе этого подхода был разработан метод расчета коэффициента генетической оригинальности образцов (КГО) коллекций генбанков, который был успешно применен для классификации коллекции вики посевной (*Vicia sativa* L.), проанализированной с применением AFLP-маркеров (Потокина, Александрова, 2008).

Для чины посевной данный метод использован нами впервые. Изученные образцы были «взвешены» исходя из частоты встречаемости RAPD-фрагментов у проанализированных нами представителей чины посевной. Матрица присутствия–отсутствия фрагментов была преобразована в матрицу с соответствующими «весовыми» значениями. Веса всех RAPD-фрагментов были суммированы для каждого образца (табл. 3). Сумма разделена на общее число изученных фрагментов. В итоге каждому образцу был присвоен индекс, соответствующий КГО. Рассчитанные значения КГО подчинялись логнормальному распределению. В соответствии со свойствами нормального распределения

значения КГО, которые группируются около средней арифметической, характерны для образцов с часто встречающимися аллелями, высокие значения КГО типичны для образцов с редкими аллелями. У образцов с небольшими значениями КГО редкие аллели не встречаются. С помощью параметров дисперсии наблюдений (минимум, максимум, 5-й, 25-й, 75-й, 95-й процентиля) выборка значений КГО на основании распределения их логарифмов была разделена на несколько интервалов, демонстрирующих увеличение доли редких аллелей в образцах. В первом интервале минимумом является 5-й перцентиль, второй интервал равен 5–25-му перцентилем, третий – 25–75-му перцентилем, четвертый – 75–95-му перцентилем и пятый – 95-му перцентилю – максимум. Абсолютные значения КГО были преобразованы в 5-балльную шкалу. По данной шкале образцы первого интервала не содержат редких аллелей и представлены типичными для культуры генотипами, а образцы, вошедшие в последний интервал, напротив, отличаются наибольшим числом редких аллелей.

В результате расчета КГО для выявленных полиморфных RAPD-фрагментов были обнаружены образцы с разным уровнем содержания редких аллелей и не имеющие их (см. табл. 3). Наименьшим количеством редких аллелей отличались образцы к-413 (Алжир) и к-1246 (Куйбышевская область), наибольшим – к-408 (остров Кипр) и к-415 (Алжир). Определение КГО позволило выявить уникальные образцы чины посевной, содержащие редко встречающиеся аллели (ОРА10₁₂₅₀, ОРК04₁₁₂₀, ОРК09₁₉₀₀ и др.). Кроме того, было выявлено, что частота встречаемости аллелей в разных растениях, относящихся к одному местному сорту, не всегда одинакова. Изучение образцов к-22 и к-704 показало существенную разницу по КГО между индивидуальными растениями. В результате дисперсионного анализа было установлено, что наличие редких аллелей у образцов не имеет связи с их принадлежностью к определенному экологическому типу.

Таким образом, наше исследование выявило значительный внутривидовой полиморфизм чины посевной как по фенотипу, так и по генотипам. Использование RAPD-анализа позволило классифицировать изученные образцы на внутривидовые группы *L. sativus*, соответ-

Таблица 3

Коэффициенты генетической оригинальности образцов чины посевной
разного эколого-географического происхождения из коллекции ВИР

Каталог ВИР	Происхождение образца	Σ ¹	КГО= Σ/n ²	Log КГО ³	КГО по шкале ⁴
704(1)	Италия	37,42	0,80	-0,33	3
704(2)	Италия	39,05	0,83	-0,27	3
705	Италия	42,54	0,91	-0,14	3
773	Испания	27,07	0,58	-0,80	2
775	Испания	39,05	0,83	-0,27	3
240	Германия	43,42	0,92	-0,11	3
390	Кипр	30,19	0,64	-0,64	2
393	Кипр	40,95	0,87	-0,20	3
401	Кипр	74,66	1,59	0,67	4
407	Кипр	20,46	0,44	-1,20	2
408	Кипр	76,29	1,62	0,70	5
772	Испания	37,44	0,80	-0,33	3
801	Малая Азия	18,59	0,40	-1,34	2
592	Эфиопия	26,53	0,56	-0,82	2
701	Эфиопия	44,95	0,96	-0,06	3
413	Алжир	17,85	0,38	-1,40	1
415	Алжир	127,62	2,72	1,44	5
416	Алжир	47,11	1,00	0,00	3
964	Германия	67,44	1,43	0,52	4
965	Грузия	54,15	1,15	0,20	3
1684	Сирия	71,77	1,53	0,61	4
13	Иран	46,04	0,98	-0,03	3
841	Памир	31,95	0,68	-0,56	2
998	Памир	53,66	1,14	0,19	3
22(1)	Индия	41,58	0,88	-0,18	3
22(2)	Индия	73,44	1,56	0,64	4
583	Индия	70,35	1,50	0,58	4
936	Аргентина	43,08	0,92	-0,13	3
1218	Украина	40,17	0,85	-0,23	3
1246	Россия	14,74	0,31	-1,67	1

¹ Взвешенные значения присутствия–отсутствия RAPD-фрагментов для каждого образца, рассчитанные на основе частоты их встречаемости в выборке; ² КГО – коэффициент генетической оригинальности; ³ Log КГО – логарифм КГО по основанию 2; ⁴ значения КГО по 5-балльной шкале.

ствующие эколого-географической дифференциации вида и его эволюции как культуры. На примере данной работы можно заключить, что RAPD-маркирование может быть полезным для выявления сходных экотипов.

Определение коэффициента генетической оригинальности образцов показало, что на-

ряду с наличием в коллекции генотипов со стандартным для культуры набором аллелей существуют образцы с редко встречающимися аллелями, которые могут оказаться полезными для селекции.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 06-04-488-а, 09-04-00574-а.

Литература

- Дорофеев В.Ф., Лаптев Ю.П., Чекалин Н.М. Цветение, опыление и гибридизация растений. М.: Агропромиздат, 1990.
- Залкинд Ф.Л. Чина. Культурная флора СССР. Т. 4. Л.: Сельхозгиз, 1937. С. 171–227.
- Залкинд Ф.Л. Чина. М.; Л.: Сельхозгиз, 1953. 144 с.
- Митрофанова О.П., Стрельченко П.П., Конарев А.В. Структура генетических взаимосвязей между местными сортами гексаплоидных пшениц по данным RAPD-, AFLP- и SSR-анализов // Аграрная Россия. 2004. № 6. С. 10–19.
- Потокина Е.К., Александрова Т.Г. Коэффициенты генетической оригинальности образцов коллекции вики посевной (*Vicia sativa* L.) по результатам молекулярного маркирования // Генетика. 2008. Т. 44. № 11. С. 1508–1516.
- Рыжова Н.Н., Мартиросян Е.В., Вишнякова М.А. Генетическое разнообразие чины посевной *L. sativus* и близкородственных видов рода *Lathyrus* на основе данных полиморфизма ITS1-5.8S-ITS2 рибосомного оперона // Сб. тез. V Съезда ВОГиС. М.: РГАУ-МСХ им. К.А. Тимирязева. 2009. С. 183.
- Смекалова Т.Н. Внутривидовые таксоны *Lathyrus sativus* L. // Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 1991. Т. 139. С. 64–72.
- Смирнов Е.С. Таксономический анализ. М.: Наука, 1964. 356 с.
- Choudhury M.A., Slinkard A.E. Linkage of random amplified polymorphic DNA, isozyme and morphological markers in grasspea (*Lathyrus sativus*) // J. Agric. Sci. 1999. V. 133. P. 389–395.
- Costa R., Carita T., Pereira G., Tavares-de-Sousa M. Characterization of grass pea genotypes by RAPD markers // Book of Abstracts. 6th Europ. Conf. on grain legumes. Lisbon, Portugal, 2007. P. 131.
- Croft A.M., Pang E.C. K., Taylor P.W.J. Molecular analysis of *Lathyrus sativus* L. (grasspea) and related *Lathyrus* species // Euphytica. 1999. V. 107. P. 167–176.
- Edwards S.K., Johonstone C., Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analyses // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. № 6. P. 1349.
- Gutierrez-Marcos J. F., Vaquero F., Sáenz de Miera L.E., Vences F.J. High genetic diversity in a world-wide collection of *Lathyrus sativus* L. revealed by isozymatic analysis // Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization. 2006. V. 4. P. 159–171.
- Hanbury C.D., Siddique K.H.M., Galwey N.W., Cocks P.S. Genotype–environment interaction for seed yield and ODAP concentration of *Lathyrus sativus* L. and *L. cicera* L. in Mediterranean-type environments // Euphytica. 2006. V. 110. № 1. P. 45–60.
- Polignato G.B., Ugenti P., Alba E. *et al.* Morpho-agronomic diversity in grass pea (*Lathyrus sativus* L.) // Plant Genet. Resour. 2005. № 3. P. 29–34.
- Przybylska J., Zimniak-Przybylska Z., Krajewski P. Diversity of seed albumins in the grasspea (*Lathyrus sativus* L.): an electrophoretic study // Genet. Resour. Crop Evol. 1998. V. 45. № 5. P. 423–430.
- Sammour R., Mustafa A-E., Badr S., Tahr W. Genetic variations in accessions of *Lathyrus sativus* L. // Acta Bot. Croat. 2007. V. 66. № 1. P. 1–13.
- Skiba B., Ford R., Pang E.C.K. Amplification and detection of polymorphic sequence-tagged sites in *Lathyrus sativus* // Plant Mol. Biol. Rep. 2003. V. 21. № 4. P. 391–404.
- Tadesse W., Bekele E. Phenotypic diversity of Ethiopian grass pea (*Lathyrus sativus* L.) in relation to geographical regions and altitudinal range // Genet. Resour. Crop Evol. 2003. V. 55. № 3. P. 497–505.
- Tavoletti S., Iommarini L. Molecular marker analysis of genetic variation characterizing a grasspea (*Lathyrus sativus*) collection from central Italy // Plant Breeding. 2007. V. 126. № 6. P. 607–611.

**PHENOTYPIC AND GENOTYPIC DIVERSITY OF *LATHYRUS SATIVUS* L.
(FABACEAE) FROM THE VAVILOV INSTITUTE COLLECTION**

M.O. Burlyueva, M.A. Vishnyakova

N.I. Vavilov Research Institute of Plant Industry, Russian Academy of Agricultural Sciences,
St.-Petersburg, Russia, e-mail: m.burlyueva@vir.nw.ru

Summary

Lathyrus sativus accessions from VIR collection were studied with regard to a set of 30 morphological and phenological characters and RAPD markers. The results of the canonical and discriminant analysis revealed seven significant traits for classification of intraspecific diversity: the type of bush, color of seed coat, diameter and width of stem wings, seed thickness, and seed length. The complex of these traits correlated with the origin of the accessions. RAPD analysis reflected the existence of two subspecies and some ecotypes close to the ecogeographical classification developed hitherto. In general, the molecular data reflect the ecogeographical differentiation and phylogeny of the species. Consideration of the degree of genetic originality (allele prevalences) revealed accessions with unique alleles, promising for breeding.

Key words: *Lathyrus sativus*, chickling vetch, phenotypic and genetic diversity, RAPD analysis, genetic originality.

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 22.11.2010 г.
Формат бумаги 60×84 1/8. Усл.-печ. л. 24,8. Уч.-изд. л. 23,4
Тираж 400. Заказ 471

Отпечатано в типографии ГУ «Издательство СО РАН»
630090, Новосибирск, Морской проспект, 2